



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**ESTUDIO TÓXICO Y GENOTÓXICO DE LOS  
COMPUESTOS LQM 308, 314, 335 Y 342**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

**PRESENTA:**

SANDRA ESMERALDA NUÑEZ MATA

**ASESORA:**

DRA. SANDRA DÍAZ-BARRIGA ARCEO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2016.



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

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN  
PRESENTE

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe 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 comunicar a usted que revisamos el: **Tesis y Examen Profesional**

Estudio tóxico y genotóxico de los compuestos LQM 308, 314, 335 Y 342.

Que presenta la pasante: **Sandra Esmeralda Nuñez Mata**

Con número de cuenta: **300089673** para obtener el Título de la carrera: **Química Farmacéutico Biológica**

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 01 de Marzo de 2016.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	M. en C. Lidia Rangel Trujano	
SECRETARIO	M. en C. Judith García Arellanes	
1er. SUPLENTE	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
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).

IHM/cga\*

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A la UNAM y a la FES Cuautitlán**

Por haberme proporcionado una formación académica profesional.

### **A la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo**

Por su enorme paciencia y apoyo como profesora y por los consejos brindados en ésta tesis.

### **A todas las Sinodales**

Por su valioso tiempo, dedicado a la revisión de éste trabajo y por sus acertadas correcciones.

### **A mis amigos**

Por brindarme su apoyo y estar conmigo en los momentos buenos y en los difíciles.

### **A la QFB Luz Alonso**

Porque sin su apoyo tampoco habría podido alcanzar ésta meta.

## **DEDICATORIA**

Le dedico éste trabajo:

### **A Virgilio**

Por todo el amor, cariño, apoyo comprensión y momentos compartidos, ya que sin su ayuda, yo no estaría escribiendo ésta dedicatoria.

### **A mi mamá Esperanza Mata**

Porque aunque no pueda estar a mi lado nunca me faltó apoyo y confianza de su parte y sé que le alegraría mucho poder estar aquí.

### **A mis hermanos Jorge, Julio y Víctor**

Por su apoyo y comprensión brindados.

## ÍNDICE

Abreviaturas	I
Índice de Tablas y Figuras	II
Resumen	IV
Marco Teórico	
1. Desarrollo de nuevos fármacos	1
1.1. Desarrollo Preclínico	3
1.2. Desarrollo Clínico	7
2. Prueba de Micronúcleos	9
2.1. Antecedentes	9
2.2. Eritropoyesis Humana	9
2.3. Fundamento	11
2.4. Relación entre mutagénesis y carcinogénesis	13
2.5. Genotoxicidad e Índice de Citotoxicidad	14
3. Compuestos LQM 300	15
3.1. Antecedentes	15
3.2. Síntesis de los LQM 300	16
3.3. Características generales	17
Justificación	22
Objetivo General	23
Objetivos Particulares	23
Hipótesis	23
Material	24
Metodología	24
Diagrama de Flujo Experimental	28
Resultados	28
Discusión	40
Conclusiones	43
Perspectivas	44
Referencias	45
Anexo. Constancia de sanidad de los ratones CD1	50

**ABREVIATURAS**

<b>ABC</b>	Área Bajo la Curva
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>BFB</b>	Ciclo de rotura, fusión y puente
<b>CADD</b>	Computer Assisted Drug Design
<b>CD1</b>	Cepa de ratones utilizados
<b>CICUAE</b>	Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación
<b>DiFAC</b>	Diseño de Fármacos Asistido por Computadora
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dosis Letal media capaz de matar al 50% de los ratones
<b>DM</b>	Dobles Minutos
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>E<sub>máx.</sub></b>	Efecto máximo
<b>ENC</b>	Eritrocito Normocrómico
<b>EPC</b>	Eritrocito Policromático
<b>EPCMN</b>	Eritrocito Policromático Micronucleado
<b>FC</b>	Frecuencia Cardíaca
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration
<b>IAM</b>	Infarto Agudo al Miocardio
<b>IR</b>	Infrarrojo
<b>K<sub>D</sub></b>	Constante de Disociación
<b>MN</b>	Micronúcleos
<b>PAD</b>	Presión Arterial Diastólica
<b>PAM</b>	Presión Arterial Media
<b>PAS</b>	Presión Arterial Sistólica
<b>QSAR</b>	Relación estructura-actividad cuantitativa
<b>RHE</b>	Modelo de Rata Hipertensa Espontánea
<b>RN</b>	Modelo de Rata Normotensa
<b>SD</b>	Desviación estándar
<b>SEA</b>	Sustitución Electrofilica Aromática
<b>SEA</b>	SEA base Mannich
<b>SEM</b>	Error estándar de la media
<b>T<sub>0</sub></b>	Tiempo ( 0 horas)
<b>T<sub>1</sub></b>	Tiempo (24 horas)
<b>T<sub>2</sub></b>	Tiempo (48 horas)
<b>T<sub>3</sub></b>	Tiempo (72 horas)
<b>UIM</b>	Unidad de Investigación Multidisciplinaria

**ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS****TABLAS**

<b>Tabla 1.</b>	Potencia de la toxicidad de un fármaco en función de su DL <sub>50</sub> _____	5
<b>Tabla 2.</b>	Datos del LQM 308_____	18
<b>Tabla 3.</b>	Datos del LQM 314_____	19
<b>Tabla 4.</b>	Datos del LQM 335_____	20
<b>Tabla 5.</b>	Datos del LQM 342_____	21
<b>Tabla 6</b>	Etapas en el Método de Lorke _____	25
<b>Tabla 7</b>	DL <sub>50</sub> de los compuestos LQM 300_____	29
<b>Tabla 8</b>	Mortalidad de ratones y Observaciones durante la experimentación_____	30
<b>Tabla 9</b>	%EPC para determinar la citotoxicidad en relación al tiempo de LQM 308_____	32
<b>Tabla 10</b>	%EPC para determinar la citotoxicidad en relación al tiempo de LQM 314_____	33
<b>Tabla 11</b>	%EPC para determinar la citotoxicidad en relación al tiempo de LQM 335_____	34
<b>Tabla 12</b>	%EPC para determinar la citotoxicidad en relación al tiempo de LQM 342_____	35
<b>Tabla 13</b>	EPCMN para determinar la genotoxicidad en relación al tiempo de LQM 308_____	36
<b>Tabla 14</b>	EPCMN para determinar la genotoxicidad en relación al tiempo de LQM 314_____	37
<b>Tabla 15</b>	EPCMN para determinar la genotoxicidad en relación al tiempo de LQM 335_____	38
<b>Tabla 16</b>	EPCMN para determinar la genotoxicidad en relación al tiempo de LQM 342_____	39

**FIGURAS**

<b>Figura 1.</b>	Desarrollo de un nuevo fármaco _____	7
<b>Figura 2.</b>	Eritropoyesis humana <i>in vivo</i> _____	10
<b>Figura 3.</b>	Mecanismo de formación de micronúcleos _____	12
<b>Figura 4.</b>	Estructura de la Changrolina _____	15
<b>Figura 5.</b>	Reacción SEA y SEA BM _____	16
<b>Figura 6.</b>	Reacción general de síntesis de los LQM _____	17
<b>Figura 7</b>	Frotis de sangre periférica de ratón CD1 _____	31
<b>Figura 8.</b>	Frecuencia de % EPC en 2000 células del compuesto LQM 308 a diferentes tiempos en relación a la dosis _____	32
<b>Figura 9.</b>	Frecuencia de % EPC en 2000 células del compuesto LQM 314 a diferentes tiempos en relación a la dosis _____	33
<b>Figura 10.</b>	Frecuencia de % EPC en 2000 células del compuesto LQM 335 a diferentes tiempos en relación a la dosis _____	34
<b>Figura 11.</b>	Frecuencia de % EPC en 2000 células del compuesto LQM 342 a diferentes tiempos en relación a la dosis _____	35
<b>Figura 12.</b>	Frecuencia de EPCMN en 2000 células del compuesto LQM 308 a diferentes tiempos en relación a la dosis _____	36
<b>Figura 13.</b>	Frecuencia de EPCMN en 2000 células del compuesto LQM 314 a diferentes tiempos en relación a la dosis _____	37
<b>Figura 14.</b>	Frecuencia de EPCMN en 2000 células del compuesto LQM 335 a diferentes tiempos en relación a la dosis _____	38
<b>Figura 15.</b>	Frecuencia de EPCMN en 2000 células del compuesto LQM 342 a diferentes tiempos en relación a la dosis _____	39



## RESUMEN

Hay compuestos de origen natural como la Changrolina que son empleados en el desarrollo de nuevos fármacos, dichos compuestos suelen ser generalmente más económicos y con propiedades similares o mejores a las que tienen los medicamentos ya en uso

Durante la investigación de nuevos compuestos es necesario realizar ensayos de genotoxicidad para asegurar la integridad del material genético de las células: Con éste propósito, se emplean pruebas como la de Micronúcleos *in vivo*, siendo éstos, cuerpos citoplasmáticos de material genético no incorporado correctamente durante la división celular, originados por roturas cromosómicas o por pérdida de cromosomas.

El objetivo del presente trabajo, se basa en la determinación de la DL<sub>50</sub> y los ensayos de genotoxicidad y citotoxicidad de una serie de 4 compuestos metilmorfolínicos (LQM 308, LQM 335) y metilpiperidinmorfolínicos (LQM 314, LQM 342), pertenecientes a la familia de los LQM 300, con actividad antiarrítmica, cardiovascular y antihipertensiva.

Para determinar la DL<sub>50</sub> de cada compuesto, se emplea el método de Lorke que en la segunda etapa indica, dividir 4 lotes de 3 ratones cada uno, donde se administran con dosis de 140 mg/kg, 225 mg/kg, 370 mg/kg y 600 mg/kg, respectivamente. Todos por vía intraperitoneal al inicio del experimento, tomado como tiempo 0, luego observar la mortalidad durante las primeras 6 horas y durante los siguientes tiempos de 24, 48 y 72 horas; En seguida de la administración del compuesto, se comienza la prueba de micronúcleos *in vivo*, obteniendo frotis de sangre periférica a cada tiempo respectivamente. Al término de las 72 horas se procede al sacrificio por dislocación cervical de los sobrevivientes. Los frotis para su lectura son teñidos con Giemsa, para contabilizar 2000 eritrocitos normocrómicos (ENC), identificando en ellos la cantidad de eritrocitos policromáticos (EPC) y eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN), para evaluar la citotoxicidad y genotoxicidad respectivamente.

Los resultados obtenidos a las dosis evaluadas indicaron que el LQM 308 y el LQM 335 sólo presentan citotoxicidad al disminuir la producción de EPC. Los LQM 314 y 342 son tóxicos, citotóxicos y genotóxicos.

## MARCO TEÓRICO

### 1. DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS

A principios del siglo XIX en nuestro país, los fármacos disponibles para la terapéutica, se encontraban en preparaciones crudas de plantas, animales o minerales (Magos G., 2009). En los últimos 50 años la farmacología ha enriquecido sus conocimientos, con un mayor entendimiento del papel que juegan los receptores moleculares en el mecanismo de acción de los fármacos y los progresos de la Química Orgánica junto con las técnicas Bioquímicas, que permiten sintetizar y modificar moléculas nuevas en el laboratorio (Sánchez G., 2012). Éste avance de la Farmacología no sólo permitió distinguir los principios activos, sino también se logró determinar los efectos que se producen en los organismos vivos (Magos G., 2009).

El desarrollo de un nuevo fármaco, puede dividirse en tres etapas principales

1. Desarrollo del fármaco
2. Desarrollo preclínico
3. Desarrollo clínico.

Generalmente el desarrollo de nuevos fármacos, se enfoca en la mejora de uno ya en uso, basado en un profundo conocimiento de la enfermedad; generando un sistema de evaluación como la *Química Combinatoria*, que permite medir su actividad y la fabricación simultánea de familias, formadas por cientos de compuestos relacionados (Ruiz G., 2009).

- **Diseño asistido por computadora.**

El diseño de fármacos asistido por computadora también conocido como CADD (Computer Assisted Drug Design) o DiFAC (Diseño de Fármacos Asistido por Computadora), encuentra sus orígenes en la década de los 60's con estudios de Corwin Hansch, quien inicio el desarrollo del método de relaciones estructura-actividad cuantitativas (QSAR), luego en los primeros años de la década de los años 70's, comenzó hacer uso de las gráficas moleculares generadas por computadoras, lo cual condujo al desarrollo del modelado molecular en tres dimensiones, que puede definirse como la generación, manipulación, cálculo y predicción de estructuras químicas y sus propiedades Físicoquímicas y Biológicas asociadas (Velázquez S., 2007), el diseño puede llevarse a cabo de dos maneras:

- Directa: Cuando se dispone de datos sobre la estructura tridimensional de la macromolécula diana sobre la que se pretende diseñar algún ligando selectivo.

- *Indirecta*: Cuando no se dispone de datos sobre la estructura tridimensional de la macromolécula diana. En este caso la superposición gráfica de un conjunto de ligandos selectivos frente a un determinado receptor, puede obtener una imagen del fragmento estructural común a todas las moléculas utilizadas. Después se selecciona un farmacóforo (región en el espacio con determinadas características electrónicas, estéricas o de lipofilia), que deberá estar presente en las nuevas moléculas que se diseñen para asegurar la interacción con el receptor. (Delgado C, 2004).

Una gran cantidad de compuestos, desarrollados con la Química Combinatoria y la Informática, pasan por un cribado o tamizaje de moléculas, llamado “screening” en inglés, el cual al revelar propiedades específicas de una sustancia, podrían ser sujetos a patentes para el principio activo en cuestión, a fin de asegurar los derechos correspondientes y justificar económicamente las inversiones de tiempo y material en el desarrollo de un nuevo medicamento (Mendoza P., 2008).

- **Cribado Sistemático**

Cribado o Screening es el conjunto de ensayos biológicos que permiten explorar de manera preliminar el perfil farmacológico de una o varias moléculas, de origen natural o sintético.

En la práctica el cribado puede plantearse según tres estrategias diferentes:

- *Cribado exhaustivo* mediante un número reducido de moléculas, sometidas a múltiples ensayos bioquímicos o farmacológicos con el objeto de estudiar el mayor número posible de propiedades biológicas.
- *Cribado aleatorio* evalúa gran diversidad de compuestos, conocidos o incluso con otras propiedades terapéuticas no relacionadas con las actividades biológicas en estudio.
- *Cribado combinado*, permite la obtención simultánea y eficiente, ya sea como mezcla o de manera individualizada, de un gran número de moléculas estructuralmente relacionadas (Delgado C., 2004).

Los estudios preclínicos evalúan la eficacia y seguridad de compuestos seleccionados con miras a ser medicamentos; por lo cual, una vez identificado y seleccionado el compuesto Cabeza de Serie, se desarrolla en cantidades adecuadas. Eso permite caracterizar sus propiedades Físicoquímicas (estructura molecular, solubilidad, coeficiente de partición, constante de ionización -pka-, etc.) y llevar a cabo pruebas experimentales que determinan los perfiles farmacodinámicos y toxicológicos (Mendoza P., 2008). Además, se observa que sólo una pequeña parte de los compuestos resulta adecuada para la administración en seres humanos (Lullmann H., 2010).

- **Cabeza de Serie.**

Es aquel compuesto original provisto de propiedades biológicas adecuadas, que constituye un modelo para la obtención de nuevos fármacos. Una vez que se dispone de un compuesto Cabeza de Serie, se diseñan análogos que permiten la exploración de dicho compuesto, éste proceso es la base de la llamada *modificación molecular o farmacomodulación*, teniendo como ventajas, una mayor probabilidad de mejorar las propiedades farmacológicas; también en la mayoría de los casos es posible obtener compuestos más simples que mantienen o mejoran la actividad del Cabeza de Serie y para los que pueden emplearse rutas sintéticas comunes o aproximaciones combinatorias de las mismas; además de ser el mismo método de valoración farmacológica o bioquímica para toda la serie de compuestos, ahorrando tiempo y dinero, permitiendo establecer relaciones estructura-actividad más fiables (Delgado C., 2004).

### **1.1. Desarrollo preclínico**

Al sintetizar un producto medicinal en humanos, los estudios preclínicos por ley deben realizarse, porque proporcionan la información necesaria para justificar, o no continuar con la investigación farmacológica en fases clínicas.

En México, la legislación en materia de investigación para la salud, está contenida en la Ley General de Salud y en el Reglamento en Materia de Investigación para la Salud, documentos de vital importancia en el terreno de la ética y la legalidad (COFEPRIS).

Durante esta fase, los nuevos compuestos deben satisfacer los siguientes estudios antes de ser aprobados en seres humanos (Mendoza P., 2008).

- **Estudios Farmacocinéticos.**

En los estudios preclínicos, la información farmacocinética es útil para predecir el inicio y la duración del efecto, al establecer la velocidad y magnitud de la absorción; así como el destino del fármaco y/o sus metabolitos en los diferentes órganos, los procesos de biotransformación, la velocidad y vías de eliminación (Mendoza P., 2008).

- **Estudios Farmacodinámicos.**

Por otra parte la evaluación farmacodinámica de los compuestos tiene como objetivo demostrar en modelos experimentales *in vitro* y en el animal íntegro, el efecto terapéutico previsto del nuevo fármaco y establecer la relación entre las dosis administradas del nuevo fármaco, con la intensidad y duración de los efectos producidos; además la evaluación se extiende a los principales órganos y sistemas de importancia farmacológica, para determinar otros posibles efectos terapéuticos o nocivos describiendo el o los mecanismos de acción responsables (Mendoza P., 2008).

- **Estudios Toxicológicos.**

Aunque ningún producto puede certificarse como totalmente seguro, es factible determinar posibles daños en el genoma (genotoxicidad), influencia sobre el desarrollo de cáncer (oncogénesis) o provocación de malformaciones (teratogénesis) (Lüllmann H., 2010). Para ello, se utilizan animales expuestos a dosis únicas (toxicidad aguda) o repetidas (subaguda, subcrónica y crónica), por la vía de administración que se piensa emplear en el humano (Mendoza P., 2008).

- Toxicidad aguda.

Es el primer paso en la evaluación toxicológica de una sustancia desconocida, cuyo índice es la  $DL_{50}$  y para determinarla, se usan al menos tres grupos administrados en dosis crecientes (Sharapin N., 2000), donde, el primer grupo tiene dosis que no matan a ningún animal tratado, el segundo grupo tiene dosis ascendentes entre los cuales mueren 10% al 90% de los animales y el último grupo llega a dosis que matan al 100% de los animales, para demostrar la relación dosis-respuesta (Repetto J., 2009).

- ✓ Dosis Letal Media ( $DL_{50}$ ).

Un parámetro toxicológico que se obtiene de manera experimental a corto plazo es la dosis letal media ( $DL_{50}$ ), que representa la dosis que produce la muerte en 50% de los animales empleados, permitiendo establecer la potencia de toxicidad del fármaco (Tabla. 1).

Tabla 1. Potencia de la toxicidad de un fármaco en función de su DL<sub>50</sub> (Mendoza P., 2008).

	DL <sub>50</sub> mg/kg
Extremadamente tóxico	<1
Altamente tóxico	1 - 50
Moderadamente tóxico	50 - 500
Ligeramente tóxico	500 - 5 000
Prácticamente no tóxico	5 000 - 15 000

Las agencias regulatorias como la FDA, exigen que se establezca la menor dosis en la que aparecen efectos adversos relacionados con la administración y una dosis tóxica que ocasione efectos graves (Mendoza P., 2008).

✓ Método de Lorke

Es un método útil para investigar la toxicidad aguda de una sustancia química desconocida, con una estimación de la DL<sub>50</sub> y se caracteriza porque es posible obtener información adecuada sólo con 13 animales de experimentación; además de que el método no presenta limitación para cualquier vía de administración, siendo aplicable en fármacos y otras sustancias, de uso en Agricultura e Industria Química (Lorke D., 1983).

La toxicidad aguda por este método, se prueba en dos pasos:

ETAPA 1) 1<sup>ra</sup>. Se establece el intervalo de dosis que producen efectos tóxicos.

ETAPA 2) Sobre la base de estos resultados, se calcula la DL<sub>50</sub>, por medio de la media geométrica de las dosis para las cuales todos o ningún animal expuesto sobreviven (1/1 y 0/1). Ej.: 370 mg/kg todos los animales sobreviven (1/1), 600 mg/kg de peso ningún animal sobrevive (0/1).

ETAPA 1		
10 mg/kg	100 mg/kg	1000 mg/kg
0/3	0/3	3/3
Número de animales que Mueren / número de animales usados.		

ETAPA 2			
140 mg/kg	225 mg/kg	370 mg/kg	600 mg/kg
Resultados de la 1er etapa y dosis correspondientes en la 2da etapa.			

- Toxicidad Subcrónica y Crónica.

Los estudios de toxicidad subcrónica suelen durar 3 meses, mientras que los de toxicidad crónica de 6 meses a 1 año según el uso terapéutico que vaya a tener la sustancia (Mendoza P., 2008).

- ✓ Carcinogénesis.

Determinan si la exposición prolongada promueve la aparición de tumores, al afectar factores de crecimiento o activar oncogenes. Las agencias regulatorias como la FDA, exigen que estas pruebas se realicen en dos especies animales, con un duración que oscila entre 18 y 24 meses (Mendoza P., 2008).

- ✓ Mutagénesis.

Las agencias regulatorias exigen tres ensayos mutagénicos “*in vitro*” y un ensayo “*in vivo*”. Para los ensayos “*in vitro*” se utilizan células bacterianas (*Salmonella typhimorium*) o de mamífero (linfocitos humanos) que se incuban con concentraciones crecientes del fármaco, en presencia o ausencia de la llamada fracción S-9. Esta fracción, consiste en una suspensión de microsomas hepáticos de rata que se añade para favorecer que un fármaco, que en principio no es mutagénico, se metabolice a un producto que si lo sea (bioactivación). En los ensayos “*in vivo*” se observan varios más posibles efectos durante la eritropoyesis en el ratón (prueba de micronúcleos *in vivo*) (Mendoza P., 2008).

- ✓ Teratogénesis y fertilidad.

En los estudios de fertilidad, las ratas macho y hembra, son expuestas al fármaco antes del apareamiento durante 60 y 15 días respectivamente, hasta el destete de la prole. En los estudios de teratogénea, la administración del fármaco tiene lugar desde los días 8 a 21 del embarazo, es decir desde el momento de la implantación del óvulo hasta el parto. Finalmente, los estudios de toxicidad peri y postnatal tienen por objeto determinar los efectos sobre el desarrollo de los embriones, el parto y la lactancia. En algunos casos determinados, estos estudios se extienden a varias generaciones, es decir, las hembras procedentes de un primer estudio, una vez en edad de procrear son tratadas desde el día 8 de la gestación hasta el destete, observándose los efectos posibles sobre sus descendientes (Mendoza, 2008).

**1.2. Desarrollo clínico**

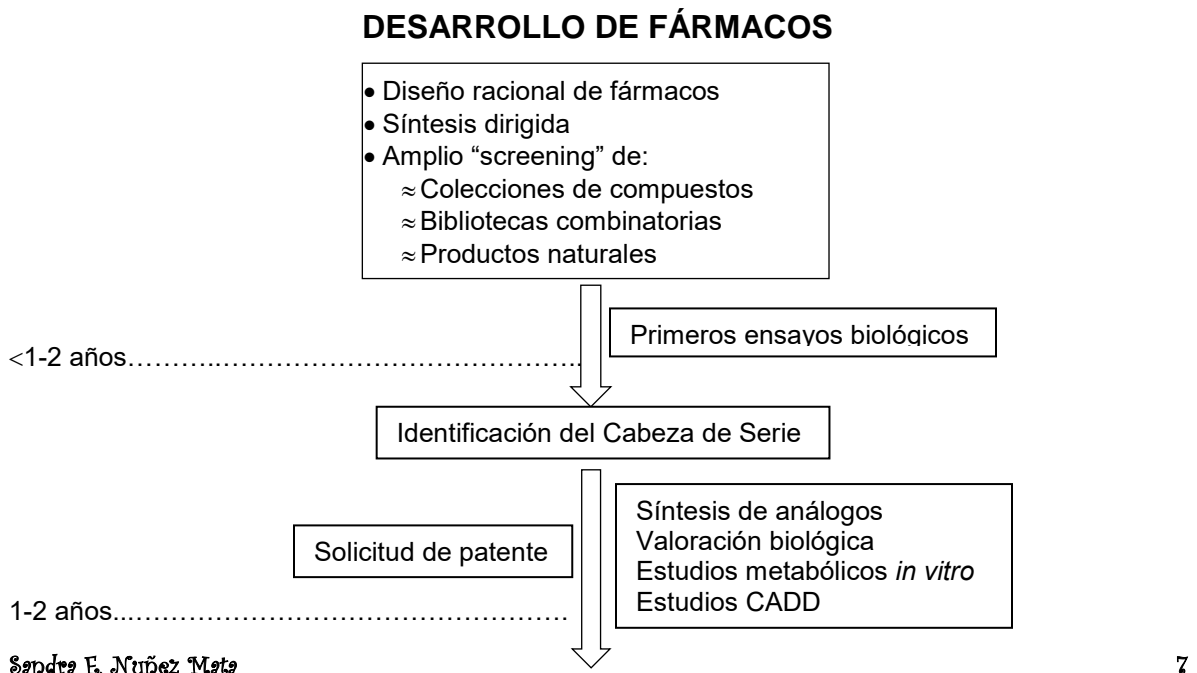
Los estudios realizados en animales de laboratorio, no son suficientes para determinar si un fármaco determinado tendrá las características deseadas de eficacia y seguridad en humanos, es por ello que el proceso clínico se efectúa en 4 fases distintas:

Fase I. Representa la primera exposición del fármaco a humanos, se realiza en un pequeño grupo de voluntarios sanos, cuyo objetivo es comprobar la seguridad, tolerancia, propiedades farmacocinéticas y los efectos farmacodinámicos.

Fase II. Se efectúa en grupos de pacientes, para valorar la eficacia en la situación clínica, constituyendo además una prolongación de los estudios de fase I para incluir pacientes y voluntarios sanos.

Fase III. Aquí se llevan a cabo ensayos aleatorizados y doble ciego definidos, con el objeto de comparar el nuevo fármaco con las alternativas habitualmente utilizadas. Al terminar ésta fase, el fármaco es remitido a las principales autoridades regulatorias para el permiso de comercialización.

Fase IV. Comprende la vigilancia posterior a la comercialización, la cual es obligatoria, diseñada para detectar cualquier afecto adverso poco frecuente o a largo plazo derivado de la utilización del fármaco en muchos miles de pacientes. Ello puede implicar la limitación del fármaco en determinados pacientes o incluso retirarlo del mercado (Ruiz G. 2009).





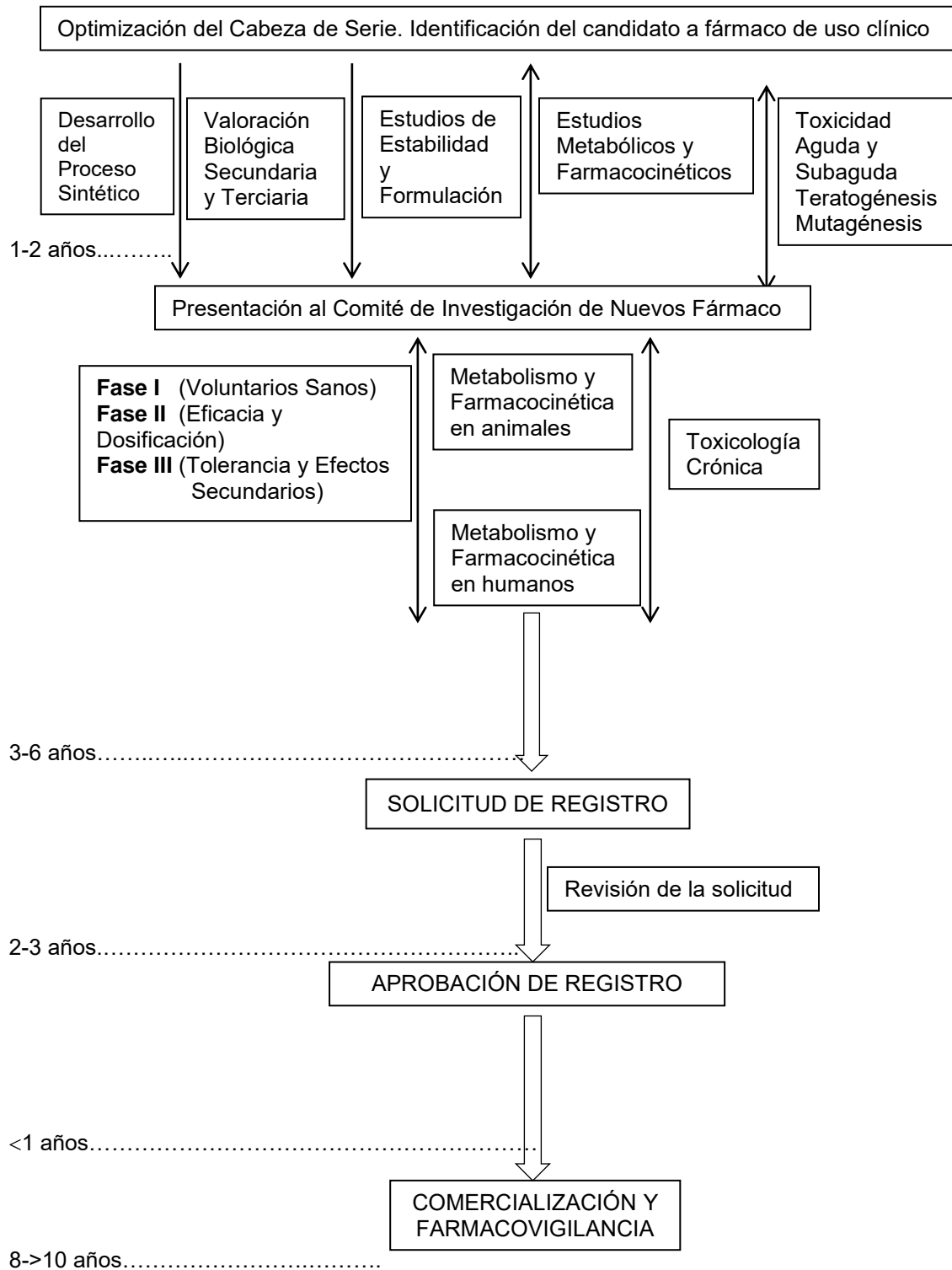


Fig. 1. Etapas en el desarrollo de un nuevo fármaco (del lado izquierdo se muestran los años que pueden tardarse los estudios). (Delgado C., 2004 modificado).

## 2. PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

Schmid, Heddle y diversos colaboradores, realizaron una serie de ensayos para definir los parámetros indicadores de daño citogenético en médula ósea; demostrando con esto que la incidencia de Eritrocitos Policromáticos Micronucleados (EPCMN), era un índice útil para evaluar el daño en los cromosomas. Gracias a esto, se condujo al desarrollo del ensayo de micronúcleos *in vivo*, basado en la identificación de EPCMN de médula ósea en ratón (Hernández A., 2012).

El ensayo de micronúcleos (MN) tiene dos principales propósitos:

- 1°. Reconocer un agente mutágeno, debido a que incluye factores como el metabolismo, la farmacocinética y los procesos de reparación de ADN, (aunque dichos factores pueden variar según la especie, el tejido y el aspecto genético considerado) (Arencibia A., et al., 2011).
- 2°. Caracterizar la relación dosis-respuesta y los mecanismos mutagénicos (Rojas O., 2008), siendo avalado por las agencias regulatorias como la *Food and Drug Administration* (FDA), la cual recomienda para el ensayo de MN en sangre periférica, analizar 1000 EPC.

Los micronúcleos (MN) son restos de cromatina con forma redonda o almendrada, con un diámetro entre 0.4 $\mu$  – 1.6 $\mu$ , de apariencia picnótica, igual a la del núcleo al ser teñidos en forma diferencial con el colorante de Giemsa (Rocha E., 2008).

- **Antecedentes.**

Los MN fueron descritos hace muchos años, entre los primeros autores en caracterizarlos se puede mencionar a W. H. Howell en 1891 y J. Jolly en 1907, ambos, detallaron la presencia de pequeños cuerpos que se teñían como el núcleo celular en el citoplasma de eritrocitos a los cuales nombraron “fragmentos de material nuclear” y “corpúsculos intraglobulares”, respectivamente, hoy conocidos como cuerpos de Howell-Jolly por los hematólogos. En la década de 1950 cuerpos similares fueron descritos por J. M. Thoday, mientras estudiaba el efecto de los rayos X y las partículas alfa en células de *Vicia faba*, fue él quien los denominó “fragmentos nucleares” o “micronúcleos”, los cuales siguieron apareciendo en experimentos subsecuentes, en 1959 John Evans y colaboradores fueron los primeros en utilizar los MN como medida de daño por exposición a radiación. Posteriormente B. Matter y W. Schmid en 1971 y J. A. Heddle en 1973 reportaron de manera independiente la inducción de MN en médula ósea de mamíferos, proporcionando un método para evaluar daño al material genético en animales (Müller W. y STREFFER C., 1994).

- **Eritropoyesis Humana.**

La eritropoyesis se produce en médula ósea, inicia con la Célula Totipotencial seguida de la progresión normoblástica, hasta llegar al eritrocito maduro.

La división celular del Pronormoblasto, permite el desarrollo potencial de 16 eritrocitos maduros, mediante 4 divisiones mitóticas en un periodo de 72 horas (Fig. 2). El Pronormoblasto tiene la función de producir, acumular y proteger a las moléculas de hemoglobina, la cual deja de sintetizarse después de que la célula sufre tres primeras divisiones mitóticas, originando la expulsión del núcleo y la diapédesis al interior de los capilares medulares, donde el Normoblasto se transforma en Eritrocito Policromático (EPC), que conserva las mitocondrias, pequeñas cantidades de ribosomas, el centriolo y vestigios del aparato de Golgi.

Los Eritrocitos Policromáticos (EPC), sintetizan la hemoglobina necesaria para la maduración del Eritrocito, el cual obtiene energía de la glucólisis. Por otro lado, el ATP capta glucosa del plasma, manteniendo las concentraciones adecuadas de calcio y potasio y conserva la forma bicóncava con la hemoglobina en estado reducido ( $Fe^{2+}$ ). La vida media del eritrocito en el humano, es de aproximadamente 120 días; pero las células anormales se eliminan antes (Rocha E., 2008).

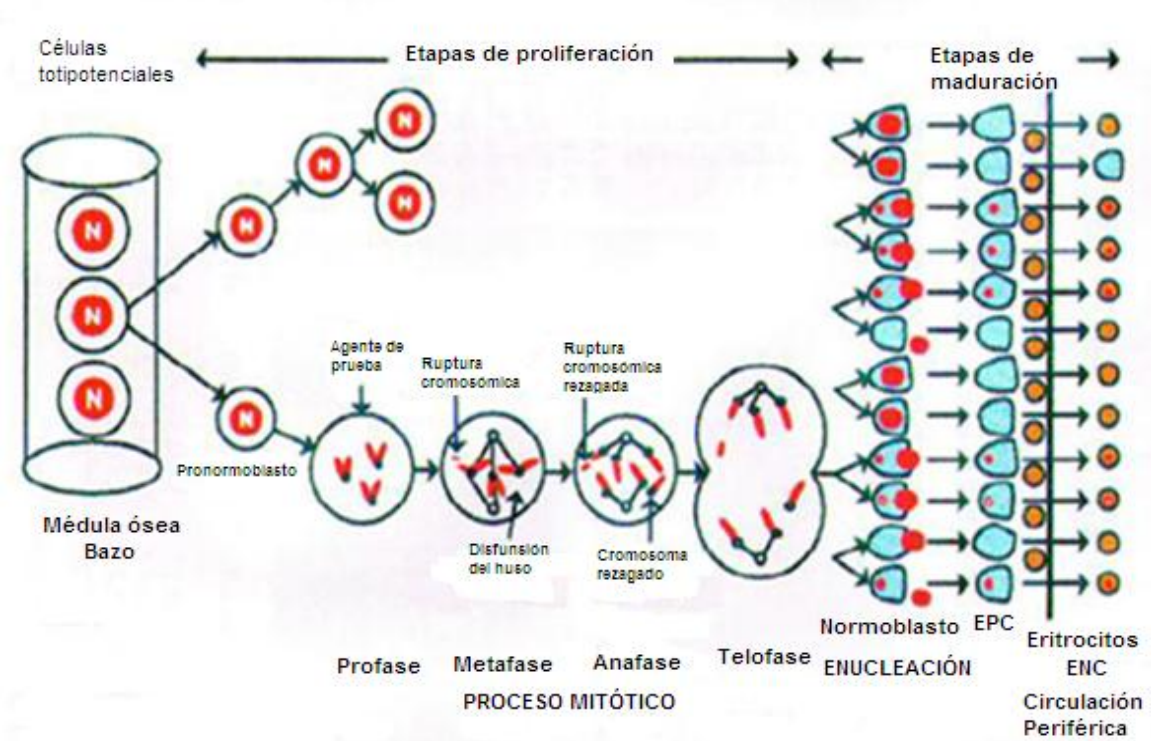


Fig. 2. Eritropoyesis humana *in vivo*. (Hernández A., 2012 modificado).

- **Fundamento.**

En el ensayo de MN, las células que se evalúan son los Eritrocitos Policromáticos (EPC), los cuales son un poco mayores que los Eritrocitos Normocrómicos (ENC) y proceden de Normoblastos que pierden su núcleo, antes de que la hemoglobinización sea completa (Hernández A., 2012); después del proceso de expulsión del núcleo, los EPC aun contienen ARN, por lo que se tiñen ligeramente de azul con el colorante de Giemsa (López G, 2012).

La médula ósea y sangre periférica, se utilizan rutinariamente para demostrar que, los EPC que se pueden obtener de estos tejidos, muestran una sensibilidad adecuada para detectar agentes que provocan daños cromosómicos, además son muy abundantes, fácilmente reconocibles y tienen incidencia de micronúcleos (MN) baja (Hernández A., 2012).

Dicho ensayo, se emplea para detectar lesiones citogenéticas provocadas por alguna sustancia en los cromosomas o el aparato mitótico de eritroblastos, que dan lugar a la formación de micronúcleos por pérdida de los centrómeros, fragmentando los cromosomas (efecto clastógeno) y/o pérdida de cromosomas completos (efecto aneúgeno), 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. En la telofase las estructuras cromosómicas son envueltas por la membrana nuclear y tanto los cromosomas completos, como los fragmentos retardados, asumen gradualmente la morfología de un núcleo en interfase con la excepción de que son más pequeños que el núcleo principal de la célula, de aquí el término de “micronúcleo”, (Arencibia A., et al., 2011); la célula también pueden contener Dobles Minutos (DM), que son pequeños fragmentos cromosómicos circulares a los que les falta centrómero activo y los telómeros. Pero su característica principal es que contienen genes altamente amplificados, que a menudo están relacionados con fenotipos cancerígenos. Gisselsson y colaboradores proponen que la presencia de micronúcleos y otras anomalías nucleares de tipo morfológico están estrechamente ligadas a las aberraciones mitóticas, generadas como consecuencia de los ciclos de rotura, fusión y puente (BFB *breakage-fusion-bridge*) y empiezan cuando, por roturas del ADN y/o acortamiento de telómeros, los mecanismos de reparación del ADN fallan y se producen fusiones incorrectas entre cromosomas, favoreciendo la aparición de puentes anafásicos, los cuales se pueden romper y generar otras roturas, que de nuevo pueden desembocar en la formación de puentes. De esta manera la célula entra en un ciclo persistente de BFB, actualmente considerado como una de las causas principales de inestabilidad cromosómica en cáncer. Por otra parte, al romperse los puentes, también pueden dar lugar a fragmentos acéntricos y a menudo, debido a la tensión liberada durante la migración de los cromosomas, estos puentes se pueden despegar. En ambos casos, generan micronúcleos (Fig. 3) (Terradas M., et al., 2010).

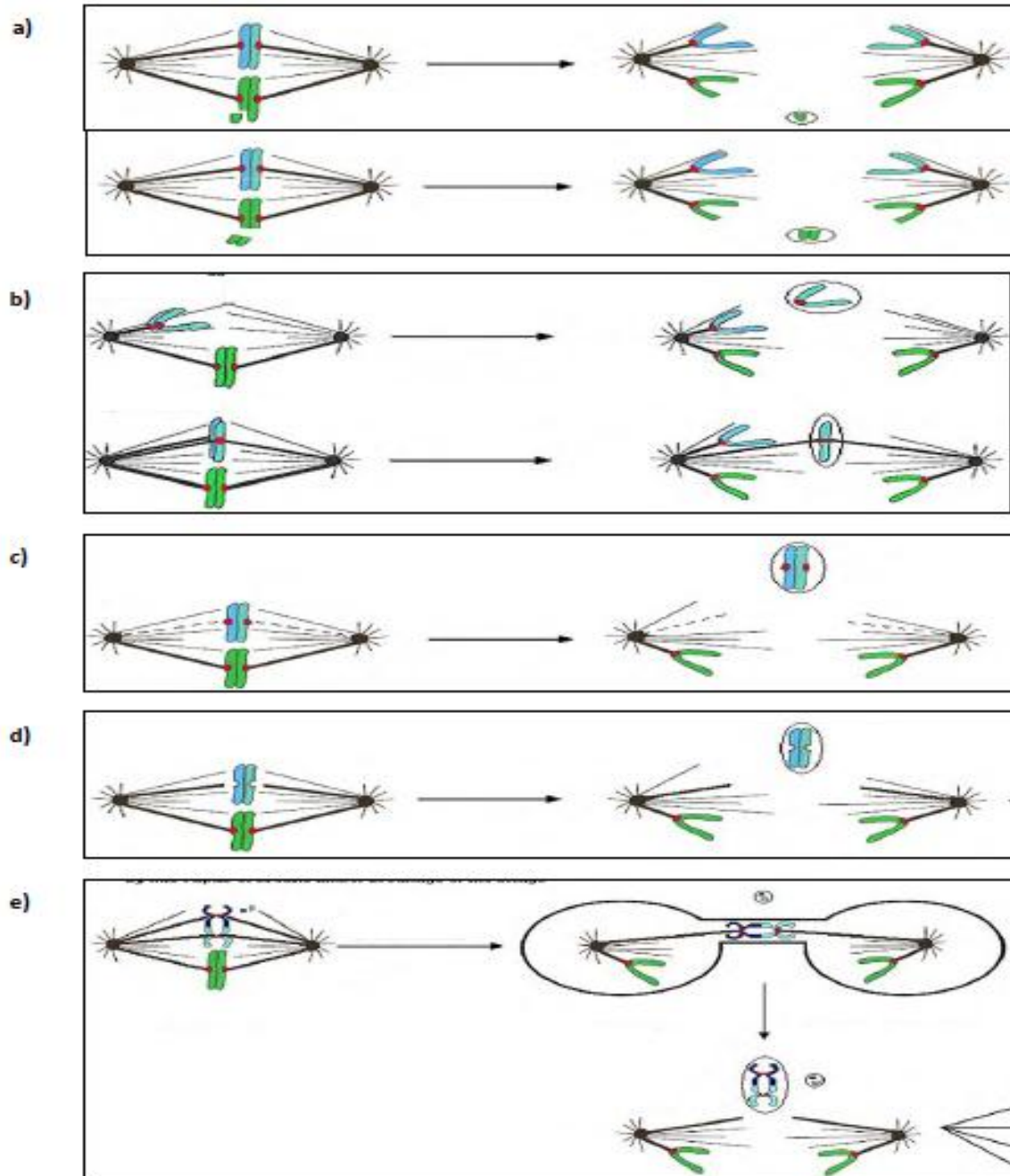


Fig. 3. Mecanismo de formación de micronúcleos. a) Rompimiento del material genético cromático y cromosómico, b) pérdida de cromosomas por el inadecuado enlace entre el cinetocoro y los microtúbulos, c) despolimerización temprana de la tubulina y pérdida de cromosomas, d) defectos en el cinetocoro, e) rearrreglo asimétrico que produce la formación de un cromosoma dicéntrico y la pérdida de fragmentos sin centrómero. El cromosoma dicéntrico a su vez puede formar un puente entre las dos células en división, puente que posteriormente puede ser roto y dar paso a un nuevo puente en el siguiente ciclo celular (Araujo A., 2009).

En un principio la evidencia sobre el contenido de MN se debía a la tinción que presentaban al usar Giemsa; sin embargo, en la actualidad con el uso de anticuerpos contra el cinetocoro o el empleo de secuencias específicas del genoma, se ha podido no sólo conocer el contenido de MN, sino que además se puede obtener información del mecanismo genotóxico distinguiendo entre daño clastogénico o aneugénico (Araujo A., 2009).

- **Relación entre mutagénesis y carcinogénesis.**

El término de genotoxicidad fue usado por primera vez para establecer la relación entre la inducción de cáncer y daño genético. Posteriormente la “Comisión Internacional para la Protección Contra los Mutágenos y Carcinógenos Ambientales”, redefinió este término y estableció que sólo sea considerado para aquellos agentes que son capaces de interactuar con ADN (Pereyra, 2010).

La prueba de la relación causal entre mutagénesis y carcinogénesis fue recabada entre 1980-1990, mediante las siguientes observaciones:

- » Presencia de cambios cromosómicos específicos en tumores humanos sanguíneos y en tumores sólidos.
- » Inducción de mutaciones *in vitro* e *in vivo* en animales, por conocidos carcinógenos.
- » Inducción experimental de carcinogénesis *in vivo* caracterizada por varias mutaciones y cambios epigenéticos.
- » Demostración de que solo se requiere una sola mutación para provocar cáncer de colon y algunos otros tumores.
- » Pre-disponibilidad a cáncer en individuos con deficiencias específicas de reparación del ADN.
- » Activación de oncogenes por mutación genética, amplificación de genes y cambios cromosómicos estructurales (Atilano A., 2007).

La formación de los MN se atribuye al rompimiento de cromosomas (clastogénesis), alteración de la segregación cromosómica (aneugénesis) y por dobles minutos (DM), que son pequeños fragmentos cromosómicos circulares a los que les falta centrómero y telómeros. Pero, su

característica principal es que contienen genes altamente amplificados, que a menudo están relacionados con fenotipos cancerígenos (Terradas M., et al., 2010).

- **Genotoxicidad e Índice de Citotoxicidad.**

La genotoxicidad indica daño al material genético y se obtiene contando 2000 EPC sobre los que se cuantifican los EPCMN que hay presentes en una muestra (Hernández A., 2012). Nótese que se cuantifica cuantas células están micronucleadas y no el número de micronúcleos dentro de ellas.

El % EPC es la proporción de EPC con relación a los eritrocitos totales presentes en las laminillas preparadas (López G., 2012). También se denomina Índice de Citotoxicidad e indica si hubo una disminución en la proliferación normal de las células o una excesiva maduración de las mismas (Hernández M., 2012).

$$I.C. = \frac{EPC}{ENC + EPC} \times 100$$

Donde: I.C. = Índice de Citotoxicidad o % EPC

EPC = Eritrocitos Policromáticos

ENC = Eritrocitos Normocrómicos

La respuesta a la prueba puede ser considerada positiva si la frecuencia de EPCMN, en cualquier tratamiento muestra incrementos estadísticamente significativos (Hernández A., 2012). La respuesta puede ser comparada con la producción de EPCMN que induce un control positivo en el experimento.

### 3. COMPUESTOS LQM 300

El desarrollo de una nueva serie de fármacos con actividad cardiovascular, modelados y sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal en la Unidad de Posgrado de la FES Cuautitlán a cargo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano, se basa en el uso de compuestos derivados de la Changrolina (Pérez C., 2010), éstos son: 2,6-bis(4-morfolilmetil)-fenol-4-sustituido y 2,6-bis(4-tiomorfolilmetil)-fenol-4-sustituido, llamados "familia LQM 300" (González V., 2010).

- Antecedentes

En 1979 Liang Quan y un grupo de investigadores de la República China, realizaban pruebas clínicas contra la malaria de los derivados de la Febribugina (Aguilar H., 2012) y descubrieron que la Changrolina tenían propiedades antiarrítmica. Más tarde en 1983, Stout y colaboradores diseñaron una nueva serie de compuestos antiarrítmicos, realizando pruebas y variaciones a partir de la Changrolina, encontrando que cada molécula tiene un puente de hidrógeno intramolecular entre el grupo –OH del fenol y el átomo de nitrógeno de uno de los anillos de la pirrolidina, sugiriendo también que el anillo libre del puente de hidrógeno intramolecular define la forma activa de la molécula. El estudio llevó al análisis de la Changrolina, la cual se divide en tres regiones: (1) la región heteroaromática que consiste de la fracción de Quinazolina, (2) la región aromática con el bis(pirrolidin-il-metil)fenol y (3) la unión entre las dos primeras regiones (Fig. 4) (Stout D., 1985).

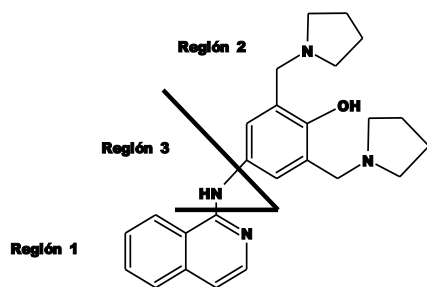


Fig.4. Estructura de la Changrolina (Stout D., 1985).

Los primeros compuestos sintetizados en la FES Cuautitlán, fueron de tipo dihidropiridínicos, de los cuales el más representativo y efectivo fue el FESC-DIPINA, que presentó efecto tanto antihipertensivo como antiarrítmico; luego más derivados fueron sintetizados, caracterizados y evaluados en su actividad biológica como toxicológica (Villegas F., 2005).

Cada uno de los compuestos, se purificó por Cromatografía de columna y se caracterizaron por Espectroscopia Infrarroja, Resonancia Magnética Nuclear de protón (RMN<sup>1</sup>H) y de carbono trece (RMN<sup>13</sup>C), Espectrometría de Masas y Difracción de Rayos X.



Los estudios teóricos se llevaron a cabo por análisis conformacional, la optimización geométrica y el cálculo de la energía, se realizaron por los métodos semiempírico PM3, *ab initio* y densidad; también se hizo la determinación experimental de *log P* y el *pka* por Espectrofotometría UV/Vis y Electroforesis Capilar (Velázquez S., 2007).

Los estudios para determinar y evaluar la actividad biológica, estuvieron a cargo de la Dra. Luisa Martínez Aguilar, en modelo de rata anestesiada normotensa con actividad hipotensora, modelo de rata consciente hipertensa espontánea y la determinación del área bajo la curva (ABC) de toda la serie de los compuestos LQM, todo esto en comparación con fármacos de referencia como Propanolol, Fenilefrina, Captopril y Losartán pudiendo así determinar el porcentaje del efecto sobre la presión arterial sistólica (PAS), presión arterial diastólica (PAD) y frecuencia cardíaca (FC) (Pérez C., 2010). Por otra parte, los estudios genotóxicos a cargo de la Dra. Sandra Díaz-Barriga, han demostrado excelentes resultados, pues señalan una baja toxicidad del compuesto cabeza de serie LQM 319 (Villegas F., 2005).

- **Síntesis de los compuestos LQM 300**

La síntesis de los derivados de (metil-il-morfolin) fenol y (metil-il-piperidinmorfolin) fenol se llevó a cabo por los métodos de sustitución electrofílica aromática (SEA) y SEA base de Mannich (SEA BM) (Fig. 5) (Velázquez S., 2007). Se fundamenta en la reacción química entre un fenol sustituido más un formaldehído y una molécula de morfolína, tiomorfolína o piperidína, para obtener una serie de compuestos mono y di sustituidos. (López y Palma, 2012). A ésta serie de compuestos fenol sustituidos se realizan nuevos cambios, utilizando otros sustituyentes en algunas posiciones del anillo aromático como: *-terbitul*, *-Cl*, *-Br*, *-NO<sub>2</sub>*, *-CN*, *-OMe*, etc. (Fig. 6) (González V., 2010).

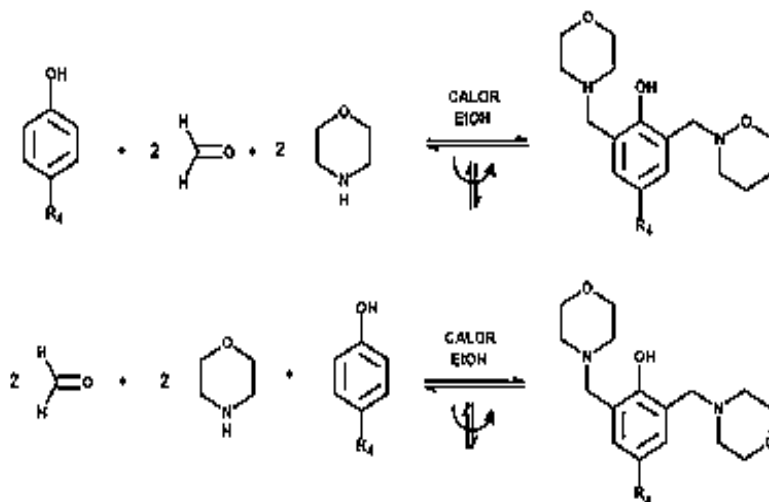


Fig. 5. Reacciones SEA Y SEA BM (Velázquez S., 2007)

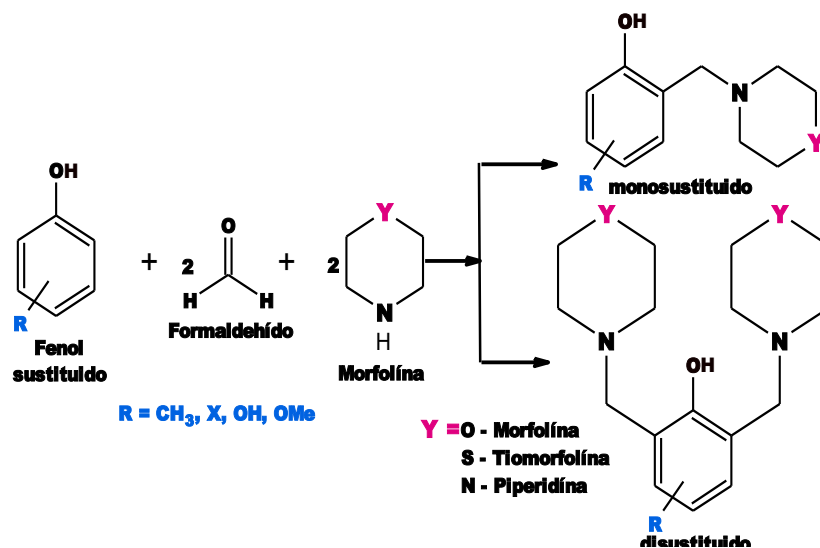


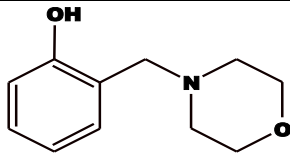
Fig. 6. Reacción general de síntesis de los LQM (González V., 2010 modificado).

### Características generales

Se ha demostrado que los compuestos LQM 308, 314, 335 y 342 presentan efectos sobre el sistema cardiovascular, en arritmias o sobre la presión arterial y la frecuencia cardiaca; además de presentar efectos sobre la contracción del músculo liso de aortas torácica y abdominal.

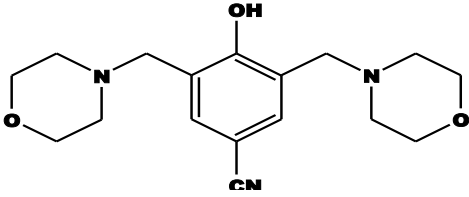
A continuación en las tablas 2 a 5, se presentan las características Físicoquímicas y la actividad biológica que se ha realizado a los cuatro compuestos.

**Tabla 2. Datos del LQM 308.**

Compuesto		308 Monomorfolínico
Estructura		
Nombre IUPAC		2-(4-morfolin-il-metil)fenol
Peso molecular		193.242 <sup>g/mol</sup>
Reacción		SEA//IR <sup>8</sup>
Rendimiento		90.0% (IR) <sup>8</sup>
Punto de fusión		95-97 °C <sup>8</sup>
Tiempo de reacción		31 h (SEA)//32 min (IR) <sup>8</sup>
RN anestesiada		Intervalo de P-R sin cambios a una dosis de 3.1 <sup>mg/kg</sup> <sup>1</sup>
RHE consciente		PAS ↓ <sup>5</sup> PAD ↓ <sup>5</sup> FC ↑ <sup>5</sup>
Infarto Agudo al Miocardio (IAM)	Antes	Previene, evita o retarda los efectos del infarto. <sup>4</sup>
	Después	↓↓ Extrasístoles ventriculares ↑ Bradicardia ventricular ↑ Taquicardia ventricular ↓↓ Fibrilación ventricular ↑↑ Frecuencia cardiaca Índice de mortalidad a dosis terapéuticas = 40% <sup>3</sup> Efecto protector en lesiones histopatológicas como ondulación de fibras musculares, desconexión de discos intercalares, adelgazamiento de fibras musculares, edema, necrosis de tejido muscular, núcleos picnóticos y fibrosis con daño nulo. <sup>4</sup>
Propranolol	%E <sub>máx</sub>	40.0 <sup>1</sup>
Fenilefrina		Antagónico competitivo
	%E <sub>máx</sub>	67.5
	K <sub>D</sub>	3 ± 1.4 <sup>2</sup>
Captopril	%E <sub>máx</sub> a una dosis de 3.0 <sup>mg/kg</sup>	PAM = 7.55 PAS = 12.24 PAD = 8.11 FC = 37.25 <sup>7</sup>
Dosis de (10 <sup>-0</sup> , 10 <sup>-1</sup> , 10 <sup>-2</sup> , 10 <sup>-3</sup> , 10 <sup>-4</sup> ) <sup>mg/kg</sup>		PAM ↓↓ a dosis de 1 <sup>mg/kg</sup> PAS ↓ PAD ↓ FC ↓ <sup>7</sup>
ABC		PAS = 1563.41 ± 32.13 PAD = 856.53 ± 29.09 FC = 2902.10 ± 205.94 <sup>6</sup>
	Captopril %E <sub>máx</sub>	PAS = 65.92 PAD = 43.10 FC = 87.87 <sup>6</sup>
	Losartán %E <sub>máx</sub>	PAS = 26.79 PAD = 30.09 FC = 394.57 <sup>6</sup>

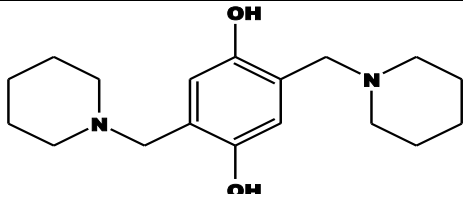
1.- Álvarez P., 2007. 2.- Castillo G., 2008. 3.- Córdoba R. y Rgz Z., 2010. 4.- Correa, 2011. 5.- López J. y Hdz. C., 2008. 6.- Pérez C., 2010. 7.- Tapia L., 2006. 8.- Velázquez S., 2007.

Tabla 3. Datos del LQM 314.

Compuesto		314 Dimorfólico	
		Puede presentar propiedades anticancerígenas <sup>4</sup>	
Estructura			
Nombre IUPAC		1-hidroxi-2,6-bis(4-morfolin-il-metil)benzonitrilo	
Peso molecular		317.39 <sup>9</sup> /mol	
Reacción		SEA//IR <sup>8</sup>	
Rendimiento		87.0%/87.0% <sup>8</sup>	
Punto de fusión		104-106°C <sup>8</sup>	
Tiempo de reacción		38 h (SEA)//21 min (IR) <sup>8</sup>	
Solubilidad		Medio ácido es ↓ poco estable Medio básico es ↑ mas estable <sup>4</sup>	
RN anestesiada	%E <sub>máx</sub> a una dosis de 3.0 mg/kg	PAM = 23.92 PAS = 28.62 PAD = 24.66 FC = 51.86 la ↑ en un 45% <sup>4</sup>	
RHE consciente	CaCl <sub>2</sub>	Aorta torácica	↓↓ la respuesta contráctil <sup>5</sup>
		Aorta abdominal	↓↓ la respuesta contráctil <sup>5</sup>
Infarto Agudo al Miocardio (IAM)	Después	↑ Bradicardia ventricular ↓↓ Taquicardia ventricular ↓↓ Fibrilación ventricular ↓ Frecuencia cardiaca ↓↓ Extrasístoles ventriculares Índice de mortalidad a dosis terapéuticas = 0% <sup>3</sup>	
Fenilefrina	%E <sub>máx</sub>	68.71 <sup>1</sup>	
	Aurícula derecha	↓ inhibe por completo la respuesta contráctil de la Fenilefrina <sup>2</sup>	
	Aorta torácica	↓ inhibe por completo la respuesta contráctil de la Fenilefrina %E <sub>máx</sub> = 39.88 <sup>1</sup>	
	Aorta abdominal	↓ inhibe por completo la respuesta contráctil de la Fenilefrina %E <sub>máx</sub> = 11.55 <sup>1</sup>	
Captopril	%E <sub>máx</sub> a una dosis de 3.0 mg/kg	PAM = 25.14 PAS = 30.46 PAD = 0 FC = 0 <sup>7</sup>	
ABC		PAS = 3832.50 ± 749.63 PAD = 3576.00 ± 433.74 FC = 3466.50 ± 1476.05 <sup>6</sup>	
	Captopril %E <sub>máx</sub>	PAS = 161.61 PAD = 179.92 FC = 104.96 <sup>6</sup>	
	Losartán %E <sub>máx</sub>	PAS = 65.68 PAD = 88.51 FC = 510.74 <sup>6</sup>	

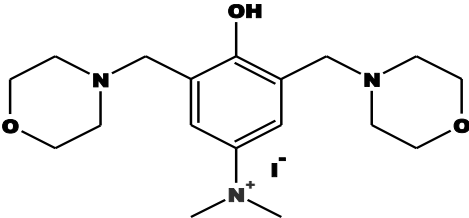
1.- Mondragón G., 2009. 2.- Castillo G., 2008. 3.- Córdova R. y Rgz Z., 2010. 4.- Rosas. R., 2008. 5.- López y Palma, 2012. 6.- Pérez C., 2010. 7.- Tapia L., 2006. 8.- Velázquez S., 2007.

Tabla 4. Datos del LQM 335.

Compuesto		335 Dipiperidínico	
Estructura			
Nombre IUPAC		2,5-bis(1-piperidin-il-metil)-1,4-bencenodiol	
Peso molecular		304.215 <sup>9</sup> /mol	
Propiedades físicas		Sólido cristalino <sup>3</sup>	
Reacción		//IR <sup>3</sup>	
Rendimiento		46.52% <sup>3</sup>	
Punto de fusión		190-194 °C <sup>3</sup>	
Tiempo de reacción		//23 min (IR) <sup>3</sup>	
Solubilidad		Soluble en DMSO	
Genotoxicidad		No a dosis de 5, 10 y 20 mg/kg	
RHE consciente	CaCl <sub>2</sub>	Aorta torácica	Sin efecto farmacológico <sup>5</sup>
		Aorta abdominal	Sin efecto farmacológico <sup>5</sup>
Fenilefrina	LQM 335 10 <sup>-9</sup> M	K <sub>D</sub> = 1.49	
	10 <sup>-9</sup> M	K <sub>D</sub> = 1.39	
	Aorta torácica	Antagonista parcial no competitivo ↓ la respuesta contráctil de la Fenilefrina %E <sub>máx</sub> = 66.04 K <sub>D FEN</sub> 10 <sup>-9</sup> M = 1.39 K <sub>D 335</sub> 10 <sup>-9</sup> M = 1.49 <sup>1</sup>	
	Aorta abdominal	↓ la respuesta contráctil de la Fenilefrina %E <sub>máx</sub> = 84.25 <sup>1</sup> K <sub>D FEN</sub> 10 <sup>-9</sup> M = 1.48 K <sub>D 335</sub> 10 <sup>-9</sup> M = 1.16 <sup>1</sup>	
Captopril	%E <sub>máx</sub> a una dosis de 3.1 mg/kg	↓ PAM = 31.02 ↓ PAS = 23.3 ↓ PAD = 24.66 ↓ FC = 25.66 <sup>2</sup>	
ABC		PAS = 764.38 ± 586.25 PAD = 586.25 ± 142.16 FC = 2139.13 ± 444.79 <sup>6</sup>	
	Captopril %E <sub>máx</sub>	PAS = 32.23 PAD = 29.50 FC = 64.77 <sup>6</sup>	
	Losartán %E <sub>máx</sub>	PAS = 13.10 PAD = 14.51 FC = 315.17 <sup>6</sup>	

1.- Mondragón G., 2009. 2.- Briones B., 2009. 3.- González V., 2010. 4.- Hdz A., 2012. 5.- López y Palma, 2012. 6.- Pérez C., 2010.

Tabla 5. Datos del LQM 342.

Compuesto		342 Dimorfolínico
		Es derivado de la reducción del compuesto LQM 341 <sup>3</sup>
Estructura		
Nombre IUPAC		2,6-bis(4-morfolin-il-metil)-4(dimetil-amino)fenol
Peso molecular		350 <sup>9</sup> /mol
RN anestesiada	%E <sub>máx</sub> a una dosis de 3.0 mg/kg	PAM = 18.33 PAS = 19.34 PAD = 20.33 FC = 23.48 <sup>3</sup>
Infarto Agudo al Miocardio (IAM)	Antes	Previene, evita o retarda los efectos del infarto. <sup>2</sup>
	Después	<p>↓↓ Extrasístoles ventriculares  ↑ Bradicardia ventricular  ↑ Taquicardia ventricular  ↓↓ Fibrilación ventricular  ↑ Frecuencia cardiaca y cte.  Índice de mortalidad a dosis terapéuticas = 0%<sup>1</sup></p> <p>Efecto protector en lesiones histopatológicas como ondulación de fibras musculares, desconexión de discos intercalares, adelgazamiento de fibras musculares, edema, necrosis de tejido muscular, núcleos picnóticos y fibrosis con daño nulo.<sup>2</sup></p>
ABC		PAS = 1287.50 ± 682.75 PAD = 521.84 ± 127.95 FC = 2345.18 ± 1136.40 <sup>4</sup>
	Captopril %E <sub>máx</sub>	PAS = 54.29 PAD = 26.26 FC = 71.01 <sup>4</sup>
	Losartán %E <sub>máx</sub>	PAS = 22.06 PAD = 12.92 FC = 345.53 <sup>4</sup>

1.- Córdova y Rdz, 2010. 2.- Correa B., 2011. 3.- Rosas. R., 2008. 4.- Pérez C., 2010.

## **JUSTIFICACIÓN**

La Organización Mundial de la Salud ubica a las enfermedades cardiovasculares como la principal causa de muerte en todo el mundo. Se calcula que en 2008 murieron por esta causa 17.3 millones de personas, lo cual representa un 30% de todas las muertes registradas a nivel global. Los decesos por enfermedades cardiovasculares afectan por igual a ambos sexos y más del 80% se producen en países de ingresos bajos y medios, por ejemplo en México es la 2<sup>da</sup> causa de mortalidad en personas mayores de 65 años, sólo detrás de diabetes mellitus y se calcula que en el 2030 morirán cerca de 23.3 millones de personas en el mundo sin dejar de ser una de las principales causas de mortandad (OMS, 2013).

Es por eso que en nuestro país, existe la necesidad de descubrir diversas moléculas con acción cardiovascular que sirvan en el control y disminución de dichas afecciones; además de ajustarse a la población tanto en acción farmacológica como en costo.

En la actualidad existe una gran variedad de medicamentos en el mercado; sin embargo en la mayoría de ellos la investigación se ha llevado a cabo en otras partes del mundo como Estados Unidos, la Unión Europea y Japón al ser las principales potencias a nivel farmacéutico.

Es por eso que en la FES Cuautitlán el Dr. Ángeles Anguiano y su grupo de colaboradores decidieron retomar la investigación que se había hecho a la molécula de la Changrolina, la cual tenía reportados efectos cardiovasculares, diseñando y sintetizando moléculas acorde a la población mexicana.

Apoyando dicho proyecto, éste trabajo colabora con los ensayos preclínicos de toxicidad aguda (DL<sub>50</sub>) y de genotoxicidad y citotoxicidad (Prueba de Micronúcleos *in vivo*).

## **OBJETIVO GENERAL**

- Evaluar la toxicidad aguda, genotoxicidad y citotoxicidad, mediante la determinación de la  $DL_{50}$  y prueba de micronúcleos *in vivo*, de los compuestos LQM 308, 314, 335 y 342, que por tener actividad antiarrítmica, se perfilan como posibles fármacos, por lo que requieren estudios preclínicos de seguridad.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar la  $DL_{50}$  del LQM 308, 314, 335 y 342, por medio del Método de Lorke y observar los efectos de la toxicidad aguda de dichos compuestos LQM 300.
- Evaluar la frecuencia de EPCMN y %EPC, mediante la prueba de micronúcleos *in vivo*, para determinar si los compuestos inducen daño genotóxico o citotóxico.
- Observar si existe relación entre la estructura de los compuestos y los efectos tóxicos y citotóxicos, por medio de los datos obtenidos en este trabajo, para poder ser considerados en estudios posteriores.

## **HIPÓTESIS**

Si los compuestos LQM 308, 314, 335 y 342 no inducen la formación de micronúcleos; tampoco presentan un índice citotóxico elevado y muestran un buen margen de seguridad a las dosis más altas utilizadas; entonces se considera que no representan ningún riesgo tóxico, ni genotóxico que pueda relacionarse con su estructura química, al ser productos sintetizados.



**MATERIAL**≈ **Material biológico:**

1. Ratones macho CD1 con peso promedio de  $25 \pm 5$  g, obtenidos en el bioterio de la FES Iztacala (ver Anexo), tratados y conservados bajo las mismas condiciones de alimentación y cuidados en la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la UIM en la FES Cuautitlán Campo 4.

≈ **Soluciones y Reactivos:**

- ✓ Aceite de inmersión (ZEISS)
- ✓ Agua destilada
- ✓ Agua inyectable (PISA)
- ✓ Alcohol al 70% (J. T. BAKER)
- ✓ Buffer de Fosfatos (J. T. BAKER)
- ✓ Colorante Giemsa (SIGMA)
- ✓ Compuestos LQM 308, 314, 335 y 342
- ✓ HCl concentrado (J. T. BAKER)
- ✓ Metanol (J. T. BAKER)
- ✓ Xylocaína sol. Inyectable al 2% (ASTRA ZENEKA)

≈ **Equipo y Material:**

- ✓ Balanza analítica (SCALTEC)
- ✓ Charolas de plástico
- ✓ Estuche de disección
- ✓ Jeringas para insulina de 1 ml (BD)
- ✓ Micropipetas de volumen variable de 10 a 500  $\mu$ l (ORANGE SCIENTIFIC)
- ✓ Microscopio óptico (LEYKA)
- ✓ Papel filtro
- ✓ Papel seda
- ✓ 1 Pipeta volumétrica de 10 ml (PYREX)
- ✓ 2 Pipetas volumétrica de 5 ml (PYREX)
- ✓ Portaobjetos
- ✓ Potenciómetro (CONDUCTRONIC)
- ✓ Probeta 50 ml (PYREX)
- ✓ Torundas de algodón
- ✓ Vasos Coplin
- ✓ 4 Viales

**METODOLOGÍA**≈ **Determinación de la DL<sub>50</sub>:**

1. En la Etapa 2 del método de Lorke, se proponen cuatro dosis, en base a los resultados previamente obtenidos de la Etapa 1, las cuales son: 140, 225, 370 y 600  $\text{mg}/\text{kg}$ .
2. Dichas dosis se distribuyen en 4 lotes de 3 ratones cada uno y se administra cada compuesto (LQM 308, 314, 335 y 342) vía intraperitoneal.
3. Durante las primeras 6 horas, se registra la letalidad y toxicidad de cada lote considerándose como tiempo 0 (T0). Así se continúa registrando durante 24, 48 y 72 horas (T1, T2 y T3).

4. Al término de las 24 horas, se calcula la DL<sub>50</sub> como lo indica el método de Lorke.

★ **Método de Lorke:**

El procedimiento se basa en dos etapas:

ETAPA 1) Organizar 3 lotes de 3 ratones cada uno, administrando 3 dosis en un amplio rango

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

Cabe mencionar que esta etapa se realizó previa a este trabajo con el mismo tipo de animales.

ETAPA 2) Se administran 4 lotes de ratones con las dosis correspondientes conforme a la primera etapa como se indica en la Tabla 6

**Tabla 6. Etapas en el método de Lorke (Lorke D., 1983).**

<b>1<sup>ra</sup> etapa</b>			<b>2<sup>da</sup> etapa</b>			
<b>Dosis en mg/kg por peso</b>			<b>Dosis en mg/kg de peso</b>			
<b>10 mg/kg</b>	<b>100 mg/kg</b>	<b>1000 mg/kg</b>				
0/3*	0/3	0/3		1 600	2 900	5 000
0/3	0/3	1/3	600	1 000	1 600	2 900
0/3	0/3	2/3	200	400	800	1 600
<b>0/3</b>	<b>0/3</b>	<b>3/3</b>	<b>140</b>	<b>225</b>	<b>370</b>	<b>600</b>
0/3	1/3	3/3	50	100	200	400
0/3	2/3	3/3	20	40	80	160
0/3	3/3	3/3	15	25	40	60
1/3	3/3	3/3	5	10	20	40
2/3	3/3	3/3	2	4	8	16
3/3	3/3	3/3	1	2	4	8
Número de animales que mueren / número de animales usados.			Resultados de la 1er etapa y dosis correspondientes en la 2da etapa.			

ETAPA 3) Calcular la  $DL_{50}$  con la media geométrica de las dosis donde se encuentran los resultados de supervivencia y mortalidad (1/1 y 0/1) ((Lorke, 1983 y Rojas O., 2008).

≈ **Tratamiento de ratones:**

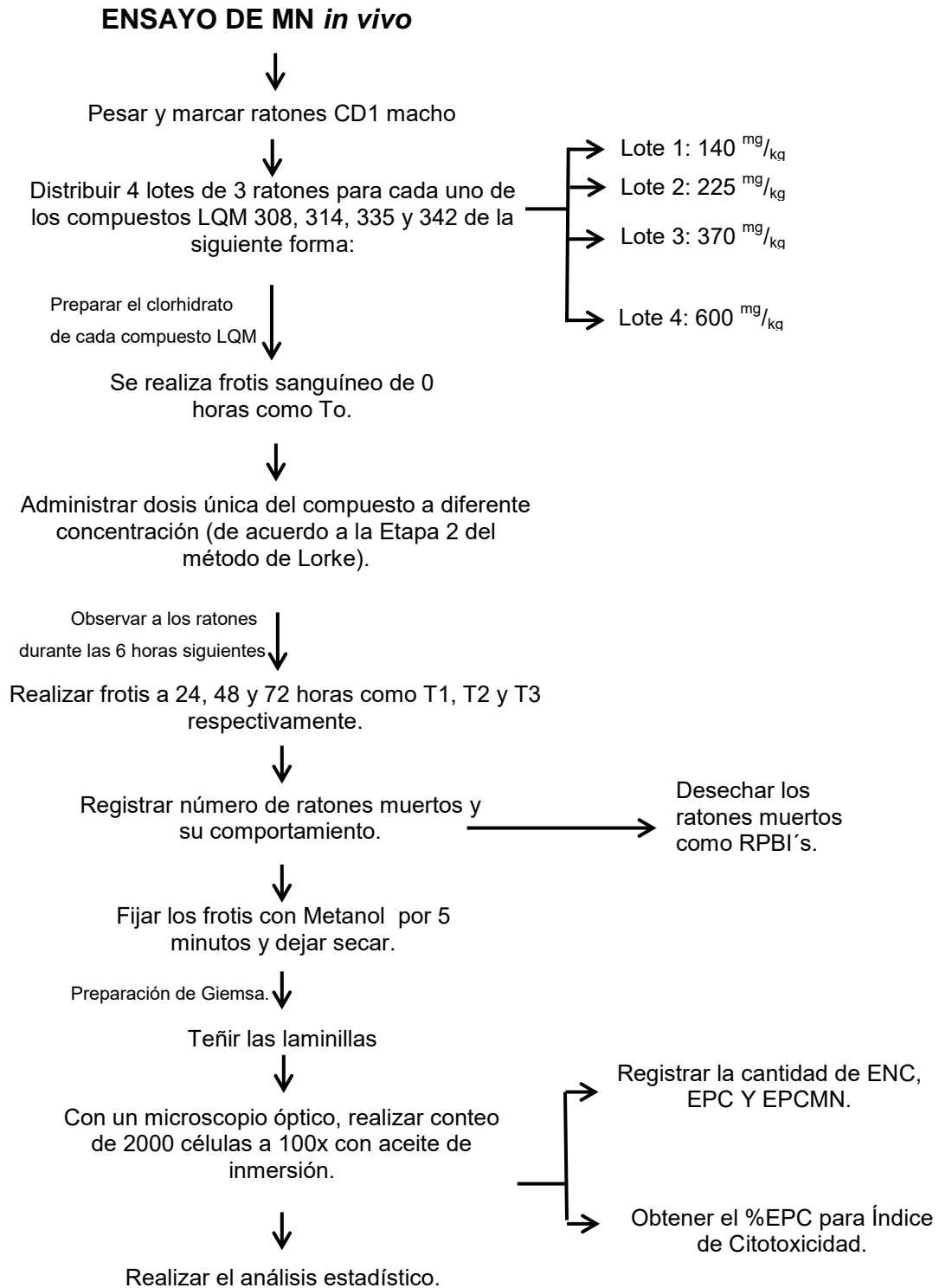
1. Los ratones CD1 son obtenidos en el Bioterio de la FES Iztacala y manipulados en la UIM de la FES Cuautitlán Campo 4, cumpliendo con todas las exigencias propuestas por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Experimentación (CICUAE).
2. Los animales se mantienen en condiciones de ambientación, alimento y bebida controladas antes y durante todo el experimento.

≈ **Prueba de micronúcleos:**

1. Realizar la limpieza de los portaobjetos para desengrasarlos.
2. Con ayuda de una torunda de algodón impregnada con Xylocaína al 2%, anestesiarse la punta de la cola del ratón.
3. Realizar un corte de 1 a 2 mm, en la porción terminal de la cola para obtener sangre periférica del ratón.
4. Depositar una gota de sangre periférica de ratón, en un portaobjetos.
5. Realizar el extendido de sangre sobre la laminilla (frotis).
6. Dejar secar al aire durante unos minutos.
7. Fijar las laminillas con metanol absoluto durante 5 minutos.
8. Guardar las laminillas hasta su tinción.

≈ **Tinción de laminillas:**

1. Es importante trabajar con un colorante recién preparado.
2. En un vaso Coplin se colocan 5 ml de Buffer de Fosfatos pH 6.8 con 5 ml de colorante de Giemsa y 40 ml de agua destilada, para preparar un total de 50 ml.
3. En seguida se sumergen las laminillas en el vaso Coplin durante un lapso de 8 minutos.
4. Finalmente las preparaciones se lavan en agua corriente y se dejan secar al aire.
5. Las laminillas se observan en microscopio óptico, primero a 40X para enfocar y después a 100X (con aceite de inmersión) para realizar el conteo de eritrocitos.
6. La cuantificación del número de EPC y EPCMN se lleva a cabo sobre 2000 células.
7. El análisis estadístico se realiza con los programas Graphpad Instant 3.0. y Prism 6.0

**DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL**

## RESULTADOS

Se realizó la Prueba de MN *in vivo* y la determinación de toxicidad aguda (DL<sub>50</sub>), de los compuestos LQM 308, 314, 335 y 342, obteniendo los siguientes resultados, (donde se tomó el promedio de cada lote como valor individual), para construir las tablas y el análisis estadístico.

≈ DL<sub>50</sub>

Para el cálculo de la DL<sub>50</sub> se tomaron en cuenta los decesos de los ratones observados desde las 0 hasta las 72 horas, administrados a dosis de 140, 225, 370 y 600 mg/kg, para cada uno de los compuestos.

En la tabla 7 se tiene la DL<sub>50</sub> de los compuestos y en la Tabla 8 se compara la letalidad con las observaciones que se hicieron durante la experimentación.

**Tabla 7. DL<sub>50</sub> de los compuestos de la serie LQM 300.**

LQM	308	314	335	342
DL <sub>50</sub> (mg/kg)	774.6	288.5	471.2	288.5

Durante la experimentación se observaron los siguientes signos y se registraron los tiempos a los cuales los animales respondieron a la dosis letal.

**Tabla 8. Mortalidad de ratones y observaciones durante la experimentación.**

LQM	Dosis mg/kg	Horas											
		0			24			48			72		
		Ratones											
		R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3	R1	R2	R3
308	140												
	225												
	370					X			X			X	
	600												
<b>Observaciones</b>		Muere 1 ratón a las 0 horas No se sabe si fue por el compuesto o porque presentaba lesiones de riña con sus compañeros de jaula. Hay resistencia a la dosis de 600 mg/kg de todos los ratones, por lo que se administró a un quinto lote una dosis de 1000 mg/kg, todos murieron después de administrar.											
314	140												
	225								X			X	
	370				X	X	X	X	X	X	X	X	X
	600				X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Observaciones</b>		Mueren todos los lotes de 370 y 600 mg/kg a las 0 horas. Presentaron convulsiones y una elevada tensión muscular generalizada, el ratón de 225 mg/kg; también mostró un periodo mayor de convulsiones hasta su deceso a las 48 horas, mientras que el resto del lote sólo presentó letargo.											
335	140				X			X			X		
	225						X			X			X
	370							X			X	X	X
	600				X	X		X	X		X	X	
<b>Observaciones</b>		A las 24 horas muere 1 ratón del lote de 140 mg/kg, 1 del lote de 225 mg/kg y 2 del lote de 600 mg/kg. A las 48 horas muere 1 ratón del lote de 370 mg/kg. Los demás se observan muy aletargados muriendo finalmente a las 72 horas.											
342	140												
	225				X		X	X		X	X		X
	370				X	X	X	X	X	X	X	X	X
	600				X	X	X	X	X	X	X	X	X
<b>Observaciones</b>		Mueren todos los ratones de los lotes de 370 y 600 mg/kg a las 0 horas y 2 del 225 mg/kg Todos temblaban tras la administración de las 0 hrs, con letargo y sin poder caminar arrastrando las patas. El resto de los animales sobrevivieron hasta las 72 hrs, con pelo seco y erizo.											

X = Ratones muertos

≈ Prueba de Micronúcleos *in vivo*.

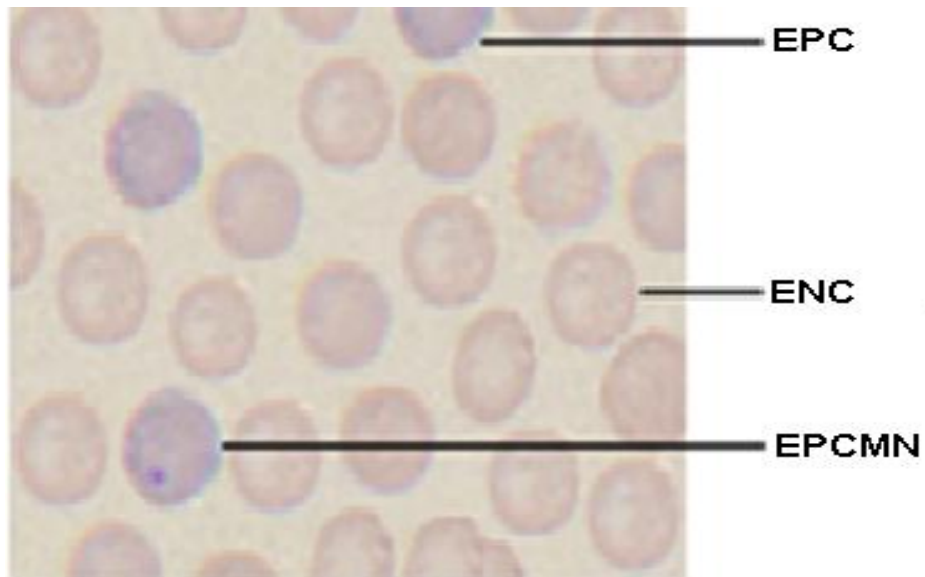


Fig. 7. Frotis de sangre periférica de ratón CD1. Visto a 100X con aceite de inmersión en microscopio óptico donde en la parte superior izquierda se observa un EPC (coloración azul violeta), en la parte inferior izquierda un EPCMN (coloración azul violeta con punto de color más intenso) y el resto de las células son ENC (coloración rosada).



★ **% EPC para evaluar la inducción de Citotoxicidad.**

En las tablas 9, 10, 11 y 12 se muestran las medias  $\pm$  el error estándar del % EPC, que presenta cada uno de los compuestos comparados a diferentes tiempos.

**Tabla 9. %EPC para determinar la citotoxicidad en relación al tiempo de LQM 308.**

CITOTOXICIDAD	308 %EPC $\pm$ SEM			
	140 <sup>mg</sup> / <sub>kg</sub>	225 <sup>mg</sup> / <sub>kg</sub>	370 <sup>mg</sup> / <sub>kg</sub>	600 <sup>mg</sup> / <sub>kg</sub>
T0	7.43 $\pm$ 0.92	6.43 $\pm$ 0.67	6.91 $\pm$ 1.42	4.86 $\pm$ 0.75
T1	4.90 $\pm$ 1.97	5.60 $\pm$ 0.77	3.30 $\pm$ 1.00	2.18 $\pm$ 0.28
T2	6.91 $\pm$ 1.42	6.45 $\pm$ 0.28	2.97 $\pm$ 0.53	2.22 $\pm$ 0.24
T3	4.86 $\pm$ 0.75	5.55 $\pm$ 1.65	2.48 $\pm$ 0.67	2.38 $\pm$ 0.49

En ésta tabla se observa el % EPC  $\pm$  SEM (desviación estándar) del compuesto LQM 308, donde T0 representa el lote Control y T1, T2, T3, representan los lotes administrados a 24, 48 y 72 horas respectivamente.

Se observa que los lotes de 140 y 225 <sup>mg</sup>/<sub>kg</sub> aumentan a las 48 horas (T2), volviendo a disminuir a las 72 horas (T3), mientras que los lotes de 370 y 600 <sup>mg</sup>/<sub>kg</sub> disminuyen con respecto al control (T0).

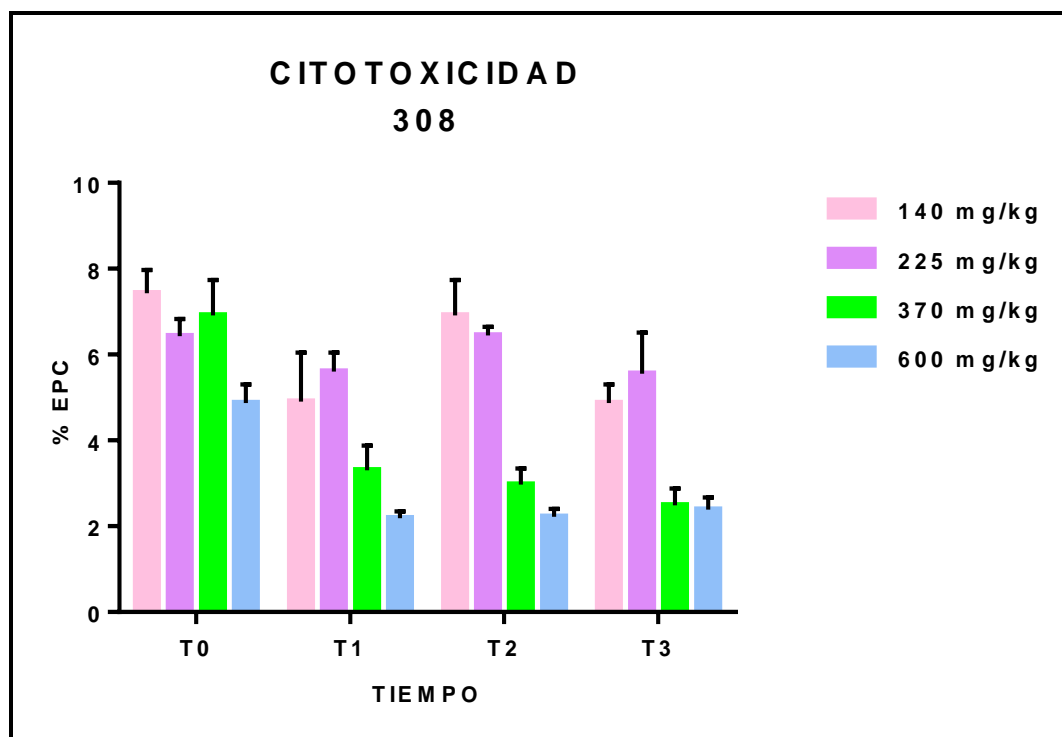


Figura 8. Frecuencia de % EPC en 2000 células del compuesto LQM 308 a diferentes tiempos en relación a la dosis. Aplicando ANOVA de una vía, con una  $p < 0.05$  y  $F = 7.637$ , se tiene una alta diferencia significativa.

Tabla 10. %EPC para determinar la citotoxicidad en relación al tiempo de LQM 314.

CITOTOXICIDAD	314 %EPC ± SEM			
	140 mg/kg	225 mg/kg	370 mg/kg	600 mg/kg
T0	5.26 ± 1.10	4.71 ± 0.38	2.96 ± 0.50	5.65 ± 0.86
T1	4.60 ± 0.90	4.13 ± 1.23	X	X
T2	2.50 ± 0.62	2.37 ± 0.60	X	X
T3	3.30 ± 1.14	3.40 ± 0.21	X	X

En ésta tabla se observa el % EPC ± SEM (desviación estándar) del compuesto LQM 314, donde las X son los lotes donde se murieron todos los animales, T0 representa el lote Control y T1, T2, T3, representan los lotes administrados a 24, 48 y 72 horas respectivamente.

Se observa que los lotes de 140 y 225 mg/kg aumentan un poco a las 72 horas (T3), de los lotes 370 y 600 mg/kg sólo hay datos del control (T0), porque todos los ratones mueren antes de las 24 horas.

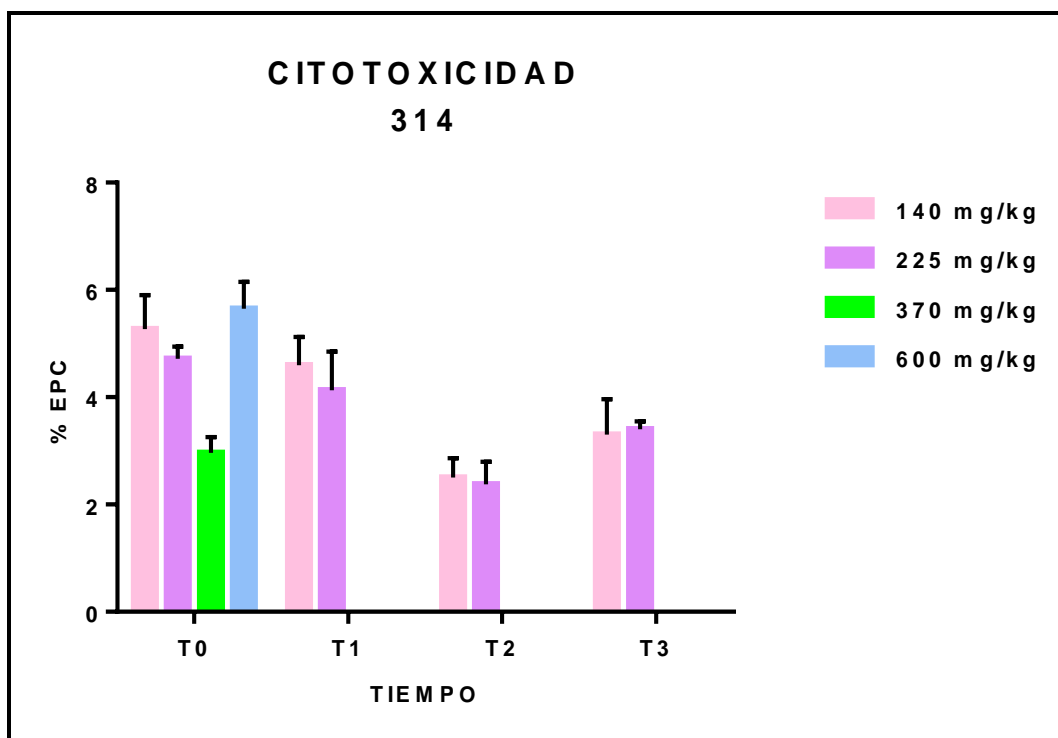


Figura 9. Frecuencia de % EPC en 2000 células del compuesto LQM 314 a diferentes tiempos en relación a la dosis. Aplicando ANOVA de una vía, con una p<0.05 y F=4.992, se tiene una diferencia muy significativa.

Tabla 11. %EPC para determinar la citotoxicidad en relación al tiempo de LQM 335.

CITOTOXICIDAD	335			
	%EPC ± SEM			
	140 mg/kg	225 mg/kg	370 mg/kg	600 mg/kg
T0	3.63 ± 0.67	3.93 ± 0.80	3.36 ± 0.90	4.01 ± 1.25
T1	2.95 ± 0.42	3.32 ± 0.38	3.46 ± 0.85	2.80 ± 0.00
T2	1.95 ± 0.28	1.85 ± 0.63	1.90 ± 0.56	2.25 ± 0.00
T3	1.85 ± 0.21	1.85 ± 0.14	X	1.85 ± 0.00

En ésta tabla se observa el % EPC ± SEM (desviación estándar) del compuesto LQM 335, donde las X son los lotes donde se murieron todos los animales, T0 representa el lote Control y T1, T2, T3, representan los lotes administrados a 24, 48 y 72 horas respectivamente.

Se observa que todos los lotes disminuyen desde las 24 horas (T1), en el lote de 370 mg/kg sólo hay datos hasta las 48 horas (T2), porque todos los ratones mueren antes de las 72 horas.

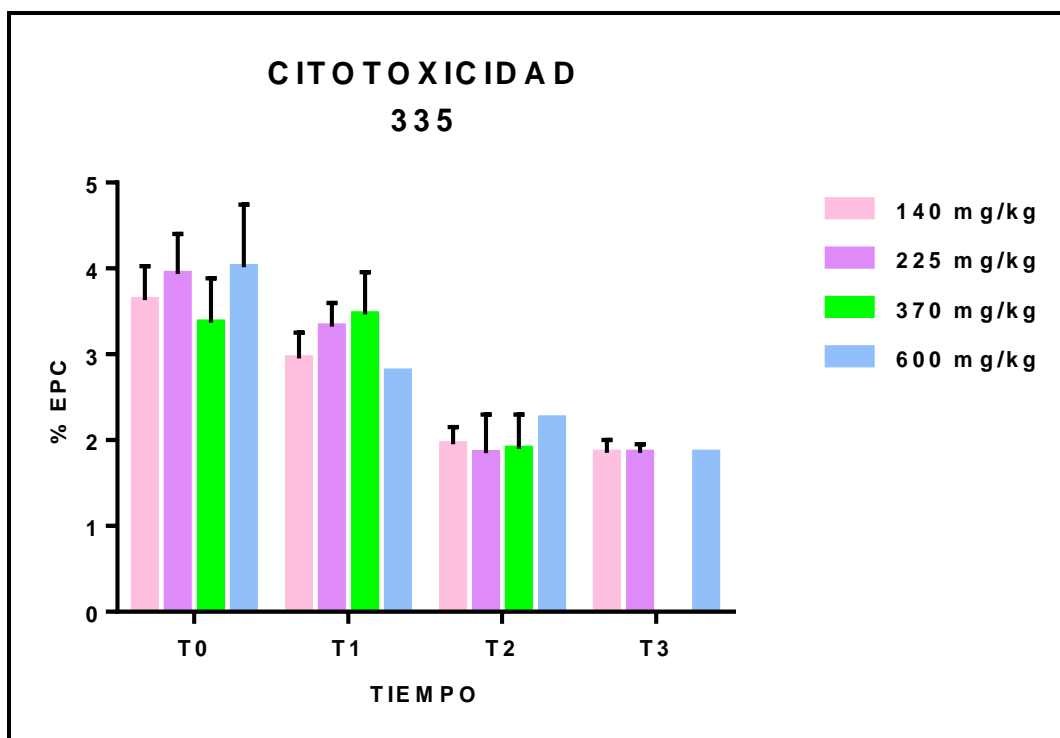


Figura 10. Frecuencia de % EPC en 2000 células del compuesto LQM 335 a diferentes tiempos en relación a la dosis. Aplicando ANOVA de una vía, con una p<0.05 y F=3.547, se tiene una diferencia muy significativa.

Tabla 12. %EPC para determinar la citotoxicidad en relación al tiempo de LQM 342.

CITOTOXICIDAD	342			
	%EPC ± SEM			
	140 <sup>mg</sup> / <sub>kg</sub>	225 <sup>mg</sup> / <sub>kg</sub>	370 <sup>mg</sup> / <sub>kg</sub>	600 <sup>mg</sup> / <sub>kg</sub>
T0	3.63 ± 0.50	3.60 ± 1.08	2.90 ± 0.75	3.36 ± 0.20
T1	4.50 ± 1.27	4.55 ± 0.00	X	X
T2	2.43 ± 0.88	2.20 ± 0.00	X	X
T3	1.55 ± 0.13	1.85 ± 0.00	X	X

En ésta tabla se observa el % EPC ± SEM (desviación estándar) del compuesto LQM 342, donde las X son los lotes donde se murieron todos los animales, T0 representa el lote Control y T1, T2, T3, representan los lotes administrados a 24, 48 y 72 horas respectivamente.

Se observa que los lotes de 140 y 225<sup>mg</sup>/<sub>kg</sub> aumentan un poco a las 24 horas (T1), de los lotes 370 y 600<sup>mg</sup>/<sub>kg</sub> sólo hay datos del control (T0), porque todos los ratones mueren antes de las 24 horas.

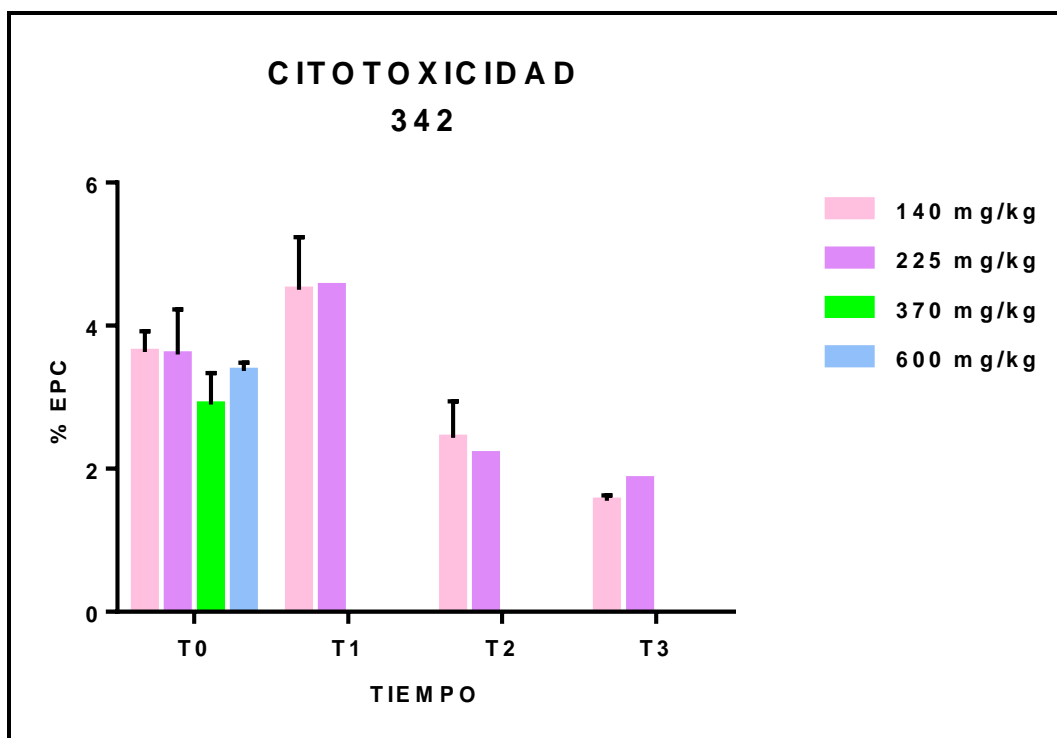


Figura 11. Frecuencia de % EPC en 2000 células del compuesto LQM 342 a diferentes tiempos en relación a la dosis. Aplicando ANOVA de una vía, con una p<0.05 y F=5.357, se tiene una diferencia muy significativa.

★ Frecuencia de EPCMN para evaluar la inducción de Genotoxicidad.

En las tablas 13, 14, 15 y 16, se resumen las medias  $\pm$  el error estándar (SEM) de los EPCMN, que se presenta a cada uno de los tiempos en base a las diferentes dosis y compuestos respectivamente.

Tabla 13. EPCMN para determinar la genotoxicidad en relación al tiempo de LQM 308.

GENOTOXICIDAD	308 EPCMN $\pm$ SEM			
	140 mg/kg	225 mg/kg	370 mg/kg	600 mg/kg
T0	2.00 $\pm$ 0.00	2.67 $\pm$ 1.52	1.33 $\pm$ 1.52	2.00 $\pm$ 0.00
T1	1.33 $\pm$ 1.52	0.33 $\pm$ 0.57	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
T2	1.00 $\pm$ 0.00	0.67 $\pm$ 1.15	0.50 $\pm$ 0.70	1.00 $\pm$ 1.00
T3	0.67 $\pm$ 0.57	0.67 $\pm$ 0.57	0.00 $\pm$ 0.00	1.33 $\pm$ 1.52

En ésta tabla se observa la cantidad de EPCMN  $\pm$  SEM (desviación estándar) del compuesto LQM 308, donde T0 representa el lote Control y T1, T2, T3, representan los lotes administrados a 24, 48 y 72 horas respectivamente.

Se observa que todos los lotes disminuyen desde las 24 horas (T1).

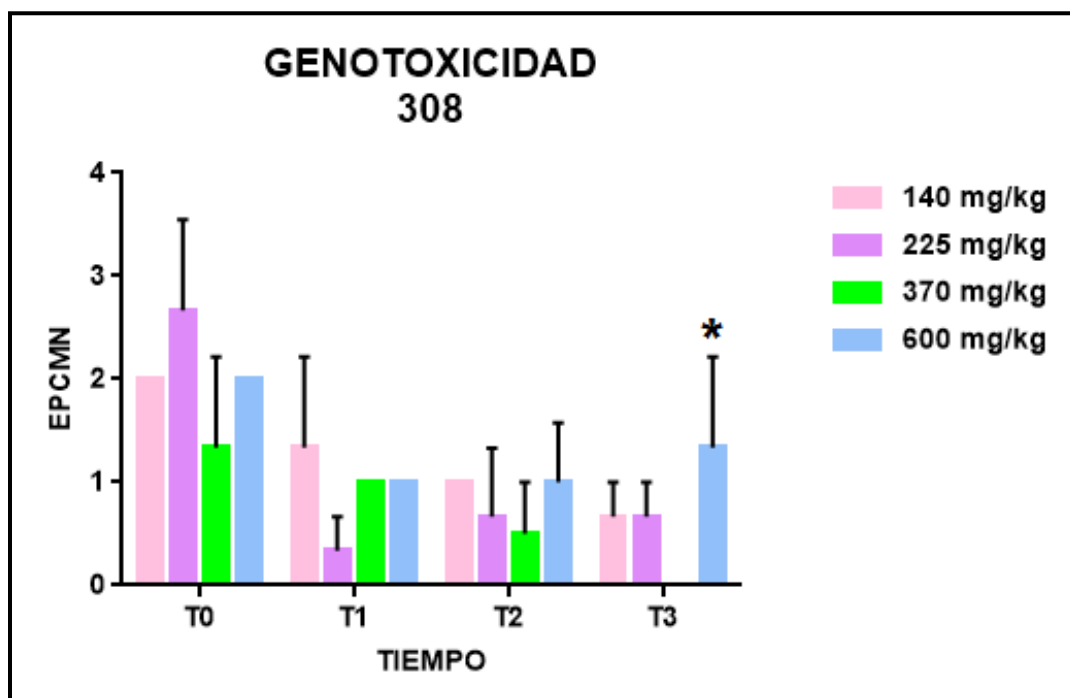


Figura 12. Frecuencia de EPCMN en 2000 células del compuesto LQM 308 a diferentes tiempos en relación a la dosis. Aplicando ANOVA de una vía, con una  $p > 0.05$  y  $F = 1.449$ , considerado no significativo.

Tabla 14. EPCMN para determinar la genotoxicidad en relación al tiempo de LQM 314.

GENOTOXICIDAD	314 EPCMN ± SEM			
	140 mg/kg	225 mg/kg	370 mg/kg	600 mg/kg
T0	1.00 ± 0.00	0.67 ± 0.57	1.33 ± 1.52	0.67 ± 1.15
T1	1.33 ± 1.15	2.00 ± 1.00	X	X
T2	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	X	X
T3	0.67 ± 1.15	1.50 ± 2.12	X	X

En ésta tabla se observa la cantidad de EPCMN ± SEM (desviación estándar) del compuesto LQM 314, donde las X son los lotes donde se murieron todos los animales, T0 representa el lote Control y T1, T2, T3, representan los lotes administrados a 24, 48 y 72 horas respectivamente.

Se observa que el lote de 140 mg/kg aumentan un poco a las 24 horas (T1); pero después de las 48 horas (T2) disminuye nuevamente; sin embargo el lote de 225 mg/kg aumenta a partir de las 24 horas (T1), manteniéndose así hasta las 72 horas (T3), por otra parte, en los lotes 370 y 600 mg/kg sólo hay datos del control (T0), porque todos los ratones mueren antes de las 24 horas.

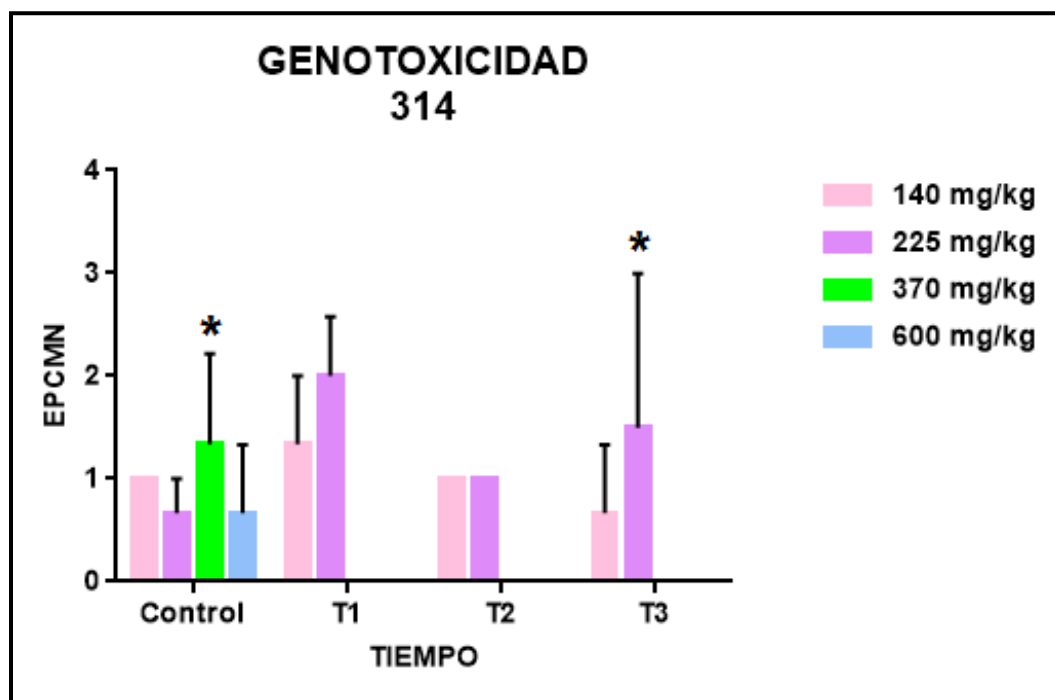


Figura 13. Frecuencia de EPCMN en 2000 células del compuesto LQM 314 a diferentes tiempos en relación a la dosis. Aplicando ANOVA de una vía, con una p<0.05 (0.0358) y F=0.4886, considerado significativo.

Tabla 15. EPCMN para determinar la genotoxicidad en relación al tiempo de LQM 335.

GENOTOXICIDAD	335 EPCMN ± SEM			
	140 mg/kg	225 mg/kg	370 mg/kg	600 mg/kg
T0	1.67 ± 1.15	1.00 ± 0.00	2.00 ± 1.00	0.67 ± 0.57
T1	0.50 ± 0.70	0.50 ± 0.70	0.67 ± 0.57	0.50 ± 0.70
T2	0.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	0.50 ± 0.70	1.00 ± 1.41
T3	0.00 ± 0.00	1.00 ± 1.41	X	0.50 ± 0.70

En ésta tabla se observa la cantidad de EPCMN ± SEM (desviación estándar) del compuesto LQM 335, donde las X son los lotes donde se murieron todos los animales, T0 representa el lote Control y T1, T2, T3, representan los lotes administrados a 24, 48 y 72 horas respectivamente.

Se observa que todos los lotes disminuyen desde las 24 horas (T1), en el lote de 370 mg/kg sólo hay datos hasta las 48 horas (T2), porque todos los ratones mueren antes de las 72 horas.

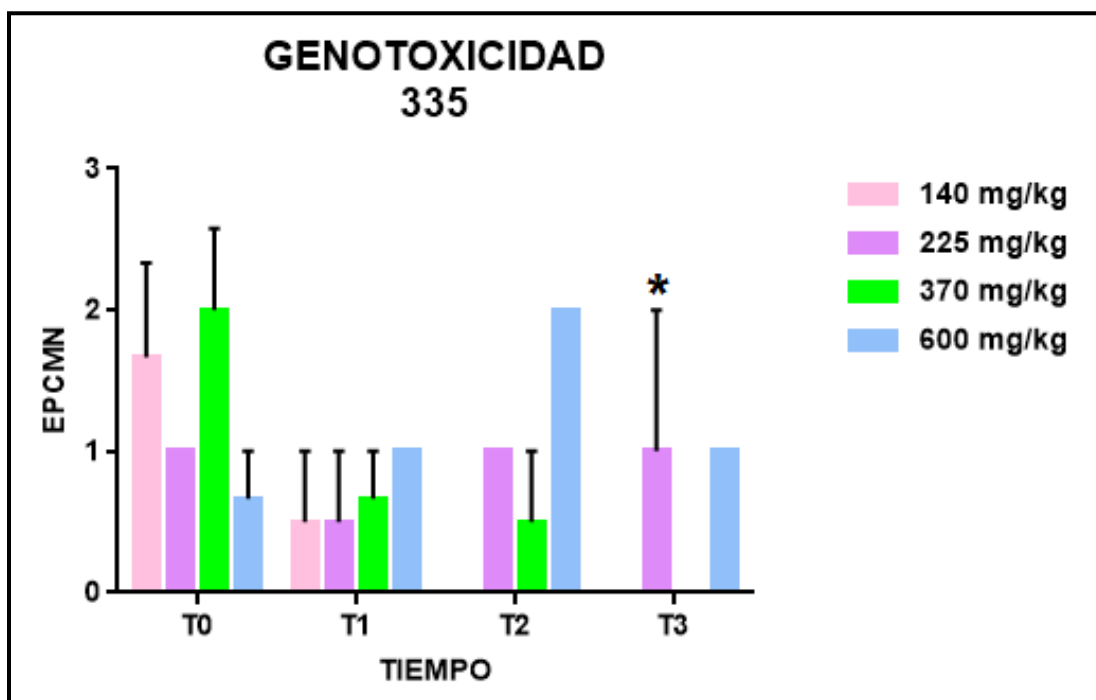


Figura 14. Frecuencia de EPCMN en 2000 células de los compuestos LQM a diferentes tiempos en relación a la dosis. Aplicando ANOVA de una vía, con una p<0.05 (0.8635) y F=1.197, considerado no significativo.

Tabla 16. EPCMN para determinar la genotoxicidad en relación al tiempo de LQM 342.

GENOTOXICIDAD	342			
	EPCMN ± SEM			
	140 mg/kg	225 mg/kg	370 mg/kg	600 mg/kg
T0	1.33 ± 0.67	1.33 ± 0.57	1.33 ± 0.57	1.33 ± 0.57
T1	2.00 ± 0.00	3.00 ± 0.00	X	X
T2	1.00 ± 1.00	0.00 ± 0.00	X	X
T3	0.33 ± 0.57	1.00 ± 0.00	X	X

En ésta tabla se observa la cantidad de EPCMN ± SEM (desviación estándar) del compuesto LQM 342, donde las X son los lotes donde se murieron todos los animales, T0 representa el lote Control y T1, T2, T3, representan los lotes administrados a 24, 48 y 72 horas respectivamente.

Se observa que los lotes de 140 y 225 mg/kg aumentan de forma considerable la cantidad de EPCMN a las 24 horas (T1) con respecto al control (T0); sin embargo, a las 48 horas disminuye nuevamente, manteniéndose hasta las 72 horas, por debajo de T0, en cuanto a los lotes 370 y 600 mg/kg sólo hay datos del control (T0), porque todos los ratones mueren antes de las 24 horas.

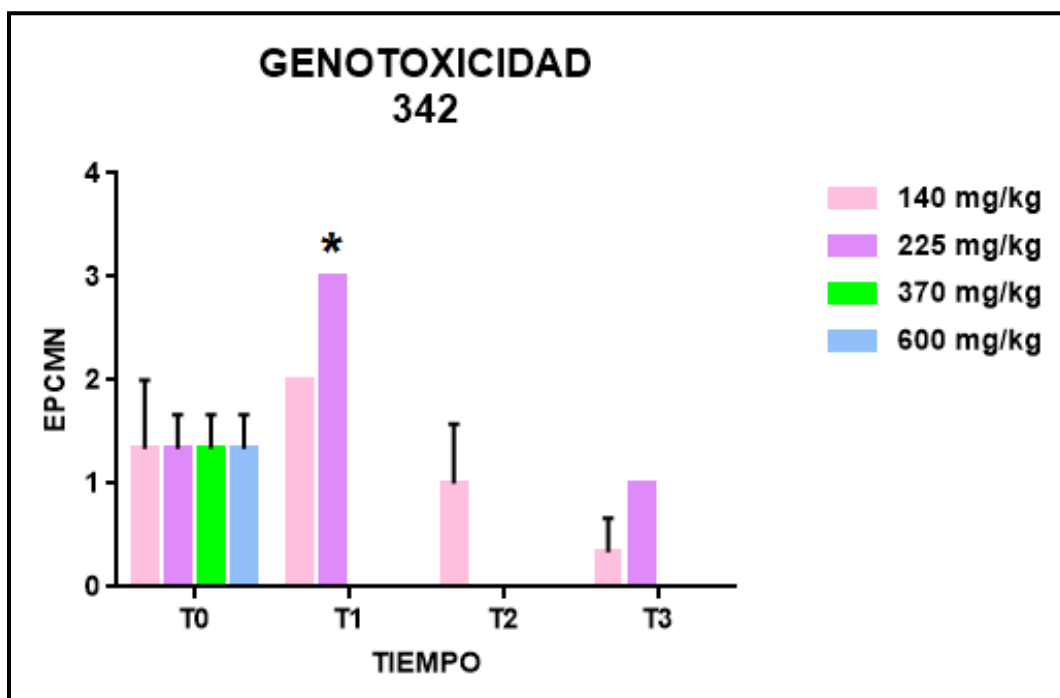


Figura 15. Frecuencia de EPCMN en 2000 células de los compuestos LQM a diferentes tiempos en relación a la dosis. Aplicando ANOVA de una vía, con una  $p < 0.05$  (0.0116) y  $F = 3.568$ , se tiene una diferencia significativa.



## DISCUSIÓN

Los compuestos LQM 308, 314, 335 y 342, son investigados ya que pretenden tener actividad antiarrítmica, cardiovascular y antihipertensiva. Es por eso que el desarrollo de éste tipo de medicamentos, es muy numeroso.

Este trabajo colabora como parte de los ensayos toxicológicos, a través de las pruebas de DL<sub>50</sub> y la Prueba de Micronúcleos *in vivo* para evaluar la Genotoxicidad y Citotoxicidad.

La mayoría de los fármacos empleados en enfermedades cardiovasculares, suelen presentarse en forma de clorhidratos, por la ventaja de ser solubles en agua (González, V., 2010).

Los compuestos LQM 308, 314 y 342 se disolvieron en HCl concentrado, excepto el LQM 335 que se disolvió en Dimetilsulfóxido (DMSO). Lo que hizo complicada la disolución del compuesto, ya que se trabajó con altas cantidades, presentando problemas de solubilidad, tanto en la preparación como en la administración, dando lugar a la precipitación o inestabilidad de la sustancia en la disolución; sin embargo no se observó ninguna influencia del disolvente durante la determinación de la DL<sub>50</sub> y la Prueba de Micronúcleos *in vivo* (Repetto J., 2009). El Dimetilsulfóxido (DMSO) es un disolvente aprótico, que interactúa con compuestos iónicos; pero al hacerlo es incapaz de formar puentes de hidrógeno con los aniones y disuelve compuestos iónicos principalmente mediante la solvatación de cationes (Morrison R., 1987).

Todos los compuestos fueron administrados por vía intraperitoneal, siguiendo el método de Lorke, al ser una vía que permite introducir la sustancia de manera directa a torrente sanguíneo de los ratones para poder observar así la DL<sub>50</sub> (Lorke, D., 1983).

Al observar la toxicidad de los compuestos LQM 300 durante las primeras 6 horas de experimentación se obtuvo que el compuesto con una menor DL<sub>50</sub> es el LQM 308 con 774.6 mg/kg, seguido por el LQM 335 con una DL<sub>50</sub> de 471.2 mg/kg y por último los LQM 314 y 342 mostraron la más alta DL<sub>50</sub> de 288.5 mg/kg cada uno.

Los fármacos antiarrítmicos corrigen alteraciones en la generación y conducción del impulso eléctrico en el miocardio. Casi todos tienen un nitrógeno básico, que puede formar sales o bien actuar como nitrógeno cuaternario y es necesario que exista un grupo o grupos aromáticos en su estructura, capaces de intercalarse con fosfolípidos una cadena alquílica de conexión en la que existan grupos funcionales capaces de asociarse por enlaces hidrógeno y un grupo amino ionizable a pH fisiológico (Velázquez S., 2007). De éste modo los compuestos de la serie LQM 300

son: monomorfolínico (LQM 308), dipiperidínico (LQM 335) y dimorfolínicos (LQM 314 y 342), por lo que si relacionamos ésta característica con su  $DL_{50}$ , podemos observar que al tener sólo un anillo de morfolina, hay una baja toxicidad, como en el caso de tener presentes dos anillos de morfolina o piperidína, donde la toxicidad es mayor (Tapia L., 2006).

Se han realizado varias investigaciones, que han demostrado la actividad sobre el sistema cardiovascular de los compuestos LQM 308, 314, 335 y 342. Por ejemplo, Tapia López en el 2006 determinó que el LQM 308 presenta un efecto hipotensor moderado sobre PAS, PAD y FC atribuido a su conformación química de un anillo de morfolina, sugiriendo que requiere de un segundo anillo en su estructura que incremente su afinidad con los receptores y de forma proporcional su potencia, dado que los compuestos que presentan dos anillos de morfolina o piperidína, así como grupos hidroxilo (OH), coadyuvan a un mayor efecto y potencia. Posiblemente la relación con su estructura, es que al no tener suficiente afinidad con los receptores y potencia no induce el deceso de los animales.

Por otra parte en el ensayo de MN las células que se evalúan son los EPC para ver saber si la sustancia de ensayo puede estar alterando la proliferación de las células eritropoyéticas. (citotoxicidad); también si dentro de los EPC hay presencia de micronúcleos, que se refiere al daño producido directamente sobre el material genético de las células, lo cual puede generar mutaciones irremediables para los mecanismos de reparación celular (Hernández, M., 2012).

En las Figuras 8 se observa que para el LQM 308 la cantidad de EPC tiende a disminuir en todas las dosis a lo largo de las 72 horas, siendo más notorio en las dosis de 370 y 600  $mg/kg$ , por lo que podemos pensar que el compuesto produce citotoxicidad conforme nos vamos acercando a su  $DL_{50}$  de 774.6  $mg/kg$ , disminuyendo la producción de EPC. Del mismo modo en la Figura 10 para el LQM 335 se tiene una disminución de EPC desde mucho antes de aproximarse a su  $DL_{50}$  de 471.2  $mg/kg$ , sobre todo a las 48 horas en todas las dosis. En cuanto al posible daño genotóxico producido por los compuestos, se tiene que en la Figura 12 se ve que la generación de EPCMN del LQM 308, tiende a disminuir a lo largo de las 72 horas, excepto para la dosis más alta de 600  $mg/kg$  que entre las 48 y 72 horas tiende a aumentar; sin embargo no es estadísticamente significativo, por lo que no se considera genotóxico.

Por otro lado en las Figuras 9 y 11 para los LQM 314 y 342 se tiene que por efecto de la  $DL_{50}$  sólo contamos con las dosis más bajas de 140 y 225  $mg/kg$  hasta las 72 horas; sin embargo es suficiente para observar que los compuestos también producen citotoxicidad sobre las proliferación de EPC al disminuir la cantidad, sobre todo a partir de las 48 horas para ambas dosis. También se sugiere que el grupo -CN del LQM 314, posiblemente bloquea los canales de  $Ca^{2+}$  incrementando los niveles de  $Na^+$  en citoplasma, lo cual puede generar hipoxia por la disminución en la distribución de

O<sub>2</sub> a los diversos tejidos para llevar a cabo su metabolismo, manifestándose con fatiga. En éste contexto, se observa que el compuesto no presenta efectos adversos a nivel terapéutico; sin embargo a dosis tóxicas fue el grupo que presentó más letargo y convulsiones con lo que posiblemente también influya en la actividad eléctrica de las células (Tapia L., 2006).

Referente a la cantidad de EPCMN en las Figuras 13 y 15 se observa que tienden a aumentar al comparar el comportamiento desde las 0 horas hasta las 24 horas y nuevamente de las 48 horas hasta las 72 horas para el caso de las dosis que mantuvimos hasta las 72 horas.

El LQM 335 de forma parecida al LQM 308 requiere de una alta concentración de compuesto 471.2 mg/kg para alcanzar su DL<sub>50</sub>; sin embargo posee en su estructura dos anillos de piperidina, lo cual si lo hace citotóxico al observar en la Figura 10 que disminuye a las 48 horas la producción de EPC de manera importante; sin embargo si observamos la Figura 14 se observa el efecto genotóxico llega a suprimirse totalmente a la dosis más baja de 140 mg/kg y a la dosis mayor de 600 mg/kg también disminuye la presencia de EPCMN aunque en menor medida (Hernández A., 2012). En tanto a la actividad cardiovascular del LQM 335, Castillo García en el 2008 encontró que disminuye la contracción auricular inhibiendo por completo el efecto contráctil de la fenilefrina sobre la aurícula derecha, ese mismo año Rosas González., observó que disminuye en un rango mayor al 50% la FC. Más tarde en el 2012 López Pacheco y Palma Anguiano determinaron que presenta un efecto vasodilatador, disminuyendo significativamente la contracción muscular en las aortas torácica y abdominal y Aguilar Hdz escribió que es estable, tanto en medio ácido como básico.

Mondragón García en el 2009 encontró que ambos LQM 314 y 335 disminuyen la contracción de las aortas torácica y abdominal, siendo el 314 más potente; también sugiere que el LQM 335 al ser dipiperidínico y poseer dos sustituyentes –OH, favorecen el efecto vasodilatador. Más tarde en el 2012 Hernández Anaya escribió que el LQM 335 no es genotóxico y si antígenotóxico a concentraciones de 5, 10 y 20 mg/kg. Por otra parte, Rosas González se refiere al LQM 342 como derivado de la reducción del compuesto LQM 341, resultando en una amina terciaria que tiene una carga positiva, la cual se estabiliza con un ion de yodo, sugiriendo que a pesar de presentar dos anillos de morfolina y un sustituyente hidroxilo no es capaz de presentar efecto farmacológico, debido a que moléculas que exhiben carga tienen dificultad para ello; sin embargo se observó que en relación a los anillos de morfolina, al tenerlos en su estructura, le confiere gran estabilidad, aunque se considera que al tener un nitrógeno como sustituyente, ya sea en forma de amina o de nitrilo se caracterizan por ser muy tóxico con la más baja concentración de compuesto para alcanzar la DL<sub>50</sub> y con signos en los ratones de mucho letargo y convulsiones.

## **CONCLUSIONES**

Se considera que la característica del LQM 308 de poseer un solo anillo de morfolína, evita que interactúe adecuadamente con su receptor disminuyendo su efecto tóxico ya que es necesaria una alta concentración de compuesto para alcanzar su  $DL_{50}$ ; sin embargo, sí, se considera citotóxico al disminuir la producción de EPC; pero sin la generación de micronúcleos.

Los LQM 314 y 342 no solo comparten coincidencia de tener presentes dos anillos de morfolína, sino también su carácter tóxico, citotóxico y genotóxico. Al mencionar antes que la presencia de dos anillos morfolínicos podría incrementar la afinidad de la molécula por el receptor, se considera afirmativo por los resultados arrojados por éste par de compuestos.

Por último el LQM 335 de origen piperidínico con dos anillos en su estructura lo hace citotóxico, por disminuir la proliferación de EPC pero no tóxico ni genotóxico al no inducir la formación de micronúcleos y al necesitar una alta dosis de compuesto para alcanzar su  $DL_{50}$ .

Se ve que la estructura que presentan los compuestos si es muy importante, debido a que de ésta dependen tanto su afinidad como su capacidad de interactuar con el medio solvente y también de los efectos que tienen sobre el organismo al que se le administra.

## **PERSPECTIVAS**









Los Cambios demográficos, epidemiológicos y económicos han transformado a la industria farmacéutica, la población está envejeciendo en algunos continentes mientras que en otros la mayor parte de la población es joven, lo que genera diferentes necesidades para mercados específicos.









La población mundial tiene un crecimiento proyectado a 7.6 billones en 2020, del cual el 9.4% serán mayores de 65 años los cuales consumen mayor cantidad de medicamentos. Por otra parte se estima que en el 2025 aproximadamente 1 billón de personas sufran de hipertensión en países en vías de desarrollo, lo que ocasiona que los productos farmacéuticos estén enfocados a este tipo de enfermedades (Sierra R., 2010).












En México, la mejora de las condiciones sanitarias y atención a la salud que ocurrieron en los últimos 60 años, trajo como resultado que la esperanza de años de vida al nacer en el año 2015 sea de 72.34 en hombres y 77.68 en mujeres y para el 2050 de estima que sea de 77.34 para hombres y 81.60 en mujeres, mientras que la tasa de natalidad disminuya de 18.52 en el 2015 a 13.85 en el 2050 por cada 1000 mexicanos; esto genera un cambio en la distribución etaria del país (Consejo Nacional de Población CONAPO).

Los modelos económicos sugieren que el grupo denominado como el de economías emergentes (E7), al cual pertenece México invertirán 15.7 trillones de dólares en el 2020 para el tratamiento de cardiopatías por ser países que están envejeciendo rápidamente (Sierra R., 2010).












## REFERENCIAS





-  AGUILAR H. A. (2012). Estudio de la interacción química del compuesto LQM 314 con el ion metálico Cu (II). Tesis de Licenciatura en Química Industrial. FES Cuautitlán.
-  ÁLVAREZ P. R. (2007). Efecto de los compuestos morfolínicos y tiomorfolínicos sobre la frecuencia cardíaca y el intervalo P R en rata anestesiada Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.
-  ARAUJO S. A. (2009). Estudio de la naturaleza de las gemaciones de cromatina producidas en respuesta a una agresión química. Tesis de Maestría. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.
-  ARENCIBIA A. D., et al. (2011). Frecuencia espontánea e inducida de micronúcleos transplacentarios en ratones Balb/c. Revista Electrónica Nova Scientia, N° 6 Vol. 3 (2), pp: 01 – 15.
-  ATILANO A. A. (2007). Evaluación de daño genotóxico, citotóxico y citostático inducido por Casiopeína Ilgly en cultivos de linfocitos humanos. Tesis de Licenciatura en Biología. FES Zaragoza. pp 15-16.
-  BRIONES B. C. (2009). Determinación de la actividad hipotensora de los compuestos morfolínicos (LQM-302, LQM-312), tiomorfolínicos (LQM-324, LQM-337,) y piperidínicos (LQM-335, LQM-336, LQM-344, LQM-344), en rata Wistar anestesiada. Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.
-  CASTILLO G. P. (2008). Determinación del efecto de 6 compuestos morfolínicos (LQM-308, LQM-309, LQM.310, LQM-312, LQM-313 y LQM-314) y 6 compuestos tiomorfolínicos (LQM-318, LQM-319, LQM-320, LQM-321, LQM-324 y LQM-332) sobre la contracción de la aurícula derecha de rata Wistar macho joven. Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.
-  CONAPO. Proyecciones de la población 2010-2050. <http://www.conapo.gob.mx/es/CONAPO/Proyecciones>

-  CORDOVA R. y RODRÍGUEZ Z. (2010). Determinación del efecto de los compuestos morfo, dimorfo, monotiomorfo y ditiomorfolínicos en arritmias post infarto miocárdico. Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.
-  CORREA B. A. (2011). Análisis histológico de aorta de rata Wistar hipertensa inducida con sal e hipertensa espontánea y estudio de corazones infartados con LQM (302, 308, 310, 312, 313, 318, 319, 341, 342 y 345). Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.
-  DELGADO C. A. et al. (2004). Introducción a la Química Terapéutica. 2ª ed. Ediciones Díaz de Santos S.A. Madrid, España. pp. 100-119.
-  GONZÁLEZ V. R. (2010). Síntesis de compuestos derivados del fenol metilpiperidin con probable actividad cardiovascular, utilizando infrarrojo como fuente de energía. Tesis de Licenciatura en Química Industrial. FES Cuautitlán.
-  HERNÁNDEZ A. B. (2012). Evaluación antigenotóxica del compuesto LQM 335 mediante el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratones CD1. Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.
-  HERNÁNDEZ M. C. (2012). Evaluación del efecto genotóxico y citotóxico del compuesto coordinado de cobre LQM 402 mediante el ensayo de micronúcleos *in vivo*. Tesis de Licenciatura en QFB a. FES Cuautitlán.
-  LÓPEZ G. A. (2012). Evaluación de daño genotóxico y citotóxico por exposición simultánea a cloroformo, diclorometano y tolueno y su relación con el metabolismo de fase II en rata. Tesis de Licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias UNAM.
-  LÓPEZ J. N. y HERNÁNDEZ C. A. (2008). Efecto de los compuestos Morfolínicos (LQM 301, 302, 304, 308, 309, 310) y Tiomorfolínicos (LQM 318 319 320 y 322) en Rata Hipertensa Espontánea Consciente. Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.

-  LOPEZ P. D. y PALMA A. M. (2012). Determinación del efecto de los compuestos morfólinicos (LQM 301 LQM 302, LQM 304, LQM 307, LQM 309, LQM 312, LQM 313 y LQM 314) tiomorfolínicos (LQM 318, LQM 319, LQM 324, LQM 328, y LQM 343) y piperidínicos (LQM 335, LQM 336 y LQM 345) en aorta de rata hipertensa espontánea en presencia de CaCl<sub>2</sub> como agente vasoconstrictor. Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.
-  LORKE D. (1983). A new approach to practical acute toxicity testing. Arch Toxicol. 54; 275-287.
-  LÜLLMANN, H. (2010). FARMACOLOGÍA. *Texto y atlas*. 6ª edición. Editorial Médica Panamericana. México. pág. 8.
-  MAGOS G.G. (2009). Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. Rev. Fac. Med. UNAM Vol. 52 No. 6.
-  MENDOZA P. N. (2008). Farmacología Médica. 1ª ed. Editorial Médica Panamericana. México. pp 139-145.
-  MONDRAGÓN G. M. (2009). Determinación del efecto de los compuestos morfólinicos (LQM 313, LQM 314, LQM 341 y LQM 352), tiomorfolínicos (LQM 318, LQM 324 y LQM 401) y piperidínicos (LQM 335, LQM 336 y LQM 345), en aorta torácica y abdominal de rata hipertensa espontánea. Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.
-  MORRISON R. T. (1987). Química Orgánica. 2ª ed. Editorial. Addison-Wesley Iberoamericana S.A. México. pp. 34 y 248.
-  MÜLLER W. U., STREFFER C. (1994). Micronucleus assays. En: Obe, G. (Ed.). Advances in Mutagenesis Research 5. Springer, Berlin. pp. 1-108.
-  OMS <http://www.who.int/countries/mex/es/>
-  OMS Enfermedades Cardiovasculares <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>
-  PENICHE T. A. (2011). La quimio informática, una herramienta eficiente para desarrollar los medicamentos del futuro. Revista TEORÍA Y PRAXIS INVESTIGATIVA. Vol. 6; No. 1; 77-86.



-  PEREYRA M. P. (2010). Efectos genotóxicos de los compuestos de Cromo (III) y (VI) en el ratón CD-1 *in vivo*. Tesis de Licenciatura en Biología. FES Zaragoza.
-  PÉREZ C. L. (2010). Estudio comparativo del ABC del efecto temporal antihipertensivo de los compuestos morfolínicos, tiomorfolínicos y piperidinicos con Captopril y Losartán. Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.
-  REPETTO J. M. (2009). Toxicología Fundamental. 4ª ed. Ediciones Díaz de Santos. España. pp. 82 y 413.
-  ROCHA E, Y. (2008). Estudio genotóxico mediante la prueba de micronúcleos del compuesto tiomorfolínico LQM 319. Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.
-  ROJAS O, F. (2008). Evaluación de la capacidad genotóxica del compuesto tiomorfolínico LQM 319 mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel *in vivo*. Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.
-  ROSAS R. G. (2008). Evaluación del efecto hipotensor de los compuestos LQM en el modelo de presión arterial invasiva en rata Wistar. Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.
-  RUIZ G. Y. (2009). Guía para la validación en la industria farmacéutica de acuerdo a los lineamientos establecidos en la NOM-059 y el CFR 21 parte 11. Tesis de Licenciatura en Ingeniería Química. Facultad de Química. UNAM.
-  SÁNCHEZ G. M. (2012). Historia de la Medicina y Humanidades Médicas. 2<sup>da</sup> edición. Editorial. Elsevier Masson. España pp 460.
-  SIERRA DÍAZ RAFAEL A. (2010). Diseño de una estrategia de productividad para el área de operaciones de una industria farmacéutica mexicana. Tesis de Maestría. IPN.
-  SHARAPIN N. (2000). Fundamentos de tecnología de productos Fitoterapéuticos. 1ª edición. Editado por CYTED. Colombia pág. 196.
-  STOUT D. M., et al. (1985). Synthesis and antiarrhythmic and parasympholyc properties of subsistuted phenols. 3 Modifications to the linkage region (region 3). J. Med. Chem.; 28(3); 295-298.

-  TAPIA L. M. (2006). Determinación del efecto hipotensor de la serie de compuestos diseñados por computadora dimorfolínicos y tiomorfolínicos. Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.
-  TERRADAS M., et al. (2010). Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? Mutation research 705 (1); 60-67.
-  VELÁZQUEZ S. A. (2007). Diseño asistido por computadora, síntesis y actividad antihipertensiva de derivados morfolínicos de fenol. Tesis de Doctorado. Posgrado Ciencias Químicas. UNAM.
-  VILLEGAS F. M. (2005). Determinación de la actividad hipotensora de los compuestos dimorfolínicos en rata anestesiada. Tesis de Licenciatura en QFB. FES Cuautitlán.

**ANEXO****CONSTANCIA DE SANIDAD DE LOS RATONES CD1**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
IZTACALA  
BIOTERIO GENERAL**  
Av. de Los Barrios No. 1, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla,  
Edo. Mex.



**A QUIEN CORRESPONDA  
PRESENTE**

Por medio de la presente le informo que los ratones CD-1 son mantenidos bajo condiciones en las cuales todo el material que entra en contacto con ellos es esterilizado. No presentan ningún signo aparente de enfermedad y la colonia fue sometida a tratamiento contra parásitos internos y externos hace dos meses.

Se extiende la presente para los fines que al interesado convengan.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**

Los Reyes Iztacala a 16 de noviembre del 2011.

**MVZ. MA. LETICIA FLORES SANCHEZ**  
**RESPONSABLE DEL BIOTERIO GENERAL**  
**FES Iztacala 56231270**