



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**“Efecto genotóxico y citotóxico de nuevos compuestos quinolínicos
(quinazolinas MLB01, MLB02 y MLB13) en sangre periférica
de ratones: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

ESTEFANI YAQUELIN HERNÁNDEZ CRUZ

DIRECTOR DE TESIS:

DRA. MARÍA DEL CARMEN GARCÍA RODRÍGUEZ



CIUDAD DE MÉXICO, AGOSTO, 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

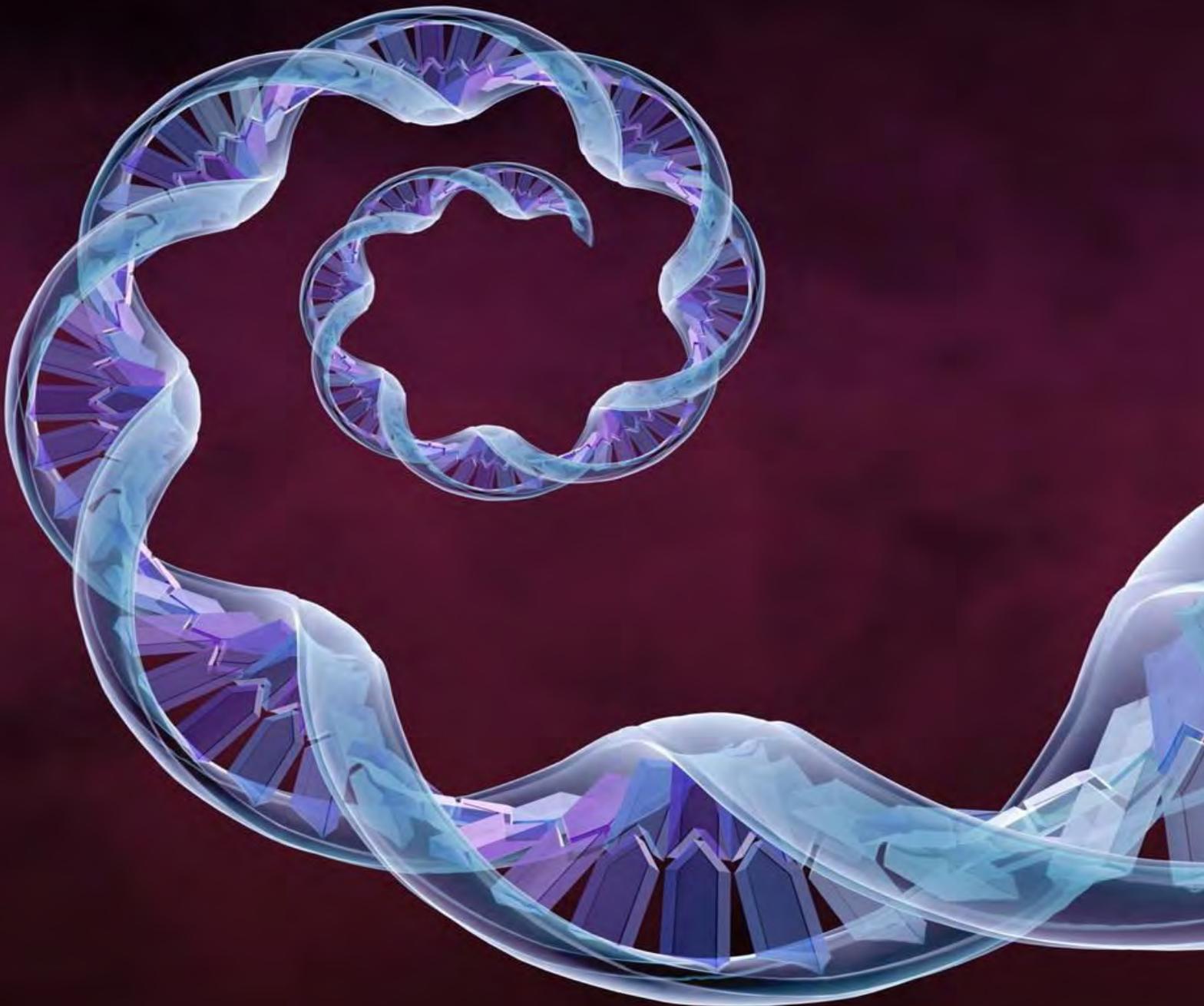
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

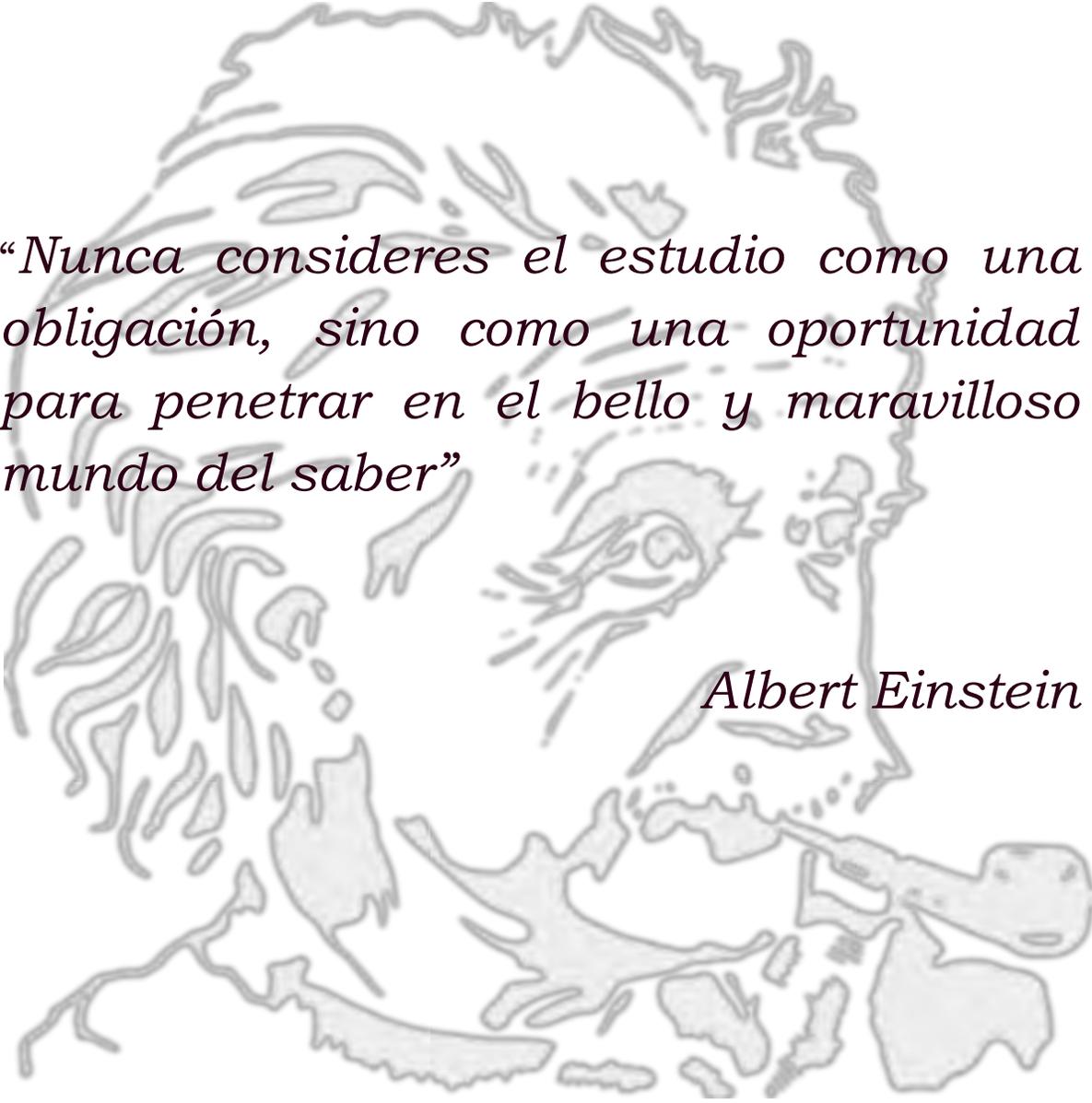
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

Este trabajo se realizó en el Laboratorio de Antimutagénesis, Anticarcinogénesis y Antiteratogénesis de la Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), de la Facultad de Estudios Zaragoza, UNAM. El proyecto de investigación se realizó en colaboración con el Departamento de Farmacia de la Facultad de Química, UNAM.

El proyecto fue financiado por la DGAPA mediante el programa PAPIIT-IN219216; IN217712 y por CB-SEP-CONACyT 220664.





“Nunca consideres el estudio como una obligación, sino como una oportunidad para penetrar en el bello y maravilloso mundo del saber”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi más cordial agradecimiento a la Dra. María del Carmen García Rodríguez por su apoyo, confianza, paciencia y sabiduría brindada durante el trayecto de la realización de esta tesis.

Gracias a la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza” por enseñarme que la biología es un arte, que muchos pueden hacer pero pocos tenemos la vocación.

Gracias a mi hermosa casa de estudios Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) que me albergó durante mis años de formación.

Agradezco a los miembros del jurado por sus valiosos comentarios y sugerencias:

*Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano
Dra. María del Carmen García Rodríguez
M. en E.S. María Cristina Alvarado Domínguez
Dr. Juan José Rodríguez Mercado
M. en C. Rodrigo Aníbal Mateos Nava*

DEDICATORIAS

Con toda mi gratitud y cariño:

A Dios:

Por la sabiduría para descubrir lo correcto, la voluntad para elegir y la fuerza para que perdure.

A mis padres:

Que como guerreros me han guiado por el camino de la vida, apoyándome en todo momento, con sus consejos, sus valores, pero más que nada con su amor. Deseo de todo corazón que mi triunfo como mujer y profesionalista lo sientan como el suyo propio.

A mis hermanos:

Por su apoyo, cariño y por estar a mi lado en los momentos más importantes de mi vida. Gracias por ser mi constante motivación.

A mis sobrinos:

Porque con sus sonrisas me recuerdan que nunca se deja de ser niño.

A mis abuelos:

Por sus enseñanzas, por los mensajes de aliento y por su manera de instruirme para afrontar las verdades de esta vida. Y especialmente gracias a mi ángel de la guardia Elia Martínez por creer siempre en mí.

Te amo abue.

A tí:

Por ser mi felicidad, por estar a mi lado en todo momento y por ser parte de esa fuerza que me impulsa a seguir adelante. TE AMO

A mi cuñado, tías y primos:

Por el apoyo y cariño que me han brindado siempre.

A mis amigos:

Que nos apoyamos mutuamente en nuestra formación profesional y que hasta ahora seguimos siendo amigos: Paula, Wendy, Misael, Jaqueline, Johen, Wow, Mateo, Vago, Betito, Raquel, Nadia, Pirru, Rodrigo, Adriana, Fercho, Enrique, Richi, Orlando, Yetsubeli, Isaac (abue), Diego, Nava, Any, Kary, Gaby y Angy.

A mis compañeros de laboratorio:

Por su amistad, paciencia, apoyo y sabiduría que me han brindado: Lulú, Tona, Gaby, Javier y Julio.

ÍNDICE

	Pág.
RESUMEN	I
ÍNDICE DE ABREVIATURAS	II
I. INTRODUCCIÓN	1
1. Alcaloides	2
2. Alcaloides quinolínicos	2
3. Quinina	3
4. Quinazolininas	4
5. Antecedentes de TAQ	6
6. Antioxidantes	7
7. Estrés oxidante	7
8. Pruebas y ensayos para evaluar genotoxicidad	8
9. Micronúcleos	9
10. Apoptosis y necrosis	10
11. Evaluación de viabilidad y muerte celular	13
II. JUSTIFICACIÓN	14
III. HIPÓTESIS	14
IV. OBJETIVOS	15
1. General	15
2. Particulares	15
V. MATERIAL Y MÉTODO	16
1. Animales	16
2. Reactivos	16
3. Diseño Experimental	17
3.1. Tratamientos	17
3.2. Establecimiento de las dosis	17
3.3. Tiempos de evaluación	18

4.	Micronúcleos.....	19
4.1.	Preparación de laminillas	19
4.2.	Obtención de sangre periférica.....	20
4.3.	Evaluación de MN.....	20
5.	Apoptosis y viabilidad celular.....	20
5.1.	Preparación del colorante y muestras.	20
5.2.	Evaluación de apoptosis y viabilidad celular	21
6.	Análisis estadístico	21
VI.	RESULTADOS	23
1.	Toxicidad	23
2.	Evaluación de daño genotóxico MN.....	24
3.	Evaluación de apoptosis y necrosis	33
4.	Evaluación del daño citotóxico.....	35
3.1.	Relación EPC/ENC.....	35
3.1.	Viabilidad celular	37
VII.	DISCUSIÓN.....	39
VIII.	CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES.....	44
IX.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
X.	ANEXOS	52

RESUMEN

Las 2,4,6-triaminoquinazolininas (TAQ), son nuevos compuestos quinólicos que han sido sintetizados en la Facultad de Química (UNAM) con el propósito de potenciar sus efectos terapéuticos, así como conferirles propiedades antioxidantes. En estudios *in vitro* realizados con las primeras TAQ se observó que eran capaces de proteger de los efectos de la malaria y la leishmania, además de presentar una baja toxicidad. En este estudio se evaluó la genotoxicidad y citotoxicidad *in vivo* de tres tipos de TAQ (MLB01, MLB02 y MLB13). Grupos de seis ratones hembra y macho de la cepa Hsd: ICR fueron divididos al azar en los siguientes grupos: a) Testigo 1, se les administró 0.25 ml de agua inyectable, b) Testigo 2, se les administró dimetilsulfóxido (DMSO) al 11.5%, c) Grupos de TAQ se les administró una dosis de MLB01, MLB02 y MLB13 (10 mg/Kg) por vía i.p., y d) Testigo positivo, se les administró en dosis única 20 mg/Kg de CrO₃ vía i.p. Para la evaluación del daño genotóxico se empleó el ensayo de micronúcleos (MN) en eritrocitos policromáticos (EPC) de sangre periférica, las muestras se tomaron de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la administración de los tratamientos. También se evaluaron las frecuencias de EPC respecto a los eritrocitos normocromáticos (ENC). Para el análisis de apoptosis y viabilidad celular se empleó la tinción diferencial con naranja de acridina/bromuro de etidio (NA/BrEt), las muestras de sangre se tomaron solo a las 48 horas. Los resultados mostraron que la administración de las TAQ no produce toxicidad ni genotoxicidad en los grupos de machos y hembras. Aunque la TAQ MLB01 aumentó ligeramente la frecuencia de MN, este incremento está dentro de los rangos aprobados por las agencias reguladoras, por lo que se sugiere que dicho efecto podría deberse a un efecto indirecto y no propiamente a un daño genotóxico. La TAQ MLB02 disminuye las frecuencias basales de MN e incrementa las células apoptóticas, lo que nos permite sugerir a la apoptosis como la posible vía de eliminación de las células dañadas. En cuanto a la citotoxicidad, la TAQ MLB01 tanto en hembras como en machos y la TAQ MLB02 en machos disminuyen las células viables. En el grupo testigo positivo (CrO₃), como se esperaba se indujo daño genotóxico y citotóxico. Con base a los resultados obtenidos se puede sugerir que las TAQ presentan grandes expectativas para continuar los estudios con la finalidad de su aplicación terapéutica en el tratamiento de malaria y leishmania.

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
BrEt	Bromuro de etidio
CrO ₃	Trióxido de cromo
DIF	Frecuencia diferencial de inducción de MN (por sus siglas en inglés)
DMSO	Dimetilsulfóxido
ECETOC	“European Centre for Ecotoxicology of Chemicals”
ENC	Eritrocitos normocromáticos
EOx	Estrés oxidante
EPA	“Environmental Protection Agency”
EPC	Eritrocitos policromáticos
ERO's	Especies reactivas de oxígeno
FDA	“Food and Drugs Administration”
H2	N6- (metil ferroceno) 2, 4, 6-triaminoquinazolina
HPβCD	2-hidroxipropil-β-ciclodextrina
i.p.	Intraperitoneal
M4	N6- antiplasmodial (4-metoxibencil) 2, 4, 6-triaminoquinazolina
MN	Micronúcleo (s)
MTD	Dosis máxima tolerada
NA	Naranja de acridina

NIF	Frecuencia de inducción neta de MN (por sus siglas en inglés)
PBS	Buffer fosfato salino (por sus siglas en inglés)
RL	Radicales libres
RNA	Ácido ribonucleico
TAQ	2,4,6-triaminoquinazolininas

I. INTRODUCCIÓN

La ciencia orgánica busca la construcción o síntesis de moléculas, que presenten efectos o mayor actividad en tratamiento y prevención de diferentes enfermedades. Una de las familias de alcaloides más estudiada, debido a sus propiedades farmacológicas es la de los compuestos quinolínicos (Kouznetsov *et al.*, 2005). Dentro de estos compuestos podemos encontrar a la quinina, la cual es conocida por ser un agente antimalárico; pero en concentraciones altas llega a ser toxica (Howard *et al.*, 2003). En el departamento de Farmacia de la Facultad de Química en la UNAM, dirigido por el Dr. Francisco Hernández Luis, se han sintetizado nuevos compuestos derivados de las quinazolininas, específicamente de 2,4,6-triaminoquinazolina (TAQ), basándose en la estructura química de los compuestos quinolínicos, con el propósito de disminuir su toxicidad. También, a estos nuevos compuestos se les han agregado grupos funcionales con la finalidad de conferirles un efecto antioxidante. En pruebas que se realizaron con los primeros derivados de TAQ se obtuvieron resultados prometedores, ya que *in vitro* fueron capaces de proteger de los efectos de la malaria y la leishmania (Rojas *et al.*, 2012; Mendoza *et al.*, 2015).

Para el uso clínico de un nuevo compuesto, se deben seguir una secuencia de estudios, tanto químicos, bioquímicos, como toxicológicos, dentro de este último se encuentran las evaluaciones de daño al material genético (genotoxicidad) (Müller *et al.*, 1999). Una de las pruebas recomendadas por las diferentes agencias reguladoras alrededor del mundo para evaluar genotoxicidad, es la evaluación de micronúcleos (MN) *in vivo*. El propósito de este ensayo, es identificar sustancias que causan daño citogenético. Aunado a estas pruebas es recomendable realizar evaluaciones de citotoxicidad (Heddle *et al.*, 1983; Mavournin *et al.*, 1990; Krishna *et al.*, 1992, 1998; Müller *et al.*, 1999). De ahí que en el presente estudio se estudió la inducción de MN, la apoptosis y la viabilidad celular de los nuevos compuestos quinolínicos (quinazolininas MLB01, MLB02 y MLB13) sintetizados en la Facultad de Química (UNAM), con la finalidad de obtener información sobre sus efectos genotóxicos y citotóxicos.

1. Alcaloides

La diversidad estructural y la variedad en la actividad biológica de los alcaloides hacen de este grupo, uno de los más importantes entre las sustancias naturales de interés terapéutico. Gran número de medicamentos se han obtenido de plantas que contienen alcaloides, estos se han aislado principalmente en plantas superiores (Evans, 2000). No existe una definición exacta para los alcaloides, pero se puede considerar como: “Un compuesto orgánico de origen natural (generalmente vegetal), nitrogenado (el nitrógeno se encuentra generalmente intracíclico), derivados generalmente de aminoácidos, de carácter más o menos básico, de distribución restringida, con propiedades farmacológicas importantes a dosis bajas y que responden a reacciones comunes de precipitación” (Paris y Hurabielle, 1981; Evans, 2000). Una de las familias de alcaloides más estudiada, debido a sus propiedades farmacológicas es la de los compuestos quinolínicos, ya que sus derivados pueden actuar como agentes analgésicos, hipertensores, amebicidas, virucidas, entre otros (Kouznetsov *et al.*, 2005).

2. Alcaloides quinolínicos

Los compuestos quinolínicos o alcaloides quinolínicos, son aquellos en los que dentro de su estructura se encuentra presente un núcleo de quinolina (Figura 1). Los compuestos quinolínicos tanto naturales como sintéticos son de gran interés debido a su amplio rango de actividades biológicas (Kouznetsov *et al.*, 2005).

Los alcaloides aislados de la corteza de la quina son de los compuestos quinolínicos más empleados, sus extractos fueron introducidos como agentes médicos en el siglo XVII en Europa, cuando la condesa de Chinchón fue tratada y curada de malaria en el año 1638 (Epperson *et al.*, 1995). El análisis detallado del extracto de quina permitió a los químicos identificar más de 20 alcaloides, de los cuales la quinina, es una de las sustancias de mayor actividad biológica (Kouznetsov y Palma, 1997).

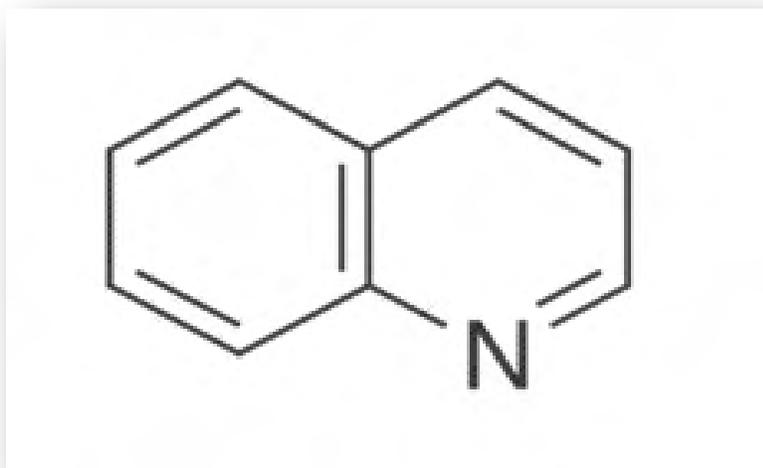


Figura 1. Estructura química de la quinolina (Heterocyclic Chemistry, 2001).

3. Quinina

La quinina fue aislada en 1820 de la corteza del árbol *Cinchona officianilis* por los científicos franceses Pelletier y Caventou y desde entonces se ha convertido en parte integral del desarrollo de la química orgánica y la medicina (Stork *et al.*, 2001). Es utilizada como un agente antimalárico, en el tratamiento de trastornos musculares y en diversas infecciones. Debido a sus propiedades antipiréticas, antisépticas y analgésicas; también es un componente de diversas formulaciones farmacéuticas; además de utilizarse por las industrias cosméticas y de forma ilegal para adulterar cocaína y heroína (Howard *et al.*, 2003). Aproximadamente el 60% de cortezas de *Cinchona* se utiliza en la producción de medicamentos y el 40% restante se utiliza principalmente en la industria de alimentos y bebidas, siendo el mayor producto las aguas tónicas (sabor amargo). También se utilizan estos alcaloides en síntesis de moléculas quirales (Verpoorte, 1988). La quinina presenta un alto grado de toxicidad, en dosis terapéuticas o excesivas, con: trastornos gastrointestinales, visuales, auditivos, cardiovasculares y neurológicos; así como cefaleas, confusión, coma, ceguera e incluso psicosis (síndrome de cinchonismo) (Howard *et al.*, 2003).

Debido a la toxicidad que puede provocar la quinina, se ha iniciado la síntesis de nuevos agentes, más efectivos y menos tóxicos, que tengan como base estructural el sistema quinolínico, siendo derivados de quinazolina los compuestos más prometedores (Davoll *et al.*, 1972; Bhattacharjee *et al.*, 2004; Mishra *et al.*, 2009; Verhaeghe *et al.*, 2009; Kabri *et al.*, 2010).

4. Quinazolininas

Las quinazolininas están formadas por un núcleo aromático bicíclico (Figura 2a), constituido, a su vez, por un anillo de benceno y un anillo de pirimidina (Cavalli *et al.*, 2009). Actualmente las quinazolininas son consideradas estructuras privilegiadas porque forma parte del esqueleto base de varias moléculas que son de uso terapéutico (Rosowsky *et al.*, 1991). Su principal uso se encuentra en el campo de la medicina donde es empleado como agente contra la malaria y en tratamientos contra el cáncer. Adicionalmente los derivados de quinazolina ayudan en el tratamiento de enfermedades neurodegenerativas como el Parkinson ya que se ha demostrado que este compuesto es un neuroprotector en cultivos primarios de soporte universal o líneas celulares dopaminérgicas (Wang D y Gao F, 2013). Dado el importante papel que han adquirido las quinazolininas estos últimos años, el departamento de Farmacia de la Facultad de Química en la UNAM, dirigido por el Dr. Francisco Hernández Luis, se dio a la tarea de sintetizar compuestos derivados de las quinazolininas, particularmente de la 2,4,6-triaminoquinazolina (TAQ) (Figura 2b), a las cuales, se les ha agregado grupos funcionales que podrían llegar tener algún efecto antioxidante. Esta modificación química lograra que estos compuestos puedan disminuir su toxicidad en los tratamientos clínicos y a su vez presentar propiedades antioxidantes contra el estrés oxidativo. En la Figura 3 se muestran las estructuras químicas de las TAQ sintetizadas.

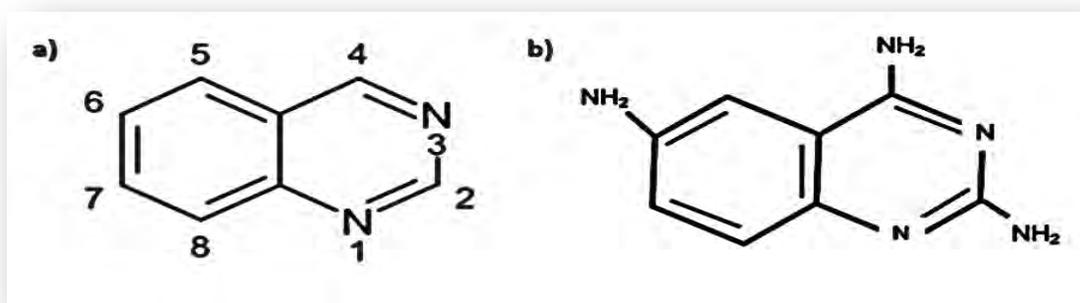


Figura 2. Estructuras químicas. a) Quinazolina b) 2,4,6-triaminoquinazolina (TAQ).

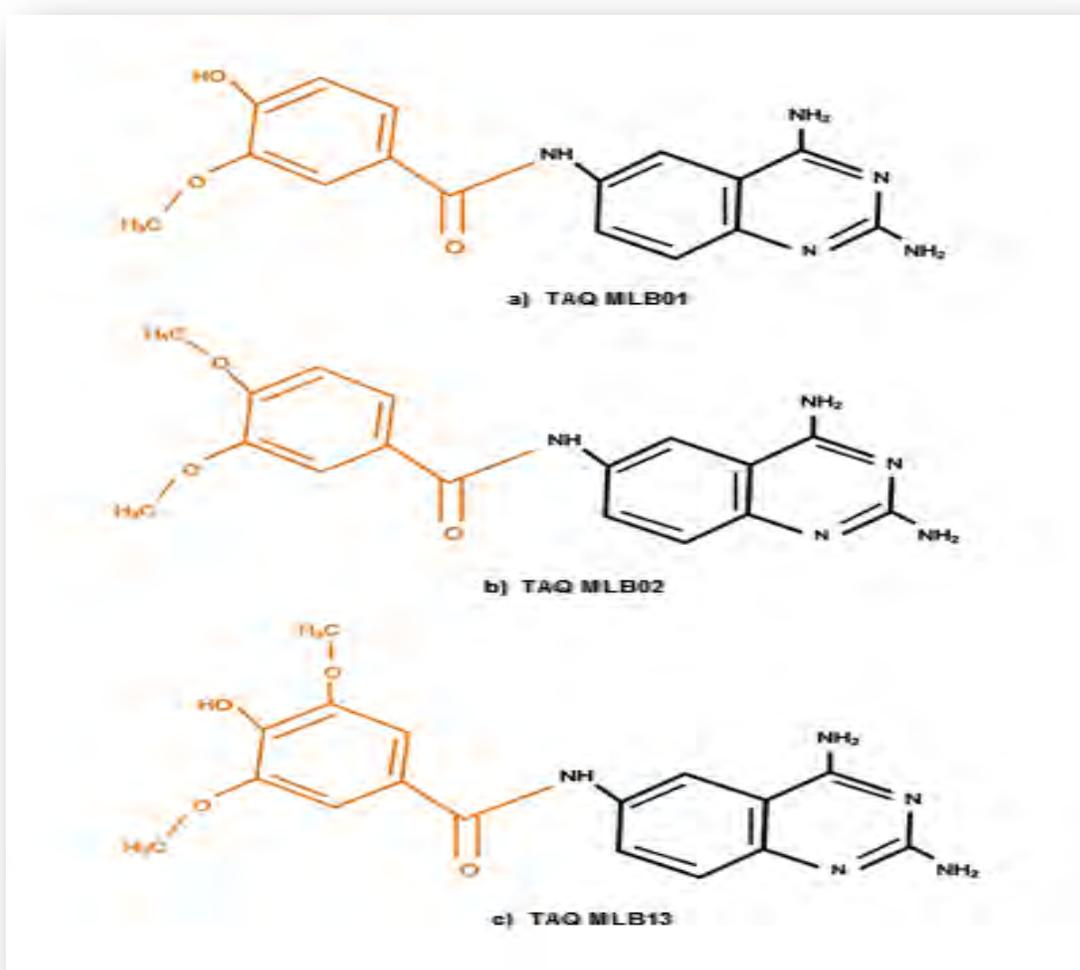
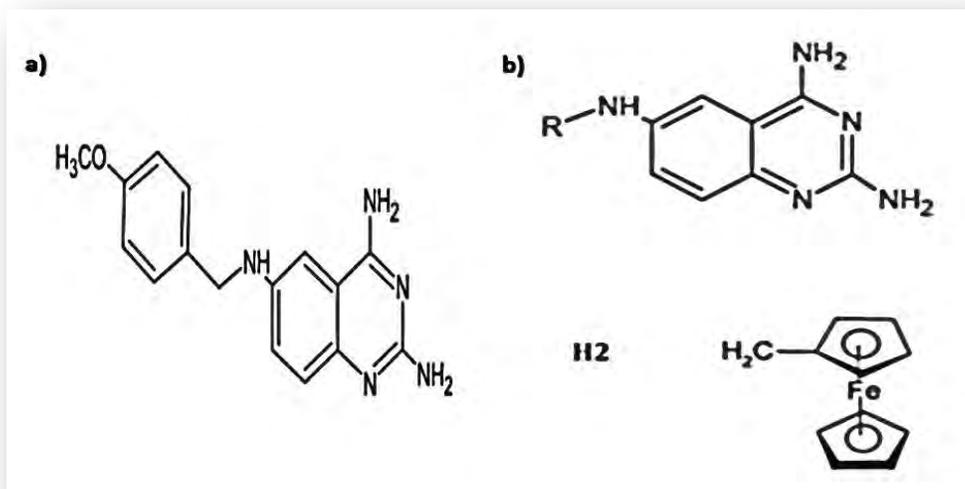


Figura 3. Estructuras químicas de los derivados de TAQ. En color naranja se muestran los grupos antioxidantes que fueron agregados.

5. Antecedentes de TAQ

Anteriormente el Dr. Francisco Hernández Luis de la Facultad de Química (UNAM), probó *in vitro* derivados de TAQ como tratamientos en la malaria y la leishmania. En particular contra la malaria se utilizó N6- antiplasmodial (4-metoxibencil) 2, 4,6-triaminoquinazolina (M4) (Figura 4a), en un complejo de inclusión a 2-hidroxiopropil- β -ciclodextrina (HP β CD). Los resultados indicaron que M4 / HP β CD actúa principalmente con el prospecto exterior de la membrana en eritrocitos humanos, donde se perturba las cadenas de lípidos y de péptidos, esto aumenta la hidratación de las interfaces de lípido-proteína en el interior de la membrana donde este compuesto es capaz de penetrar. Esto dio una fuerte razón para considerar M4/HP β CD una solución prometedora para el tratamiento de la malaria (Rojas *et al.*, 2012). Mientras que, para combatir la leishmania, se utilizaron una serie de cinco tipos de TAQ las cuales se sintetizaron y evaluaron. Entre ellas, la N6- (metil ferroceno) 2,4,6-triaminoquinazolina (H2) (Figura 4b) que mostró actividad en promastigotes y amastigotes intracelulares, así como una baja citotoxicidad en células de mamífero. Siendo este tipo de quinazolina la más efectiva contra la leishmania (Mendoza *et al.*, 2015).



*Figura 4. Estructuras químicas de TAQ. a) N6- antiplasmodial (4-metoxibencil) quinazolina-2,4, 6-triamina (M4) utilizada para tratamiento de malaria (Rojas *et al.*, 2012); b) N6- (metil ferroceno) quinazolina-2, 4, 6-triamina (H2) utilizada en el tratamiento de leishmania modificada de Mendoza *et al.*, 2015.*

6. Antioxidantes

Un antioxidante puede capturar a los radicales libres (RL), prevenir la formación y dispersión de estos, sacrificando su integridad molecular protegiendo así del daño a biomoléculas como proteínas, azúcares, lípidos y ácidos nucleicos. Además se ha observado que los antioxidantes pueden intervenir en los procesos de reparación celular e inhibir la inducción de mutaciones. Según su origen los antioxidantes se pueden clasificar en a) Endógenos: son aquellos que son sintetizados por la misma célula y b) Exógenos: son los que provienen del exterior del organismo comúnmente consumidos en los alimentos (Gonzales *et al.*, 2000; Venero, 2002).

Se ha propuesto que el inicio de la prevención del daño al material genético derivado del estrés oxidante, se basa en el consumo de agentes químicos naturales que disminuyen o inhiben la actividad mutagénica o carcinogénica de los compuestos. Las evidencias obtenidas a partir de estudios epidemiológicos y pruebas realizadas en diferentes laboratorios, sugieren que los alimentos consumidos contienen compuestos que pueden desempeñar un papel importante en la disminución del daño al ADN. Aunque los mecanismos de acción de muchos de ellos aún no se conocen, algunos tienen propiedades antioxidantes y pueden atrapar radicales generados durante el metabolismo celular o los producidos por mógatenos (Sandler, 1996).

7. Estrés oxidante

El estrés oxidante (EOx) se define como la alteración de la señalización y el control redox, por lo que cuando el contenido intracelular de especies reactivas de oxígeno (ERO's) y RL sobrepasa las defensas antioxidantes de la célula, se produce un estado de desequilibrio bioquímico que puede alterar las proteínas, lípidos y ADN presentes en los distintos componentes celulares (Jones, 2006). Se ha mostrado que en las células con EOx se genera daño directamente al ADN, por el incremento de ERO's y RL que interactúan con el material genético e indirectamente mediante alteraciones en los componentes celulares que se encuentran relacionados con la funcionalidad de los cromosomas. En ambos casos, la

acumulación del daño al material genético puede llegar a ocasionar progresión descontrolada del ciclo celular y contribuir a la generación de neoplasias (Ward, 1985). Por lo que el EOX se ha asociado con diversos estados patológicos como el cáncer, entre otros, en los cuales, se altera la función celular, contribuyendo al desarrollo de enfermedades crónico-degenerativas como Alzheimer, esclerosis múltiple, diabetes, hipertensión, asma, glaucoma y cataratas (Halliwell y Gutteridge, 1999).

8. Pruebas y ensayos para evaluar genotoxicidad

El termino referente a la 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 Mutágenos y Carcinogénicos Ambientales”, redefinió este término y estableció que sólo sea considerado para aquellos agentes que son capaces de interaccionar con el ADN. La inducción del daño genético por exposición a agentes genotóxicos es un proceso que se realiza en varias etapas. El agente xenobiótico ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas celulares. Una vez dentro de la célula puede ser reactivo por sí mismo (de acción directa) o bien puede ser activado por enzimas metabólicas (de acción indirecta). Se da entonces la interacción con el ADN produciéndose un daño que puede ser reparado eficientemente o ineficientemente (Ames, 1989).

Para evaluar daño genotóxico se recomienda iniciar con ensayos de tamizaje como los son los de mutaciones, ensayos *in vitro* empleando células de mamíferos (frecuencia de aberraciones cromosómicas) *in vivo* empleando médula ósea o sangre periférica (frecuencia de micronúcleos) (Krishna y Hayashi, 2000). Las pruebas de genotoxicidad no solo son indispensables para evaluar agentes genotóxicos y sus mecanismos inductores, sino también sustancias con propiedades protectoras o moduladoras de daño al ADN (García-Rodríguez y Altamirano-Lozano, 2006).

9. Micronúcleos

Los MN son cuerpos que están en el citoplasma y que contienen ya sea un cromosoma completo o parte de un cromosoma que durante la división celular no se une al núcleo de la célula hija (Khrisna y Hayashi, 2000).

Los MN se pueden originar por alguno de estos eventos:

- Daño a nivel de las proteínas involucradas, directa o indirectamente, en la segregación de cromosomas, esto incluye inhibición en el ensamble o desensamble de microtúbulos, remoción de cinetocoros, daños al centriolo, centrómero inactivado, entre otros (daño aneuploidógeno) (Figura 5A).
- Aberraciones cromosómicas que conllevan a la formación de fragmentos acéntricos (daño clastógeno) (Figura 5B).

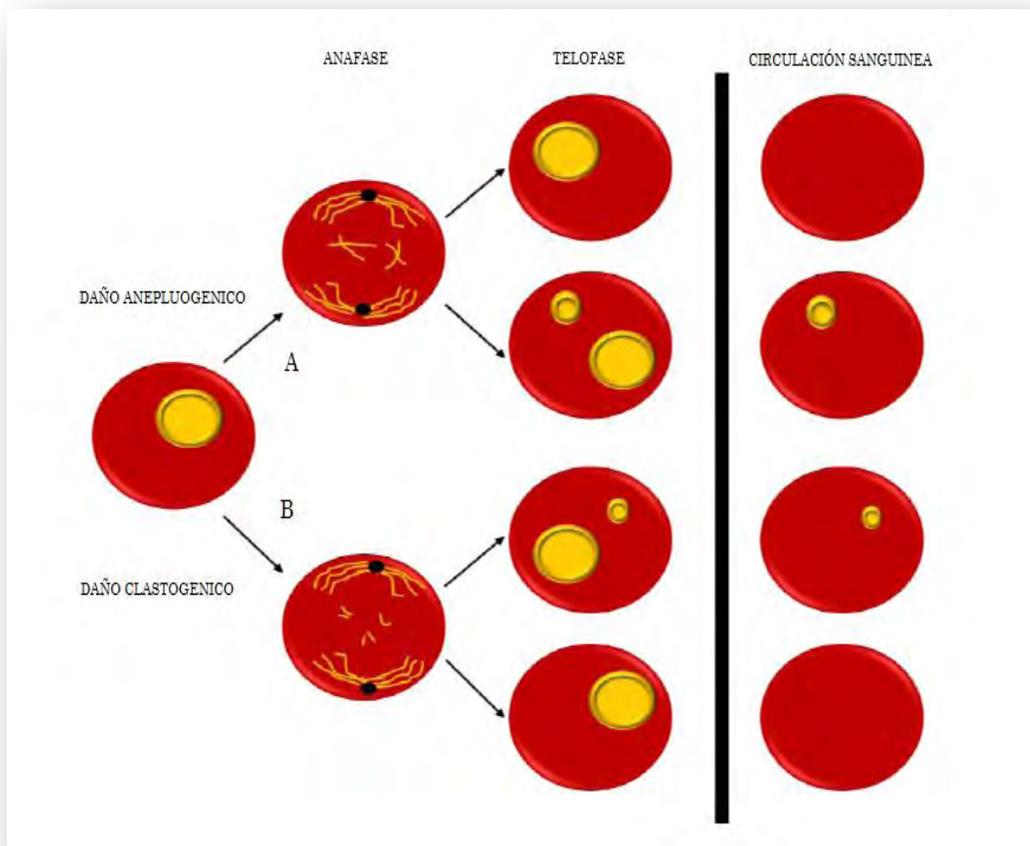


Figura 5. Mecanismos de formación de MN en eritrocitos (Tomado de Ramos-Leon, 2016).

La técnica de MN es un ensayo *in vivo* que se puede realizar en cualquier tejido que este en proliferación, puede ser en medula ósea o en eritrocitos de sangre periférica de animales donde el bazo no elimine eritrocitos micronucleados (FDA, 2000). Cuando los eritrocitos policromáticos (EPC) son expulsados de la medula ósea, el núcleo queda extruido y si un MN se ha formado permanece en el citoplasma, estos eritrocitos aun contiene ARN y son basófilos lo que los diferencia fácilmente de eritrocitos normocromáticos (ENC) en los que se ha degradado el ARN y son acidófilos.

Con los MN se puede identificar la respuesta a la mezcla compleja de contaminantes y representa un índice valioso para la detención de daño genético acumulado durante la vida de las células (Bolognesi y Hayashi, 2011). Se caracteriza por su simplicidad, fiabilidad, sensibilidad y rapidez. Además, es ampliamente utilizado para detectar la genotoxicidad de contaminantes ya sean clastogénicos y/o aneugénicos así como para evaluar las aberraciones cromosómicas numéricas y estructurales (Rocha *et al.*, 2011). Un incremento en la frecuencia de MN en animales tratados con agentes químicos, indica que estos agentes son inductores de daño cromosómico. Sin embargo la presencia de MN indica un daño cromosómico, pero no de que tipo, ni qué cromosomas estuvieron involucrados (Hayashi *et al.*, 2000).

10. Apoptosis y necrosis

La muerte celular en los tejidos de los organismos es un evento natural y no produce alteraciones de las funciones, por el contrario, la cantidad de células en los diferentes tejidos está determinada por un balance homeostático entre la proliferación de las células nuevas y la muerte de las no funcionales. Existen dos tipos de muerte celular, una es la que se produce como consecuencia de una lesión celular masiva (necrosis) y la otra que es un mecanismo controlado de muerte celular (apoptosis) (Elena, 2002).

La apoptosis (Figura 6) se presenta como un mecanismo para eliminar células anómalas de una forma controlada, sin afectar a las células vecinas. Los restos celulares resultantes, que están siempre rodeados de membrana plasmática, son eliminados mediante fagocitosis,

evitando la inflamación en esta zona. Además de que la apoptosis es un proceso celular importante para el desarrollo y para el mantenimiento de la homeostasis de los tejidos adultos, juega un papel fundamental como mecanismo de protección contra la carcinogénesis mediante la eliminación de las células dañadas genéticamente, por lo cual también se ha considerada como un marcador de daño al ADN (Hayashi *et al.*, 1990; Blankenberg, 2008).

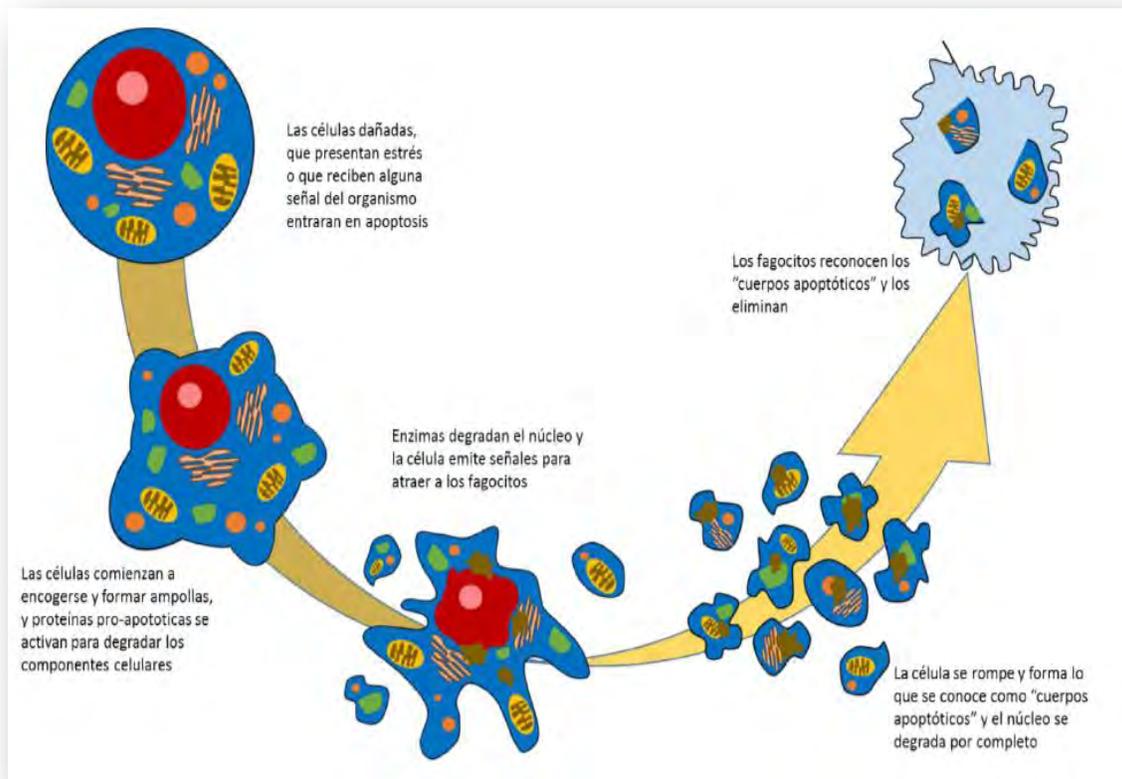


Figura 6. Procesos de apoptosis (Tomado de Ramos-Leon, 2016).

Por su parte, la necrosis (Figura 7) ocurre de manera aguda, por una forma no fisiológica, mediante una agresión que causa lesión en una porción importante del tejido. Este proceso es desencadenado por toxinas, hipoxia severa, agresión masiva y cualquier otra condición que genere disminución de ATP (Elena, 2002).

En el proceso de necrosis se crean cambios histológicos, debido a que hay ganancia de volumen celular, desorganización y lisis del citoplasma, así como dilatación del retículo endoplásmico y las mitocondrias aunado a una disolución de la cromatina, pérdida de la continuidad de la membrana citoplasmática y fragmentación al azar del ADN. Debido a la pérdida de la integridad de la membrana celular, el contenido del citoplasma es vertido al espacio extracelular, se genera el proceso de inflamación, en el cual los restos celulares son eliminados por fagocitosis (Elena, 2002; Ramírez y Rojas, 2010).

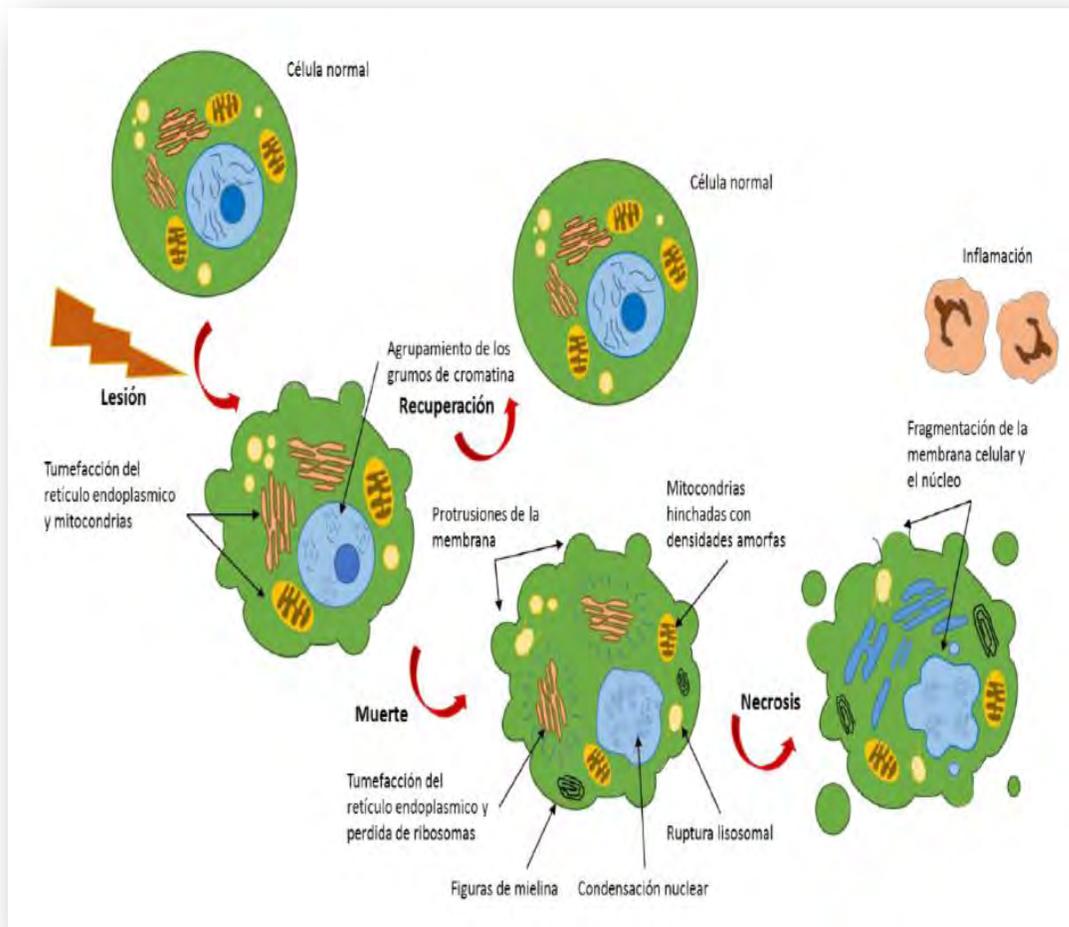


Figura 7. Proceso de necrosis (Tomado de Ramos-Leon, 2016).

11. Evaluación de viabilidad y muerte celular

El análisis de la muerte celular puede realizarse tanto *in vivo* como *in vitro*. Existen varios métodos que permiten diferenciar entre la muerte por apoptosis y necrosis. La valoración de la integridad de la membrana a través de la tinción con colorantes vitales pueden ser específicos si se analizan las características morfológicas de las células directamente (Allen *et al.*, 1997). El método por tinción diferencial con fluorocromos, utilizando una mezcla de los colorantes naranja de acridina (NA) y bromuro de etidio (BrEt), es uno de los métodos utilizados para la evaluación de apoptosis y necrosis. El NA se puede intercalar en el ADN (coloración amarilla), mientras que el BrEt se introduce únicamente a las células con pérdida de integridad de la membrana plasmática, mostrando una fluorescencia roja. Además que con esta técnica se pueden diferenciar a las células apoptóticas tempranas (amarilla con inicio de fragmentación nuclear) de las apoptóticas tardías (roja-fragmentada) (McGahon *et al.*, 1995; García-Rodríguez *et al.*, 2013).

II. JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, los compuestos quinólicos han adquirido un gran interés, debido a sus propiedades farmacológicas, ya que sus derivados pueden actuar como agentes analgésicos, hipertensores, amebicidas, virucidas, entre otros. Uno de los compuestos quinolónicos más utilizado es la quinina, la cual es conocida por ser un agente antimalárico; pero en concentraciones altas llega a ser tóxica. Por lo que, se ha iniciado la síntesis de nuevos agentes, a partir de la base estructural del sistema quinolónico, siendo los derivados de la quinazolina los compuestos más prometedores, efectivos y menos tóxicos. El Dr. Francisco Hernández Luis del Departamento de Farmacia de la Facultad de Química de la UNAM, ha desarrollado un grupo de compuestos derivados de las quinazolininas, las TAQ, las cuales han mostrado actividad en contra de la malaria y la leishmania *in vitro*, generando grandes expectativas para su posible uso clínico. De ahí que, es necesario realizar evaluaciones genotóxicas y citotóxicas. Aunado a ello, a estas estructuras se les ha tratado de potenciar sus efectos terapéuticos, mediante la adición de posibles grupos antioxidantes. Por lo que, este estudio se realizó en colaboración con la Facultad de Química de la UNAM, con la finalidad de evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de las quinazolininas (MLB01, MLB02 y MLB13) en ratones macho y hembras de la cepa Hsd:ICR.

III. HIPÓTESIS

Varios compuestos quinolónicos, como la quinina, se han utilizado ampliamente como tratamiento en diferentes enfermedades, pero a concentraciones altas llegan a ser tóxicos. Las TAQ MLB01, MLB02 y MLB13 se sintetizaron basándose en la estructura de los compuestos quinolónicos, pero con algunas modificaciones químicas para lograr hacerlas menos tóxicas y darles propiedades como antioxidantes, entonces, se espera que la administración a ratones hembra y macho de las TAQ MLB01, MLB02 y MLB13 no presenten efectos genotóxicos, ni citotóxicos mediante las evaluaciones de MN, apoptosis y viabilidad celular, así mismo se espera que no modifiquen la relación de EPC/ENC.

IV. OBJETIVOS

1. General

Evaluar el efecto genotóxico y citotóxico de nuevos compuestos quinolínicos (quinazolinas MLB01, MLB02 y MLB13) en sangre periférica de ratones Hsd:ICR, mediante la evaluación de micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular y la relación de EPC/ENC.

2. Particulares

- 1.- Establecer la dosis máxima tolerada (MTD) de las TAQ (MLB01, MLB02 y MLB13) en ratones hembra y macho, administradas vía intraperitoneal, mediante la evaluación de la toxicidad general y la letalidad.
- 2.- Evaluar la cinética de inducción de MN en sangre periférica obtenida cada 24 h durante tres días después de los tratamientos de las TAQ en ratones hembra y macho.
- 3.- Evaluar la inducción de apoptosis y necrosis en sangre periférica obtenida a las 48 h después del tratamiento de las TAQ en ratones hembra y macho.
- 4.- Evaluar la relación de los EPC/ENC en sangre periférica de ratones hembras y machos tratados con las TAQ empleando NA.
- 5.- Evaluar viabilidad celular en sangre periférica de ratón hembra y macho tratados con las TAQ empleando la tinción diferencial de NA/BrEt.

V. MATERIAL Y MÉTODO

1. Animales

Se emplearon ratones macho y hembra de la cepa Hsd:ICR de 2 a 3 meses de edad, provenientes del bioterio Harlan de la Facultad de Química, UNAM. Los ratones fueron aclimatados en el bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, donde se mantuvieron bajo condiciones ambientales de temperatura (22° C) y circulación de aire controladas, con fotoperiodo de 12 horas luz/12 horas oscuridad y bajo una dieta a base de alimento comprimido (NUTRI-CUBOS, Purina^{MR}) y libre acceso a agua.

Los criterios de evaluación y condiciones de trabajo fueron establecidos con base a los lineamientos de los programas GENOTOX, la EPA, la ECETOC y la FDA (Heddle *et al.*, 1983; EPA, 1984; Mavournin *et al.*, 1990; Hayashi *et al.*, 1994; FDA, 2000).

2. Reactivos

Los reactivos empleados en el estudio se obtuvieron de Sigma Chemicals Co. (St. Louis, MO, USA). Colorante NA [CAS No. 10127-02-3], BrEt [CAS No. 1239-45-8], Trióxido de cromo (CrO₃) [CAS No. 1333-82-0] y Dimetilsulfóxido (DMSO) [CAS No. 67-68-5].

Las TAQ MLB01, MLB02 y MLB13 utilizadas en el presente estudio fueron proporcionadas por el Departamento de Farmacia a cargo del Dr. Francisco Hernández Luis en la Facultad de Química de la UNAM.

3. Diseño Experimental

3.1. Tratamientos

Las TAQ fueron preparadas en una solución estándar mediante su disolución en DMSO (10 mg/ml). Mientras que el DMSO y CrO₃ se disolvieron en agua inyectable. Una vez preparados los reactivos se administraron inmediatamente vía intraperitoneal (i.p.) en un volumen de alrededor de 0.25 ml.

Se conformaron grupos experimentales formados por seis individuos cada uno. Para cada tratamiento se tuvo un grupo de machos y uno de hembras. Los grupos se dividieron de la siguiente manera:

- a) Testigos agua, se les administró 0.25 ml de agua inyectable.
- b) Testigos negativos, se les administró DMSO a 11.5%.
- c) Grupos de TAQ MLB01, se les administró una dosis de 10 mg/kg.
- d) Grupos de TAQ MLB02, se les administró una dosis de 10 mg/kg.
- e) Grupos de TAQ MLB13, se les administró una dosis de 10 mg/kg.
- f) Testigos positivos, se les administró CrO₃ en una dosis de 20 mg/kg.

3.2. Establecimiento de las dosis

La dosis empleada para los tratamientos de CrO₃ fue seleccionada con base en resultados obtenidos previamente, en donde se observó que la administración de CrO₃ por vía i.p. en una dosis de 20 mg/kg de peso corporal es inductora del daño genotóxico (García-Rodríguez *et al.*, 2001). La dosis inicial empleada para los tratamientos con TAQ (MLB01, MLB02 y MLB13) fue seleccionada con base en las dosis empleadas en estudios previos en los que se probó su efecto sobre la malaria y la leishmania (Rojas *et al.*, 2012; Mendoza *et al.*, 2015).

3.3. Tiempos de evaluación

Una vez establecidas las dosis, así como las condiciones de trabajo, se evaluó el daño genotóxico mediante la frecuencia de MN, la citotoxicidad mediante la frecuencia EPC con respecto a la de ENC, la viabilidad celular y la apoptosis. En las Figuras 8 y 9 se muestra el protocolo para la administración de los tratamientos de hembras y machos respectivamente, así como la toma de muestra.

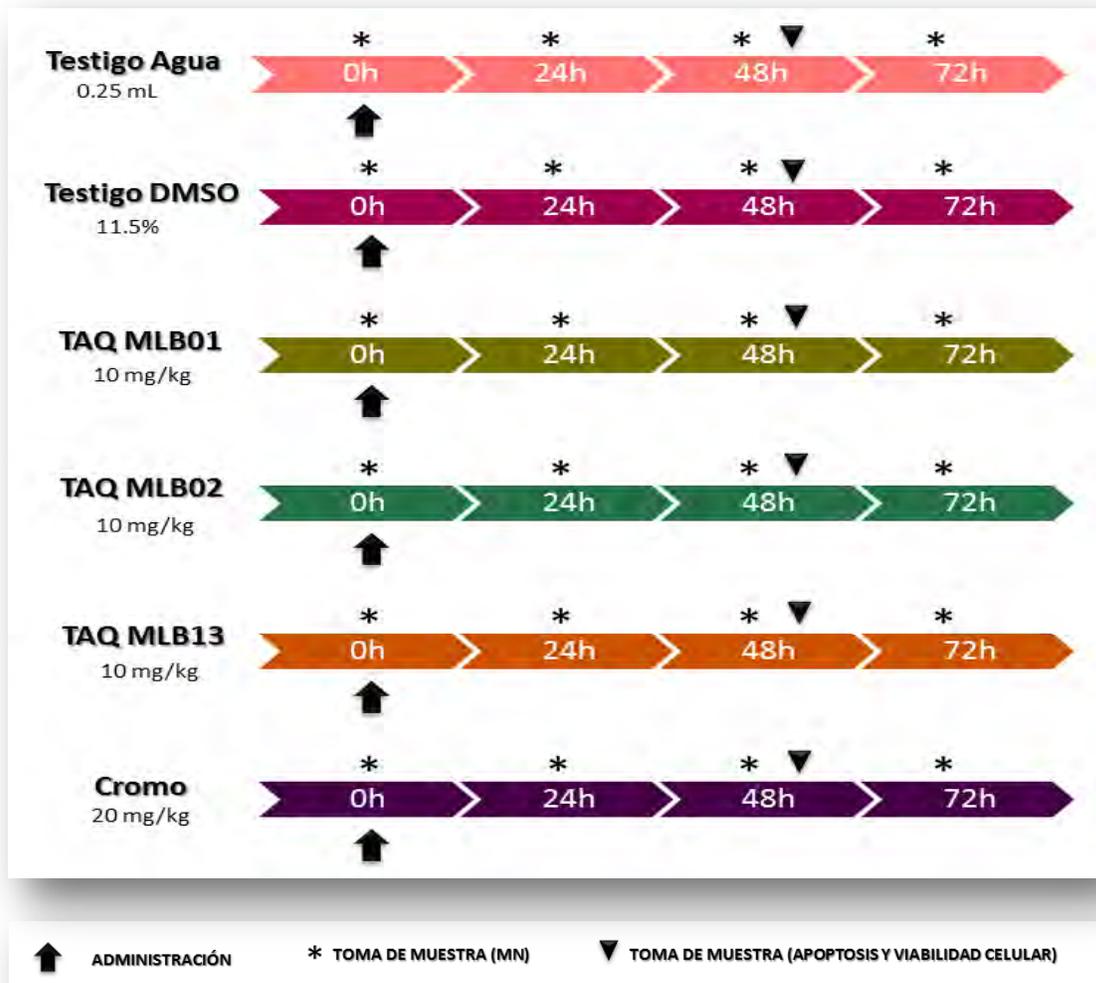


Figura 8. Protocolo para la administración de los tratamientos de TAQ MLB01, TAQ MLB02 y TAQ MLB13 por vía i.p. de hembras y toma de muestra para MN y viabilidad celular.

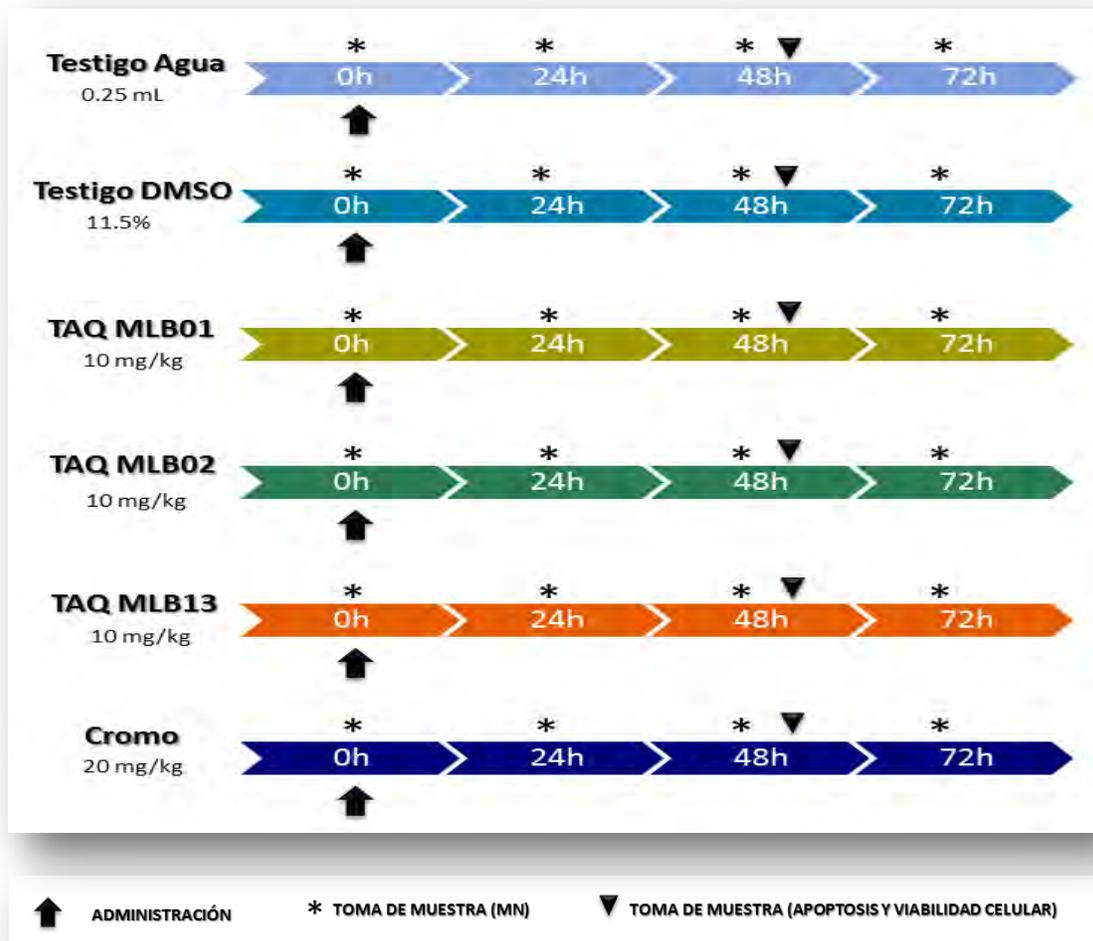


Figura 9 . Protocolo para la administración de los tratamientos de TAQ MLB01, TAQ MLB02 y TAQ MLB13 por vía i.p. de machos y toma de muestra para MN y viabilidad celular.

4. Micronúcleos

4.1. Preparación de laminillas

Se preparó una solución de NA (1 mg/ml), la cual se colocó sobre portaobjetos limpios y precalentados a 70°C, de acuerdo a Hayashi *et al.*, (1990). Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente y se guardaron en la oscuridad hasta su uso.

4.2. Obtención de sangre periférica

Las muestras se obtuvieron de la vena caudal (5 μ l) que fueron colocadas directamente sobre las laminillas preparadas previamente con NA. Las preparaciones se guardaron en cajas de plástico en la oscuridad a una temperatura aproximada de 4°C, de acuerdo a Hayashi *et al.*, (1990).

4.3. Evaluación de MN

La observación de las muestras se realizó con ayuda de un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión amarilla (Nikon Ophthiphon-2). La tinción de los eritrocitos con NA, permite diferenciar a los ENC de los EPC, ya que estos últimos se tiñen de color rojo debido a la presencia de ARN- ribosomal. Con esta tinción también se pueden identificar a los MN ya que el ADN se tiñe de color amarillo fluorescente (Figura 10 A). La evaluación del daño genotóxico se realizó analizando 4000 EPC por ratón, entre los cuales se cuantificó los EPC-MN. Para la evaluación de daño citotóxico, se analizaron 2000 eritrocitos totales por ratón, entre los cuales se cuantificó la frecuencia de EPC en relación con los ENC.

5. Apoptosis y viabilidad celular

5.1. Preparación del colorante y muestras.

Se preparó una solución de NA/BrEt (100 μ g/ml) de acuerdo a McGahon *et al.*, (1995) con algunas modificaciones (García-Rodríguez *et al.*, 2013). Se tomaron muestras de sangre de la vena caudal a las que se le agregó la mezcla de colorantes.

5.2. Evaluación de apoptosis y viabilidad celular

La observación de las muestras se realizó con ayuda de un microscopio de fluorescencia con un filtro de excitación azul y un filtro de emisión amarilla (Nikon Ophthiphon-2). Se evaluaron 200 células por ratón. Para la evaluación de apoptosis y necrosis se cuantificaron las células sanas, apoptóticas tempranas, apoptóticas tardías y necróticas (Figura 10B). Mientras que para el análisis de viabilidad celular se contabilizaron las células viables (sanas) y no viables (apoptóticas tempranas + apoptóticas tardías + necróticas).

6. Análisis estadístico

A los datos obtenidos en los experimentos de MN se les aplicó un análisis de varianza, ANOVA, seguido de una prueba de Tukey o Dunnett para determinar la significancia entre las medias de cada grupo, mediante el paquete estadístico SPSS. Para la inducción de MN se calculó la Frecuencia Neta de Inducción de MN (NIF por sus siglas en inglés) que sirve para descartar la inducción espontánea basal de los grupos (hora 0). Además se calculó la frecuencia diferencial MN (DIF por sus siglas en inglés) lo que permite descartar la posibilidad de que el efecto observado fuera producto de la manipulación de los animales durante los experimentos (García-Rodríguez *et al.*, 2001). Los datos obtenidos de los análisis del NIF y DIF y los resultados del ensayo de apoptosis y necrosis se analizaron mediante una prueba de chi-cuadrada utilizando el paquete de Statistica V6 y GraphPad Prism 5 (Adler *et al.*, 1998; García-Rodríguez *et al.*, 2001). Para todos los casos, se tomaron los datos con una $p < 0.05$ como significativos estadísticos (Adler *et al.*, 1998).

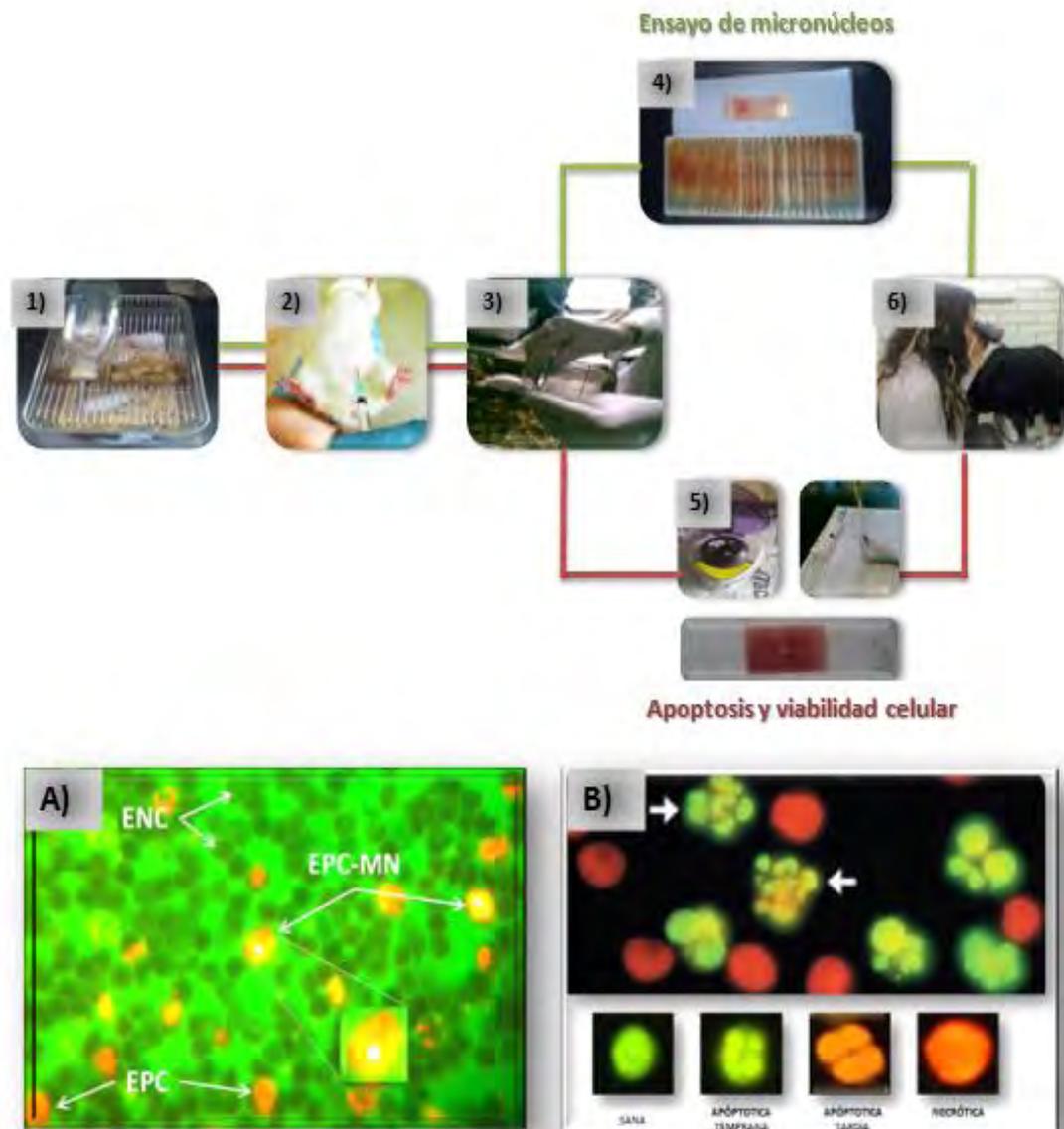


Figura 10. Evaluación del daño genotóxico y citotóxico: 1) grupos de seis ratones; 2) administración de tratamientos; 3) obtención de muestras; 4) preparación de laminillas para MN; 5) preparación de laminillas para apoptosis y viabilidad celular; 6) observación bajo el microscopio de fluorescencia; A) Evaluación del daño genotóxico y B) evaluación de la viabilidad celular, apoptosis y necrosis mediante tinción diferencial con NA/BrEt.

VI. RESULTADOS

1. Toxicidad

En el Cuadro 1 se muestran el seguimiento de los ratones hembras y machos para identificar signos clínicos de toxicidad (pelo erizado, disminución de la actividad, diarrea y pérdida de del apetito) cuando se administraron tanto los tratamientos con las TAQ como con el CrO₃. Se puede observar que solo el grupo tratado con CrO₃ presentó efectos.

Cuadro 1. Observaciones para identificar toxicidad en los grupos de hembras y machos tratados con las diferentes TAQ.

GRUPO	TRATAMIENTO	SIGNOS DE TOXICIDAD			
		Pelo erizado	Diarrea	Apetito	Actividad
Hembras	Testigo Agua	Normal	Normal	Normal	Normal
	Testigo DMSO (11.5%)	Normal	Normal	Normal	Normal
	TAQ MLB01 (10 mg/kg)	Normal	Normal	Normal	Normal
	TAQ MLB02 (10 mg/kg)	Normal	Normal	Normal	Normal
	TAQ MLB13 (10 mg/kg)	Normal	Normal	Normal	Normal
	CrO ₃ (20 mg/kg)	Efecto (aumento)	Efecto (4/6 organismos)	Efecto (disminución)	Efecto (disminución)
Machos	Testigo Agua	Normal	Normal	Normal	Normal
	Testigo DMSO (11.5%)	Normal	Normal	Normal	Normal
	TAQ MLB01 (10 mg/kg)	Normal	Normal	Normal	Normal
	TAQ MLB02 (10 mg/kg)	Normal	Normal	Normal	Normal
	TAQ MLB13 (10 mg/kg)	Normal	Normal	Normal	Normal
	CrO ₃ (20 mg/kg)	Efecto (aumento)	Efecto (3/6 organismos)	Efecto (disminución)	Efecto (disminución)

2. Evaluación de daño genotóxico (MN)

En el Cuadro 2 se muestran los promedios de los MN evaluados en sangre periférica de las 0 a las 72 horas en hembras tratadas con 10 mg/kg de las TAQ y con 20 mg/kg de CrO₃. Se observa que la administración de las TAQ no incrementan significativamente los promedios de MN al compararse con el grupo testigo de DMSO y contra su propia hora cero (es decir antes de la administración de los tratamientos). La TAQ MLB01 es la que presentó el mayor incremento a la hora 72 (alrededor de 2 MN). Al comparar el grupo testigo de DMSO y el testigo de agua se observa incremento con el grupo tratado con DMSO que resulta estadísticamente significativo a las 24 y 72 horas. Se empleó como testigo positivo el CrO₃. Se puede observar que en este grupo se presentó un incremento significativo en los promedios de MN (alrededor de 5 a 14 MN) comparado con su testigo (agua) y su propia hora cero.

Cuadro 2. Promedios de las frecuencias de MN en ratones hembra tratadas con los diferentes tipos de quinazolininas.

Grupo	Dosis mg/kg	N	Hora	MN 4000EPC $\bar{x} \pm d.e.$
Testigo agua	---	6	0	1.8 ± 0.9
			24	1.8 ± 1.1
			48	2.8 ± 1.6
			72	2.5 ± 1.0
Testigo (DMSO 11.5%)	---	6	0	3.5 ± 1.9
			24	5.6 ± 1.5 ^a
			48	5.8 ± 0.7
			72	6.0 ± 1.0 ^a
TAQ MLB01	10	6	0	4.1 ± 1.7
			24	5.6 ± 1.6
			48	5.5 ± 1.8
			72	8.0 ± 5.3
TAQ MLB02	10	6	0	5.0 ± 0.6
			24	5.6 ± 2.0
			48	5.6 ± 1.5
			72	5.1 ± 2.1
TAQ MLB13	10	6	0	3.3 ± 1.8
			24	3.3 ± 1.3
			48	4.1 ± 1.8
			72	4.6 ± 1.7
CrO ₃	20	6	0	5.0 ± 1.7
			24	10.3 ± 3.3 ^{a,b}
			48	16.8 ± 2.9 ^{a,b}
			72	7.6 ± 2.3 ^a

Significancia estadística $p < 0.05$; ^ap: vs. Testigo agua; ^bp: vs. CrO₃ hora 0.

En el Cuadro 3 se muestran los promedios de las frecuencias de MN evaluados en machos tratados con la misma dosis de 10 mg/kg de las TAQ (MLB01, MLB02 y MLB13). Se empleó el mismo control positivo (20 mg/kg de CrO₃). Al igual que para hembras las TAQ no incrementan significativamente los promedios de MN al compararse con el grupo testigo de DMSO y contra su propia hora cero. Así mismo, al comparar el grupo testigo de DMSO y el testigo de agua se observa incremento de MN en el grupo tratado con DMSO pero solo resulta significativo a las 72 horas. De igual manera, la administración de CrO₃ incrementó el promedio de MN (alrededor de 7 a 18 MN) comparado con su testigo (agua) y su propia hora cero.

Cuadro 3. Frecuencia de MN en ratones macho tratados con los diferentes tipos de quinazolininas.

Grupo	Dosis mg/kg	N	Hora	MN 4000EPC $\bar{x} \pm d.e.$
Testigo agua	---	6	0	1.8 ± 0.9
			24	1.8 ± 1.1
			48	2.8 ± 1.6
			72	2.5 ± 1.0
Testigo (DMSO 11.5%)	--	6	0	4.0 ± 0.8 ^a
			24	4.5 ± 0.5
			48	5.5 ± 1.0
			72	5.0 ± 0.8 ^a
TAQ MLB01	10	6	0	5.3 ± 1.3
			24	7.3 ± 1.7
			48	6.0 ± 2.0
			72	6.3 ± 2.0
TAQ MLB02	10	6	0	3.3 ± 1.8
			24	3.1 ± 1.7
			48	2.3 ± 1.2
			72	3.3 ± 1.6
TAQ MLB13	10	6	0	3.1 ± 1.8
			24	4.5 ± 1.2
			48	3.6 ± 1.2
			72	4.8 ± 1.1
CrO₃	20	6	0	5.5 ± 2.1
			24	8.3 ± 1.9 ^a
			48	20.0 ± 4.8 ^{a,b}
			72	5.8 ± 1.3

Significancia estadística $p < 0.05$; ^ap: vs. Testigo agua; ^bp: vs. CrO₃ hora 0.

Debido a la variabilidad que se observó en los promedios de MN basales (es decir cuando aún no se habían administrado los tratamientos), se realizó el cálculo de la Frecuencia de Inducción Neta (NIF por sus siglas en inglés) este cálculo parte de la premisa de que la inducción de MN a la hora 0 de cada grupo es su propio testigo, por lo que al restar el número de MN evaluados en la hora 0 a las demás horas restantes, se asume que se obtiene la inducción neta de MN. Este cálculo se realizó mediante la siguiente fórmula:

$$\text{NIF} = (\text{MN observados en "A" a la hora } X_1) - (\text{MN observados en "A" a la hora } X_0)$$

Dónde: "A" = grupo evaluado; X_1 = tiempo de evaluación; X_0 = tiempo 0

En la Figura 11 se muestra el análisis por tiempo y por grupo calculado para 24 000 EPC, de los grupos de hembras tratados con TAQ y CrO_3 . Al realizar este análisis se corroboró el aumento de las frecuencias de MN desde las 24 a las 72 horas en el grupo tratado CrO_3 . Por otro lado, en el grupo tratado con TAQ MLB01, se observa un aumento en la frecuencia de MN a la hora 72 que resulta significativo respecto al grupo testigo de DMSO. En el grupo tratado con la TAQ MLB02 se observa una disminución parcial de las frecuencias de MN basales a la hora 72 pero no resulta significativa.

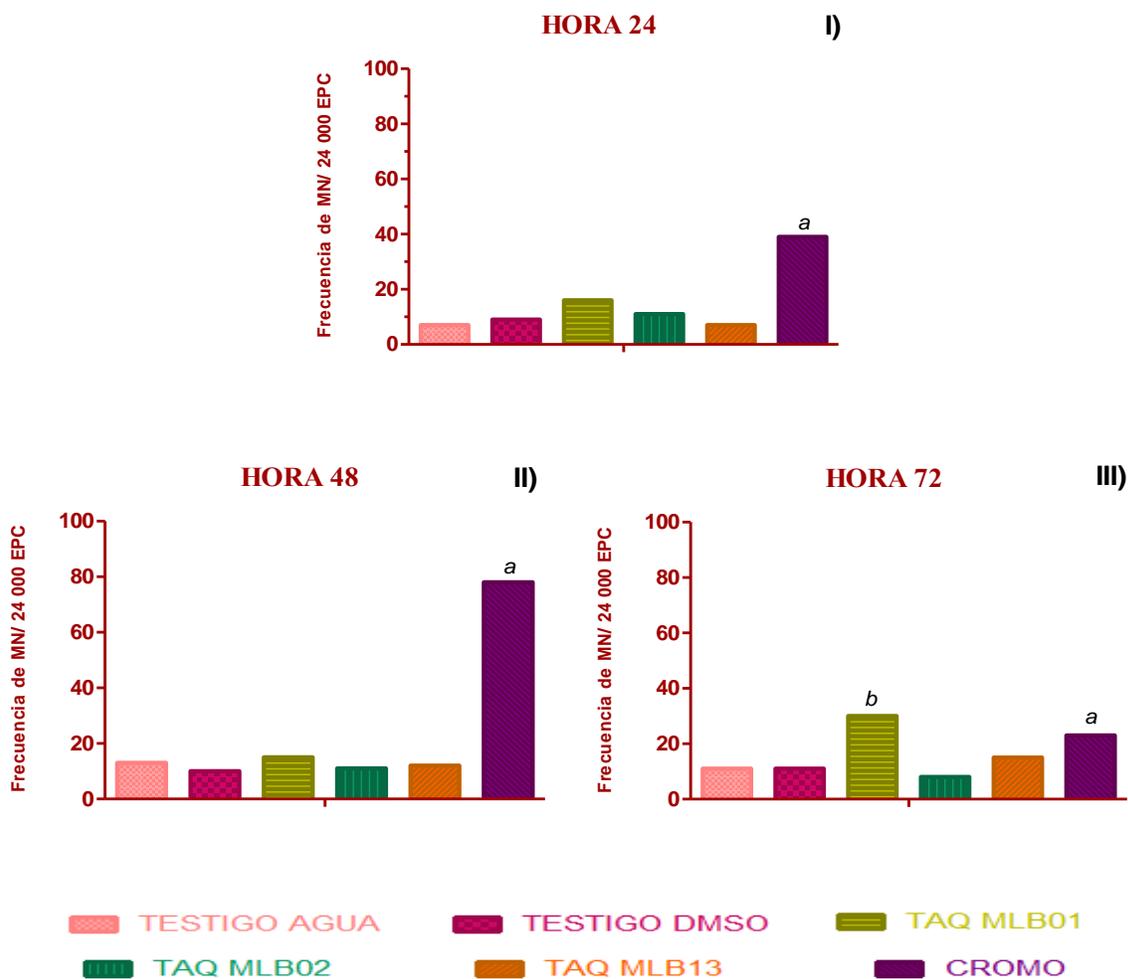


Figura 11. Análisis de la inducción de frecuencia neta de MN (NIF) calculada por grupo de hembras en los diferentes tiempos evaluados: I) 24, II) 48 y III) 72 horas. $p < 0.05$; ^ap: vs. Testigo agua; ^bp: vs. Testigo DMSO.

Al realizar el análisis de NIF para los grupos de machos (Figura 12) se observa una disminución en las frecuencias de MN en el grupo tratado con la TAQ MLB02 a la hora 48, que al compararse con el testigo de DMSO resulta significativo. Mientras que las TAQ MLB01 y MLB13 mantienen la frecuencia de MN basales. Por otro lado, el grupo tratado con CrO_3 incrementa la frecuencia de MN a la hora 24 y 48. De igual manera que para las hembras, cuando se comparó el grupo testigo de DMSO con el testigo de agua no se observó una diferencia significativa.

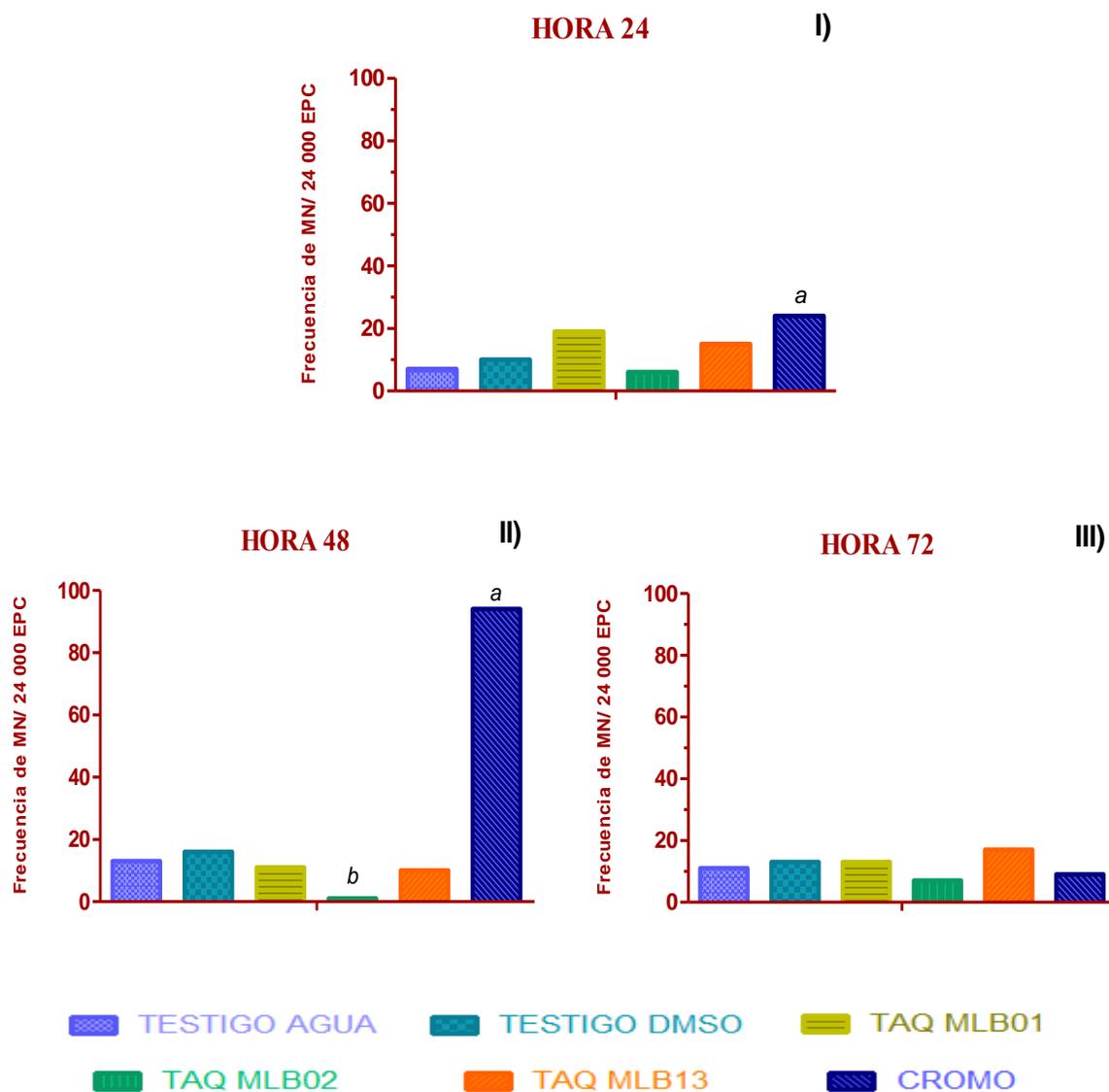


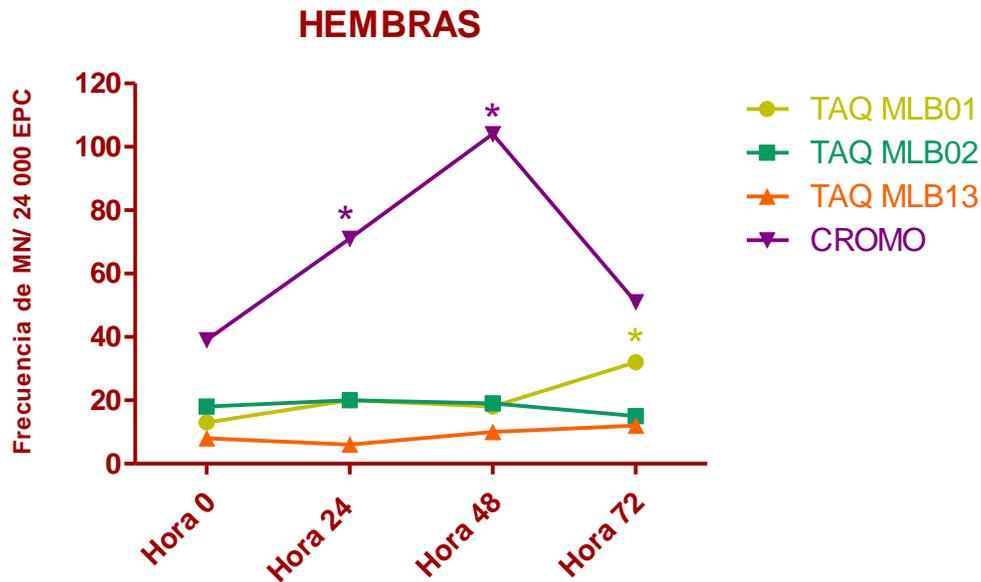
Figura 12. Análisis de la inducción de frecuencia neta de MN (NIF) calculada por grupo de machos en los diferentes tiempos evaluados: I) 24, II) 48 y III) 72 horas. $p < 0.05$; ^a*p*: vs. Testigo agua; ^b*p*: vs. Testigo DMSO.

También se calculó la Frecuencia Diferencial de Inducción de MN (DIF por sus siglas en inglés), con la intención de descartar los MN inducidos por el manejo de los ratones durante el experimento. El análisis consistió en restar los valores de MN obtenidos en todas las horas del grupo testigo a sus correspondientes horas de los grupos tratados con las TAQ y CrO₃, de tal manera que se observaran los MN inducidos únicamente por los tratamientos. Este cálculo se realizó mediante la siguiente formula:

$$\text{DIF} = (\text{MN observados en "A" a la hora } X_1) - (\text{MN observados en "T" a la hora } X_1)$$

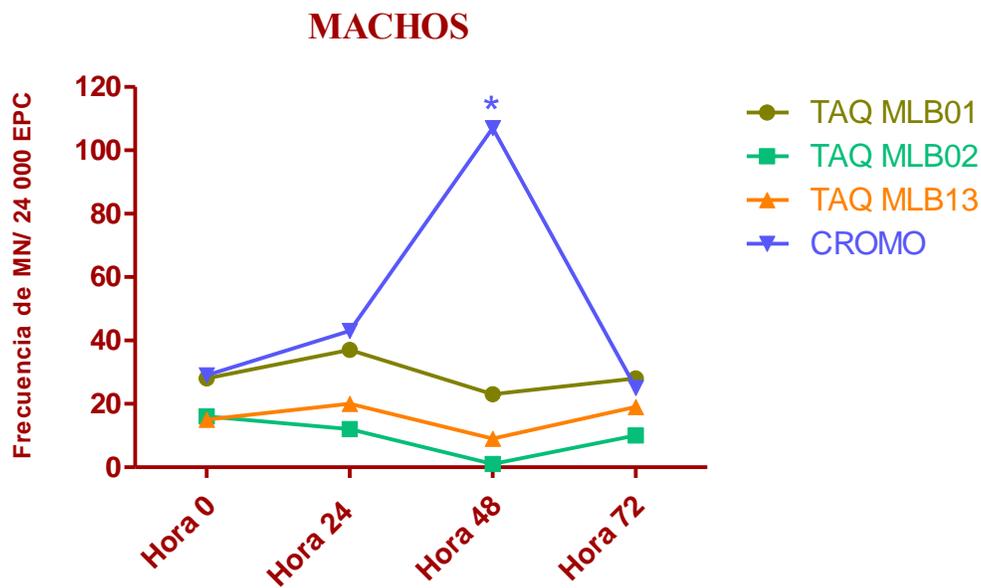
Dónde: "A" = grupo evaluado; X_1 = tiempo de evaluación; "T" = grupo testigo

En la Figura 13 se muestra el comportamiento de las frecuencias de MN al realizar el análisis del DIF para los grupos de hembras. Se observa que los grupos tratados con las TAQ MLB02 y MLB13 presentan un comportamiento similar, sin variaciones significativas en las frecuencias de MN con respecto a sus frecuencias basales. Mientras que el grupo tratado con la TAQ MLB01 aumenta la frecuencia de MN a la hora 72. En el grupo tratado con CrO₃ se observan incrementos de las frecuencias basales de MN en las horas 24 y 48.



*Figura 13. DIF absoluto calculado por tiempo y grupos de hembras para 24 000 EPC. $p < 0.05$ *p: vs hora 0 de cada tratamiento.*

En la Figura 14 se muestra el comportamiento de las frecuencias de MN al realizar el análisis del DIF para los grupos de machos. Se observa que los grupos tratados con las TAQ presentan un comportamiento similar, sin variaciones significativas en las frecuencias de MN con respecto a sus frecuencias basales. Mientras que, el grupo tratado con CrO_3 se observa un incremento en la frecuencia de MN basales a la hora 48.



*Figura 14. DIF absoluto calculado por tiempo y grupos de machos para 24 000 EPC. $p < 0.05$ *p: vs hora 0 de cada tratamiento.*

3. Evaluación de apoptosis y necrosis

En el Cuadro 4 se muestran los promedios de los datos obtenidos para el análisis de la apoptosis en los grupos de hembras tratados con las TAQ y CrO_3 . Se observa que al grupo que se le administró la TAQ MLB01 presenta un aumento significativo en el promedio de las células necróticas en comparación con el testigo DMSO, y las células apoptóticas tempranas se incrementan ligeramente aunque este incremento no resulta estadísticamente significativo. Sin embargo, en el grupo tratado con la TAQ MLB02 el incremento de las células apoptóticas tempranas sí resulta estadísticamente significativo. Al igual que para MN, también se empleó un grupo tratado con CrO_3 como testigo positivo. Se observa que hay aumento en el promedio de las células apoptóticas tempranas y necróticas que resulta estadísticamente significativo al compararlo con el testigo agua.

Cuadro 4. Promedios de las frecuencias de las células normales o sanas, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas para los grupos de hembras.

GRUPO	DOSIS mg/kg	N	SANAS $\bar{x} \pm d.e.$	APOPTÓTICAS TEMPRANAS $\bar{x} \pm d.e.$	APOPTÓTICAS TARDÍAS $\bar{x} \pm d.e.$	NECRÓTICAS $\bar{x} \pm d.e.$
Testigo Agua		6	186.0 ± 4.6	13.0 ± 3.6	0.8 ± 1.2	0.2 ± 0.4
Testigo DMSO		6	176.0 ± 2.7	20.0 ± 2.7	0.2 ± 0.4	3.8 ± 1.2
TAQ MLB01	10	6	165.7 ± 4.0 ^b	25.5 ± 4.1	0.0 ± 0.0	8.8 ± 3.6 ^b
TAQ MLB02	10	6	167.2 ± 9.4	30.5 ± 9.2 ^b	0.0 ± 0.0	2.3 ± 1.7
TAQ MLB13	10	6	178.7 ± 5.3	19.0 ± 4.6	0.0 ± 0.0	2.3 ± 2.1
CrO ₃	20	6	163.3 ± 6.1 ^a	29.3 ± 4.0 ^a	0.0 ± 0.0	7.3 ± 2.5 ^a

Significancia estadística $p < 0.05$; ^ap: vs. Testigo agua; ^bp: vs. Testigo DMSO.

En el Cuadro 5 se muestran los promedios del análisis para machos tratados con las TAQ y CrO₃. Se observa que al igual que para las hembras, en machos se incrementaron significativamente las células apoptóticas tempranas con el tratamiento de la TAQ MLB02 y con el tratamiento de CrO₃. Mientras que a los grupos a los que se les administro la TAQ MLB01 y CrO₃ aumentan los promedios de las células necróticas significativamente.

Cuadro 5. Promedios de las frecuencias de las células normales o sanas, apoptóticas (tempranas y tardías) y necróticas para los grupos de machos.

GRUPO	DOSIS mg/kg	N	SANAS $\bar{x} \pm d.e.$	APOPTÓTICAS TEMPRANAS $\bar{x} \pm d.e.$	APOPTÓTICAS TARDÍAS $\bar{x} \pm d.e.$	NECROTICAS $\bar{x} \pm d.e.$
Testigo Agua		6	186.0 ± 4.6	13.0 ± 3.6	0.8 ± 1.2	0.2 ± 0.4
Testigo DMSO		6	182.8 ± 3.3	16.0 ± 3,9	0.0 ± 0.0	1.2 ± 0.9
TAQ MLB01	10	6	168.8 ± 7.0 ^b	24.7 ± 5.7	0.2 ± 0.4	6.3 ± 2.0 ^b
TAQ MLB02	10	6	168.3 ± 10.1 ^b	29.0 ± 10.0 ^b	0.0 ± 0.0	2.7 ± 1.7
TAQ MLB13	10	6	184.0 ± 3.9	15.7 ± 4.1	0.0 ± 0.0	0.3 ± 0.5
CrO ₃	20	6	163.3 ± 10.6 ^a	28.7 ± 7.6 ^a	0.0 ± 0.0	8.0 ± 3.9 ^a

Significancia estadística $p < 0.05$; ^ap: vs. Testigo agua; ^bp: vs. Testigo DMSO.

4. Evaluación del daño citotóxico

3.1. Relación EPC/ENC

En el Cuadro 6 se muestra los promedios de las frecuencias de EPC en relación a los ENC, evaluados de las 0 a las 72 horas en los grupos de hembras tratados con las TAQ y CrO₃. Se observa que al comparar el grupo testigo de DMSO con el testigo de agua se presenta alta variabilidad a la hora 24 que resulta significativa.

Cuadro 6. Frecuencias de EPC en ratones hembra de la cepa Hsd: ICR tratados con las diferentes quinazolinas.

Grupo	Dosis mg/kg	N	Hora	EPC/ 2000 Células $\bar{x} \pm d.e.$
Testigo Agua	--	6	0	110.0 ± 4.8
			24	116.8 ± 4.2
			48	122.0 ± 3.8
			72	136.0 ± 6.9
Testigo (DMSO 11.5%)	--	6	0	180.5 ± 45.0 ^a
			24	199.2 ± 45.1 ^a
			48	169.7 ± 22.8
			72	185.0 ± 33.6
TAQ MLB01	10	6	0	129.2 ± 14.6
			24	167.3 ± 14.6
			48	197.7 ± 54.7
			72	207.0 ± 78.5
TAQ MLB02	10	6	0	213.3 ± 39.9
			24	197.0 ± 33.7
			48	199.0 ± 14.1
			72	262.2 ± 42.9
TAQ MLB13	10	6	0	174.8 ± 22.2
			24	173.7 ± 30.6
			48	206.2 ± 39.4
			72	219.8 ± 18.8
CrO₃	20	6	0	133.3 ± 19.4
			24	138.5 ± 21.7
			48	166.7 ± 41.3
			72	127.8 ± 31.7

Significancia estadística p<0.05; ^ap: vs. Testigo agua.

En el Cuadro 7 se muestran los promedios de las frecuencias de EPC con respecto a la frecuencia de ENC, para los grupos de machos tratados con las TAQ y CrO₃. Al igual que para las hembras se observa alta variabilidad al momento de comparar el grupo testigo de DMSO con el testigo de agua que resulta significativa desde las 0 hasta las 72 horas. Por otro lado, en el grupo tratado con CrO₃ se disminuyeron los promedios de EPC y si resultaron significativos a la hora 72 en comparación con su testigo.

Cuadro 7. Frecuencias de EPC en ratones macho tratados con las diferentes quinazolininas.

Grupo	Dosis mg/kg	N	Hora	EPC/ 2000 Células $\bar{x} \pm d.e.$
Testigo Agua	--	6	0	110.0 ± 4.8
			24	116.8 ± 4.2
			48	122.0 ± 3.8
			72	136.0 ± 6.9
Testigo (DMSO 11.5%)	--	6	0	186.8 ± 28.1 ^a
			24	214.3 ± 36.6 ^a
			48	240.7 ± 35.1 ^a
			72	229.7 ± 32.3 ^a
TAQ MLB01	10	6	0	150.0 ± 32.7
			24	153.8 ± 20.7
			48	156.0 ± 16.9
			72	154.3 ± 31.2
TAQ MLB02	10	6	0	195.8 ± 20.8
			24	147.8 ± 21.0
			48	172.8 ± 22.5
			72	176.8 ± 19.4
TAQ MLB13	10	6	0	279.5 ± 151.0
			24	275.8 ± 172.4
			48	257.3 ± 95.6
			72	283.3 ± 116.4
CrO₃	20	6	0	156.0 ± 21.2
			24	131.5 ± 23.8
			48	166.7 ± 41.2
			72	127.8 ± 31.7 ^a

Significancia estadística p<0.05; ^ap: vs. Testigo agua.

3.1. Viabilidad celular

Debido a la alta variabilidad observada en las frecuencias de EPC con relación a los ENC se realizó una técnica basada en una tinción diferencial con NA/BrEt, en donde el NA se introduce únicamente a las células viables (vivas) y el BrEt se introduce a las células no viables (muertas) (McGahon *et al.*, 1995; García-Rodríguez *et al.*, 2013).

En la Figura 15 se observa que en los grupos de hembras tratados con TAQ MLB01 y CrO₃ hay un incremento significativo en las células no viables al compararse con sus testigos. Así mismo, al compararse el grupo testigo de DMSO con el testigo de agua se observa un incremento significativo. Mientras que a los grupos que se les administró la TAQ MLB02 y TAQ MLB 13 no hay diferencia estadísticamente significativa.

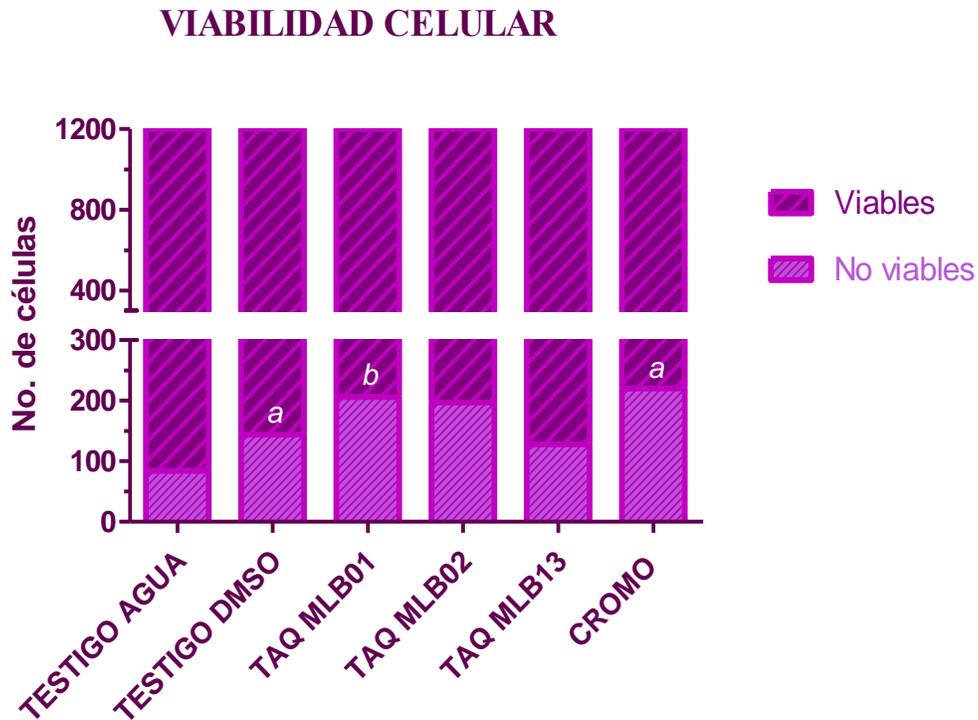


Figura 15. Frecuencias de las células viables y no viables en ratones hembra tratados con las diferentes TAQ $p < 0.05$; ^a p : vs. Testigo agua; ^b p : vs. Testigo DMSO.

En la Figura 16 se observa que en los grupos de machos tratados con TAQ MLB01, TAQ MLB02 y CrO₃ hay un incremento significativo en las células no viables al compararse con sus testigos. A diferencia de las hembras, al comparar el testigo de DMSO con el testigo de agua no hay una diferencia significativa.

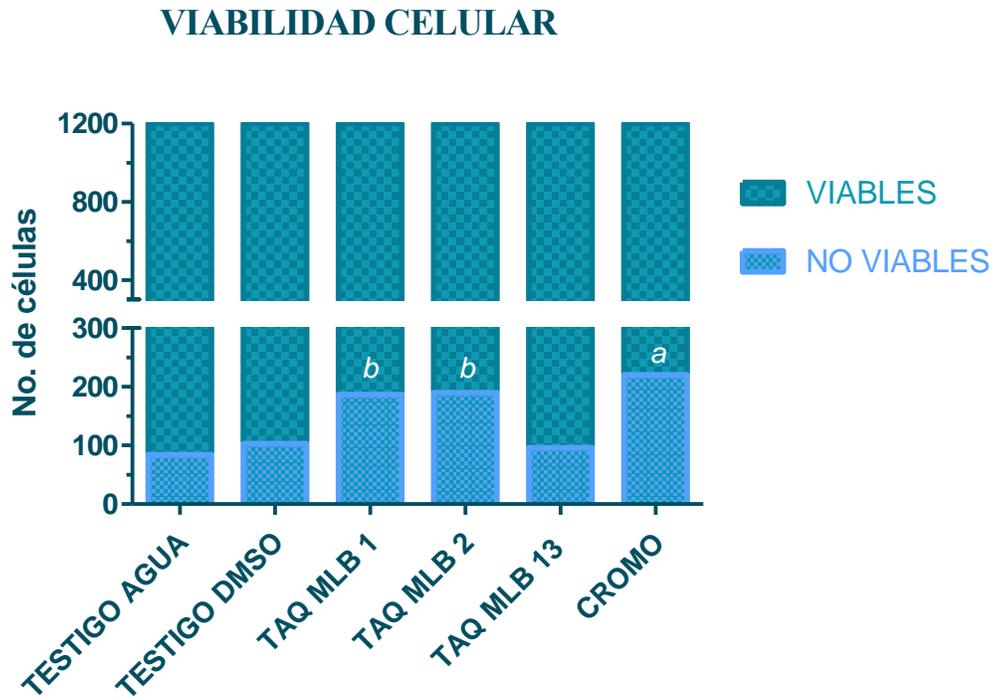


Figura 16. Frecuencias de las células viables y no viables en ratones macho tratados con las diferentes TAQ $p < 0.05$; ^a*p*: vs. Testigo agua; ^b*p*: vs. Testigo DMSO.

VII. DISCUSIÓN

Los compuestos heterocíclicos que contienen un núcleo de quinazolina juegan un papel muy importante en el campo de la química médica. Un gran número de derivados de quinazolina se han sintetizado y evaluado por sus diferentes actividades biológicas. Los fármacos de quinazolina se están volviendo una clase muy importante de agentes terapéuticos y es probable que se vuelvan la base de muchos productos farmacéuticos que se pueden obtener en un futuro muy próximo. Esto debido a que se han descrito como actividades terapéuticas su actividad anticarcinogénica (Chandregowda *et al.*, 2009; Al-Rashood *et al.*, 2006; Vasdev *et al.*, 2005; Wakeling *et al.*, 2002), antiinflamatoria (Alagarsamy *et al.*, 2007; Baba *et al.*, 1996), antibacteriana (Rohini *et al.*, 2010; Antipenko *et al.*, 2009; Jata *et al.*, 2008; Aly, 2003), analgésica (Alagarsamy *et al.*, 2007; Jata *et al.*, 2008), antiviral (Li *et al.*, 1998), anticitoxina (Chandrika *et al.*, 2009), antiespasmódica (Jata *et al.*, 2008; Paneersalvam *et al.*, 2010), antioxidante (Saravanan *et al.*, 2010) y anti-malarica (Lakhan *et al.*, 1987), aunado a sus propiedades sobre la hipertensión (Hess *et al.*, 1968), obesidad (Sasmal *et al.*, 2012), psicosis (Alvarado *et al.*, 2006), diabetes (Malamas y Millen, 1991), tuberculosis (Nandy *et al.*, 2006), entre otras.

Los derivados de quinazolinas, TAQ, han mostrado efectos sobre malaria y leishmania en estudios *in vitro* (Rojas *et al.*, 2012; Mendoza *et al.*, 2015). Particularmente la TAQ MLB01, MLAB02 y MLB13 se sintetizaron con el fin de potenciar sus efectos terapéuticos además de agregarles grupos funcionales con posible actividad antioxidante. Dado que las TAQ fueron sintetizadas para su posible aplicación como fármaco en humanos, es necesario someterlas a una serie de estudios previos. Estos estudios van desde los químicos hasta los toxicológicos, dentro de estos últimos es necesario establecer la posible genotoxicidad y citotoxicidad.

En el presente estudio se observó que al administrar las TAQ (10 mg/Kg) a ratones hembras y machos, estos no mostraban signos clínicos de toxicidad (pelo erizado, disminución de la movilidad y del apetito). Sin embargo el grupo tratado con CrO₃ si presenta estos efectos lo cual corrobora el daño genotóxico previamente reportado para los compuestos de Cr (VI)

(O'Brien *et al.*, 2003) y en particular para el CrO₃ (García-Rodríguez *et al.*, 2001). Asimismo, en diversos estudios epidemiológicos con trabajadores ocupacionalmente expuestos a los compuestos de Cr, se ha observado efectos tóxicos tanto agudos como crónicos, relacionados con neurotoxicidad, toxicidad reproductiva, cardiotoxicidad, citotoxicidad y genotoxicidad (Bagchi *et al.*, 1997).

La administración de las TAQ MLB02 y MLB13 en hembras no incrementan los MN. Solo la TAQ MLB01 presenta en hembras un efecto significativo en la frecuencia de MN a la hora 72, sin embargo aunque este incremento es significativo, fue de alrededor de 2 MN por 1000 EPC, y organizaciones como la FDA (2000) y la OECD (1997) han propuesto que se considere como un agente genotóxico evidente solo aquellos compuestos que incrementan más de 4 MN por 1000 EPC, por ello se sugiere que la TAQ MLB01 no presenta un efecto genotóxico claro. En los grupos de machos tratados con las TAQ no se presentaron incrementos significativos en ninguno de los tratamientos. En estudios realizados con fármacos que tienen estructura quinazolínica, como son MINIPRES® y ALFUZOSINA® no se han reportado efectos mutagénicos y genotóxicos (MSSSI y AEMPS, 2008, 2014).

El incremento de la frecuencia de MN en los grupos de hembras tratados con la TAQ MLB01 puede atribuirse al DMSO, ya que como se puede observar al comparar el testigo de DMSO con el testigo de agua hay un claro aumento del promedio de MN. Por otro lado, este compuesto es utilizado como vehículo en la administración de fármacos, incrementando el paso a través de la piel e intensificando su acción, por lo que también aumenta su riesgo de toxicidad (Matindale, 2003).

Por otro lado se observa que la TAQ MLB02 disminuye la frecuencia de MN basales en hembras y machos a las 72 y 48 horas respectivamente, siendo significativo únicamente en el grupo de machos. Esto se podría deber a la actividad antioxidante que se le ha atribuido a los derivados de quinazolininas. Kumar *et al.*, (2001) utilizando el método del DPPH (técnica utilizada para medir la capacidad antioxidante de una especie o sustancia) estudiaron una serie de derivados de quinazolininas, en donde demostraron que estos compuestos tienen un alto potencial para atrapar radicales, en comparación con el ácido ascórbico, el cual utilizaron como testigo; se atribuyó esta actividad antioxidante a la presencia de grupos

hidroxilo (que puede donar átomos de hidrógeno) y en algunas a la presencia del grupo metoxi (es decir, la presencia del donante de electrones del grupo OCH₃). Además, al anillo de pirimidina que forma la estructura de las quinazolininas se le ha atribuido diversas actividades biológicas como antifúngico, antibacteriano, antiinflamatorias y antioxidantes (Ravikanth *et al.*, 2006; Kumar *et al.*, 2001; Kuyper *et al.*, 1996). La disminución de los MN en estos grupos puede deberse al aumento de las células apoptóticas tempranas proponiéndose a la apoptosis como un mecanismo de protección, mediante la eliminación de células dañadas genéticamente. En estudios donde se evaluaron derivados de quinazolininas para el tratamiento de diferentes líneas de cáncer, se demostró que estos compuestos inducían a las células cancerígenas a apoptosis (Shilei *et al.*, 2013). La apoptosis, es un proceso normal en los organismos que puede ser activada como un mecanismo para eliminar las células con daño en su material genético, por lo cual al ser una de las respuestas celulares frente al daño al ADN puede ser considerada como un marcador de daño genotóxico (White, 1996; Taraphdar *et al.*, 2001).

La administración de los tratamientos con TAQ MLB01 condujo a un aumento de células necróticas tanto en hembras como en machos que resulto significativo. Estudios crónicos (con una duración de 1 año o superior) realizados en ratas y perros tratados con MINIPRES® a una dosis de 25 mg/kg/día (75 veces la dosis máxima habitual recomendada en humanos); se observó la inducción de necrosis y la existencia de atrofia testicular (MSSSI y AEMPS, 2008).

Se administró CrO₃ como testigo positivo para demostrar la inducción de MN. En estudios realizados previamente en nuestro laboratorio se ha demostrado que 20 mg/kg de CrO₃ induce MN (García Rodríguez *et al.*, 2001). El mecanismo de daño genotóxico de los compuestos de Cr [VI], se ha planteado con base en que estos tienen la capacidad de atravesar la membrana celular y dentro de la célula se reducen rápidamente por la interacción con moléculas citoplasmáticas a cromo [V], [VI] y [III] el cual tienen afinidad con las bases y fosfatos de la cadena de ADN, además de generar ERO's en cada reducción que pueden inducir rupturas y aductos en la cadena de ADN así como entrecruzamientos, y por lo tanto inducir daño mutagénico y cancerígeno (O'Brien *et al.*, 2003; Jomova y Valko *et al.*, 2011).

De igual manera, también el CrO_3 incrementa las células apoptóticas *in vivo* (García-Rodríguez *et al.*, 2013; 2015) e *in vitro* (Hayashi *et al.*, 2004; Das *et al.*, 2015). En el presente estudio se corroboró el incremento de las células apoptóticas tanto en hembras como en machos con 20 mg/kg de CrO_3 . La apoptosis se relaciona con el daño al ADN; la alteración de los estados oxidativos intracelular tiene el potencial para desencadenar o sensibilizar una célula a la apoptosis. Por lo tanto, las ERO's generadas a partir de Cr [VI] durante su reducción, puede jugar un papel importante en la vía de señalización de apoptosis (Hayashi *et al.*, 2004; García-Rodríguez *et al.*, 2013). Si bien la apoptosis es un mecanismo importante para el mantenimiento de una población de células funcionales y sanas, hay un margen de actividad apoptótica que si se rebasa puede conducir a errores que permiten a las células dañadas a escapar de la muerte celular y proliferar, lo cual podría ser un factor importante en la carcinogénesis que se ha observado en personas expuestas al cromo.

Cuando se evaluó la citotoxicidad mediante la relación EPC con respecto a los ENC, se observa una diferencia significativa para el grupo de machos tratados con CrO_3 y para los grupos tratados con DMSO. Si bien la OECD (1997) indica que al realizar la prueba de MN se determine también la frecuencia de EPC/ENC, este parámetro debe tomarse con reserva, debido a que cuando un compuesto causa muerte celular, puede activarse también los mecanismos de división celular y por lo tanto enmascarar el efecto (Krishna *et al.*, 1986; Hayashi *et al.*, 2000). Para corroborar la citotoxicidad se realizó la evaluación de viabilidad celular empleando la técnica de NA/BrEt modificada por García-Rodríguez *et al.* (2013).

Al realizar este análisis, se observa que la administración de TAQ MLB01 en machos y en hembras disminuye las células viables significativamente, considerando a este derivado de quinazolina como citotóxico. Así mismo la administración de la TAQ MLB02 solo disminuye las células viables significativamente en los grupos de machos, lo que nos indica citotoxicidad producida por este derivado. En un estudio de citotoxicidad realizado a un derivado de quinazolina, específicamente a un tipo de TAQ, se observó que a concentración de 100 μM , era ligeramente citotóxica, y este resultado se lo atribuyen al DMSO (Mendoza *et al.*, 2015).

En los grupos de ratones machos y hembras en donde se administró la TAQ MLB13 no se observa ningún daño citotóxico, ya que no aumenta las células apoptóticas ni las células no viables. Mientras que en los grupos de hembras y machos tratados con el CrO_3 se observa una disminución significativa de las células viables, que es consistente con el aumento de las células necróticas y apoptóticas que se observó en estos grupos. A pesar que las TAQ evaluadas en este estudio tienen una estructura química muy similar, la respuesta fisiológica es muy diferente, esto se debe principalmente a que las propiedades de los derivados de quinazolinas dependen en gran medida de la naturaleza de los sustituyentes, en este caso de los grupos hidroxilo y metoxi, además de que si estos se encuentran en el anillo de pirimidina o en el anillo de benceno (Armarego, 1963).

Por otro lado se puede observar que la administración de una misma TAQ tiene resultados diferentes cuando se administra a machos y a hembras, estas diferencias se pueden explicar en base a las diferencias hormonales entre los dos sexos, y los efectos que estas hormonas tienen en los procesos de absorción, distribución, biotransformación y excreción, especialmente la presencia o ausencia de testosterona o estrógeno. En humanos las diferencias en metabolismo de los xenobióticos está menos influenciada por el sexo que en algunas especies de animales experimentales como las ratas (TOXAMB, 2004). Los niveles de estrógenos en los machos son menores que en el de las hembras, y se ha propuesto que los estrógenos confieren protección a las células dañadas por estrés oxidante. Se han realizado estudios *in vivo* e *in vitro* para identificar el mecanismo de protección de los estrógenos y se plantea que funcionan como antioxidantes ya que actúan como inactivadores de RL, así como en la quelación y reducción de iones oxidantes (Bandeau *et al*, 2005). Por otra parte, en un estudio realizado por Borrás *et al.*, (2003) con ratas hembras, se observó que el daño oxidante en ADN mitocondrial en los machos es 4 veces mayor que en las hembras, debido a la actividad de la Mn- superóxido dismutasa y a la glutatión reductasa. Esto nos explica porque un ligero aumento de MN en ratones machos tratados con TAQ MLB01 y el efecto citotóxico en los grupos de ratones machos en donde se administró la TAQ MLB01 y TAQ MLB02.

VIII. CONCLUSIONES Y COMENTARIOS FINALES

1. La administración de las TAQ a una dosis de 10 mg/kg no son tóxicas, ya que no presentan signos clínicos de toxicidad.
2. La administración de las TAQ no inducen daño genotóxico en machos y hembras, ya que los incrementos de MN observados son marginales y se encuentran dentro de los rangos aprobados por las agencias reguladoras de sustancias genotóxicas, por lo que se sugiere que dicho efecto podría deberse a un efecto indirecto y no propiamente a un daño genotóxico.
3. Particularmente las TAQ MLB01 y MLB02 incrementan las células apoptóticas en hembras y machos, siendo más significativo para la TAQ MLB02. Este efecto podría estar relacionado con la disminución de MN.
4. La administración de la TAQ MLB01 y MLB02 inducen daño citotóxico en hembras/machos y machos respectivamente, ya que incrementan las células no viables.
5. La administración del testigo positivo (CrO_3) indujo daño genotóxico y citotóxico ya que incrementó la frecuencia de MN, células apoptóticas y necróticas, además de que disminuyó la viabilidad celular, lo que permitió corroborar nuestros resultados.
6. La TAQ MLB02 presenta un efecto muy interesante, ya que disminuye las frecuencias basales de MN e incrementa las células apoptóticas, lo que nos permite sugerir a la apoptosis como la posible vía de eliminación de las células dañadas.
7. Con base a los resultados obtenidos, las TAQ presentan grandes expectativas para continuar los estudios con la finalidad de su aplicación terapéutica en el tratamiento de malaria y leishmania.

IX. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adler ID, Bootman J, Favor J, Hook G, Schriever G, Welzl G, Whorton E, Yoshimura I, Hayashi M. (1998). Recommendations for statistical designs of in vivo mutagenicity test with regard to subsequent statistical analysis. *Mutation Research*, 417:19-30.
- Alagarsamy V, Solomon VR, Dhanabal K., (2007) Synthesis and pharmacological evaluation of some 3-penyl-2-substituted-3H-quinazolin-4-one as analgesic, anti-inflammatory agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 15:235-241.
- Allen RT, Hunter WJ III, Agrawal DK. 1997. Morphological and Biochemical Characterización and Analysis of Apoptosis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* 37: 215-228
- Al-Rashood ST, Aboldahab IA, Nagi MN, Abouzedid LA, Abdel-AZIZ AA, ABDEL-Hamine SG, Youssef KM, Al-Obaid AM (2006). Synthesis, dihydrofolate reductase inhibition, antitumor testing, and molecular modeling study of some new 4(3H)-quinazoline analogs. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 14: 8608-8621
- Alvarado M, Barcélo M, Carro L, Masaguer CF, Raviña E. (2006). Synthesis and biological evaluation antipsychotics. *Chemistry & Biodiversity*, 3:106-117
- Aly AA. (2003). Synthesis of novel quinazoline derivatives as antimicrobial agents. *Chinese Journal of Chemistry*, 21: 339-346
- Ames B, (1989). Mutagens and carcinogens: endogenous and exogenous factors. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 14, 66-77.
- Antipenko L, Karpenko A, Kovalenko S, Katsev A, Komarovska-Porokhnyavets E, Novikov V., Chekolito A. (2009) Synthesis of new 2-thio-[1,2,4] triazolo[1,5-c] quinazoline derivatives and its antimicrobial activity. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 57: 580-585
- Armarego WLF. (1963) Quinazolines, *Advances in Heterocyclic Chemistry*, Volume 1, Pages 253-309
- Baba A, Kawamura N, Makino H, Ohta Y, Taketomi S, Sohda T. (1996). Studies on disease-modifying antirheumatic drugs: synthesis of novel quinoline and quinazoline derivatives and their anti-inflammatory effect. *Journal Medicinal Chemistry*, 39: 5176-5182
- Bagchi D, Vuchetich PJ, Bagchi M, Hassaoun E, Tran M.N, Tangs L y Stosh. (1997). Induction of oxidative stress by chronic administration of sodium dichromate (Chromium VI) and Cadmium Chloride (Cadmium II) to rats; *Free Radical Biology & Medicine*; 22 (3) 471-478
- Bandeau M, Adlercreutz H, Kaihovaara P, Tikkanen MJ. (2005). Estrogen A-ring structure and antioxidative effects on lipoproteins. *Journal of steroid Biochemistry and molecular Biology*, 96:271-278
- Bhattacharjee A, Hartell MG, Nichols DA, Hicks RP, Stanton B, Van-Hamont JE, Milhous WK.. (2004). Structure-activity

- relationship study of antimalarial indolo [2,1-b] quinazoline-6,12-diones (tryptanthrins). Three dimensional pharmacophore modeling and identification of new antimalarial candidates. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 39 59–67.
- Blankenberg F. (2008). In vivo detection of apoptosis. *Journal of Nuclear Medicine*, 49(2): 81-95
- Bolognesi C. y Hayashi M. (2011). Micronucleus assay in aquatic animal. *Mutagenesis*, 26(1): 205-213
- Borras C, Sastre J, García-Sala D, Lloret A., Pallardo FV, Viña J. (2003). Mitochondria from females exhibit higher antioxidant gene expression and lower oxidative damage than males. *Free Radical Biology & Medicine* 34:546-552.
- Cavalli A, Lizzi F, Bongarzone S, Brun R, Krauth-Siegel LR, Bolognesi LM. (2009). Privileged structure-guided synthesis of quinazoline derivatives as inhibitors of trypanothione reductase. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 19, 3031-30335
- Chandregowda V, Kush AK, Chandrasekara Reddy G. (2009) Synthesis and in vitro antitumor activities of novel 4-anilinoquinazoline derivatives. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44: 3046-3055
- Chandrika PM, Yakaiah T, Narsaiah B, Sridhar V, Venungopal G, Rao JV, Kumar KP, Murthy USN, Rao ARR. (2009.) Synthesis leading to novel 2,4,6-trisubstituted quinazoline derivatives, their antibacterial and cytotoxic activity against THP-1, HL-60 and A375 cells lines. *Indian Journal of Chemistry*, 48B: 840-847
- Das J, Kang M, Kim E, Kwon D, Choi Y, Kim J. (2015). Hexavalent chromium induces apoptosis in male somatic and spermatogonial stem cells via redox imbalance. *Scientific Reports*; 5(1): 1-14
- Davoll J, Johnson A.M, Davies H.J., (1972). Folate antagonists. 2,2,4-Diamino-6 ((aralkyl and (heterocyclic) methyl) amino) quinazolines, a novel class of antimetabolites of interest in drug-resistant malaria and Chagas' disease. *Journal of Medicinal Chemistry*, 15 (1972) 812–826.
- Elena GA. 2002. Mecanismos de muerte celular: apoptosis y necrosis. *Revista Argentina Anestesiología*, 60 (6):391-401
- EPA. Environmental Protection Agency. (1984). Health Assessment Document for Chromium. *Environmental Assessment and Criteria Office*. Research Triangle Park, NW.
- Epperson M, Hadden C, Waddell T. (1995). Mechanistic basis for rate enhancements in the methanolysis of aliphatic esters of quinine. *Journal of Organic Chemistry* 60: 8113-8114.
- Evans, W.C. (2000) “Trease and Evans - Pharmacognosy“, 15TH ed. Saunders, Edinburgh.
- FDA. (2000). Guidelines for reproduction studies for safety evaluations of drugs for human use. *Food and Drug Administration*. USA.
- García-Rodríguez MC, López-Santiago M. Altamirano-Lozano M. (2001). Effect of chlorophyllin on chromium trioxide-induced micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. *Mutation Research*; 496: 145-51

- García-Rodríguez MC, Y Altamirano-Lozano MA. (2006) La clorofilina como modulador y protector de daño al ADN: experiencia en el ratón in vivo. *Bioquímica* 32:15-24
- García- Rodríguez MC, Carvente-Juarez MM, Altamirano-Lozano MA. (2013). Antigenotoxic and apoptotic activity of green tea polyphenol extracts on hexavalent chromium- induced ADN damage in peripheral blood of CD-1 mice: analysis with differential acridine orange/ethidium bromide staining. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* 13:1-9
- García-Rodríguez MA, Montaña-Rodríguez AR, Altamirano-Lozano MA (2015). Modulation of hexavalent chromium induced genotoxic damage in peripheral. *Journal of toxicology and environmental health*. 1104525
- Gonzales-Torres M, Betancourt M, Ortiz R (2000). Daño Oxidativo y Antioxidantes. *Bioquímica*; 25(1): 3-9
- Hayashi M., Morita T., Kodama Y., Sofuni T., Ishidate M Jr. (1990). The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*, 245: 245-249.
- Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volders M, Oleson FBJr., Pacchierotti F, Romagna F, Shimada H, Soutu S, Vannier B. (1994). In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutation Research*, 312: 293-304
- Hayashi M, Mac Gregor J, Gartehouse D, Adler I, Blaker D, Derting S, Krishna G, Morita T, Ruso A, Suto S (2000) In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatment, integration with toxicity testing, and automated scoring. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 35: 234-252.
- Hayashi Y, Kondo T, Zhao Q, Ogawa R, Cui Z, Feril L, Kasuya M. (2004). Signal transduction of p-53 independent apoptotic pathway induced by hexavalent chromium in U937 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 197 (2): 96-106
- Halliwell y Gutteridge (1999). Free Radicals and Antioxidants in the Year 2000; A Historical Look to the Future. *Free Radical Biology & Medicine*. 3rd edición; Oxford, U.K.
- Heddle AJ, Hite M, Kirkhart B, Mavournin K, McGahon JT, Newell GW, Salamone MF. (1983). The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity. A report of the U.S Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 123: 61-118.
- Hess HJ, Cronin TH, Scriabine A. (1968). Antihypertensive 2-amino-4(3H)-quinazolinones. *Journal of Medicinal Chemistry*, 11: 130-136
- Heterocyclic Chemistry. M. Sainsbury. (2001). The Royal Society of Chemistry. ISBN 0-85404-652-6.
- Howard MA, Terrel AB, Terrel DR, Medina PJ, Vesely SK, George JN. (2003). Quinine allergy causing acute severe systemic illness: report of four patients manifesting hematologic, renal and hepatic abnormalities. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 16:21-26.
- Jata V, Kashaw A, Mishra P. (2008) Synthesis and antimicrobial activity of some new 3-[5-(4-substituted) phenyl]-1,3,4-oxadiazole-2yl]-2-styrylquinazoline-

- 4(3H)-ones. *Medicinal Chemistry Research*, 17:205-211
- Jomova K, Valko M (2011) Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*; 283(2-3): 65-87
- Jones D. (2006). Redefining Oxidative Stress. *Antioxidants & Redox Signaling*, 8(9-10): 1865-1879.
- Kabri Y, Azas N, Dumètre A, Hutter S, Laget M, Verhaeghe P, Gellis A, Vanelle P. (2010). Original quinazoline derivatives displaying antiplasmodial properties. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45 616–622.
- Kouznetsov V, Palma AR. (1997). Química básica de los heterociclos y su importancia práctica. 1a Ed., Ediciones UIS, Bucaramanga, Colombia, 196.
- Kouznetsov VV, Vargas LY, Meléndez CM. (2005). Recent progress in the synthesis of quinolines. *Current Organic Chemistry* 9: 141-161.
- Krishana G, Nath J y Ong T. (1986). Inhibition of cyclophosphamide and mitomycin C-induced sister chromatid exchanges in mice by vitamin C. *Cancer Research*; 46(6): 2670-2674.
- Krishna G y Hayashi M. (2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutation Research*, 455: 155-166.
- Krishna, G, Fiedler, R, Theiss, JC, (1992). Simultaneous evaluation of clastogenicity, aneugenicity and toxicity in the mouse micronucleus assay immunofluorescence. *Mutation Research*, 282; 159-167.
- Krishna G, Urdana G, and Theiss J. (1998). Principles and practices of integrating genotoxicity evaluation into routine toxicology studies; a pharmaceutical industry perspective. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 32; 115-120
- Kumar N, Singh G, Yadav AK. (2001). Synthesis of some new pyrido [2,3-d] pyrimidines and their ribofuranosides as possible antimicrobial agents. *Heteroatom Chemistry*, 12(1):12,52
- Kuyper L F., Garvey J. M., Baccanari D.P. Champness J. N., Stammers, D.K., Bedell C.R. (1996). Conformationally Restricted Analogues of Trimethoprim: 2,6-Diamino-8-substituted Purines as Potential Dihydrofolate Reductase Inhibitors from *Pneumocystis carinii* and *Toxoplasma gondii*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 4, 593.
- Lakhan R, Singh OP, Singh-J RL. (1987) Studies on 4 (3H)- quinazoline derivatives as anti-malarials. *Journal of Indian Chemical Society*, 64: 316-318.
- Li H, Huang R, Qiu D, Yang Z, Liu X, Ma J, Ma Z. (1998) Synthesis and bioactivity of 4-quinazoline oxime ethers. *Progress in Natural Science*, 8:359-365
- Malamas MS, Millen J. (1991). Quinazolineacetic acids and related analogs as aldose reductase inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry*. 1492-1503
- Martindale. (2003). Guía completa de consulta farmacoterapéutica, 1ª ed. España: ARS MEDICA ISBN-13-9788495993007
- Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. (1990). The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutation Research*, 23 22.

- McGahon AJ, Martin SJ, Bissonnette RP, Mahboubi A, Shi Y Mogil RJ, Nishioka WK, Green DR. (1995). The End of the (Cell) Line: Methods for the Study of Apoptosis in vitro, en: *Methods in Cell Biology*. Vol 46. pp. 153-185.9: 29-80.
- Mendoza-Martínez C, Galindo-Sevilla N, Correa-Basurto J, Ugalde-Saldivar VM, Rodríguez-Delgado RG, Hernández-Pineda J, Padierna-Mota C, Flores-Alamo M, Hernández- Luis, F. (2015). Antileishmanial activity of quinazoline derivatives: Synthesis, docking screens, molecular dynamic simulations and electrochemical studies. *EL SEVIER. European Journal of Medicinal Chemistry*, 92: 314- 331.
- Mishra A., Srivastava K., Tripathi R., Puri S.K., Batra S. (2009). Search for new pharmacophores for antimalarial activity. Part III: synthesis and bioevaluation of new 6- thioureido-4 anilinoquinazolines, *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44 4404–4412.
- MSSSI y AEMPS (2008) Ficha técnica MINIPRESS. Renovación de la autorización: 30 de Mayo del 2004.
- MSSSI y AEMPS (2014) Ficha técnica ALFUZOSINA. Laboratorios Aurobindo, S.L.U Renovación de la autorización: Julio del 2014.
- Müller L, Kikuchi Y, Probst G, Shechtman L, Shimada H, Sofuni T, Tweats D. (1999). ICHharmonized guidance on genotoxicity testing of pharmaceuticals: evolution, reasoning and impact. *Mutation Research*, 436: 195-225.
- Nandy P, Vishalakshi MT, Bhat Ar. (2006). Synthesis and antitubercular activity of Mannich bases of 2-methyl-3H-quinazolin-4-ones. *Indian Journal of Heterocyclic Chemistry*, 15: 293-294
- O'Brien CS, Patierni S. (2003). Complexities of chromium carcinogenesis: role of cellular response, repair and recovery mechanisms. *Mutation Research*, 533: 3-36.
- OECD (1997) Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. Guideline for Testing of Chemicals; 474
- Paneersavam P., Raj T., Ishar PS M., Singh B., Sharma V., Rather BA. (2010) Anticonvulsant activity of Schiff bases of 3-amino-6,8-dibromo-2-phenyl-quinazolin-4(3H) – ones. *Indian J Pharm Sci*, 72:375-378
- Paris M., Hurabielle M. (1981) “Abrégé de Matière Médicale - Pharmacognosie”, tomo 1, y tomo 2. Ed. Masson. Paris.
- Ramírez AME y Rojas LM. (2010) La necrosis, un mecanismo regulado de muerte celular. *Latreia* 23 (2): 166-177.
- Ramos-León J. (2016). Efecto de los flavonoles de camellia sinesis (mircetina, quercetina y rutina) sobre la inducción de MN y apoptosis en ratones tratados con trióxido de cromo. (Tesis de pregrado). Fes Zaragoza (UNAM), México.
- Ravikanth S, Reddy GV, Kishore KH, Shanthanrao P, Narsaiah B, Murthy SN. (2006). *European Journal of Medicinal Chemistry*, 41,1011.
- Rocha CAM, Da Cuncha LA, Pionheiro RHS, Bahía MO, Burbano RMR, (2011). Studies of micronuclei and other nuclear abnormalities in red blood cells of colossoma macropomum exposed to methylmercury. *Genetics and Molecular Biology*, 34(4): 694-697.
- Rohini R. Muralidhar Reddy P, Shanker K., Hu A., Ravinder V. (2010) Antimicrobial study of newly synthesized 6-substituted

- indolo [1,2-c] quinazolines. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45:1200-1205
- Rojas-Aguirre Y, Hernández-Luis F, Mendoza-Martínez C, Patricio Sotomayor C, Felipe Aguilar L, Villena F, Castillo I, Hernández DJ, Suwalsky M. (2012). Effects of an antimalarial quinazoline derivative on human erythrocytes and on cell membrane molecular models. *ELSEVIER. 818 7 Biochimica et Biophysica Acta* 138–746
- Rosowsky, A.; Forsch, a. R.; Bader, H. (1991) Freisheim. Síntesis and in vitro biological activity, and methotrexate White and L-ornithinr side chain. *Journal of Medicinal Chemistry*, 191, 34, 1447-1454.
- Saravanan G, Alagarsamy V, Prakash CR (2010) Synthesis and evolution of antioxidant activities of novel quinazoline derivates. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2:83-86
- Sasmal S, Balaji G, Kanna Reddy HR, Balasubrahmanyam D, Srinivas G, Kyasa S, Sasmal PK, Khanna I, Talmar R, Sebastian VJ, Frimurer TM, Rist O, Elsert L. (2012). Desing and apyimizati'n of quinazoline derivates as melanin concentrating hormone receptor 1 (MCHR1) atagonists. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 22
- Shilei L, Xiao W, Yong H, Mingxia Z, Yurong C, Jingli X, Man F, Jin C, Hongyu N, Chuanmin Q, (2013). Design and synthesis of novel quinazoline nitrogen mustard derivatives as potential therapeutic agents for cáncer . *European Journal of Medicinal Chemistry*, Volume 67, Pages 293-301: 3157-3162
- Stork G, Niu D, Fujimoto A, Koft E, Balkovec J, Tata J, Dake G. (2001). The first stereoselective total synthesis of quinine. *Journal of the American Chemical Society*, 123: 3239-3242
- Taraphdar AK, Roy M, and Bhattacharya RK. (2001). Natural products as inducers of apoptosis: implication for cáncer theraphy and prevention. *Current Science*, 80: 1387-1396.
- Ton SE, Curry BJ, Barker AJ, Walkeling AE, Guy SP, Woodburn JR, Ashton. (2002) Se inhibitor of epidermal growth factorE., Curry BJ., Gibson KH. ZD 1839 (Iressa): ano rally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cáncer therapy. *Cancer Research*, 62:5749-5754.
- TOXAMB, (2004). Evaluación de Riesgos y Daño Ambiental © 1996-2001, The University of Arizona, Disponible en <http://toxamb.pharmacy.arizona.edu/c2-4-2-3.html>. Revisada el 26 de Mayo del 2016
- Vasdev N, Dorff PN, Gibbs AR, Nandan E, Reid LM, Neil JPO', VanBrocklin HF (2005). Sintesis of 6-acrylamido-4-(-2-[18F] fluoroanilino) quinazoline: A prospective irreversible EGFR binding probe. *Journal of Labeledled Compd Rad*, 48: 109-115
- Verhaeghe P, Azas N, Hutter S, Castera-Ducros C, Laget M, Dumètre A, Gasquet M., Reboul J.-P., Rault S., Rathelot P., Vanelle P. (2009) Synthesis and in vitro antiplasmodial evaluation of 4-anilino-2-trichloromethylquinazolines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 17 4313–4322.
- Verpoorte R, (1988). "Cinchona Alkaloids", in: Brossi, A. (Ed), *The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology*, Ac. Press, Inc., Vol. 34 . 331

- Wakeling AE, Guy SP, Woodburn JR, Ashton SE, Curry BJ., Barker A.J, Gibson KH: (2002) ZD1839 (Iressa): ano rally active inhibitor of epidermal growth factor signaling with potential for cáncer therapy. *Cancer Research*, 62:5749-5754.
- Wang D. & Gao f. (2013), Quinazoline derivatives: synthesis and bioactivities. *Chemistry Central Journal*, 7;95-334; 358-369.
- Ward J. (1985) Biochemistry of DNA lesions. *Radiation Research*, 104:103-111
- White, E. (1996). Life, death , and pursuit of apoptosis. *Genes and Development*. 10:1-

1. PRESENTACIÓN DE TRABAJOS

- 1.1. Evento:** XX simposio del departamento de Ciencias de la Salud
Título de la ponencia: “Efecto genotóxico y citotóxico de la quinazolina MLB13 en sangre periférica de ratón: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular”.
Organizador: La Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y el Departamento de Ciencias de la salud.
Lugar y fecha: Departamento de Ciencias de la Salud de la Universidad Autónoma de México Iztapalapa 9 de octubre del 2015.
Tipo de participación: PONENTE
- 1.2. Evento:** XIX Congreso Estudiantil de Farmacología “Dr. Rafael Méndez Martínez”
Título de la ponencia: “Evaluación genotóxica y citotóxica de nuevos fármacos derivados de las quinazolininas (MLB13) en ratones Hsd: ICR.
Organizador: Asociación Mexicana de Farmacología A. C. y el Instituto Nacional de Cardiología
Lugar y fecha: Instituto Nacional de Cardiología, México D.F. 6 de Noviembre del 2015
Tipo de participación: PONENTE
- 1.3. Evento:** XVII Foro de Investigación Escolar de Biología
Título de la ponencia: “Efecto genotóxico y citotóxico de la quinazolina MLB13 en sangre periférica de ratones Hsd: ICR”
Organizador: Carrera de Biología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM
Lugar y fecha: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza 5 de febrero del 2016
Tipo de participación: PONENTE
- 1.4. Evento:** XVI Reunión Internacional de Ciencias Médicas
Título de la ponencia: “Evaluación de micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular en sangre periférica de ratones Hsd:ICR tratados con compuestos quinolínicos (quinazolininas MLB13y MLB02)”
Organizador: Universidad de Guanajuato (Campus León), División Ciencias de la Salud, Departamento de Ciencias Médicas.
Lugar y fecha: Universidad de Guanajuato (Campus León) 27 de abril del 2016
Tipo de participación: PONENTE

- 1.5. **Evento:** XVIII Foro de Investigación Escolar de Biología
Título de la ponencia: “Efecto de la quinazolina MLB13 sobre el daño genotóxico y citotóxico en ratones tratados con CrO₃”.
Organizador: Carrera de Biología de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM
Lugar y fecha: Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. 12 de agosto del 2016
Tipo de participación: Ponente.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA
UNIDAD IZTAPALAPA

SIMPOSIO DEL DEPARTAMENTO DE



XXX

CIENCIAS DE LA SALUD

MEMORIAS

7 al 9 de octubre de 2015
Sala Sandoval Vallarta

Universidad Autónoma Metropolitana – Unidad Iztapalapa
México D. F.

20

EFFECTO CARDIOTÓXICO DEL ÁCIDO 3-NITROPROPIONICO EN EL MIOCARDIO DURANTE EL ENVEJECIMIENTO.

¹Alejandro Silva Palacios, ²Armando Luna López, ³Ana Cecilia Zazueta Mendizabal y Mina Königsberg Fainstein

¹ Universidad Autónoma Metropolitana/Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chavez", ² Instituto Nacional de Geriatria, ³ Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", ⁴ Universidad Autónoma Metropolitana

Las quinazolininas, son nuevos compuestos quinólicos que han sido sintetizados en la Facultad de Química (UNAM) con el propósito de potenciar sus efectos terapéuticos como antioxidantes. En las primeras pruebas que se realizaron in vitro con variantes de estas quinazolininas se observó que eran capaces de proteger de los efectos de la malaria y la leishmaniasis, además de presentar una baja toxicidad. En este estudio se evaluó la genotoxicidad y citotoxicidad in vivo de la quinazolinina MLB13. Grupos de seis ratones hembra y macho de la cepa Hsd: ICR fueron divididos al azar en los siguientes grupos: a) testigo, se le administró solo el vehículo por vía i.p. (dimetilsulfóxido), y b) quinazolininas, se les administró por vía i.p. 10 mg/Kg de la quinazolinina MLB13. Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. Los micronúcleos (MN) se evaluaron de acuerdo a la técnica propuesta por Hayashi et al. (1990)¹, mientras que la apoptosis y viabilidad celular se realizó de acuerdo a la técnica modificada por García-Rodríguez et al., (2013)². Se observó que la quinazolinina MLB13 disminuye las frecuencias basales de MN tanto en hembras como en machos, siendo más significativo en las hembras. Sin embargo, hubo un incremento significativo en la muerte celular en las hembras. Estos resultados nos permiten sugerir que una dosis de 10 mg/kg de la quinazolinina MLB13 no produce daño genotóxico, sino por el contrario lo disminuye, y que la posible vía es mediante la inducción de muerte celular de las células dañadas.

Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN217712, y por CB-SEP-CONACyT 220664.

¹Hayashi M, Morita T, Kodama Y, Sofuni T, Ishidate M. 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res*; 245: 245-249.

²García-Rodríguez MC, Cervante-Juárez MM, Altamirano-Lozano MA. 2013. Antigenotoxic and Apoptotic Activity of Green Tea Polyphenol Extracts on Hexavalent Chromium-induced DNA Damage in Peripheral Blood of CD-1 Mice: Analysis with Differential Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining. *Oxid Med Cell Longev*; 1-9.

Palabras claves: Genotoxicidad, Citotóxicidad, Quinazolininas, Micronúcleos, Apoptosis, Quinina.



XIX Congreso Estudiantil de Farmacología

“La Farmacología Cardiovascular en México”

En memoria del Dr. Rafael Méndez Martínez (1906-1991)

SEDE: Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez”

Dr. Marco A. Martínez Ríos, Presidente Honorario del Congreso

fool.com

Efecto genotóxico y citotóxico de la quinazolina MLB13 en sangre periférica de ratones: micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular

Hernández-Cruz Estefani¹, Altamirano-Lozano Mario¹, Hernández-Luis Francisco², López-Sánchez Marcela Alejandra² y García-Rodríguez María del Carmen^{1*} ¹Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental (UNIGEN), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México, D.F. ²Departamento de Farmacia, Facultad de Química. UNAM, México D.F. *carmen.garcia@unam.mx

Las quinazolininas, son nuevos compuestos quinólicos que han sido sintetizados en la Facultad de Química (UNAM) con el propósito de potenciar sus efectos terapéuticos como antioxidantes. Para ello, se evaluó la genotoxicidad y citotoxicidad *in vivo* de la quinazolina MLB13. Grupos de seis ratones hembra y macho de la cepa Hsd: ICR fueron divididos al azar en los siguientes grupos: a) testigo, se le administró solo el vehículo por vía i.p. (dimetilsulfóxido), y b) quinazolininas, se les administró por vía i.p. 10 mg/Kg de la quinazolina MLB13. Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. Los micronúcleos (MN) se evaluaron de acuerdo a la técnica propuesta por Hayashi *et al.* (1990)¹, mientras que la apoptosis y viabilidad celular se realizó de acuerdo a la técnica modificada por García-Rodríguez *et al.*, (2013)². Se observó que la quinazolina MLB13 disminuye las frecuencias basales de MN tanto en hembras como en machos, siendo más significativo en machos. En cuanto a viabilidad celular no se observa una diferencia entre machos y hembras. Estos resultados nos permiten sugerir que una dosis de 10 mg/kg de la quinazolina MLB13 no produce daño genotóxico, sino por el contrario lo disminuye, y que la posible vía es mediante la inducción de muerte celular de las células dañadas.

Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN217712, y por CB-SEP-CONACyT 220664.

¹Hayashi M, *et al.*, 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res*; 245. 245-249. ²García-Rodríguez MC, *et al.*, 2013. Antigenotoxic and Apoptotic Activity of Green Tea Polyphenol Extracts on Hexavalent Chromium-induced DNA Damage in Peripheral Blood of CD-1 Mice: Analysis with Differential Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining. *Oxid Med Cell Longev*; 1-9.



XVII FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA

del 03 al 05 de FEBRERO de 2016



Efecto genotóxico y citotóxico de la quinazolina MLB13 en sangre periférica de ratones Hsd:ICR

Hernández-Cruz Estefani, Altamirano-Lozano Mario, Hernández-Luis Francisco, López-Sánchez Marcela Alejandra y García-Rodríguez María del Carmen

Modalidad y Ciclo

Por favor marque con una x

	Oral		Básico
X	Cartel		Intermedio
	Video	X	Terminal

Resumen

Las quinazolinas, son nuevos compuestos quinólicos que han sido sintetizados en la Facultad de Química (UNAM) con el propósito de potenciar sus efectos terapéuticos como antioxidantes. Para ello, se evaluó la genotoxicidad y citotoxicidad in vivo de la quinazolina MLB13. Grupos de seis ratones hembra y macho de la cepa Hsd: ICR fueron divididos al azar en los siguientes grupos: a) testigo, se le administró solo el vehículo por vía i.p. (dimetilsulfóxido), y b) quinazolinas, se les administró por vía i.p. 10 mg/Kg de la quinazolina MLB13. Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. Los micronúcleos (MN) se evaluaron de acuerdo a la técnica propuesta por Hayashi et al. (1990)¹, mientras que la apoptosis y viabilidad celular se realizó de acuerdo a la técnica modificada por García-Rodríguez et al., (2013)². Se observó que la quinazolina MLB13 disminuye las frecuencias basales de MN tanto en hembras como en machos, siendo más significativo en machos. En cuanto a viabilidad celular no se observa una diferencia entre machos y hembras. Estos resultados nos permiten sugerir que una dosis de 10 mg/kg de la quinazolina MLB13 no produce daño genotóxico, sino por el contrario lo disminuye, y que la posible vía es mediante la inducción de muerte celular de las células dañadas. **Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN217712, y por CB-SEP-CONACyT 220664.**

¹Hayashi M, *et al.*, 1990. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res*; 245. 245-249. ²García-Rodríguez MC, *et al.*, 2013. Antigenotoxic and Apoptotic Activity of Green Tea Polyphenol Extracts on Hexavalent Chromium-induced DNA Damage in Peripheral Blood of CD-1 Mice: Analysis with Differential Acridine Orange/Ethidium Bromide Staining. *Oxid Med Cell Longev*; 1-9.

Palabras clave:

Antioxidante, quinazolina, cromo hexavalente, micronúcleos, apoptosis.

XVI Reunión Internacional de Ciencias Médicas



UNIVERSIDAD DE GUANAJUATO

Universidad de Guanajuato, Campus León,
División Ciencias de la Salud, Departamento de Ciencias Médicas.

XVI Reunión Internacional de Ciencias Médicas

27-29 abril 2016

Pre-inscripción hasta el 8 de Abril

Profesores
MX\$ 800 - US\$ 60
Estudiantes
MX\$ 300 - US\$ 20

Inscripción desde el 8 de Abril

Profesores
MX\$ 800 - US\$ 60
Estudiantes
MX\$ 400 - US\$ 40

Auditorio del Departamento de Estudios Culturales del Campus León, de la Universidad de Guanajuato



Sede:

Prolongación Calzada de los
Héroes esp. Viraso de Querólan,
Colonia La Matricula, León,
Guanajuato, México

Informes:

Departamento de Ciencias Médicas de la Universidad de Guanajuato,
20 de Enero 929, Colonia Obregón, León, Guanajuato, México
e-mail: ronaugo@gmail.com
+52 (477) 716 8354 / 714 2612



Envío de Trabajos Libres: www.reunioncienciasmedicasugto.org.mx



84. Evaluación de micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular en sangre periférica de ratones Hsd:ICR tratados con compuestos quinolínicos (quinazolinas MLB13 y MLB02)

Hernández-Cruz Estefani Yaquelin[a], Altamirano-Lozano Mario[a], Hernández-Luis Francisco[b], López-Sánchez Marcela Alejandra[b] y García-Rodríguez María del Carmen[a]*. [a]Unidad de Investigación en Genética y Toxicología Ambiental, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. México, D.F. [b]Departamento de Farmacia, Facultad de Química. UNAM, México D.F.

Introducción. En la Facultad de Química (UNAM) el grupo de investigación del Dr. Francisco Hernández-Luis ha sintetizado y modificado nuevos compuestos derivados de las quinazolinas (formados por un anillo de benceno y otro de pirimidina) con el propósito de potenciar sus efectos terapéuticos en el tratamiento de la malaria y leishmaniasis, así como de conferirles propiedades antioxidantes. Antes del uso preclínico de un nuevo fármaco deben realizarse pruebas genotóxicas y citotóxicas.

Objetivo. En el presente trabajo se evaluó el efecto genotóxico y citotóxico de estos nuevos compuestos quinolínicos (quinazolina MLB13 y MLB02), mediante la evaluación de micronúcleos, apoptosis y viabilidad celular.

Métodos. Grupos de seis ratones hembra y macho de la cepa Hsd:ICR fueron divididos en los siguientes grupos: a) testigo, se le administró solo el vehículo por vía i.p. (dimetilsulfóxido), b) quinazolinas, MLB13 ó MLB02, administradas por vía i.p. 10 mg/kg y c) testigo positivo (CrO₃), administrado por vía i.p. 20 mg/Kg. Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. Los micronúcleos (MN) se evaluaron de acuerdo a la técnica propuesta por Hayashi et al. (1990)[1], mientras que apoptosis y viabilidad celular se realizó de acuerdo a la técnica modificada por García-Rodríguez et al., (2013)[2].

Resultados. Se observó que tanto la quinazolina MLB13 como MLB02 disminuyen las frecuencias basales de MN tanto en hembras como en machos, siendo más significativo para los machos tratados con la quinazolina MLB02, los cuales también incrementaron las frecuencias de apoptosis. No se observaron cambios significativos en la viabilidad celular.

Conclusión. Estos resultados sugieren que una dosis de 10 mg/kg tanto de la quinazolina MLB02 como MLB13 no produce daño genotóxico, por el contrario lo disminuye, y que la posible disminución de daño al ADN observado para la quinazolina MLB02 es mediante la inducción de apoptosis. Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN217712, y por CB-SEP-CONACyT 220664. [1]Hayashi et al., 1990. *Mutat Res*; 245:245-249. [2]García-Rodríguez et al., 2013. *Oxid Med Cell Longev*; 2013:1-9.



XVIII FORO DE INVESTIGACIÓN ESCOLAR EN BIOLOGÍA

del 10 al 12 de AGOSTO de 2016



Efecto de la quinazolina MLB13 sobre el daño genotóxico y citotóxico en ratones tratados con CrO₃

Julio César Olguin-Galindo, Estefani Yaquelin Hernández-Cruz, Francisco Hernández-Luis, Marcela Alejandra López-Sánchez, María del Carmen García-Rodríguez

Modalidad y Ciclo

Por favor marque con una x

	Oral		Básico
X	Cartel		Intermedio
	Video	X	Terminal

Resumen

En la Facultad de Química (UNAM) se sintetizaron nuevos compuestos derivados de las quinazolininas, con el propósito de potenciar sus efectos terapéuticos en el tratamiento de la malaria y la leishmania, aunado a ello en particular a la quinazolina MLB13 se le adicionaron grupos hidroxilo y metoxi para conferirles propiedades antioxidantes. En contra parte los compuestos de cromo hexavalente como el trióxido de cromo (CrO₃) son capaces de inducir daño oxidativo al ADN durante su reducción intracelular a cromo trivalente. En este estudio se evaluó el efecto de la quinazolina MLB13 sobre el daño genotóxico y citotóxico inducido por el CrO₃. Grupos de cinco ratones de la cepa Hsd:ICR fueron divididos en los siguientes grupos: a) testigo 1, se administró sólo el vehículo agua, b) testigo 2, tratado con dimetilsulfóxido (disolvente de quinazolina) por vía i.p., c) quinazolina MLB13, administrada por vía i.p. (10 mg/kg), d) CrO₃, administrado por vía i.p. (20 mg/kg), y e) grupo tratado con MLB13 y CrO₃. Se tomaron muestras de sangre periférica de la vena caudal a las 0, 24, 48 y 72 horas después de la aplicación de los tratamientos. Se observó que la administración de quinazolina no incrementa las frecuencias de MN. La administración del CrO₃ incrementa las frecuencias de MN. Cuando se combinaron los tratamientos de quinazolina-CrO₃, se observó una disminución de alrededor del 24% a la hora 48. En cuanto a la apoptosis, se observó que tanto el grupo tratado con CrO₃ como el combinado (MLB13-CrO₃) incrementaron las células apoptóticas. La administración de CrO₃ y quinazolina-CrO₃ modifican la viabilidad celular. A partir de estos resultados se sugiere que la quinazolina MLB13 puede modular parcialmente el daño genotóxico inducido por metales pesados. *Proyecto financiado por UNAM mediante la DGAPA PAPIIT-IN219216 y por la CB-SEP-CONACyT 220664.*

Palabras clave:

Antioxidante, quinazolina, cromo hexavalente, micronúcleos, apoptosis.

