



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL

**“EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE DOS COMPUESTOS DE  
COORDINACIÓN EN UN MODELO MURINO DE OBESIDAD  
INDUCIDA POR LA DIETA COMO ADYUVANTES EN EL  
TRATAMIENTO DE ESTA ENFERMEDAD.”**

TESIS  
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA:  
**LUIS ALBERTO ROMERO GONZÁLEZ**

TUTOR PRINCIPAL

**M. EN C. MARÍA ISABEL GRACIA MORA**  
FACULTAD DE QUÍMICA

COMITÉ TUTORAL

**DRA. LAURA COBOS MARÍN**  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

**M. EN C. LUIS ENRIQUE GARCÍA ORTUÑO**  
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

CIUDAD UNIVERSITARIA, CD.MX.

JUNIO 2018



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



## **A mis papas y mi hermano...**

Porque este es un logro compartido, pues es el resultado de todo el esfuerzo que sin ustedes no seria posible.

Porque son los mas importante para mi, por su gran amor e incondicional apoyo, por ser esta gran familia, que a pesar de todo salimos adelante siempre juntos, esto es parte de nuestro comienzo de una nueva y mejor vida.

...LOS AMO.

**Luis Romero**

# Agradecimientos

---

A la Universidad Nacional Autónoma de México por darme la oportunidad y el apoyo de realizar mis estudios profesionales en tan importante institución, por todos los profesores que a lo largo de la licenciatura y la maestría me brindaron sus conocimientos y contribuyeron en mi formación académica.

A CONACYT por la beca de apoyo otorgada durante la realización de este posgrado.

A la Dra. Noráh Yolanda Barba Behrens como responsable de los proyectos CONACYT CB2012-178851 y PAPIIT IN224516 DGAPA-UNAM, así como por la por la síntesis y caracterización físico-química de los compuesto de prueba.

A la M. en C. María Isabel Gracia Mora por fungir como tutora principal de mi maestría y formar parte del jurado evaluador de esta tesis, por su dedicación y todo el apoyo que me ha dado a lo largo de estos 8 años dentro de la UNEXA-UNIPREC, por aconsejarme, guiarme y compartirme su infinito conocimiento, siendo realmente un ejemplo a seguir, pero en especial por todo el gran cariño que siempre me ha dado.

A la Dra. Laura Cobos Marín, el M. en C. Luis Enrique García Ortuño, la M. en C. Marisol Rivera Huerta y la Dra. Azucena Ibeth Carballo Villalobos por formar parte del comité tutor y del jurado evaluador de esta tesis, así también por sus comentarios, observaciones y recomendaciones realizadas, pero principalmente por su disposición, interés y accesibilidad.

Al M. en C. Francisco Sánchez Bartéz por todo su apoyo durante la maestría, por todo el conocimiento que me ha brindado y por su gran amistad.

A la MVZ Lucia Macías Rosales, la MVZ Mabel Cecilia Tinoco Méndez y el M. en C Héctor Ariel Rico Morales, por su gran apoyo en la ejecución de este estudio y por su gran amistad.

A la MVZ Mónica Velázquez Guerra por el inmenso apoyo que me brindo cada día en la ejecución de este estudio.

A todo el equipo del área de patología clínica y anatomopatología de la UNIPREC, la MMVZ Adriana Isabel Muñoz Duarte, la MVZ Ayla María Pérez Gutiérrez, la MVZ Margarita Franco García, el MVZ Ramón Sebastián León Zetina y la histotecnóloga María de Lourdes Velázquez Jiménez por su tan valioso apoyo en la realización de los análisis patológicos y por formar una muy buena amistad.

A la Dra. Ruth Bustamante García por compartirme con tanta amabilidad sus conocimientos y apoyarme en la realización de los análisis estadísticos.

A mis compañeros y amigos M. en C. Abel Zapata Arenas, Marco Antonio Hernández José y Alejandro Erwin Mösso Vázquez por su amable apoyo en la ejecución de este estudio y por su amistad.

Agradezco infinitamente a todos ustedes, pues la ayuda y colaboración de cada uno fue parte fundamental en la realización de este trabajo.

El presente trabajo se realizó en la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC) de la Facultad De Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la M. en C. María Isabel Gracia Mora de la Facultad de Química como tutora principal, y de la Dra. Laura Cobos Marín y el M. en C. Luis Enrique García Ortuño de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia como miembros del comité tutor.

# Resumen

---

Las sensaciones de apetito y saciedad están reguladas por una red de vías neuronales localizadas en el hipotálamo que funcionan mediante neuropéptidos y neurotransmisores encargados de mantener el equilibrio entre la ingesta y el gasto calórico. Entre estos neurotransmisores se encuentra la serotonina, involucrada en la disminución del apetito, reducción del consumo de alimento y pérdida de grasa corporal excesiva. A partir del conocimiento del papel de la serotonina sobre los mecanismos de saciedad se ha buscado desarrollar alternativas terapéuticas eficaces en el tratamiento de la obesidad, como parte de dichas alternativas se encuentra la administración de su precursor, el 5-hidroxitriptófano. Por otro lado, es bien conocida la importancia de los compuestos de coordinación dentro de la medicina, se ha demostrado que estos complejos metálicos de ligantes biológicamente importantes pueden ser más eficaces que dicho ligante libre, puesto que incorporan una multifuncionalidad dentro de una sola molécula. Con base en esto, se propuso el uso de dos compuestos de coordinación basados en el ligante 5-hidroxitriptofano y que poseen un centro metálico, ya sea de cobalto o de cobre, los cuales podrían presentar eficacia terapéutica como posibles adyuvantes al tratamiento de la obesidad. El objetivo de este estudio fue contribuir a la evaluación de seguridad y eficacia de estos compuestos de coordinación como tratamiento para la obesidad en un modelo de obesidad inducida por dieta. Para el estudio de la seguridad se evaluó la toxicidad aguda de los compuestos, obteniendo las  $DL_{50}$  de cada uno en ratones Hsd:ICR (CD-1<sup>®</sup>) (NB5H02: 613.9 mg/kg; NB5H08: 341.045 mg/kg) y ratas HsdHan<sup>®</sup>:WIST (Wistar) (NB5H02: 95.90 mg/kg; NB5H08: 122.88 mg/kg), demostrando que dichos compuestos presentan una toxicidad menor que cada uno de los metales y el ligante por separado. Además se utilizaron ratas HsdBlu:LE (Long-Evans) como modelo de obesidad inducida por una dieta hipercalórica, en donde se evaluó la toxicidad subcrónica y la eficacia antiobesidad de los compuesto de coordinación a las dosis de 2.6 y 3.8 mg/Kg, encontrando un incremento en los niveles de fosfatasa alcalina a las dosis altas de ambos compuestos, así como un aumento en el hematocrito, eritrocitos y hemoglobina de los grupos correspondientes al compuesto de cobalto NB5H02. En cuanto a la eficacia se observó que los grupos de dicho compuesto, NB5H02, presentaron valores de glucosa menores a los demás tratamientos, así como una tendencia a disminuir los valores de colesterol y triglicéridos, y un menor grado de degeneración hepatocelular. Aunado a esto,

específicamente el grupo con la dosis baja de este compuesto mostró un menor incremento de peso, consumo de alimento e índice de masa corporal. Por lo tanto se concluyó que ningún compuesto presenta una toxicidad importante a las dosis evaluadas y que la eficacia antiobesidad es mayor en el compuesto de cobalto, principalmente a la dosis de 2.6 mg/Kg. Es importante mencionar que el presente trabajo fue realizado bajo un sistema de gestión de la calidad y buenas prácticas de laboratorio lo cual garantiza la confiabilidad y exactitud de los datos con el fin de promover la calidad y validez de las pruebas.

Palabras clave: Obesidad, 5-Hidoxitriptófano, Compuestos de coordinación, Cobre, Cobalto, Obesidad inducida por dieta.

# Abstract

---

Appetite and satiety are regulated by a network of neuronal pathways located in the hypothalamus that function through neuropeptides and neurotransmitters responsible for maintaining balance between intake and caloric expenditure. One of these neurotransmitters is serotonin, which is involved in decreasing appetite, reducing food intake and losing excessive body fat. From the knowledge of the role of serotonin on satiety mechanisms, it has been sought to develop effective therapeutic alternatives in the treatment of obesity, as part of these alternatives is the use of its precursor, 5-hydroxytryptophan. On the other hand, is well known the value of coordination compounds in medicine, it has been demonstrated that these metal complexes of biologically important ligands can be more effective than free ligand, since they incorporate a multifunctionality within a single molecule. Based on this, it was proposed the use of two coordination compounds based on the 5-hydroxytryptophan which have either a cobalt or copper metallic center, that could have therapeutic efficacy as possible adjuvants to the treatment for obesity. The objective of this study was to contribute to the safety and efficacy evaluation of these coordination compounds as a treatment for obesity in a model of diet-induced obesity. For safety assay, the acute toxicity of the compounds was evaluated, obtaining the LD<sub>50</sub> of each in Hsd:ICR (CD-1®) mice (NB5H02: 613.9 mg/kg, NB5H08: 341.045 mg/kg) and HsdHan®:WIST (Wistar) rats (NB5H02: 95.90 mg/kg; NB5H08: 122.88 mg/kg), showing that this compounds have a lower toxicity than each of the metals and the ligand separately. In addition, HsdBlu:LE (Long-Evans) rats were used as a model of induced obesity by a hypercaloric diet, in which subchronic toxicity and anti-obesity efficacy of coordination compounds were evaluated at 2.6 and 3.8 mg/kg, finding an increase in alkaline phosphatase levels of high doses of both compounds, as well as an increase in the hematocrit, erythrocytes and hemoglobin values of the groups corresponding to the cobalt compound NB5H02. According efficacy, it was observed that the groups of this NB5H02 compound, had lower glucose values than the other treatments, as well as a tendency to decrease cholesterol and triglycerides values, and a lower degree of hepatocellular degeneration. Additionally, specifically, low dose of cobalt compound group, showed a lower weight increase, food consumption and body mass index.

Therefore, it was concluded that no compound has an important toxicity at evaluated doses and that antiobesity efficacy is greater in cobalt compound, mainly at dose of 2.6 mg/kg. It is important to mention that the present work was performed under a quality management system and good laboratory practices which guarantees data reliability and accuracy in order to promote quality and validity of the tests.

Key words: Obesity, 5-Hydroxytryptophan, Coordination compounds, Copper, Cobalt,  
Diet-induced obesity.

# Contenido

---

|                              |           |
|------------------------------|-----------|
| <b>LISTA DE CUADROS.....</b> | <b>XI</b> |
|------------------------------|-----------|

|                               |            |
|-------------------------------|------------|
| <b>LISTA DE FIGURAS .....</b> | <b>XII</b> |
|-------------------------------|------------|

|   |              |
|---|--------------|
| <b>INTRODUCCIÓN.....</b>                                  | <b>- 1 -</b> |
| APETITO Y SACIEDAD .....                                  | - 1 -        |
| EPIDEMIOLOGÍA .....                                       | - 4 -        |
| COSTOS Y CONSECUENCIAS DE LA OBESIDAD .....               | - 7 -        |
| PREVENCIÓN Y TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD.....              | - 8 -        |
| TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO.....                            | - 9 -        |
| 5-HIDROXITRIPTÓFANO EN EL TRATAMIENTO DE LA OBESIDAD..... | - 12 -       |
| QUÍMICA BIOINORGÁNICA.....                                | - 15 -       |
| IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL COBALTO .....                   | - 16 -       |
| IMPORTANCIA BIOLÓGICA DEL COBRE .....                     | - 17 -       |
| COMPUESTOS DE COORDINACIÓN.....                           | - 19 -       |
| DESARROLLO DE NUEVOS FÁRMACOS .....                       | - 23 -       |
| MODELOS PARA EL ESTUDIO DE LA OBESIDAD .....              | - 27 -       |

|                       |               |
|-----------------------|---------------|
| <b>HIPÓTESIS.....</b> | <b>- 29 -</b> |
|-----------------------|---------------|

|                             |               |
|-----------------------------|---------------|
| <b>OBJETIVOS .....</b>      | <b>- 30 -</b> |
| OBJETIVO GENERAL.....       | - 30 -        |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS ..... | - 31 -        |

|   |               |
|---|---------------|
| <b>MATERIAL Y MÉTODOS .....</b>   | <b>- 32 -</b> |
| PREPARACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE PRUEBA .....   | - 32 -        |
| MANTENIMIENTO DE LOS ANIMALES .....   | - 33 -        |
| EVALUACIÓN DE LA SEGURIDAD DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN.....   | - 34 -        |
| EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN POR VÍA INTRAPERITONEAL EN RATONES HSD:ICR (CD-1 <sup>®</sup> ) Y OBTENCIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 .....     | - 35 -        |
| EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN POR VÍA INTRAPERITONEAL EN RATAS HSDHAN <sup>®</sup> :WIST (WISTAR) Y OBTENCIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 ..... | - 37 -        |
| MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR LA DIETA (DIO) EN RATAS HsdBLU:LE (LONG-EVANS) .....  | - 39 -        |

|  |               |
|--|---------------|
| EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD SUBCRÓNICA A DOSIS REPETIDAS DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN POR VÍA INTRAPERITONEAL EN RATAS HSDBLU:LE (LONG-ÉVANS) .....  | - 43 -        |
| EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN ADMINISTRADOS DE FORMA SUBCRÓNICA POR VÍA INTRAPERITONEAL EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR LA DIETA EN RATAS HSDBLU:LE (LONG-ÉVANS) ..... | - 46 -        |
| ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....   | - 50 -        |
| <b>RESULTADOS.....</b>   | <b>- 51 -</b> |
| EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN POR VÍA INTRAPERITONEAL EN RATONES HSD:ICR (CD-1®) Y OBTENCIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 .....   | - 51 -        |
| EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD AGUDA DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN POR VÍA INTRAPERITONEAL EN RATAS HSDHAN®:WIST (WISTAR) Y OBTENCIÓN DE LA DOSIS LETAL 50 .....   | - 53 -        |
| EVALUACIÓN DE LA TOXICIDAD SUBCRÓNICA A DOSIS REPETIDAS DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN POR VÍA INTRAPERITONEAL EN RATAS HSDBLU:LE (LONG-ÉVANS) .....  | - 57 -        |
| <i>Biometría hemática.....</i>   | - 62 -        |
| <i>Evaluación anatomopatológica .....</i>  | - 64 -        |
| EVALUACIÓN DE LA EFICACIA DE LOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN ADMINISTRADOS DE FORMA SUBCRÓNICA POR VÍA INTRAPERITONEAL EN UN MODELO DE OBESIDAD INDUCIDA POR LA DIETA EN RATAS HSDBLU:LE (LONG-ÉVANS) ..... | - 68 -        |
| <i>Incremento de peso.....</i>   | - 68 -        |
| <i>Consumo de alimento .....</i>   | - 69 -        |
| <i>Consumo de agua.....</i>  | - 71 -        |
| <i>Composición corporal.....</i>   | - 71 -        |
| <i>Presión arterial.....</i>   | - 72 -        |
| <i>Bioquímica sanguínea .....</i>  | - 73 -        |
| <b>DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES .....</b>  | <b>- 79 -</b> |
| <b>REFERENCIAS .....</b>   | <b>- 88 -</b> |
| <b>ANEXOS .....</b>  | <b>- 94 -</b> |
| A1. ANÁLISIS PROBIT DE LA TOXICIDAD AGUDA DE LOS COMPUESTOS NB5H02 Y NB5H08 EN RATONES HSD:ICR (CD1®) .....  | - 94 -        |
| A2. ANÁLISIS PROBIT DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL COMPUESTO NB5H02 EN RATAS HSDHAN:WIST® .....   | - 99 -        |
| A3. ANÁLISIS PROBIT DE LA TOXICIDAD AGUDA DEL COMPUESTO NB5H08 EN RATAS HSDHAN:WIST® .....   | - 102 -       |
| A4 TOXICIDAD AGUDA DE NB5H02 EN RATONES HSD:ICR (CD-1®) .....  | - 105 -       |
| A5.TOXICIDAD AGUDA DE NB5H08 EN RATONES HSD:ICR (CD-1®) .....  | - 106 -       |
| A6. TOXICIDAD AGUDA DE NB5H02 EN RATAS HSDHAN®:WIST .....  | - 107 -       |
| A7. TOXICIDAD AGUDA DE NB5H08 EN RATAS HSDHAN®:WIST .....  | - 108 -       |

# Lista de cuadros

---

- **Cuadro 1.** Prevalencia de sobrepeso y obesidad en México por grupos de edad.
- **Cuadro 2.** Distintos tratamientos farmacológicos de la obesidad, mecanismos de acción y efectos secundarios.
- **Cuadro 3.** Modelos animales de obesidad.
- **Cuadro 4.** Dosis (mg/kg) de los compuestos de coordinación utilizadas para la evaluación de la toxicidad aguda en ratón y rata.
- **Cuadro 5.** Grupos experimentales para la evaluación de la toxicidad subcrónica y de la eficacia antiobesidad de los compuestos de coordinación.
- **Cuadro 6.** Esquema de adaptación de los animales a los cepos para la medición de la presión sanguínea.
- **Cuadro 7.** Determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del compuesto de cobalto NB5H02 en ratones Hsd:ICR (CD-1<sup>®</sup>) mediante el análisis de regresión Probit.
- **Cuadro 8.** Determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del compuesto de cobre NB5H08 en ratón Hsd:ICR (CD-1<sup>®</sup>) mediante el análisis de regresión Probit.
- **Cuadro 9.** Determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del compuesto de cobalto NB5H02 en ratas HsdHan<sup>®</sup>:WIST (Wistar) mediante el análisis de regresión Probit.
- **Cuadro 10.** Determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del compuesto de cobre NB5H08 en ratas HsdHan<sup>®</sup>:WIST (Wistar) mediante el análisis de regresión Probit.
- **Cuadro 11.** Hematocrito, eritrocitos y hemoglobina.
- **Cuadro 12.** Relación de animales por grupo y descripción de hallazgos microscópicos para los grupos administrados.

# Lista de figuras

---

- **Figura 1.** Control hipotalámico del balance energético.
- **Figura 2.** Tasa de obesidad en los países pertenecientes a la OCDE.
- **Figura 3.** Proyecciones de la obesidad.
- **Figura 4.** Estructura de los compuestos NB5H02 y NB5H08.
- **Figura 5.** Fases del desarrollo de nuevos fármacos.
- **Figura 6.** Compuestos de prueba solubilizados en DMSO al 10%.
- **Figura 7.** Unidad de Investigación Preclínica.
- **Figura 8.** Administración de los compuestos NB5H02 Y NB5H08 por vía intraperitoneal en ratas HsdHan<sup>®</sup>:WIST para la evaluación de la toxicidad aguda.
- **Figura 9.** Modelo de obesidad inducida por la dieta.
- **Figura 10.** Información nutricional del alimento alto en grasa utilizado en el modelo de obesidad inducida por la dieta.
- **Figura 11.** Información nutricional del alimento utilizado en los grupos de dieta estándar.
- **Figura 12.** a) Alojamiento de los animales por grupos y asignación de dietas. b) Alimento alto en grasa utilizado en el modelo de obesidad inducida por dieta.
- **Figura 13.** Toma de muestra sanguínea vía seno retro-orbital.
- **Figura 14.** Medición de la composición corporal mediante el equipo de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica “IMPEDIVET”.
- **Figura 15.** Medición de la presión arterial mediante el equipo no invasivo “CODA”.
- **Figura 16.** Fosfatasa alcalina de NB5H02 DA Y NB5H08 DA durante los cuatro muestreos.
- **Figura 17.** Fosfatasa alcalina a las 12 semanas.
- **Figura 18.** Alanino aminotransferasa.

- **Figura 19.** Bilirrubinas totales.
- **Figura 20.** Hematocrito.
- **Figura 21.** Necropsias de los animales al final del estudio y evaluación anatomopatologica macroscópica.
- **Figura 22.** Incremento de peso.
- **Figura 23.** Consumo de alimento.
- **Figura 24.** Índice de masa corporal.
- **Figura 25.** Triglicéridos.
- **Figura 26.** Colesterol.
- **Figura 27.** Colesterol LDL.
- **Figura 28.** Glucosa, medición por espectrofotometría.
- **Figura 29.** Glucosa, medición por glucómetro convencional.

# Introducción

---

## *Obesidad*

Según la Organización Mundial de la Salud, el sobrepeso y la obesidad se definen como una acumulación anormal o excesiva de grasa que puede ser perjudicial para la salud. La obesidad es una enfermedad de curso crónico y gradual que suele iniciarse en la infancia y la adolescencia la cual se caracteriza por la acumulación de grasa y por ende ganancia de peso, que representa un desequilibrio energético, que ocurre cuando el aporte o ingestión de energía de los alimentos excede al gasto de la misma y, como consecuencia, el exceso se almacena en forma de grasa más allá del valor esperado según el género, la talla y la edad. El balance positivo de energía es la causa inmediata de la obesidad; sin embargo, esto tiene sus orígenes en un sistema causal de gran complejidad, que involucra una serie de factores biológicos, sociales, conductuales y ambientales que se interconectan desencadenando un trastorno metabólico y dificultando el control y prevención de esta enfermedad tanto a nivel individual como poblacional (1, 2, 3, 4).

## *Apetito y saciedad*

La ingesta de alimentos es un factor importante para el desarrollo de la obesidad y es una conducta dada por las sensaciones de apetito y saciedad, reguladas por una compleja red de vías neuronales que se encuentran en el hipotálamo. El núcleo hipotalámico ventromedial es el centro de la saciedad, en tanto que el hipotálamo lateral es considerado el centro del hambre. El sistema nervioso central recibe información del estado energético en que se encuentra el organismo y en consecuencia envía señales hacia los diversos órganos y sistemas periféricos para lograr un balance energético óptimo a corto y a largo plazo (5). (Figura 1)

Existen neuropéptidos y neurotransmisores implicados en el control hipotalámico de la sensación hambre/saciedad que se encargan de mantener el equilibrio entre la ingesta y el gasto calórico, son varios los procesos reguladores que pueden influir sobre estos centros hipotalámicos, en ausencia de alimento en el intestino y la reducción de reservas de lípidos y de glucógeno, se activa la expresión y liberación de diferentes señales peptídicas orexigénicas como el neuropéptido Y (NPY) y la proteína r-Agouti (AgRP) que se sintetizan en el núcleo arqueado, por el contrario, la elevación de la glucemia o de la insulina, o la distensión gástrica producida con las comidas, son factores que activan el centro de la saciedad mediante la liberación de péptidos anorexigénicos como la proopiomelanocortina (POMC) o la transcripción regulada de cocaína y anfetamina (TRCA), con lo cual se logra un punto de ajuste relativamente fijo de la adiposidad corporal para mantener una homeostasis energética (6, 7). (Figura 1)

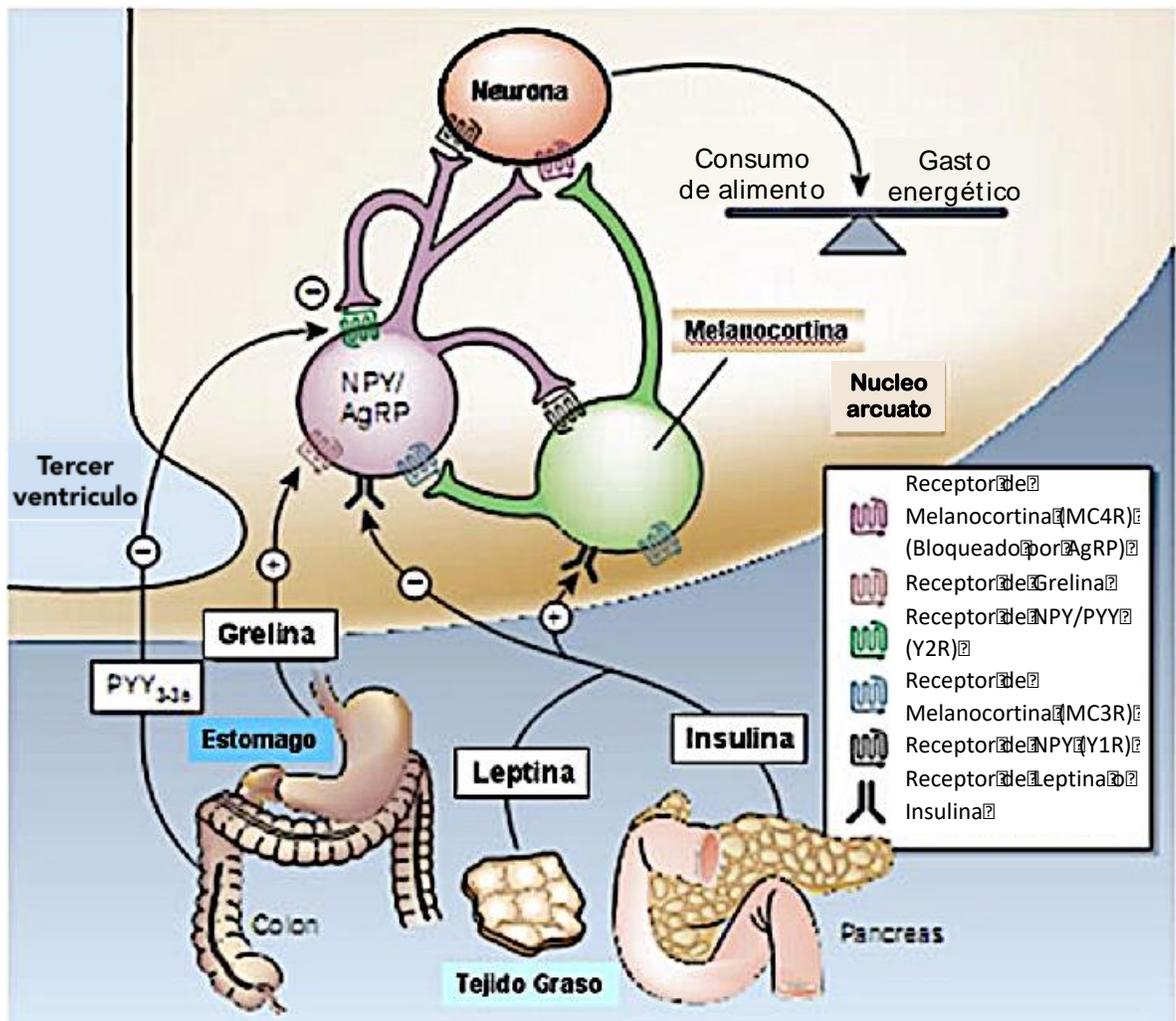


Figura 1. Control hipotalámico del balance energético (8).

Otro péptido involucrado en la disminución del apetito es la serotonina. En modelos experimentales se ha observado que un aumento de los niveles de serotonina en áreas hipotalámicas disminuye la sensación de hambre, reducen el consumo de alimento y la masa grasa sin alterar la actividad locomotora (9,10). Así mismo, se encontró que después del comienzo de la alimentación, se elevan los niveles del aminoácido esencial triptófano en cerebro, incrementando la saturación del sustrato de la enzima triptófano hidroxilasa, la cual controla la síntesis de serotonina (11). Los receptores de la serotonina modulan tanto la cantidad de alimento como la selección de los macronutrientes, es decir, la estimulación de estos receptores hipotalámicos reducen la ingesta en general, y de las

grasas en particular, con poco efecto sobre carbohidratos y proteínas, además promueve la pérdida de grasa corporal excesiva y mejora los parámetros metabólicos asociados a la obesidad, mientras que la delación de éstos estímulos sobre los receptores serotoninérgicos promueve el desarrollo del sobrepeso y obesidad. Estos datos evidencian el rol de este neurotransmisor en la regulación del consumo de alimentos y del peso corporal (9, 12, 13).

## *Epidemiología*

Existen diferentes métodos para determinar la composición corporal y los grados de desnutrición, sobrepeso u obesidad, tales como la circunferencia de la cintura, la medición del grosor de los pliegues cutáneos, la bioimpedancia y el índice de masa corporal que es la medida más utilizada para identificar el sobrepeso y la obesidad, y se basa en la relación que existe entre el peso y la estatura de un individuo ( $\text{kg}/\text{m}^2$ ). Según la clasificación de la organización mundial de la salud, los adultos con un IMC de 25 a 30 se definen con sobrepeso, mientras que aquellos que presentan un IMC de 30 o más presentan obesidad (14, 15).

Actualmente la obesidad y sobrepeso han alcanzado proporciones epidémicas y se han convertido en el principal problema de salud pública a nivel mundial, razón por la que la Organización Mundial de la Salud denomina a la obesidad como “la epidemia del siglo XXI”. Las personas con obesidad son mayoría en países de la OCDE y esta epidemia continúa extendiéndose, no se ha visto alguna reversión en esta tendencia desde que la epidemia comenzó. Hasta 1980, menos de una de cada diez personas eran obesas en los países de la OCDE, en las décadas siguientes, las tasas se duplicaron o triplicaron, y continúan creciendo (4, 16, 17). (Figura 2)

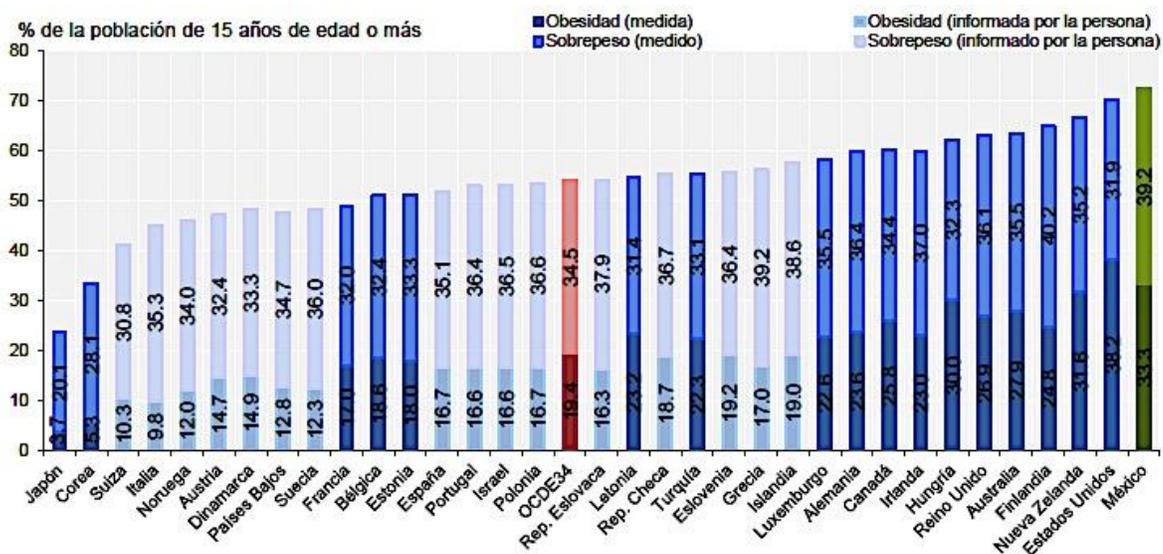


Figura 2. Tasa de obesidad en los países pertenecientes a la OCDE (18).

En México se ha documentado uno de los incrementos más rápidos en el mundo en la prevalencia de peso excesivo (sobrepeso y obesidad) y sus comorbilidades, alcanzando el primer lugar en la población infantil y adulta a nivel mundial (1, 2). (Cuadro 1) (Figura 3)

Cuadro 1. Prevalencia de sobrepeso y obesidad en México por grupos de edad (4).

| Prevalencia de sobrepeso y obesidad por grupo de edad |           |          |
|---|-----------|----------|
| Grupo de edad   | Sobrepeso | Obesidad |
|   | (%)       | (%)      |
| Niños menores de cinco años                           | 12.0      | 5.2      |
| Niños de cinco a nueve años                           | 16.2      | 12.1     |
| Adolescentes  | 26.5      | 11.9     |
| Mujeres   | 36.8      | 38.6     |
| Hombres   | 42.5      | 32.5     |
| Adultos mayores                                       | 41.9      | 33.5     |

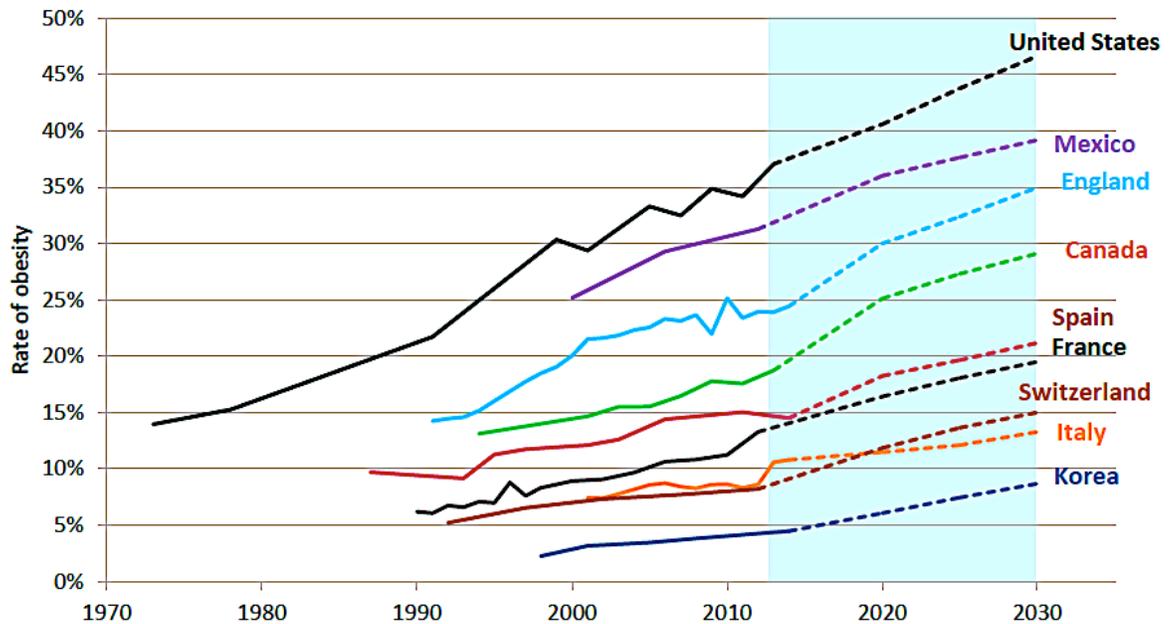


Figura 3. Proyecciones de la obesidad (19).

## *Costos y consecuencias de la obesidad*

La obesidad es un importante problema de salud pública ya que está asociada causalmente con la pérdida de la salud puesto que es un factor de riesgo clave para el desarrollo de una serie de enfermedades crónicas tales como la diabetes tipo 2, hipertensión arterial, dislipidemias, hipercolesterolemia, enfermedades cardiovasculares (especialmente la cardiopatía isquémica y los infartos cerebrales), enfermedades respiratorias y gastrointestinales, enfermedades osteoarticulares, ciertos tipos de cáncer como el de mama, próstata y colon, apnea del sueño y varias otras enfermedades (1, 20).

A nivel individual, una persona con sobrepeso incrementa su riesgo de muerte aproximadamente un 30% con cada 15 kg adicionales a su peso ideal. Así mismo los gastos en cuanto a salud de una persona obesa ascienden al menos un 25% más que aquellas que se encuentran dentro de un peso adecuado. Además, la obesidad es causa de estigma social y en ciertas sociedades se asocia con menor ingreso laboral, especialmente entre las mujeres (20).

En la mayoría de los países la obesidad es responsable aproximadamente del 1 al 3% del gasto total en salud, mientras que en México esto asciende drásticamente al 15%, de acuerdo a los estimados realizados por la Secretaría de Salud en 2008, los efectos económicos de la obesidad tuvieron un costo directo anual de 42,000 millones de pesos en atención médica para el sistema público de salud de 14 complicaciones derivadas de cuatro grupos de enfermedades vinculadas con la obesidad (diabetes *mellitus* tipo 2, enfermedades cardiovasculares, cáncer de mama y osteoartritis), mientras que el costo indirecto por pérdida de productividad fue de 25,000 millones de pesos. La suma total estimada de los costos directos e indirectos alcanzó los 67,000 millones de pesos. En 2017 se estima que el costo directo fluctúe entre los 101,000 millones de pesos y el indirecto podría alcanzar los 73,000 millones de pesos(1, 20).

Dentro de los efectos secundarios que representa la obesidad se encuentra también la transferencia de estos hábitos alimentarios y de salud inadecuados a las mascotas, incluyendo una cierta pereza y falta de reconocimiento de la salud nutricional de estos animales. En general, los propietarios de animales con sobrepeso muestran menos interés por la salud preventiva que los propietarios de animales con una condición corporal ideal. En animales domésticos se considera sobrepeso cuando estos exceden un 15% más de su “peso óptimo”, y obesos cuando sobrepasan el 30% (21, 22, 23).

Si bien es cierto que en los animales también existen diversos factores individuales y ambientales que desencadenan un estado obesogénico tales como el género, la esterilización, la edad, la raza, el componente alimentario, el hábitat, la presencia de otros animales en casa y el modo de vida; el humano desempeña un papel fundamental en la relación de todos estos factores. Para sustituir la compañía humana, las personas suelen “humanizar” sus mascotas, y en diversos estudios realizados se ha observado que este antropomorfismo se asocia fuertemente con el sobrepeso (24).

Los costos elevados directos e indirectos de la obesidad y sus comorbilidades, así como los efectos de éstas, que aumentan la demanda de servicios de salud, imponen la necesidad urgente de actuar con base en la mejor evidencia científica disponible para la prevención, tratamiento y control de esta enfermedad.

### *Prevención y Tratamiento de la obesidad*

Al ser la obesidad una patología crónica degenerativa, es en gran medida una enfermedad prevenible, por lo que para su control es necesario plantear en primer lugar una etapa preventiva con el objetivo de disminuir la prevalencia y, en segundo lugar, debido a su etiología multifactorial, un tratamiento multidisciplinario de los profesionales de la salud.

Se considera que el enfoque de salud pública en la prevención primaria es la acción más económica, asequible, sostenible e importante para hacer frente a la epidemia de enfermedades crónicas en todo el mundo.

La adopción de un enfoque basado en el conocimiento profundo de las causas mencionadas y de sus múltiples y complejas interrelaciones para prevenir las enfermedades crónicas, representa un avance importante de las ideas favorables a una política sanitaria integrada puesto que resulta esencial para cambiar los hábitos de la población y modificar los determinantes de la obesidad. Una combinación de actividad física regular, variedad de alimentos en la dieta e interacción social amplia constituye, probablemente, el abordaje adecuado para hacer frente a este problema (25, 26).

Así mismo el tratamiento de la obesidad como tal es a través de un equipo multidisciplinario que incluye al médico de primer contacto, así como al internista, nutriólogo, enfermera, farmacéutico, cirujano dentista, psicólogo, gerontólogo, terapeuta, etc. Y está basado totalmente en un tratamiento no farmacológico que supone la modificación y adopción de dietas adecuadas, actividad física y una intervención conductual y/o psicológica la cual pretende modificar el estilo de vida para favorecer el control de peso (6, 7, 27).

### *Tratamiento farmacológico*

El tratamiento farmacológico contra la obesidad está indicado únicamente en pacientes con un IMC mayor o igual a 30 o en pacientes con un IMC superior a 27 con otras patologías asociadas como diabetes tipo II o dislipemias, y que hayan intentado una disminución de peso infructuosa con medidas dietéticas durante los dos o tres meses anteriores. **El uso de estos fármacos sólo se justifica como coadyuvante al tratamiento dietético y de los cambios en el estilo de vida, pero no debe utilizarse nunca como único tratamiento (28).**

Actualmente el Orlistat, es el único fármaco aprobado por la *Food and Drug Administration* (FDA) para el tratamiento a largo plazo de la obesidad. Es un derivado de la lipstatina y actúa como potente inhibidor de las lipasas gastrointestinales, lo que reduce un 30% la absorción de la grasa dietética. No interfiere en la absorción de hidratos de carbono, proteínas y fosfolípidos aunque puede disminuir la absorción de las vitaminas liposolubles (A, D, E y K).

Los efectos adversos de Orlistat inicialmente descritos son principalmente de carácter digestivo y con una alta frecuencia, por lo que hay que tener especial precaución en caso de diabetes, patología renal o hepática. Su uso fue aprobado por la FDA en el 1999 y a partir del 2008 por la Agencia Europea de Medicamentos (EMA), sin embargo, desde el 2011, la misma EMA, ha iniciado un proceso de revisión de este principio activo por su potencial riesgo de hepatotoxicidad (9). (Cuadro 2)

Otros fármacos de prescripción para la obesidad han mostrado efectos adversos, por ejemplo, en el 2008, la EMA recomendó no continuar la prescripción y el uso de Rimonabant debido a los posibles riesgos asociados con el fármaco, principalmente de tipo psiquiátrico, mientras que en el 2010, la FDA recomendó no continuar la prescripción y el uso de la Sibutramina debido a los posibles riesgos cardiovasculares que produce en los pacientes con enfermedad cardiovascular conocida (29). (Cuadro 2)

En los últimos años se han desarrollado algunos medicamentos tales como la Liraglutida que es un análogo peptídico similar al glucagón tipo 1 (GLP-1), una incretina de origen intestinal que estimula la producción y secreción de insulina; la Fentermina/Topiramato, una anfetamina en combinación con una molécula empleada como anticonvulsivante y en tratamiento de algunos tipos de migraña; y la Lorcaserina que es un agonista selectivo de los receptores 5HT<sub>2c</sub> de serotonina (9). (Cuadro 2)

Cuadro 2. Distintos tratamientos farmacológicos de la obesidad, mecanismos de acción y efectos secundarios (9).

| Fármaco                                       | Mecanismo de acción   | Efectos secundarios   |
|---|---|---|
| <b>Efedrina</b>                               | Lipólisis por activación de los receptores $\beta_3$ (acción termogénica).                        | Hipertensión, taquicardia, nerviosismo, etc.  |
| <b>Anfetamina</b>                             | Estimula las vías noradrenérgicas centrales, suprimiendo el apetito y aumentando la termogénesis. | Efectos adversos a nivel cardiovascular.  |
| <b>Anfepramona, Clobenzorex y Fenproporex</b> | Agonistas adrenérgicos y serotoninérgicos.  | Alteración en las válvulas cardíacas y de hipertensión pulmonar, dependencia y abuso tras uso prolongado.                                 |
| <b>Sibutramina</b>                            | Inhibidor de la recaptación de serotonina y noradrenalina.  | Riesgo de sufrir ictus, infarto de miocardio y paro cardíaco.   |
| <b>Rimonabant</b>                             | Antagonista de receptor cannabinoide tipo 1 (CB1).  | Alteraciones psiquiátricas, trastornos depresivos, intento de suicidio y suicidio consumado.  |
| <b>Orlistat</b>                               | Inhibidor de las lipasas gastrointestinales, reduce la absorción de la grasa dietética.           | Aumento de las deposiciones y de color blanquecino, incontinencia fecal, flatulencia, hemorroides y gastritis, riesgo de hepatotoxicidad. |
| <b>Naltrexona/<br/>Bupropión</b>              | Antagonista de receptores opioides/Estimula las neuronas productoras de pro-opiomelanocortina.    | Nauseas, dolor de cabeza, estreñimiento, mareos, vómitos y boca seca.   |

|                                   |   |  |
|-----------------------------------|---|--|
| <b>Liraglutida</b>                | Incretina que estimula la producción y secreción de insulina, suprime el apetito y la ingesta de energía. | Riesgo de pancreatitis y posible desarrollo de cáncer de páncreas. |
| <b>Fentermina/<br/>Topiramato</b> | Anfetamina/ anticonvulsivante.  |  |
| <b>Lorcaserina</b>                | Agonista selectivo de los receptores 5HT <sub>2c</sub> .  |  |

Estos datos son de cierta forma desalentadores ya que no son exactamente un gran avance científico pues, el lento desarrollo de alternativas eficaces pone de manifiesto los obstáculos que se presentan en la investigación para el tratamiento de la obesidad, además se ha registrado que en el 95% de los casos el paciente recupera su peso a largo plazo, es por ello la gran importancia de nuevas investigaciones enfocadas en la búsqueda de tratamientos efectivos, seguros y que se puedan mantener de forma crónica.

### *5-Hidroxitriptófano en el tratamiento de la obesidad*

A partir del conocimiento del papel de la serotonina sobre los mecanismos de saciedad, se ha buscado desarrollar alternativas terapéuticas que puedan ser eficaces en el tratamiento de la obesidad.

La 5-hidroxitriptamina (5-HT), también conocida como serotonina es un neurotransmisor y neuromodulador con un importante papel regulador en el sistema nervioso central (SNC). Tiene implicaciones importantes en funciones fisiológicas tales como el sueño, el estado de ánimo, el apetito, la conducta sexual, los ritmos circadianos, la temperatura entre muchos otros. En los humanos, las alteraciones en el sistema serotoninérgico están relacionadas con trastornos

conductuales y neurológicos que incluyen los alimenticios, la depresión, la epilepsia, la esquizofrenia y la ansiedad (30, 31).

La síntesis de la serotonina inicia con la hidroxilación del aminoácido esencial L-triptófano (LT), el cual se obtiene en la dieta y es transportado a través de la barrera hematoencefálica hacia el cerebro utilizando los transportadores de aminoácidos neutros, en donde compete con otros aminoácidos como la fenilalanina, la leucina y la metionina. La enzima triptófano hidroxilasa, que se encuentra únicamente en las neuronas serotoninérgicas del cerebro permite la conversión del triptófano a 5-hidroxitriptofano (5-HTP), seguida por la descarboxilación mediada por la descarboxilasa de aminoácidos en 5-hidroxitriptamina; este proceso se lleva a cabo dentro de las nueve subpoblaciones de neuronas serotoninérgicas localizadas en una zona cerebral llamada Núcleo de Rafé (13, 32).

Existen diferentes enfermedades, por ejemplo, la depresión o la ansiedad en las que el objetivo de su tratamiento es aumentar los niveles de serotonina y con esto provocar el efecto fisiológico deseado, que ayude a revertir dicho problema, sin embargo, un exceso de serotonina puede generar efectos secundarios indeseados tales como salivación, euforia, hiperreflexia, hipertermia, taquicardia, midriasis, diarrea, hipertensión, rigidez, temblores, mioclonía y convulsión generalizada, hasta llegar en los casos más graves a conducir a una afección potencialmente mortal que se describe como el síndrome de serotonina, o la toxicidad de la serotonina (33).

Como parte de las alternativas terapéuticas con posible eficacia usadas en el tratamiento de la obesidad, se encuentra la administración del 5-hidroxitriptófano, precursor directo de la serotonina, se ha observado una disminución de los niveles de serotonina en individuos obesos, estos niveles bajos se asocian con ganas de comer carbohidratos y con atracones de comida, así, el gran interés reciente por este nutriente se debe a que se ha demostrado que incrementa los niveles cerebrales del neurotransmisor, por lo cual ha sido también utilizado en el tratamiento de enfermedades como

la depresión, fibromialgia, insomnio, dolores de cabeza crónicos y Parkinson en donde se han observado bajos niveles de serotonina (31).

Se sabe que el 5-HTP juega un rol en la conducta alimenticia como una molécula anoréxica, pues se ha demostrado que la administración oral de 5-HTP reduce el hambre, disminuye la ingesta de alimentos, principalmente carbohidratos, aumentando el consumo de proteínas, y promueve la presencia consistente de saciedad temprana. En consecuencia, aumenta significativamente la pérdida de peso sin tener efecto en el comportamiento (34, 35).

Dentro de las ventajas del uso del 5-HTP sobre el triptófano (LT) es que presenta una mayor eficacia y seguridad, esto está dado por lo siguiente:

1. Puesto que el 5-HTP no requiere de moléculas transportadoras, presenta una elevada absorción intestinal pues esta no se ve afectada por la presencia de otros aminoácidos (31, 36).

2. Con la ingestión directa de 5-HTP se evita la conversión de LT en 5-HTP. Esta reacción la cataliza la enzima triptófano hidrolasa (también denominada triptófano 5-monooxigenasa), y es el paso limitante en la síntesis de serotonina. Esta enzima puede verse inhibida por numerosos factores como: estrés, resistencia a insulina, deficiencia de vitamina B6 y deficiencia de magnesio. Además, todos estos factores junto con elevados niveles de cortisol y dosis elevadas de LT (mayores a 2.000mg) pueden incrementar la conversión de LT a kinurenina vía triptófano 2,3 dioxigenasa, haciendo que LT no esté disponible para la producción de serotonina (31, 36).

3. A diferencia de LT, la molécula de 5-HTP no puede ser dirigida hacia la producción de niacina o de proteínas corporales (31, 36).

4. 5-HTP atraviesa fácilmente la barrera hematoencefálica, sin necesidad de moléculas transportadoras, cosa que sí necesita LT. Debido a que las moléculas transportadoras de LT son compartidas por 5 aminoácidos (tirosina, fenilalanina, valina, leucina e isoleucina), la presencia de estos aminoácidos competidores puede inhibir el transporte de LT al cerebro, cosa que no ocurre con el 5-HTP. Además, altos niveles séricos de kinurenina pueden inhibir el transporte de LT hacia el sistema nervioso central reduciendo los niveles de serotonina (31, 36).

5. El 5-HTP se obtiene a partir de semillas de una planta africana, *Griffonia simplicifolia*, evitando los problemas de contaminación que llevaron a la prohibición en la comercialización de productos de LT obtenidos mediante fermentación bacteriana. La prohibición se debió a la aparición de algunos casos de productos de LT en los cuales se realizó un filtrado inadecuado y que provocaron síndrome de mialgia eosinofílica. Actualmente el 5-HTP es comercializado en forma de tableras por diferentes marcas como un suplemento para el tratamiento de las diferentes enfermedades mencionadas anteriormente (31, 36).

Estos hallazgos junto con la buena tolerancia observada, sugieren que el 5-HTP podría utilizarse de forma segura para tratar la obesidad (37).

### *Química bioinorgánica*

Por otro lado, es bien conocido que algunos elementos inorgánicos, en cantidades traza, son esenciales para la vida, estos micronutrientes son suplidos, en condiciones normales, en cantidades adecuadas por los procesos naturales. La química bioinorgánica es una extensa disciplina que, en el sentido más amplio, se ocupa de las relaciones existentes entre estos elementos y los sistemas biológicos (38).

Dichos elementos denominados “trazas” intervienen en muchos aspectos en el metabolismo: en enzimas, en procesos de transporte, en síntesis, en control de determinadas funciones, etc.; actualmente se conoce que cuatro metales del grupo principal (Na, K, Mg y Ca) y diez metales de transición (V, Cr, Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo y Cd) son requeridos para las funciones biológicas normales en humanos, se sabe, por ejemplo, que la sangre contiene hierro, desde los primeros tiempos de la existencia del hombre se reconoce la importancia fisiológica de la sal y se sabe también desde hace tiempo, que aproximadamente un tercio de las enzimas conocidas requieren iones metálicos para su actividad (39, 40).

La existencia de niveles adecuados de concentración de tales elementos suele implicar un correcto funcionamiento de los órganos o procesos en los que intervienen. Así, la escasez de algunos iones metálicos puede provocar enfermedades. Ejemplos bien conocidos incluyen anemia perniciosa resultante de la deficiencia de hierro, retraso del crecimiento derivado de insuficiencia de zinc en la dieta y enfermedad cardíaca en los niños debido a la deficiencia de cobre (39, 41).

### *Importancia biológica del cobalto*

El cobalto es un elemento traza esencial. Los rumiantes que se alimentan de pastos deficientes en cobalto muestran retrasos en el crecimiento, pérdida de apetito y anemia; estos síntomas desaparecen cuando se suministra al animal una dieta suplementaria de cobalto. La presencia del cobalto en la coenzima B12 es la función biológica más importante de este elemento, ya que de esta forma participa como cofactor en un amplio e importante grupo de reacciones enzimáticas. El cuerpo del ser humano adulto contiene de 2 a 5 mg de vitamina B12 y sus derivados, principalmente en el hígado (39).

Recientemente se ha descubierto la presencia de cobalto como componente esencial de un sistema enzimático conocido comúnmente como glucosa-isomerasa. Esta enzima cataliza la isomerización

de D-glucosa a D-fructosa, así como de D-xilosa a D-xilulosa. El equilibrio glucosa-fructosa se establece en condiciones normales sólo muy lentamente, pero en presencia de la enzima se puede obtener rápidamente una mezcla de glucosa y fructosa que es fuertemente edulcorante. Este “azúcar líquido” no cristalino se puede emplear directamente en la industria de los refrescos, en la industria panadera o en la fabricación de mermeladas (39).

Las sales de cobalto no son consideradas particularmente tóxicas en animales, pero en hombres, dosis suficientemente grandes producen irritación en el tracto intestinal, náuseas, vómitos y diarreas. Pequeñas cantidades de cobalto, sin embargo, son necesarias en el tratamiento de la anemia perniciosa (39).

### *Importancia biológica del cobre*

El cobre es un elemento traza que está ampliamente distribuido en animales y plantas, siendo el tercer metal de transición más abundante en el cuerpo humano, tras el hierro y el zinc, encontrándose mayoritariamente en el hígado, el cerebro, los pulmones, los riñones y los ovarios, así como también en el iris. Los mariscos, las vísceras, nueces, legumbres secas, chocolate y cacao y algunas verduras son los alimentos que mayor cantidad de cobre aportan a la dieta (42).

El cobre posee unas características que lo hacen idóneo para intervenir en procesos biológicos, ya que cuenta con numerosas posibilidades de coordinación. Gracias a esta amplia variedad de posibilidades, el cobre puede adaptarse fácilmente a ligantes con átomos donadores de azufre, nitrógeno y oxígeno, dentro de los cuales se encuentran los aminoácidos de las proteínas (39).

Todo esto explica que se hayan identificado un número relativamente grande de metaloproteínas que lo contienen. El cobre está también asociado a sistemas y procesos que involucran la utilización

del oxígeno por parte de sistemas biológicos, apareciendo en el transportador de oxígeno hemocianina, en diversas oxidasas y oxigenasas y en la superóxido-dismutasa y, por otra parte, está presente también en sistemas transportadores de electrones (39).

La absorción de cobre tiene lugar en el estómago y en el intestino delgado, viéndose facilitada por la presencia de ciertos aminoácidos y proteínas como la metalotioneína específica para cobre, una vez en el torrente sanguíneo, la mayor parte del cobre está enlazado a la proteína ceruloplasmina que promueve la fijación de hierro y la biosíntesis de hemoglobina. De este modo, una deficiencia de cobre se traduce en una disminución de la fijación de hierro, y como consecuencia, en la aparición de anemia. El cobre celular, a diferencia del presente en el plasma, está enlazado fundamentalmente a metalotioninas, polinucleótidos y otras proteínas (39).

Así mismo, la carencia de cobre causa anomalías óseas, debidas a una biomineralización deficiente, que normalmente responden satisfactoriamente a la suplementación de cobre. Además de anemias y problemas óseos, entre las enfermedades asociadas a la deficiencia de cobre también cabe destacar ataxias, así como el desorden genético conocido como enfermedad de Menkes, que conduce a una progresiva degeneración cerebral, a lesiones óseas, hipotermias severas, anomalías en las paredes arteriales y en las fibras elásticas (39).

En cuanto a la acumulación de cobre en el organismo, se sabe que puede desencadenar la enfermedad de Wilson, originada por la acumulación de cobre en el hígado, y que se caracteriza por la paulatina destrucción de los tejidos hepáticos y nerviosos (39).

El cobre en exceso puede acumularse también en otros tejidos, principalmente en el riñón y cerebro, aunque puede también verse como anillos marrones o verdes en la córnea. Se ha comprobado que el exceso de cobre se acumula primero en el hígado y después en el sistema nervioso central, lo que puede producir cirrosis hepática y deterioro mental. La extensión de estos síntomas depende de la cantidad de cobre presente (39).

## *Compuestos de coordinación.*

La química bioinorgánica médica, es una importante rama dedicada a actuar en distintos campos que van desde el diseño de nuevos agentes terapéuticos y de diagnosis, hasta la posibilidad de tratamiento y comprensión de enfermedades intratables. La capacidad de reconocer, comprender a nivel molecular y tratar enfermedades causadas por una inadecuada función de los iones metálicos constituye un aspecto importante de esta rama de la química inorgánica (39, 43, 44).

En los últimos años se ha destacado que los compuestos de coordinación tienen potencial eficacia en diversas áreas de la medicina para servir como agentes anticancerígenos, antipalúdicos, antimicrobianos o de diagnóstico. Además, se ha demostrado que los complejos metálicos de ligantes biológicamente importantes son a veces más efectivos que el ligante libre, debido a sus notables propiedades fisicoquímicas, únicas y de gran interés en un contexto de química médica (42).

El diseño de este tipo de compuestos utilizando ligantes que son farmacéuticamente activos por sí mismos, incorpora una multifuncionalidad dentro de una sola molécula. Actualmente se ha incrementado más la investigación sobre la utilidad de los ligantes en compuestos terapéuticos basados en metales, que aquella enfocada en agentes de diagnóstico. En ambos casos, la porción del ligando puede ser diseñada para servir como un agente que dirija la molécula, ya sea hacia un tejido particular, o una enzima. En los agentes de diagnóstico, generalmente se puede esperar que la molécula completa permanezca intacta, desde la administración hasta la excreción. No ocurre lo mismo con la terapéutica basada en metales, puesto que algunas de ellas ni siquiera funcionarían si permanecieran intactas indefinidamente (42).

Los iones metálicos comúnmente presentan un comportamiento conocido como "ácido de Lewis", es decir, que se unen a átomos como el oxígeno en el agua o el nitrógeno en el amoníaco. Esto les

permite ensamblar espontáneamente grupos de átomos a su alrededor para formar un "complejo metálico". También pueden unirse a ciertos átomos de oxígeno, nitrógeno o azufre en proteínas y otras especies bioquímicas. De esta forma, pueden influir en las estructuras de las moléculas orgánicas a las que se unen, formando además centros reactivos dentro de las especies biológicas a las que se han unido (42).

Las principales propiedades de los complejos de coordinación utilizados con fines terapéuticos son las siguientes:

- **Diversidad estructural:** un átomo de carbono con cuatro sustituyentes diferentes puede estar presente en dos enantiómeros diferentes, que no son superponibles. Por el contrario, un complejo de metal de transición octaédrico con seis sustituyentes tiene 30 estereoisómeros diferentes. Si tomamos como base el átomo central (carbono o metal de transición) simplemente para orientar los sustituyentes en el espacio tridimensional, entonces claramente, la diversidad estructural en los complejos de metales de transición excede la de los compuestos puramente orgánicos.

- **Aumento de la solubilidad:** gran parte de la eficacia de un agente terapéutico depende de que este tenga la capacidad de mantener una solubilidad suficiente en el entorno salino acuoso de la sangre. Se ha observado que los complejos metálicos conceden a la molécula una mayor solubilidad en agua, así como una mayor estabilidad en medios aerobios acuosos y una mayor biocompatibilidad y con esto potencializan significativamente la eficacia terapéutica de estos compuestos (45).

- **Interacción con proteínas séricas:** la interacción de los metalofármacos con las proteínas y otras especies presentes en la sangre es un aspecto importante del metabolismo de los medicamentos basados en metales, siendo esto capaz de afectar fuertemente la distribución, la biotransformación y, en última instancia, el mecanismo de acción del agente terapéutico (45).

Las dos proteínas clave para los iones metálicos en el suero humano son la Apo-transferrina (apo-Tf) y la albúmina sérica humana (HSA). La Apo-transferrina es una proteína de cadena simple bilobal capaz de unirse estrechamente de forma reversible al Fe, y se ha demostrado que además se une a una amplia variedad de otros iones metálicos. Por otro lado, la albúmina sérica humana, está presente a una concentración considerablemente mayor que la apo-Tf, es una proteína globular de tamaño grande que sirve para transportar metabolitos hidrófobos, por ejemplo, los ácidos grasos, así como iones metálicos; la unión a HSA, es usada para aplicaciones de la inorgánica medicinal. Las consecuencias de la unión de iones metálicos a la HSA incluyen el retraso de la excreción sistémica y la prevención de su transformación por reacciones redox (46).

- **Estado de oxidación y propiedades de óxido-reducción:** el estado de oxidación es un factor crítico en la biodisponibilidad de fármacos basados en metales pues regula la respuesta *in vivo* inmediata, a menudo haciendo la diferencia entre un beneficio y una respuesta tóxica a la misma dosis administrada de un ion metálico, además de direccionar las rutas metabólicas por las cuales se integrará el compuesto. El estado de oxidación del ion metálico también dicta geometrías de coordinación particulares, por lo tanto, limita la unión apropiada para diferentes tipos de ligantes y permite la adaptación de la molécula para reconocer e interactuar con un objetivo molecular definido (47).

Al optimizar la elección de los ligantes y el estado de oxidación, es posible adecuar las propiedades cinéticas y termodinámicas de los metalofármacos para necesidades terapéuticas específicas permitiendo participar en reacciones de transferencia de electrones y actividad redox biológica lo que puede ser muy benéfico para la actividad medicinal del complejo metálico (38).

- **Intercambio de ligantes:** los complejos de coordinación poseen la capacidad de experimentar reacciones de intercambio de ligantes, lo cual ofrece grandes oportunidades para que los metales interactúen y se coordinen con las moléculas biológicas. Dicha capacidad de los compuestos

organometálicos para someterse a un intercambio de ligantes puede conducir a aplicaciones importantes en medicina.

Así mismo es posible que en vez de interrumpir la actividad de un ligante debido a su liberación del complejo de coordinación, este ligante liberado puede ser una molécula con un efecto medicinal propio que podrá efectuar su actividad terapéutica. Se ha observado que, en medios acuosos, los metales a menudo son bastante reactivos para cambiar los átomos a los cuales están unidos (45).

- **Propiedades catalíticas:** una propiedad físico-química de los compuestos organometálicos que hasta ahora se ha subestimado por su potencial en química médica y biología química es su capacidad para catalizar reacciones químicas (48).

Con base en estos datos se propuso el uso de dos compuestos de coordinación que se sintetizaron basados en el ligante 5-Hidroxitriptofano y que poseen un centro metálico, ya sea de cobalto o de cobre, los cuales podrían presentar eficacia terapéutica como posibles adyuvantes al tratamiento de la obesidad. (Figura 4)

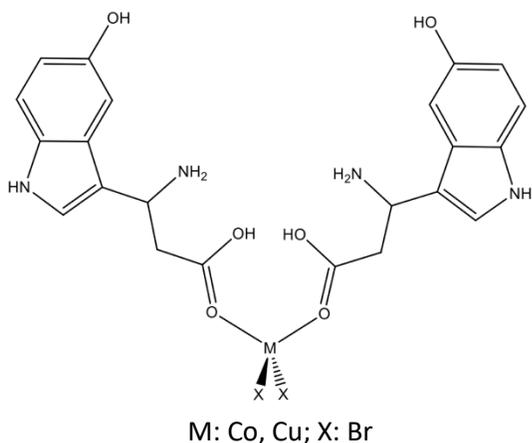


Figura 4. Estructura de los compuestos NB5H02 y NB5H08.

## *Desarrollo de nuevos fármacos*

Actualmente el desarrollo de nuevos fármacos se ha convertido en un proceso largo y complejo, cada vez que aparece una nueva molécula con posibilidades de ser utilizada como fármaco, deberá ser sometida a una serie de pruebas exigidas por las autoridades sanitarias, para demostrar, a lo largo de sus distintas fases, que el nuevo medicamento reúne los requisitos de **eficacia, seguridad y calidad** exigidos para su comercialización y administración en personas o animales. Estas fases requieren de periodos largos de tiempo, un gran esfuerzo intelectual, grandes recursos tecnológicos y un coste económico enorme (49).

Los datos de estas actividades deben ser confiables para garantizar una base sólida para decidir si invertir en el desarrollo posterior de un producto. La disponibilidad de evidencia de calidad facilitará la elección de nuevas estrategias para prevenir o combatir enfermedades, incluida la elección de nuevos fármacos candidatos para un mayor desarrollo. La inversión en el candidato equivocado no sólo desperdiciará recursos y tiempo, sino que también obstaculizará el desarrollo de un candidato más prometedor (50).

Por lo general, los países del hemisferio occidental se guían por las normativas de la *Food and Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos, para la evaluación de nuevos fármacos; específicamente, en México es la Comisión Federal para la Protección de Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) quien se encarga de regular y vigilar el cumplimiento de las normativas correspondientes (51).

Se considera que para que un nuevo fármaco culmine todo el proceso de desarrollo desde el descubrimiento de una molécula innovadora hasta que el medicamento llegue al mercado, pueden transcurrir entre 8 y 12 años durante los cuales se investiga de entre 5,000 y 10,000 compuestos

diferentes; y la inversión correspondiente a este proceso va desde los 500 a los 1000 millones de dólares. (Figura 5)



Figura 5. Fases del desarrollo de nuevos fármacos (49).

En el proceso de investigación y desarrollo de un fármaco, hay que diferenciar cuatro fases:

**1.- Fase de Descubrimiento.** Es el primer paso en el proceso de desarrollo de nuevos fármacos y consta en un inicio de la identificación de una necesidad médica no cubierta, y con esto la investigación de posibles dianas terapéutica a las cuales serán dirigidos los fármacos en desarrollo; a partir de esto, inicia la búsqueda, obtención y adecuada caracterización de las moléculas en estudio hasta su modificación y mejoramiento con el fin de obtener un compuesto líder y el cual será sometido a las siguientes fases de evaluación.

**2.- Fase Preclínica.** Esta fase consiste en la evaluación exhaustiva del compuesto seleccionado con el fin de confirmar que será segura su administración en humanos. Inicialmente se debe analizar la formulación del medicamento para su uso en pruebas clínicas; así mismo se deben realizar las evaluaciones correspondientes, ya sea, en animales íntegros (*in vivo*), o en órganos aislados de animales, en tejidos, cultivos celulares o a escala molecular (*in vitro*), dependiendo del objetivo farmacológico.

El objetivo de las pruebas preclínicas es el de tener al menos una aproximación acerca del perfil farmacocinético y farmacodinámico del producto, incluyendo su potencial toxicológico a corto y largo plazo antes de iniciarse las pruebas en seres humanos.

Concretamente, lo que se pretende es averiguar cómo se distribuye o elimina el medicamento del organismo y conocer sus efectos, a distintas dosis, en los órganos. La evaluación toxicológica incluye la realización de pruebas de toxicidad aguda, toxicidad subaguda y crónica, efectos sobre el comportamiento reproductivo, potencial carcinogénico, mutagénico y otras pruebas de toxicología de investigación como son la dosis sin efecto, la dosis letal mínima y la dosis letal media o DL<sub>50</sub>.

Si con todos estos datos obtenidos es posible demostrar que el producto investigado presenta una eficacia y seguridad aceptable, entonces las agencias reguladoras autorizaran el inicio de los ensayos clínicos en humanos.

Gran parte del trabajo de desarrollo preclínico, especialmente el relacionado con las cuestiones de seguridad, deben realizarse bajo un sistema formal y normalizado, conocido como sistema de Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL), que constituye un sistema de garantía de calidad relativo al modo de organización y las condiciones en que se planifican, se ejecutan, se controlan, se registran, se archivan y se difunden los estudios de seguridad no clínicos referentes a la salud y al medio ambiente; y que incluye aspectos tales como los procedimientos de mantenimiento de registros, análisis de datos, calibración de instrumentos y formación del personal (52).

El objetivo de las BPL es eliminar, en lo posible, los errores humanos, asegurar la exactitud de los datos y promover la calidad y la validez de las pruebas que sirven para establecer la seguridad de los productos presentados antes las autoridades reguladoras. La aplicación de estos principios de BPL implica la aceptación mutua de los datos procedentes de las pruebas para la evaluación de los productos realizados en un país miembro de la OCDE, por los demás países miembros con fines de

evaluación y otras utilidades que tengan por propósito la protección del hombre y del medio ambiente (53).

Dichos principios deberán aplicarse a las pruebas de seguridad no clínicas practicadas en los elementos contenidos en los productos farmacéuticos, los pesticidas, los cosméticos, los medicamentos veterinarios, los aditivos para la alimentación humana y animal y para los productos químicos industriales. Los laboratorios son periódicamente evaluados para comprobar el cumplimiento de los estándares de BPL. La estricta disciplina impuesta por este sistema dificulta el abordaje creativo necesario en los estadios más precoces del descubrimiento de fármacos, por lo que los estándares de BPL normalmente no se adoptan hasta que los proyectos han sobrepasado la fase de descubrimiento (52, 53).

**3.- Fase Clínica.** Se refiere a los procesos de evaluación de un nuevo medicamento en el ser humano. Esta fase es necesaria para saber cómo actúa el medicamento en las personas y para averiguar si se trata de un medicamento adecuado y eficaz en el tratamiento de la enfermedad en cuestión.

Los estudios clínicos constan de la evaluación experimental de una sustancia o medicamento mediante su administración o aplicación al ser humano con la finalidad de poner de manifiesto sus efectos farmacodinámicos y farmacocinéticos, de establecer su eficacia para una indicación terapéutica, profiláctica o diagnóstica determinada y además conocer el perfil de sus reacciones adversas y establecer la seguridad de dicho fármaco (51).

**4.- Fase de Aprobación y Registro:** En esta fase se lleva a cabo la solicitud, a las agencias reguladoras, de la autorización para la comercialización del fármaco.

Toda la información obtenida a lo largo de todo el proceso de investigación y desarrollo del medicamento es recopilada en un informe que demuestre la eficacia y seguridad del nuevo fármaco y es presentado ante las autoridades.

Una vez autorizado el fármaco, se llevan a cabo ensayos que se realizan después de su comercialización para estudiar su eficacia y seguridad, así como condiciones de uso distintas de las autorizadas como, por ejemplo, nuevas indicaciones. Se lleva a cabo, por tanto, un seguimiento detallado de las incidencias e irregularidades que el producto pueda generar, para modificar la información relativa a las recomendaciones de uso o, incluso, para retirar el fármaco del mercado en el caso de que sea necesario (49).

### *Modelos para el estudio de la obesidad*

Como se mencionó anteriormente, para conocer el perfil farmacocinético y farmacodinámico de los agentes con potencial eficacia terapéutica es necesario echar mano ya sea de modelos de cultivos (*in vitro*) o de modelos animales. Actualmente se emplean líneas celulares de preadipocitos o de células madre capaces de diferenciarse en adipocitos. Dichos modelos se utilizan en cultivos tridimensionales, aisladas o co-cultivadas con otros tipos celulares para estudiar la relación del tejido adiposo con otros tejidos. Desde hace más de medio siglo se ha intentado desarrollar estos modelos animales que mimeticen la mayor parte de los desórdenes fisiológicos que posee un individuo obeso. Un conocimiento detallado de las rutas moleculares que regulan el desarrollo y el metabolismo del adipocito son necesarios para desarrollar estrategias frente a las enfermedades metabólicas ya mencionadas.

Los modelos animales han supuesto una gran contribución para el entendimiento de los parámetros que regulan el apetito y el balance energético. Dentro de ellos se pueden clasificar diferentes tipos según el origen de la obesidad (54). (Cuadro 3)

Cuadro 3. Modelos animales de obesidad (55, 56).

|                       | <b>Modelos</b>                            | <b>Ejemplos</b>  |
|-----------------------|---|--|
| <b>Genéticos</b>      | Mutación de un solo gen dominante         | Ratón Agouti   |
|                       | Mutación de un solo gen recesivo          | Ratón Ob<br>Ratón Db<br>Rata Zucker  |
|                       | Mutación poligénica                       | Ratón Nueva Zelanda<br>Ratón KK<br>Ratón NH  |
|                       | Mutación al azar genéticamente modificada | Knockout NPY1r<br>R. $\beta$ -3 adrenérgico  |
| <b>Nutricionales</b>  | Obesidad inducida por la dieta            | Wistar con dieta de cafetería o<br>dieta alta en grasa<br>SD con dieta alta en grasa<br>SD DR/DS |
| <b>Farmacológicos</b> |   | Ciproheptadina<br>Clonidina  |
| <b>Quirúrgicos</b>    | Hipotálamo                                | Lesiones hipotalámicas   |
|                       | Ovarios                                   | Ooforectomía   |
| <b>Otros</b>          | Apareamiento selectivo                    |  |

Los modelos de obesidad inducida por una dieta alta en grasa se han utilizado como modelo eficiente de la obesidad, dislipidemia y resistencia a la insulina en roedores pues representan la etiología de la obesidad en las sociedades modernas. En general estos modelos presentan la mayor parte de las características del fenotipo obeso humano, tales como un aumento de los ácidos grasos libres, triglicéridos, glucosa e insulina en sangre, esteatosis hepática moderada o grave y aumento de los factores inflamatorios. Las características de dicho modelo dependerán del tipo de grasa, del porcentaje presente en la dieta y de la duración del periodo de inducción. Existen numerosas variantes de estos modelos, normalmente utilizando ratas Wistar, Sprague Dawley o Long Evans alimentadas con dietas hipercalóricas como la dieta de cafetería o las dietas con alto contenido en grasa, cuyo contenido de este macronutriente está en torno al 20-60%, y en donde el aumento de peso es evidente después de 4 semanas de alimentación con este tipo de dietas. Una alimentación a largo plazo con dietas enriquecidas en grasas finalmente conduce a una moderada hiperglucemia e intolerancia a la glucosa en la mayoría de las cepas de ratas y ratones (57, 58).

# Hipótesis

---

Se sabe que la adición de ciertos metales a diferentes fármacos puede potenciar su efecto terapéutico, por lo que se cree que la administración de los compuestos de coordinación NB5H02 y NB5H08 en ratas HsdBlu:LE (Long-Evans) obesas alimentadas con una dieta hipercalórica, presentará una mayor eficacia antiobesidad que la administración de únicamente 5-HTP.

# Objetivos

---

## *Objetivo general*

Contribuir a la evaluación de seguridad y eficacia de dos compuestos de coordinación basados en el 5-hidroxitriptófano como tratamiento para la obesidad en ratas HsdBlu:LE (Long-Evans) con obesidad inducida por la dieta.

## *Objetivos específicos*

Evaluar la toxicidad aguda de los compuestos de coordinación por vía intraperitoneal en ratones Hsd:ICR (CD-1®) y obtener la dosis letal 50.

Evaluar la toxicidad aguda de los compuestos de coordinación por vía intraperitoneal en ratas HsdHan®:WIST (Wistar) y obtener la dosis letal 50.

Establecer un modelo de obesidad inducida por la dieta en ratas HsdBlu:LE (Long-Evans).

Evaluar la toxicidad subcrónica a dosis repetidas de los compuestos de coordinación por vía intraperitoneal en ratas HsdBlu:LE (Long-Evans), mediante la medición de parámetros fisiológicos, bioquímicos y hematológicos asociados, así como su evaluación anatomopatológica.

Evaluar la eficacia de los compuestos de coordinación administrados de forma subcrónica por vía intraperitoneal en un modelo de obesidad inducida por la dieta en ratas HsdBlu:LE (Long-Evans), mediante la medición del peso y del consumo de alimento y agua, así como la evaluación de parámetros fisiológicos y bioquímicos asociados a la obesidad.

# Material y métodos

---

El presente trabajo fue realizado bajo un sistema de gestión de la calidad y buenas prácticas de laboratorio.

Todos los procedimientos fueron aprobados por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Facultad de Química, UNAM y el Subcomité Institucional para el Cuidado de Animales en Experimentación (SICUAE) del Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias de la Producción y de la Salud Animal, UNAM.

## *Preparación de los compuestos de prueba*

Los compuestos de coordinación fueron proporcionados en estado sólido por el laboratorio de la Dra. Norah Yolanda Barba Behrens, y en la UNIPREC se pesaron en una balanza analítica y se solubilizaron utilizando DMSO al 10% y agua inyectable mediante agitación constante. (Figura 6)



Figura 6. Se muestran los compuestos de prueba solubilizados en DMSO al 10%.

### *Mantenimiento de los animales*

Los ratones Hsd:ICR (CD-1®) y las ratas HsdHan®:WIST (Wistar) fueron adquiridos del Centro de Producción UNAM-ENVIGO en México y las ratas HsdBlu:LE (Long-Evans) de ENVIGO en Estados Unidos, y permanecieron en la Unidad de Investigación Preclínica (UNIPREC), del conjunto “E” de la Facultad de Química, UNAM (Figura 7); en donde se mantuvieron en condiciones ambientales controladas cumpliendo con la NOM 062-ZOO-1999 (59).



Figura 7. Unidad de Investigación Preclínica, El desarrollo de este proyecto se realizó en la UNIPREC.

Los animales fueron identificados y alojados en sus cajas por un periodo de 5 - 10 días para aclimatarse a las condiciones del cuarto de experimentación, durante este periodo se les dio acceso al agua y a la comida *ad libitum* y permanecieron en observación para verificar su buen estado de salud (59).

### *Evaluación de la seguridad de los compuestos de coordinación*

Al trabajar con moléculas nuevas es necesario realizar estudios de seguridad, en este caso se realizaron pruebas de toxicidad para conocer los posibles efectos adversos de los compuestos de coordinación y con esto asegurar el bienestar de quien reciba el tratamiento y evitar posibles daños a su salud.

## *Evaluación de la toxicidad aguda de los compuestos de coordinación por vía intraperitoneal en ratones Hsd:ICR (CD-1<sup>®</sup>) y obtención de la dosis letal 50*

Se emplearon 30 ratones machos Hsd:ICR (CD-1<sup>®</sup>) "S.P.F." (*Specific Pathogen Free*) adultos jóvenes de 4 a 5 semanas de edad. Al comienzo del estudio, las variaciones de peso de los animales eran mínimas ( $23 \pm 5$  gramos), los animales estaban sanos y no habían sido utilizados en procedimientos experimentales previos.

Se evaluaron cinco diferentes niveles de dosis (10, 50, 100, 500 y 750 mg/kg) espaciadas apropiadamente para obtener un rango de efectos tóxicos y tasas de mortalidad (Cuadro 4). Con estos datos fue suficiente para producir una curva dosis-respuesta y permitir una estimación aceptable de la Dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>). Cada grupo de dosis por compuesto incluía tres ratones, a los cuales se les administró un volumen no mayor a 2 mL/ratón, de la solución de los compuestos NB5H2 y NB5H8 por vía intraperitoneal.

Cuadro 4. Dosis (mg/kg) de los compuestos de coordinación utilizadas para la evaluación de la toxicidad aguda en ratón y rata.

| Ratón          |                | Rata           |                |
|----------------|----------------|----------------|----------------|
| NB5H02 (mg/kg) | NB5H08 (mg/kg) | NB5H02 (mg/kg) | NB5H08 (mg/kg) |
| 10             | 10             | 50             | 100            |
| 50             | 50             | 75             | 125            |
| 100            | 100            | 100            | 130            |
| 500            | 500            | 125            | 135            |
| 750            | 750            | 150            | 140            |
|                |                |                | 145            |
|                |                |                | 150            |
|                |                |                | 175            |
|                |                |                | 200            |

Los animales se administraron y posteriormente se observaron individualmente para identificar signos de toxicidad y la mortalidad principalmente dentro de las primeras 24 horas post-administración y por un total de 14 días. Con estos datos se realizó la determinación de la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) para ratón (60). Este valor obtenido de DL<sub>50</sub> se extrapoló a rata empleando la constante metabólica de cada especie y se calculó una DL<sub>50</sub> teórica (61). A partir de esta dosis se plantearon nuevas dosis a utilizar en la determinación de la DL<sub>50</sub> en ratas.

$$D1 \text{ Km1} = D2 \text{ Km2}$$

En donde:

**D1:** Dosis obtenida en ratón (mg/kg)

**Km1:** Constante metabólica de ratón (3)

**Km2:** Constante metabólica de rata (6)

**D2:** Dosis en rata (mg/kg)

### *Evaluación de la toxicidad aguda de los compuestos de coordinación por vía intraperitoneal en ratas HsdHan<sup>®</sup>:WIST (Wistar) y obtención de la dosis letal 50*

Se emplearon 75 ratas machos HsdHan:WIST (Wistar) "S.P.F." (*Specific Pathogen Free*) adultos jóvenes de 7 a 8 semanas. Al comienzo del estudio, las variaciones de peso de los animales eran mínimas ( $170 \pm 20$  gramos), los animales estaban sanos y no habían sido utilizados en procedimientos experimentales previos.

A partir de la  $DL_{50}$  teórica obtenida para rata, se seleccionaron 5 dosis cercanas entre sí (NB5H02: 50, 75, 100, 125 y 150 mg/kg; NB5H08: 100, 125, 150, 175 y 200 mg/kg) dentro de un intervalo donde se esperaba encontrar la  $DL_{50}$  (Cuadro 4), y se administraron los compuestos NB5H02 y NB5H08 en los grupos correspondientes con 5 ratas cada uno por vía intraperitoneal, en una solución con un volumen no mayor a 4 mL/rata (Figura 8). Para el compuesto NB5H08 fue necesario utilizar 4 niveles de dosis más (130, 135, 140 y 145 mg/kg) para obtener una curva de mortalidad más representativa (Cuadro 4).

Los animales se administraron y posteriormente se observaron individualmente para identificar signos de toxicidad y la mortalidad principalmente dentro de las primeras 24 horas post-administración y por un total de 14 días. Con estos datos se realizó la determinación de la Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) para rata mediante un análisis de regresión Probit utilizando el software SPSS versión 23.0 (60).

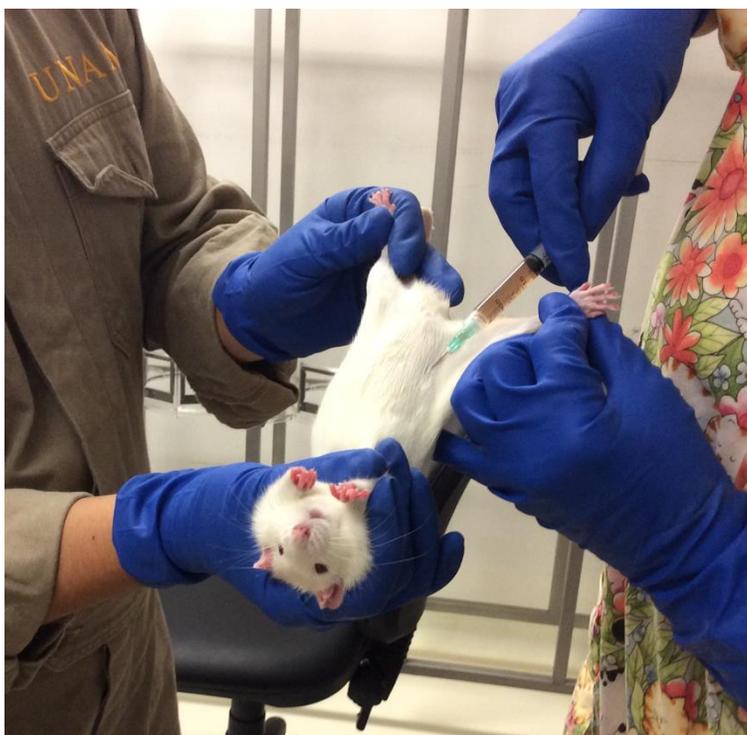


Figura 8. Administración de los compuestos NB5H02 Y NB5H08 por vía intraperitoneal en ratas HsdHan®:WIST para la evaluación de la toxicidad aguda.

## *Modelo de obesidad inducida por la dieta (DIO) en ratas HsdBlu:LE (Long-Evans)*

La evaluación de la toxicidad subcrónica y de la eficacia antiobesidad de los compuestos de coordinación se realizaron simultáneamente en los mismos individuos, para esto se estableció un modelo de obesidad inducida por la dieta (DIO).

Se utilizaron 75 ratas hembras HsdBlu:LE (Long-Evans) "S.P.F." (*Specific Pathogen Free*) adultos jóvenes hembras de 7 a 8 semanas de edad. Al comienzo del estudio, las variaciones de peso de los animales eran mínimas ( $230 \pm 20$  gramos), los animales estaban sanos, eran nulíparas y no habían sido utilizadas en procedimientos experimentales previos (Figura 9).

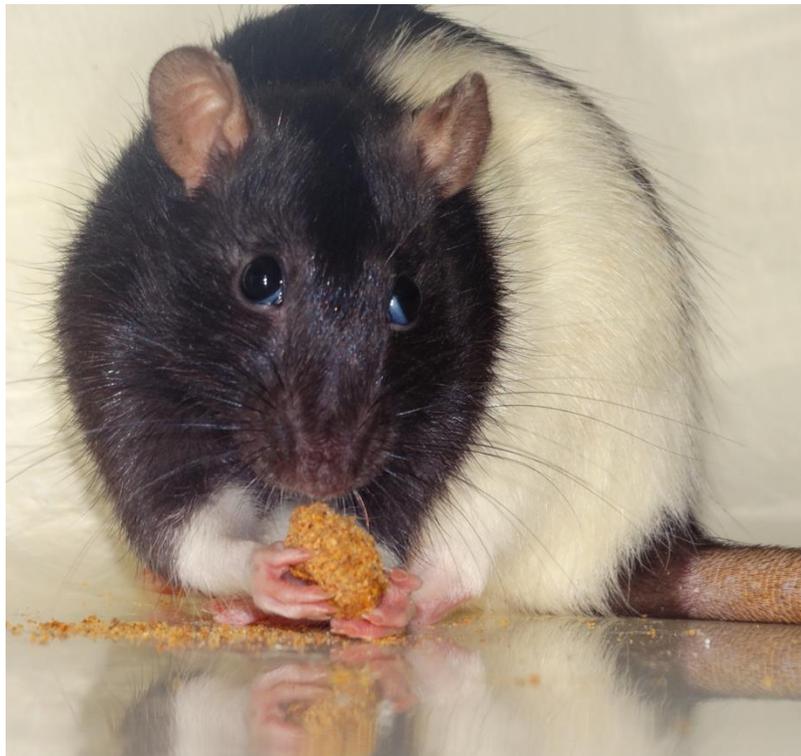


Figura 9. Modelo de obesidad inducida por la dieta utilizando ratas hembras HsdBlu:LE (Long-Evans).

Una vez pasado el tiempo de aclimatación, se hicieron grupos al azar de al menos 8 ratas cada uno y fueron alojadas en jaulas por parejas. Estos grupos de experimentación se sometieron a una dieta hipercalórica (40% grasa, 4.54 kcal/g; *Research Diets Tso's high fat diet*) (Figura 10) por un periodo de 12 semanas (62). Un grupo fue considerado como control y fue alimentado con una dieta estándar (6.2% grasa, 3.81 kcal/g; Envigo 2018S Teklad global) (Figura 11). A estos grupos alimentados con la dieta alta en grasa, también se les administró el compuesto de cobalto NB5H02, el compuesto de cobre NB5H08 o el 5-HTP ya sea a la dosis baja (2.6 mg/kg) o a la dosis alta (3.8 mg/kg). Estas dosis se determinaron con base en la DL<sub>50</sub> y DL<sub>90</sub> del compuesto más tóxico en ratas (NB5H02, DL<sub>50</sub>: 95.90 mg/kg, DL<sub>90</sub>: 137 mg/kg) siendo la dosis baja la DL<sub>50</sub> y la dosis alta la DL<sub>90</sub> divididas entre los 36 días de administración. Los grupos experimentales se muestran en el siguiente cuadro. (Cuadro 5) (Figura 12)

### Tso's Low or High Fat Diet

|                            | % | gm             | kcal        |
|----------------------------|---|----------------|-------------|
| <b>Proteínas</b>           |   | 16.6           | 15          |
| <b>Carbohidratos</b>       |   | 52.0           | 46          |
| <b>Grasas</b>              |   | 20.0           | 40          |
| <b>Total</b>               |   |                | 100         |
| <b>kcal/gm</b>             |   | 4.54           |             |
| <b>Ingredientes</b>        |   | <b>gm</b>      | <b>kcal</b> |
| <b>Caseína</b>             |   | 164            | 656         |
| <b>L- Cisteína</b>         |   | 2.1            | 8           |
|                            |   |                |             |
| <b>Almidón</b>             |   | 303.1          | 1212        |
| <b>Maltodextrina</b>       |   | 115            | 460         |
| <b>Sacarosa</b>            |   | 89.9           | 360         |
|                            |   |                |             |
| <b>Celulosa</b>            |   | 58.6           | 0           |
| <b>Celulosa</b>            |   |                |             |
| <b>Aceite de Soya</b>      |   | 10             | 90          |
| <b>Mantequilla anhidra</b> |   | 190            | 1710        |
|                            |   |                |             |
| <b>Total</b>               |   | <b>1000.05</b> | <b>4543</b> |

Figura 10. Información nutricional del alimento alto en grasa utilizado en el modelo de obesidad inducida por la dieta (62).

## 2018S Teklad Global

| <b>Macronutrientes</b>           |               |            |
|----------------------------------|---------------|------------|
| <b>Proteínas crudas</b>          | %             | 18.6       |
| <b>Grasas</b>                    | %             | 6.2        |
| <b>Carbohidratos</b>             | %             | 44.2       |
| <b>Fibra cruda</b>               | %             | 3.5        |
| <b>Fibra Detergente Neutro</b>   | %             | 14.7       |
| <b>Minerales</b>                 | %             | 5.3        |
| <b>Energía</b>                   | kcal/g (kJ/g) | 3.1 (13.0) |
| <b>Calorías de Proteínas</b>     | %             | 24         |
| <b>Calorías de Grasas</b>        | %             | 18         |
| <b>Calorías de Carbohidratos</b> | %             | 58         |

Figura 11. Información nutricional del alimento utilizado en los grupos de dieta estándar (63).

Cuadro 5. Grupos experimentales para la evaluación de la toxicidad subcrónica y de la eficacia antiobesidad de los compuestos de coordinación. STD=Dieta estándar; DIO=Dieta inductora de obesidad (alta en grasa).

| Grupo                         | Dieta estándar | Dieta hipercalórica | Agua inyectable | Compuesto con cobalto | Compuesto con cobre | 5-HTP     |
|-------------------------------|----------------|---------------------|-----------------|-----------------------|---------------------|-----------|
| <b>NB5H02 DB (Dosis baja)</b> | -              | +                   | -               | 2.6 mg/kg             | -                   | -         |
| <b>NB5H02 DA (Dosis alta)</b> | -              | +                   | -               | 3.8 mg/kg             | -                   | -         |
| <b>NB5H08 DB (Dosis baja)</b> | -              | +                   | -               | -                     | 2.6 mg/kg           | -         |
| <b>NB5H02 DA (Dosis alta)</b> | -              | +                   | -               | -                     | 3.8 mg/kg           | -         |
| <b>5-HTP DB (Dosis baja)</b>  | -              | +                   | -               | -                     | -                   | 2.6 mg/kg |
| <b>5-HTP DA (Dosis alta)</b>  | -              | +                   | -               | -                     | -                   | 3.8 mg/kg |
| <b>STD</b>                    | +              | -                   | +               | -                     | -                   | -         |
| <b>DIO</b>                    | -              | +                   | +               | -                     | -                   | -         |



Figura 12. a) Alojamiento de los animales por grupos y asignación de dietas. b) Alimento alto en grasa utilizado en el modelo de obesidad inducida por dieta.

A partir del día 1 los animales fueron alimentados con las dietas correspondientes, además de que a partir de este mismo día inició el régimen de administración de los compuestos, el cual se realizó vía intraperitoneal, tres veces por semana durante un periodo de doce semanas, las dosis administradas fueron calculadas en base a los resultados obtenidos en la toxicidad aguda. (Figura 12)

### *Evaluación de la toxicidad subcrónica a dosis repetidas de los compuestos de coordinación por vía intraperitoneal en ratas HsdBlu:LE (Long-Evans)*

Los animales se revisaron diario de forma individual poniendo especial atención en los posibles signos de toxicidad que pudieran presentar.

Se realizaron análisis de bioquímica sanguínea en donde se midieron algunos analitos asociados a toxicidad hepática: Fosfatasa Alcalina (FA), Alanino aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST) y Bilirrubina total (BT).

Se tomó una muestra basal y posteriormente una cada mes hasta el final del estudio (4, 8 y 12 semanas), con un total de 4 muestreos.

La muestra de sangre individual se obtuvo por vía seno retro-orbital, los animales se sometieron a un ayuno por un periodo de 6 h para posteriormente anestésarlos en la cámara de anestesia utilizando isoflurano y tomar 500  $\mu$ L de sangre por rata dentro de un tubo microtainer sin ningún tipo de anticoagulante (Figura 13). Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min y se tomó el suero con el cual se realizaron los análisis bioquímicos utilizando el equipo analizador de química húmeda por espectrofotometría Dirui CST-240.

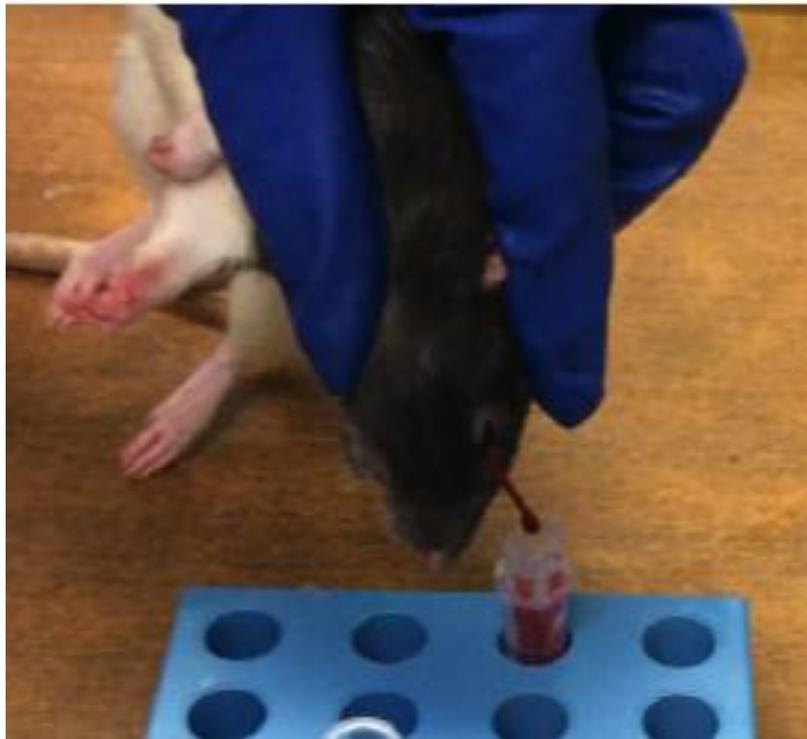


Figura 13. Toma de muestra sanguínea vía seno retro-orbital.

Para conocer el estado de salud final de cada uno de los animales se les realizó una biometría hemática, por lo que en la última toma de muestra sanguínea se obtuvieron 500 µL adicionales de sangre de cada rata dentro de un tubo microtainer con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) con la cual se midió:

- Hematocrito
- Eritrocitos
- Hemoglobina
- Volumen globular medio (VGM)
- Concentración globular media en hemoglobina (CGMH)
- Leucocitos
- Linfocitos
- Monocitos
- Neutrófilos
- Eosinófilos
- Plaquetas

Al final del estudio se les aplicó eutanasia a todos los animales utilizando una cámara de CO<sub>2</sub> para posteriormente realizar la necropsia y la obtención del hígado, así como cualquier otro órgano que presentara un daño o anomalía macroscópica. Todos los órganos obtenidos fueron fijados en formol para posteriormente realizar un análisis histopatológico en donde pudiéramos encontrar hallazgos indicativos de toxicidad debida a los productos administrados.

*Evaluación de la eficacia de los compuestos de coordinación administrados de forma subcrónica por vía intraperitoneal en un modelo de obesidad inducida por la dieta en ratas HsdBlu:LE (Long-Evans)*

Para evaluar la eficacia de los compuestos de coordinación se realizó el pesaje de los animales dos veces por semana durante las doce semanas del estudio, mientras que semanalmente se midió el consumo de agua y alimento.

Además, se realizó la medición de la composición corporal de las ratas y de su presión arterial, así como un análisis de bioquímica sanguínea, todo esto teniendo un muestreo de forma basal y posteriormente otros a las 4, 8 y 12 semanas del estudio.

- Medición de la composición corporal: índice de masa corporal (IMC), masa libre de grasa (FFM) y masa grasa (FM) de cada rata mediante un equipo de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica (IMPEDIVET, Impedimed, Carlsbad, CA). Los animales se anestesiaron con isoflurano, posteriormente para realizar las mediciones se colocaron dos agujas conectadas a los electrodos en la punta de la nariz y dos más en la base de la cola. (Figura 14)

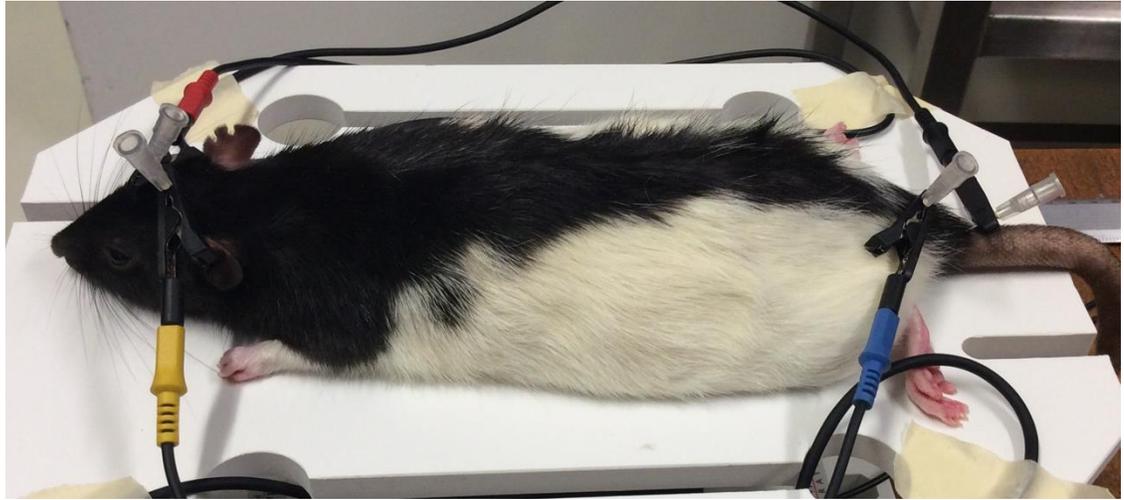


Figura 14. Medición de la composición corporal mediante el equipo de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica “IMPEDIVET”.

- Medición de la presión arterial de cada animal mediante un equipo no invasivo de tecnología de sensor de registro de presión de volumen (CODA, Kent Scientific, Torrington, CT) (Figura 15). Para esto cada rata fue sometida previamente a un periodo de adaptación a los cepos por diez días antes de la medición basal, esto con la finalidad de que los animales estén familiarizados con el manejo y no se alteren los valores al momento de hacer las mediciones debido al estrés que pudiera provocar su manipulación. (Cuadro 6)

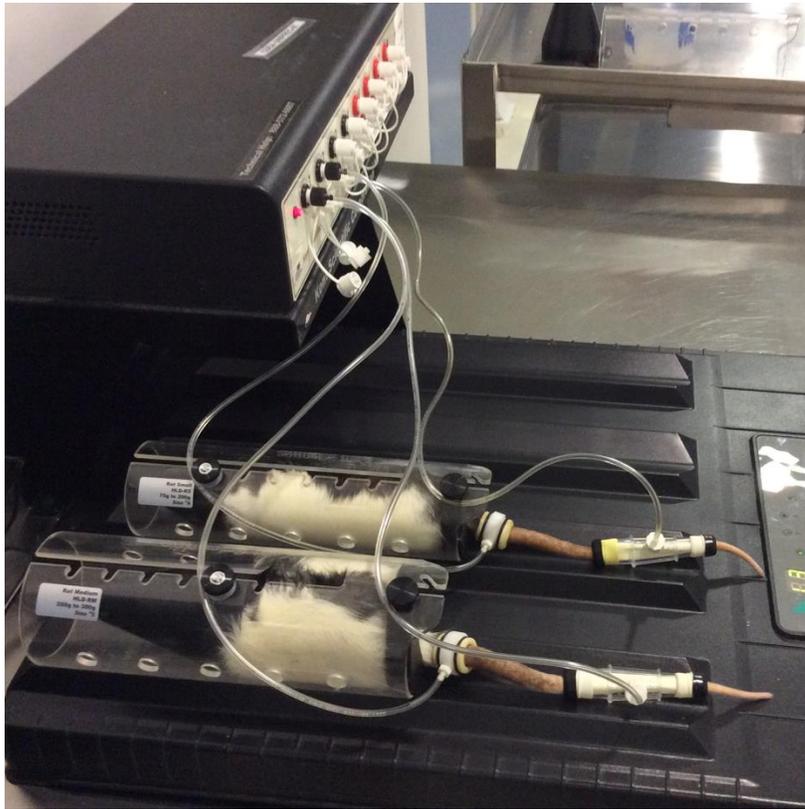


Figura 15. Medición de la presión arterial mediante el equipo no invasivo “CODA”.

Cuadro 6. Esquema de adaptación de los animales a los cepos para la medición de la presión sanguínea.

| Día | Tiempo dentro del cepo (min) |
|-----|------------------------------|
| 1   | 2                            |
| 2   | 4                            |
| 3   | 6                            |
| 4   | 8                            |
| 5   | 10                           |
| 6   | 10                           |
| 7   | 10                           |
| 8   | 10                           |
| 9   | 10                           |
| 10  | 10                           |

- Se realizaron análisis de bioquímica sanguínea para determinar el perfil lipídico de los animales, por lo que se midieron algunos analitos asociados a la obesidad: triglicéridos, colesterol, colesterol HDL, colesterol LDL y glucosa.

Se obtuvo la sangre de cada rata vía seno retro-orbital, los animales se sometieron a un ayuno por un periodo de 6 h para posteriormente anestésarlos con isoflurano y tomar 500 µL de sangre por rata dentro de un tubo microtainer sin algún anticoagulante.

Las muestras de sangre se centrifugaron a 3000 rpm por 15 min y se tomó el suero con el cual se realizaron los análisis utilizando el equipo analizador de química húmeda por espectrofotometría Dirui CST-240. Además, se realizó la medición de glucosa en sangre semanalmente mediante un glucómetro convencional.

### *Análisis estadístico*

La determinación de las Dosis Letal 50 (DL<sub>50</sub>) en ratón y rata se realizó mediante un análisis de regresión Probit utilizando el software SPSS versión 23.0.

Los datos obtenidos en los estudios de toxicidad subcrónica y estudios de eficacia fueron sometidos a pruebas de normalidad y homogeneidad de varianzas, así como cálculo del error estándar (E.E.), para posteriormente realizar los análisis estadísticos mediante pruebas de análisis de varianza (ANDEVA) de una o dos vías, pruebas t-Student pareada o U de Mann-Whitney en los casos en los cuales no pasaba la prueba de normalidad, para determinar que existen diferencias significativas con  $p \leq 0.05$  con relación a los factores de estudio. En las pruebas de ANDEVA en donde hubo diferencias significativas a  $p \leq 0.05$  se realizó la prueba post-hoc: prueba t por el método Holm-Sidak (comparación de medias), utilizando el software SigmaPlot versión 13.0.

# Resultados

---

## *Evaluación de la toxicidad aguda de los compuestos de coordinación por vía intraperitoneal en ratones Hsd:ICR (CD-1®) y obtención de la dosis letal 50*

La evaluación de la toxicidad aguda de los compuestos de coordinación NB5H02 Y NB5H08 en ratones se realizó por vía intraperitoneal, se evaluaron las dosis de 10, 50, 100, 500 y 750 mg/kg, rango de dosis en el cual se pudiera obtener una curva para estimar la DL<sub>50</sub>, es decir, encontrar la dosis en la cual se murieran el 50% de los animales. Una vez administrados los compuestos, los animales se mantuvieron en observación, poniendo atención en los posibles signos de toxicidad, con especial énfasis en ojos, mucosas, piel, sistema respiratorio, patrones de comportamiento, actividad motora, (lagrimeo, salivación, piloerección, ruido nasal, epistaxis, apnea, disnea, somnolencia, micción, defecación, ataxia, temblor, convulsiones, letargo, etc.)

De acuerdo a lo observado en los grupos administrados con el compuesto de cobalto NB5H02, se puede decir que a la dosis más baja (10 mg/kg) los animales no presentaron ningún signo de toxicidad, pero conforme aumentaron las dosis se fueron presentado algunas signologías, en la dosis de 50 y 100 mg/kg ningún animal se murió, pero los animales presentaron postración. A la dosis de 500 mg/kg la postración fue más notoria además de que empezaron a presentar una disminución en la movilidad de los miembros posteriores e irregularidad en la frecuencia respiratoria, pero lo más importante es que a esta dosis se murió el 30% de los animales. Mientras que a la dosis de 750 mg/kg los signos de toxicidad anteriormente mencionados fueron muy evidentes pues desde el momento de la administración los animales empezaron a presentar estos efectos con mayor intensidad y al final el 60% de los ratones murieron (A4).

Aunque en ninguna dosis se murió el 100% de los animales, se realizó el análisis Probit con el cual se estimó una DL<sub>50</sub> de 613.9 mg/kg (Cuadro 7), a partir de este valor se obtuvo una DL<sub>50</sub> calculada para rata con base en las constantes metabólicas de cada animal la cual fue de 306.93 mg/kg (A1.)

Cuadro 7. Determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del compuesto de cobalto NB5H02 en ratones Hsd:ICR (CD-1<sup>®</sup>) mediante el análisis de regresión Probit.

| <b>Ratón Hsd:ICR (CD-1<sup>®</sup>)</b> |                      |              |                |              |
|---|----------------------|--------------|----------------|--------------|
| <b>Compuesto</b>                        | <b>Dosis (mg/kg)</b> | <b>Vivos</b> | <b>Muertos</b> | <b>Total</b> |
| <b>NB5H02</b>                           | 10                   | 3            | 0              | 3            |
|   | 50                   | 3            | 0              | 3            |
|   | 100                  | 3            | 0              | 3            |
|   | 500                  | 2            | 1              | 3            |
|   | 750                  | 1            | 2              | 3            |
| <b>DL<sub>50</sub> = 613.869 mg/kg</b>  |                      |              |                |              |

En cuanto al compuesto de cobre NB5H08, la administración de la dosis de 10 mg/kg no provocó en los animales ningún signo de toxicidad, mientras que a partir de la dosis de 50 mg/kg los animales empezaron a mostrar postración, y en la de 100 mg/kg también presentaron cierta dificultad de movimiento en los miembros posteriores, estos signos se fueron intensificando conforme aumentaron las dosis. A partir de la dosis de 500 mg/kg los signos de toxicidad mencionados anteriormente fueron más evidentes, los animales tenían dificultad para respirar además de que en esta dosis murieron el 60 % de los animales, mientras que en la dosis más alta (750 mg/kg) murieron el 100 % de los ratones (A5).

A partir de estos datos se realizó el análisis probit con el cual se estimó una DL<sub>50</sub> de 341.045 mg/kg (Cuadro 8), y con este valor se obtuvo una DL<sub>50</sub> calculada para rata mediante la fórmula de conversión de dosis entre especies con base en las constantes metabólicas de cada animal la cual fue de 170.52 mg/kg (A1).

Cuadro 8. Determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del compuesto de cobre NB5H08 en ratón Hsd:ICR (CD-1®) mediante el análisis de regresión Probit.

| Ratón Hsd:ICR (CD-1®)                  |               |       |         |       |
|--|---------------|-------|---------|-------|
| Compuesto                              | Dosis (mg/kg) | Vivos | Muertos | Total |
| NB5H08                                 | 10            | 3     | 0       | 3     |
|  | 50            | 3     | 0       | 3     |
|  | 100           | 3     | 0       | 3     |
|  | 500           | 1     | 2       | 3     |
|  | 750           | 0     | 3       | 3     |
| <b>DL<sub>50</sub> = 341.045 mg/kg</b> |               |       |         |       |

*Evaluación de la toxicidad aguda de los compuestos de coordinación por vía intraperitoneal en ratas HsdHan®:WIST (Wistar) y obtención de la dosis letal 50*

La evaluación de la toxicidad aguda de los compuestos de coordinación en ratas HsdHan®:WIST (Wistar) se realizó por vía intraperitoneal, se evaluaron dosis por arriba y por debajo de la DL<sub>50</sub> calculada con base en la DL<sub>50</sub> en ratón. Cuando se administraron las dosis bajas y medias se observaron signos de toxicidad severos como piloerección, disnea, ataxia, convulsiones y letargo,

por lo que se decidió que antes de administrar dosis mayores se debía ajustar y disminuir las dosis a utilizar (A6).

Para el compuesto de cobalto NB5H02 se utilizaron dosis de 50, 75, 100, 125 y 150 mg/kg. Inmediatamente después de la administración todos los animales se encontraron aletargados y con conductas agresivas hacia el investigador. Más allá de estos signos de toxicidad, no se murió ninguno de los animales correspondientes a la dosis más baja. A la dosis de 75 mg/kg comenzaron a morir los animales, dentro de este grupo se murió solo una rata la cual además de los signos de toxicidad anteriormente mencionados, empezó a presentar postración hasta que finalmente murió. En el grupo de la dosis de 100 mg/kg los signos de toxicidad se fueron intensificando y se presentaron nuevos signos, pues se observó que mostraban dificultad para mover los miembros posteriores, así como dificultad para respirar, posteriormente tres de estos animales se quedaron postrados hasta que finalmente murieron. En las ratas a las que se les administró una dosis de 125 mg/kg de este compuesto, los signos de toxicidad fueron similares a los de la dosis que la precedía, con la diferencia de que los animales presentaron algunos saltos, esto principalmente en los minutos previos a su muerte, dentro de este grupo se murieron 4 ratas. En la dosis más alta utilizada (150 mg/kg) se observó que los signos de toxicidad evaluados y ya mencionados se exacerbaron provocando la muerte de los cinco individuos pertenecientes a este grupo (A6).

Todos estos datos fueron analizados estadísticamente realizando un análisis de regresión Probit, mediante la cual pudimos obtener una  $DL_{50}$  estimada en rata de 95.90 mg/kg para el compuesto de cobalto NB5H02 (Cuadro 9) (A2).

Cuadro 9. Determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del compuesto de cobalto NB5H02 en ratas HsdHan®:WIST (Wistar) mediante el análisis de regresión Probit.

| Rata HsdHan®:WIST (Wistar)           |               |       |         |       |
|--------------------------------------|---------------|-------|---------|-------|
| Compuesto                            | Dosis (mg/kg) | Vivos | Muertos | Total |
| NB5H02                               | 50            | 5     | 0       | 5     |
|                                      | 75            | 4     | 1       | 5     |
|                                      | 100           | 2     | 3       | 5     |
|                                      | 125           | 1     | 4       | 5     |
|                                      | 150           | 0     | 5       | 5     |
| <b>DL<sub>50</sub> = 95.90 mg/kg</b> |               |       |         |       |

Para el estudio de toxicidad aguda en ratas HsdHan®:WIST (Wistar) del compuesto de cobre NB5H08 se probaron inicialmente las dosis de 100, 125, 150, 175, y 200 mg/kg ya que a dosis más altas se observó que todos los animales se morían y dentro de este rango se encontraba la DL<sub>50</sub> calculada a partir del estudio en ratones. Durante la realización de la prueba se pudo observar que casi inmediatamente después de la administración, los animales de todos los grupos tuvieron un comportamiento hiperactivo y agresividad hacia el investigador, posteriormente iban disminuyendo su actividad hasta quedar aletargados. En cuanto a la relación de ratas vivas y muertas se encontró que en las dos dosis más bajas, 100 y 125 mg/kg, ningún animal murió, mientras que en las dosis mayores todos los animales fueron presentando los signos anteriormente descritos, además de presentar también dificultad para respirar, postración y finalmente murieron. Al tener estos resultados se replanteó evaluar nuevas dosis intermedias entre la dosis de 125 mg/kg donde no murió ningún animal y la de 150 mg/kg en la cual murieron todos con el fin de acotar el valor de la DL<sub>50</sub> (A7).

Es por esto que se realizó un nuevo ensayo para este compuesto en el que se utilizaron dosis de 130, 135, 140, 145 y 150 mg/kg. La administración de estas dosis en las ratas de todos los grupos,

provocó una disminución en su actividad hasta quedar aletargadas. Así mismo, mostraban cierta dificultad para respirar; pasados algunos minutos de la administración aumentaron los signos de toxicidad hasta que los animales quedaron totalmente postrados y finalmente murieron (A7).

Lo resultados arrojados se evaluaron estadísticamente mediante un análisis Probit en el cual se obtuvo una estimación de la DL<sub>50</sub> de 122.88 mg/kg para la administración intraperitoneal del compuesto de cobre NB5H08 (Cuadro 10) (A3).

Cuadro 10. Determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) del compuesto de cobre NB5H08 en ratas HsdHan®:WIST (Wistar) mediante el análisis de regresión Probit.

| <b>Rata HsdHan®:WIST (Wistar)</b> |                                       |              |                |              |
|-----------------------------------|---------------------------------------|--------------|----------------|--------------|
| <b>Compuesto</b>                  | <b>Dosis (mg/kg)</b>                  | <b>Vivos</b> | <b>Muertos</b> | <b>Total</b> |
| <b>NB5H08</b>                     | 100                                   | 5            | 0              | 5            |
|                                   | 125                                   | 5            | 0              | 5            |
|                                   | 130                                   | 0            | 5              | 5            |
|                                   | 135                                   | 0            | 5              | 5            |
|                                   | 140                                   | 0            | 5              | 5            |
|                                   | 145                                   | 1            | 4              | 5            |
|                                   | 150                                   | 0            | 5              | 5            |
|                                   | 175                                   | 1            | 4              | 5            |
|                                   | 200                                   | 0            | 5              | 5            |
|                                   | <b>DL<sub>50</sub> = 122.88 mg/kg</b> |              |                |              |

## *Evaluación de la toxicidad subcrónica a dosis repetidas de los compuestos de coordinación por vía intraperitoneal en ratas HsdBlu:LE (Long-Evans)*

### **Bioquímica sanguínea**

Se realizaron bioquímicas sanguíneas en las que se evaluó la concentración en sangre de: Fosfatasa Alcalina (FA), Alanino aminotransferasa (ALT), Aspartato aminotransferasa (AST) y Bilirrubina total (BT) los cuales están relacionados con la integridad hepática. Se realizaron cuatro muestreos durante todo el experimento, uno basal y posteriormente uno cada mes hasta el final del estudio.

De acuerdo a los resultados obtenidos de fosfatasa alcalina, se observa que en el muestreo basal los valores de todos los grupos son similares y van de 254 a 307 UI/L, a partir del primer muestreo a la semana 4 los valores disminuyeron en general y van de 142 a 214 UI/L y se mantienen durante el resto del estudio, a excepción del grupo de la dosis alta del compuesto de cobalto y de cobre (NB5H02 DA y NB5H08 DA) (Figura 16) los cuales presentan una clara tendencia a aumentar los valores casi como los basales en el tercer muestreo (12 semanas), siendo incluso estadísticamente significativa la diferencia entre dicho grupo del compuesto de cobalto y el control de dieta alta en grasa (U de Mann-Whitney (U=20;  $T_{n1=9, n2=11}=124$ ;  $p=0.028$ )) (Figura 17).

## Fosfatasa alcalina

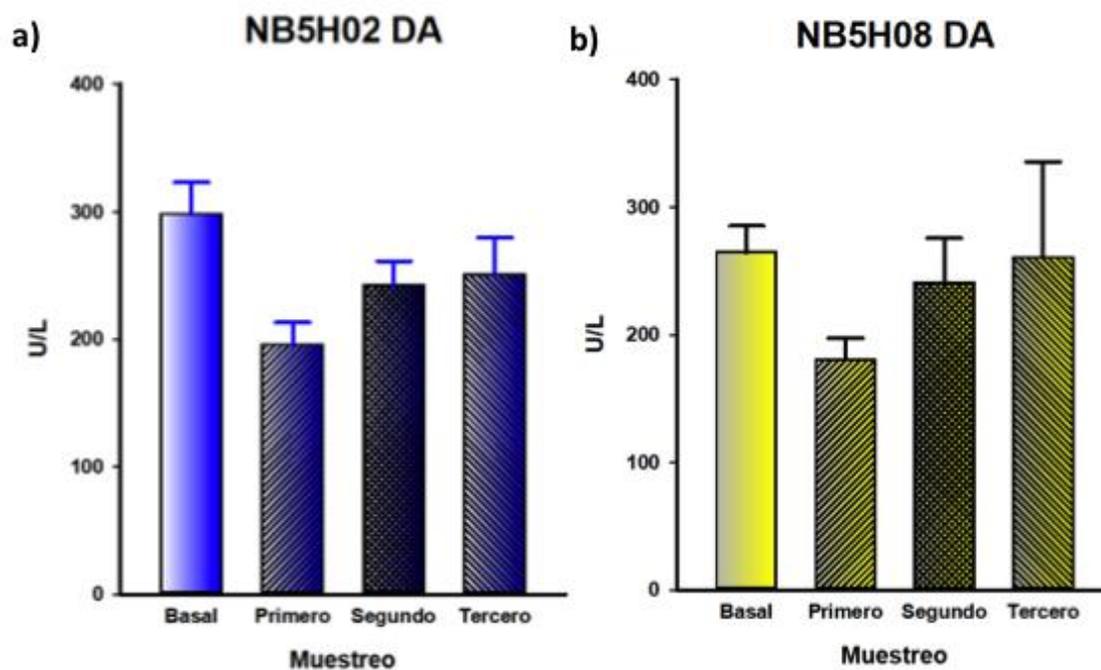


Figura 16. Fosfatasa alcalina de NB5H02 DA Y NB5H08 DA durante los cuatro muestreos. Cada barra representa el promedio de los valores de fosfatasa alcalina (U/L)  $\pm$  E.E. para los grupos administrados con la dosis alta (3.8 mg/Kg) del compuesto de cobalto NB5H02 (a) y cobre NB5H08 (b) respectivamente durante los cuatro muestreos (basal=0, primero=4 semanas, segundo=8 semanas, tercero=12 semanas). N.s. a  $p>0.05$ .

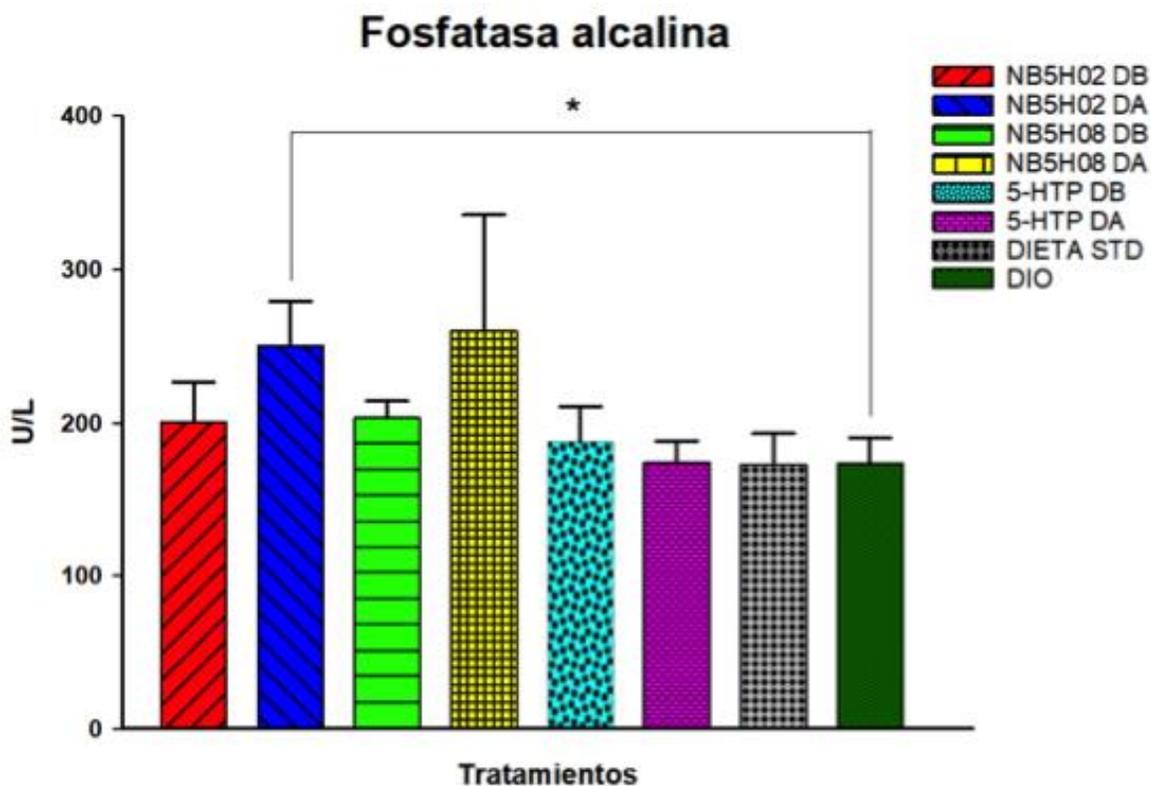


Figura 17. Fosfatasa alcalina a las 12 semanas. Cada barra representa el promedio de los valores de fosfatasa alcalina (U/L)  $\pm$  E.E. para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), 3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DA), dieta estándar (Dieta *STD*) y dieta inductora de obesidad (*DIO*), en el tercer muestreo (12 semanas). \*NB5H02 DA Vs. DIO diferencias significativas U de Mann-Whitney  $p=0.028$ .

Para los valores basales de ALT no se observaron diferencias significativas entre los grupos experimentales, estos se encuentran entre 81 y 99 UI/L, pero para los muestreos posteriores todos disminuyeron significativamente a excepción del grupo con la dieta estándar el cual se mantuvo similar al valor basal durante todo el estudio; además del grupo con la dosis baja del compuesto de cobalto, que aunque no presenta diferencias estadísticas se observa una tendencia a aumentar sus

valores de forma progresiva durante los posteriores muestreos hasta alcanzar un valor de 75 U/L (Figura 18).

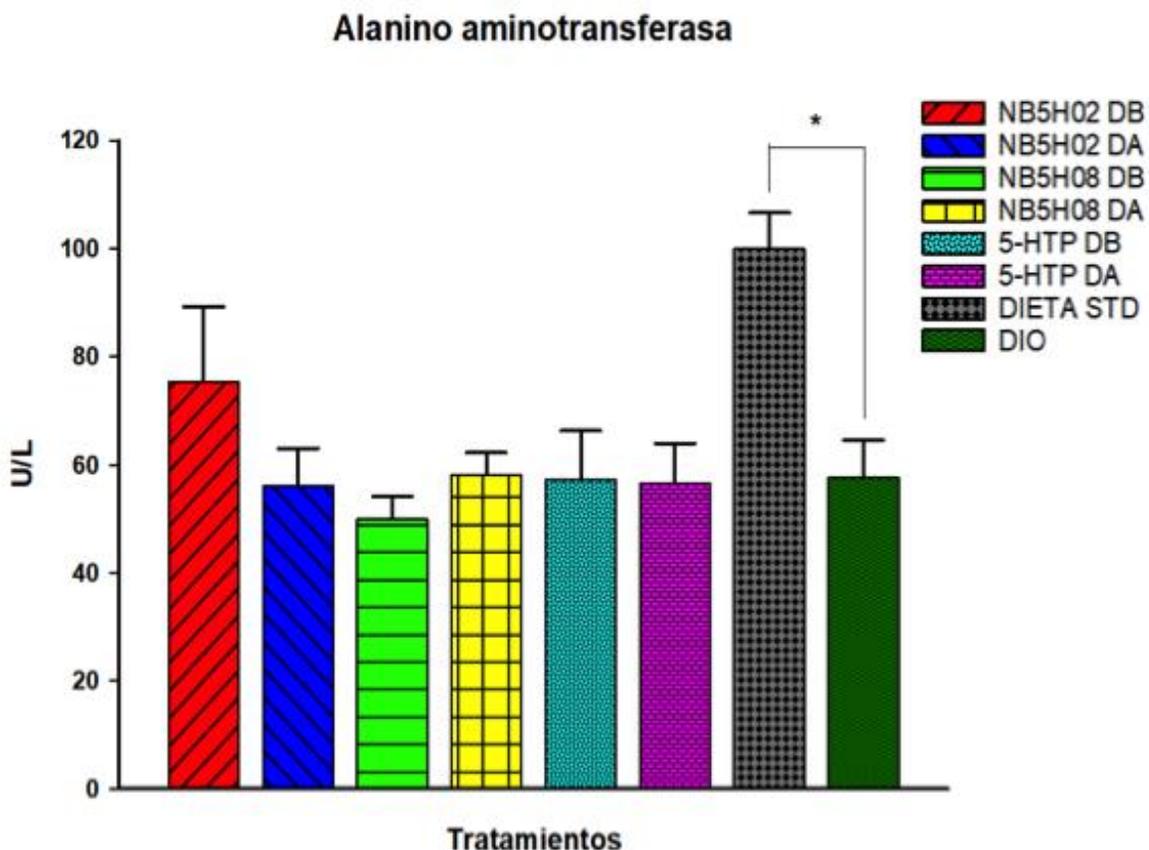


Figura 18. Alanino aminotransferasa. Cada barra representa el promedio de los valores de alanino aminotransferasa (U/L)  $\pm$  E.E. para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), 3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DA), dieta estándar (Dieta *STD*) y dieta inductora de obesidad (*DIO*), en el tercer muestreo (12 semanas). \*Dieta *STD* Vs. *DIO* diferencias significativas (ANDEVA  $p < 0.001$ ).

En los valores obtenidos de AST no se encontraron diferencias significativas entre los grupos y durante todo el estudio, en general estos valores van de 90 UI/L hasta 138 UI/L.

En cuanto a BT, los valores que presentan todos los grupos en el muestreo basal van de 2.03 mol/L a 2.66 mol/L, éstos valores aumentan conforme avanza el estudio (3.64 mol/L hasta 5.30 mol/L), siendo el grupo de la dosis alta del compuesto de cobalto el que alcanzó valores significativamente mas altos en comparación con los grupos controles (t de Student ( $t_{g.l.=18}=3.572$ ;  $p=0.00218$ )). (Figura 19).

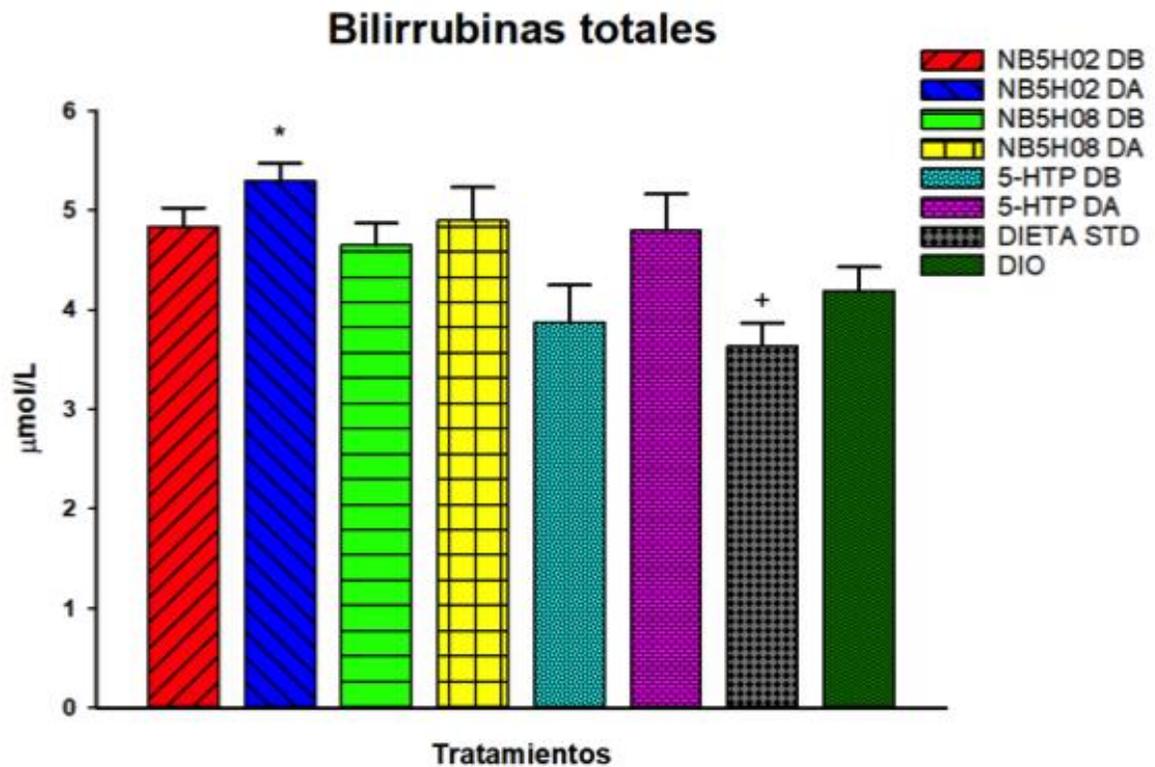


Figura 19. Bilirrubinas totales. Cada barra representa el promedio de los valores de bilirrubinas totales ( $\mu\text{mol/L}$ )  $\pm$  E.E. para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), 3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DA), dieta estándar (Dieta *STD*) y dieta

inductora de obesidad (*DIO*), en el tercer muestreo (12 semanas). Diferencias significativas a  $p < 0.05$ : \*NB5H02 DA Vs. Dieta *STD* y *DIO* diferencias significativas t de Student ( $t_{g.l.=18}=3.572$ ;  $p=0.00218$ ); +Dieta *STD* Vs. NB5H02 DB, NB5H08 DB, NB5H08 DA y 5-HTP DA diferencias significativas t de Student ( $t_{g.l.=14} \leq 3.109$ ;  $p \leq 0.00769$ ).

### **Biometría hemática**

Al realizar el estudio de la biometría hemática, se observó que las variables relacionadas con la línea roja (hematocrito, eritrocitos y hemoglobina) presentan diferencias únicamente en los dos grupos correspondientes al compuesto que contiene cobalto NB5H02 (ANDEVA ( $F_{7,0.05}=34.392$ ;  $p < 0.001$ )), en los cuales los valores aumentan significativamente en comparación con todos los demás grupos que presentaron valores muy semejantes entre sí y que no tienen diferencias significativas (Figura 20, Cuadro 11).

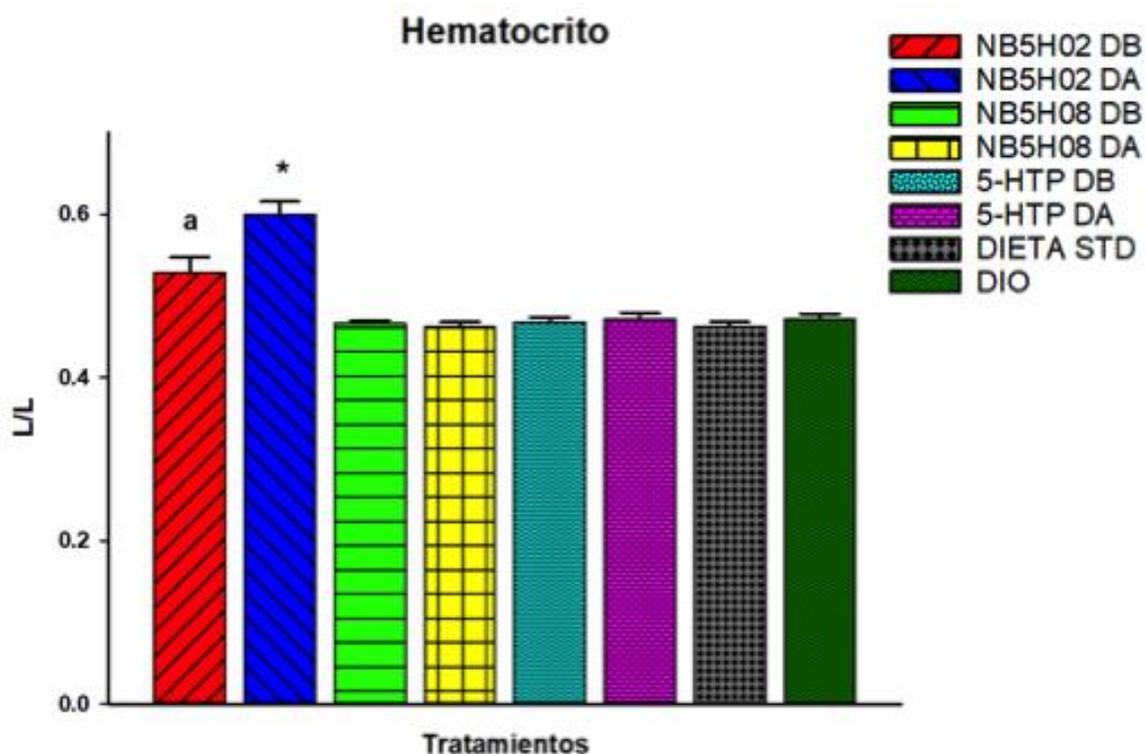


Figura 20. Hematocrito. Cada barra representa el promedio de los valores de hematocrito (L/L) ± E.E. para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), 3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DA), dieta estándar (Dieta *STD*) y dieta inductora de obesidad (*DIO*). Diferencias significativas a  $p < 0.05$ : <sup>a</sup>NB5H02 DB Vs. NB5H08 DB y DA, 5-HTP DB y DA, Dieta *STD* y *DIO*; \*NB5H02 DB Vs. NB5H08 DB y DA, 5-HTP DB y DA, Dieta *STD* y *DIO*, diferencias significativas ANDEVA ( $F_{7,0.05}=34.392$ ;  $p < 0.001$ ).

Cuadro 11. Hematocrito, eritrocitos y hemoglobina. Cada dato representa el promedio de los valores de hematocrito (L/L), eritrocitos ( $X10^{12}/L$ ) y hemoglobina (g/L) para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), 3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DA), dieta estándar (Dieta *STD*) y dieta inductora de obesidad (*DIO*). Diferencias significativas a  $p \leq 0.001$ : \* NB5H02 DB y DA Vs. NB5H08 DB y DA, 5-HTP DB y DA, Dieta *STD* y *DIO*.

|                    | NB5H02<br>DB   | NB5H02<br>DA   | NB5H08<br>DB | NB5H08<br>DA | 5-HTP<br>DB | 5-HTP<br>DA | STD    | DIO    |
|--------------------|----------------|----------------|--------------|--------------|-------------|-------------|--------|--------|
| <b>Hematocrito</b> | <b>0.53*</b>   | <b>0.60*</b>   | 0.47         | 0.46         | 0.47        | 0.47        | 0.46   | 0.47   |
| <b>Eritrocitos</b> | <b>9.06*</b>   | <b>10.18*</b>  | 7.96         | 8.06         | 7.88        | 7.85        | 7.74   | 7.80   |
| <b>Hemoglobina</b> | <b>170.56*</b> | <b>181.89*</b> | 150.63       | 149.00       | 150.67      | 151.80      | 148.75 | 148.55 |

En cuanto a las variables relacionadas con la línea blanca, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos, el rango de estos valores es de: VGM (57.88 – 60.55 fL), CGMH (314.55 – 327.63 g/L), leucocitos ( $3.9 \times 10^9$  –  $5.17 \times 10^9/L$ ), linfocitos ( $3.06 \times 10^9$  –  $3.99 \times 10^9/L$ ), monocitos ( $0.08 \times 10^9$  –  $0.34 \times 10^9/L$ ), neutrófilos ( $0.48 \times 10^9$  –  $0.82 \times 10^9/L$ ), eosinófilos ( $0.04 \times 10^9$  –  $0.13 \times 10^9/L$ ), plaquetas ( $862.89 \times 10^9$  –  $1415.8 \times 10^9/L$ ).

### Evaluación anatomopatológica

De acuerdo a los hallazgos encontrados en la evaluación anatomopatológica macroscópica se observó que en general todos los ejemplares presentaban una buena condición corporal, con mucosas (oral, pulmonar, conjuntival y vaginal) color rosa pálido y buen estado de conservación. Internamente se observó una mínima o discreta congestión pulmonar en todos los ejemplares. Los

hígados eran color rojo oscuro, los bordes eran redondeados y presentaban un patrón lobulillar aumentado (congestión). Además, en el grupo de la dosis alta del compuesto de cobalto NB5H02 se encontró que tres animales presentaban discretas áreas pálidas multifocales en los lóbulos hepáticos, así como un ejemplar del grupo de la dosis baja de NB5H08. El resto de los órganos de todos los animales no presentaron lesiones patológicas evidentes, mas allá de la gran cantidad de masa grasa presente en la zona abdominal de todos los animales a excepción de aquellos pertenecientes al grupo control que fueron alimentados con la dieta estándar (Figura 21).

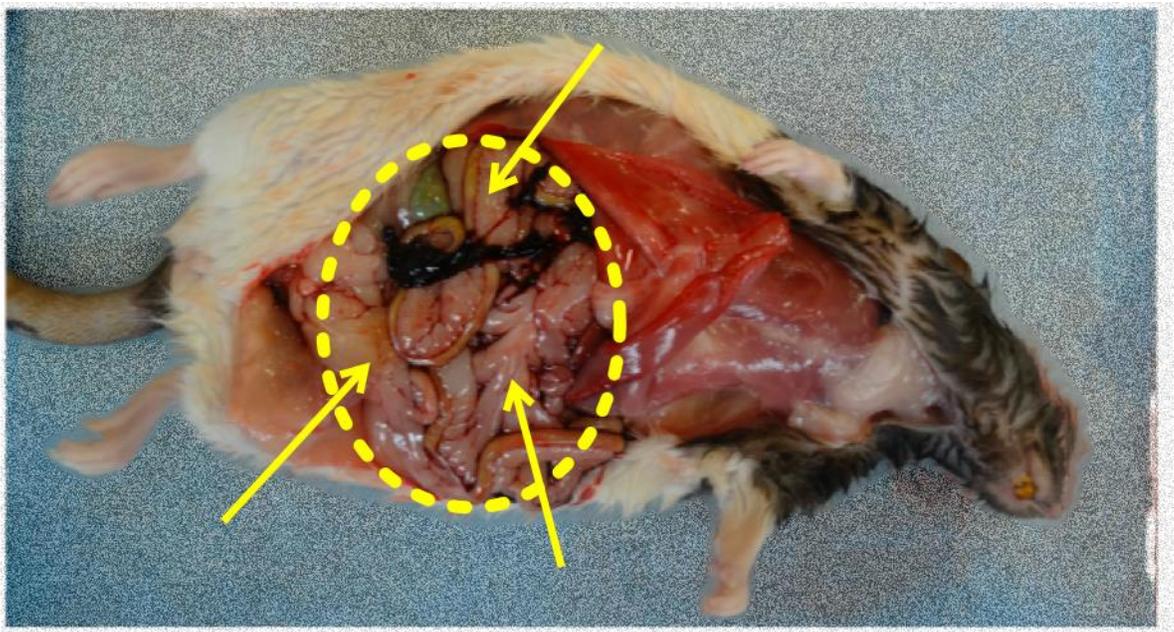


Figura 21. Necropsias de los animales al final del estudio y evaluación anatomopatológica macroscópica. Se observa la gran cantidad de tejido adiposo presente en la zona abdominal.

En cuanto a la evaluación microscópica se encontró que todos los animales presentaban de leve a moderada distención de los sinusoides hepáticos por abundantes eritrocitos. Además, fue evidente la presencia de hepatocitos tumefactos, y en algunas ocasiones un citoplasma granular eosinofílico en aproximadamente la mitad de los animales de todos los grupos, a excepción del grupo control que se le dio únicamente la dieta alta en grasa, en el cual el total de los animales presentó esta

característica. Así mismo se observó que en los grupos de las dosis altas del compuesto de cobalto NB5H02, de cobre NB5H08 y de 5-HTP, los hepatocitos de algunas ratas presentaron vacuolas anfófilas intracitoplasmáticas las cuales desplazaban el núcleo a la periferia; aunado a esto se identificó a una rata del grupo de la dosis baja de 5-HTP la cual tenía una moderada cantidad de eritrocitos fuera de los lechos vasculares hepáticos (Cuadro 12).

Aparte de estos hallazgos se identificó que una o dos ratas de cada uno de los dos grupos del compuesto de cobre NB5H08 y de los dos grupos de 5-HTP exhibían escasos linfocitos alrededor de los vasos sanguíneos hepáticos. Los dos grupos controles, uno con la dieta estándar (*2018S Teklad global*) el otro con la dieta alta en grasa (*Tso's high fat diet*) presentaron un leve infiltrado inflamatorio compuesto por linfocitos dispuestos de forma aleatoria en dos animales cada uno, mientras que en el grupo de la dosis baja del compuesto de cobre NB5H02 se observó que una rata presentaba un área de infiltrado inflamatorio compuesto por escasos neutrófilos, así como algunos linfocitos (Cuadro 12).

Cuadro 12. Relación de animales por grupo y descripción de hallazgos microscópicos para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), 3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DA), dieta estándar (Dieta STD) y dieta inductora de obesidad (DIO), donde F=focal, M=multifocal, +=discreto, ++=moderado, +++=severo, N/P=no presentó.

| HALLAZGO MICROSCOPICO                     |   |     | GRUPO     |           |           |           |          |          |        |        |
|---|---|-----|-----------|-----------|-----------|-----------|----------|----------|--------|--------|
|   |   |     | NB5H02 DB | NB5H02 DA | NB5H08 DB | NB5H08 DA | 5-HTP DB | 5-HTP DA | STD    | DIO    |
| Congestión                                | M | +   | 4 de 9    | 2 de 9    | 3 de 8    | 7 de 8    | 3 de 9   | 2 de 10  | 4 de 8 | 5 de 9 |
|   | M | ++  | 5 de 9    | 6 de 9    | 5 de 8    | 1 de 8    | 6 de 9   | 7 de 10  | 4 de 8 | 4 de 9 |
|   | M | +++ | N/P       | 1 de 9    | N/P       | N/P       | N/P      | N/P      | N/P    | N/P    |
| Degeneración hepatocelular                | M | +   | 5 de 9    | 3 de 9    | 5 de 8    | 3 de 8    | 1 de 9   | 5 de 10  | 3 de 8 | 5 de 9 |
|   | M | ++  | N/P       | 2 de 9    | N/P       | 2 de 8    | 2 de 9   | 2 de 10  | N/P    | 4 de 9 |
|   | M | +++ | N/P       | 1 de 9    | N/P       | N/P       | N/P      | N/P      | N/P    | N/P    |
| Degeneración hepatocelular grasa          | F | +   | N/P       | 3 de 9    | N/P       | 1 de 8    | N/P      | N/P      | N/P    | N/P    |
|   | M | ++  | N/P       | N/P       | N/P       | 1 de 8    | N/P      | 1 de 10  | N/P    | N/P    |
| Infiltrado neutrofilico linfoplasmocitico | F | +   | N/P       | N/P       | 1 de 8    | N/P       | N/P      | N/P      | N/P    | N/P    |
| Infiltrado perivascular                   | F | ++  | N/P       | N/P       | 1 de 8    | N/P       | N/P      | N/P      | N/P    | N/P    |
| Infiltrado perivascular linfoplasmocitico | M | +   | N/P       | N/P       | N/P       | 2 de 8    | 1 de 9   | 1 de 10  | N/P    | N/P    |
| Hemorragía                                | M | ++  | N/P       | N/P       | N/P       | N/P       | 1 de 9   | N/P      | N/P    | N/P    |
| Infiltrado linfoplasmocitico              | F | +   | N/P       | N/P       | N/P       | N/P       | N/P      | N/P      | 1 de 8 | 1 de 9 |
|   | M | +   | N/P       | N/P       | N/P       | N/P       | N/P      | N/P      | 1 de 8 | 1 de 9 |

*Evaluación de la eficacia de los compuestos de coordinación administrados de forma subcrónica por vía intraperitoneal en un modelo de obesidad inducida por la dieta en ratas HsdBlu:LE (Long-Evans)*

**Incremento de peso**

El porcentaje de incremento de peso se calculó con base en el peso inicial que presentaron los animales y conforme a las mediciones obtenidas 2 veces por semana durante las 12 semanas. Los valores calculados nos indican un incremento de peso mayor en el grupo de la dieta alta en grasa en relación con el grupo de dieta estándar. Respecto a los grupos con tratamientos farmacológicos se observa que todos mostraron un incremento de peso similar o mayor al grupo control con alimento alto en grasa, a excepción del grupo administrado con el compuesto de cobalto NB5H02 a una dosis baja en el cual se observa un incremento de peso significativamente menor ( $t_{14}=2.7$ ;  $p=0.0172$ )(Figura 22).

## Incremento de peso

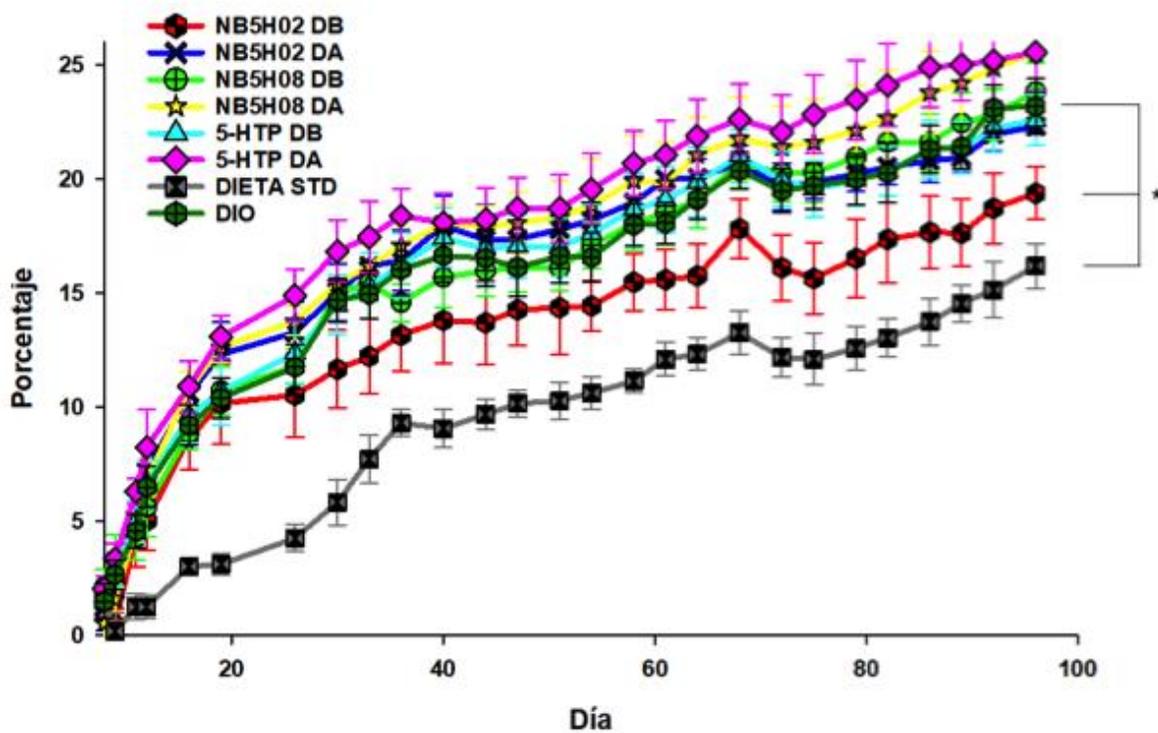


Figura 22. Incremento de peso. Cada punto representa el promedio del porcentaje de incremento de peso (%)  $\pm$  E.E. para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), 3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DA), dieta estándar (Dieta *STD*) y dieta inductora de obesidad (*DIO*), en los días de pesaje. \**DIO* Vs. NB5H02 DB y Dieta *STD* diferencias significativas (t de Student,  $p < 0.0172$ ).

## Consumo de alimento

De acuerdo a los datos obtenidos en relación al consumo de alimento que tuvieron los animales se puede observar que en las primeras tres semanas todos los grupos presentaron un importante aumento en el consumo de alimento, siendo en el grupo administrado con la dosis baja del

compuesto de cobalto NB5H02 en el que este aumento fue menor significativamente (ANDEVA ( $F_{480,0.05}=2.875$ ;  $p<0.017$ )). A partir de esta tercera semana, el consumo de alimento del grupo alimentado con la dieta estándar se mantuvo constante, mientras que los demás grupos presentaron una disminución en el consumo durante aproximadamente dos semanas y pasado este tiempo se mantuvo constante el consumo de alimento hasta el final del experimento (Figura 23).

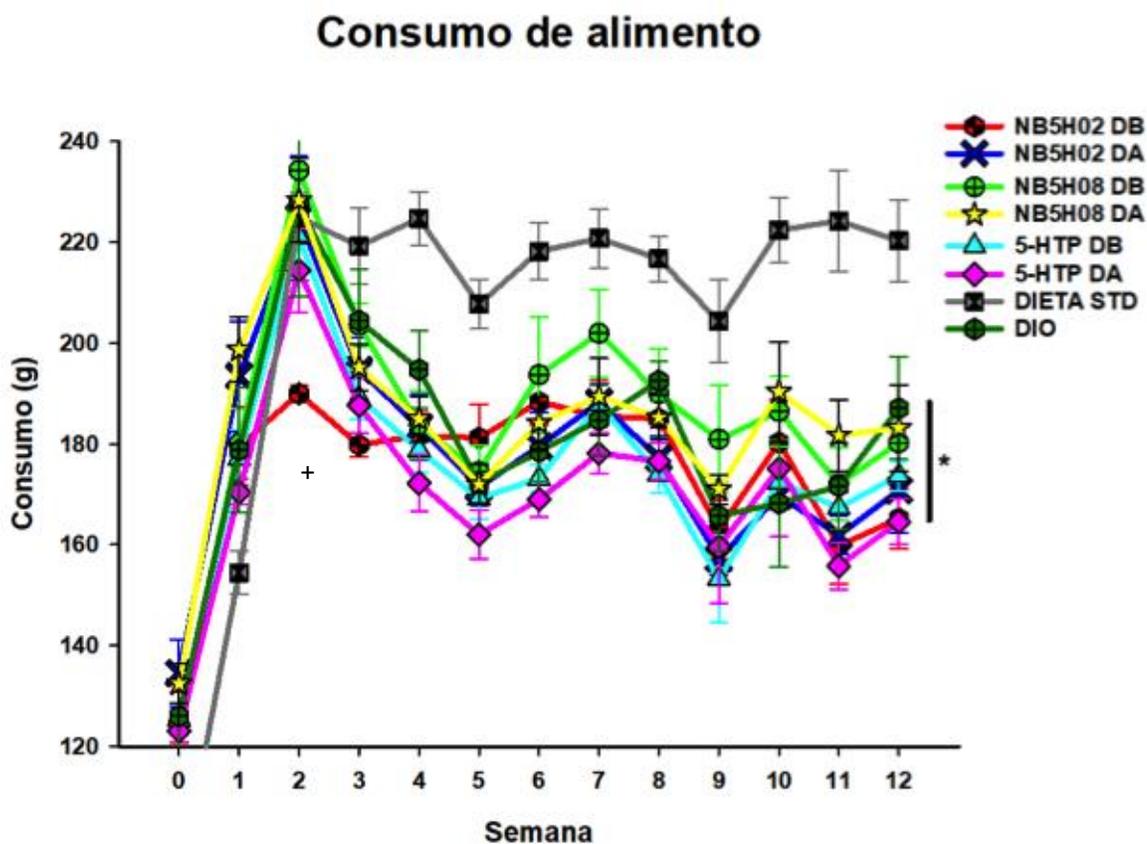


Figura 23. Consumo de alimento. Cada punto representa el promedio de consumo de alimento (g)  $\pm$  E.E. para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), 3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DA), dieta estándar (Dieta *STD*) y dieta inductora de obesidad (*DIO*), durante 12 semanas. +NB5H02 DB Vs NB5H02 DA, NB5H08 DB y DA, 5-HTP DB y DA, Dieta

*STD* y *DIO*, diferencias significativas (ANDEVA  $p < 0.017$ ); \*Dieta *STD* Vs. NB5H02 DB y DA, NB5H08 DB y DA, 5-HTP DB y DA y *DIO*, diferencias significativas (ANDEVA  $p < 0.027$ ).

### **Consumo de agua**

En cuanto a la medición del consumo de agua de los animales se observa un consumo constante durante todo el experimento y no se observan diferencias significativas entre los diferentes grupos.

### **Composición corporal**

Se realizó la medición de la composición corporal mediante el equipo de espectroscopia de bioimpedancia eléctrica "IMPEDIVET". De los valores obtenidos de índice de masa corporal, se puede observar que, en todos los grupos en la medición basal dichos valores van de 9.7 a 10.4 y éstos se mantienen en los muestreos posteriores a excepción del grupo de dieta estándar en el cual el índice va disminuyendo hasta llegar a valores de 8.6 en el último muestreo (12 semanas) y que es significativamente diferente a los demás grupos (ANDEVA( $F_{147,0.05}=3.431$ ;  $p < 0.001$ )), así como el grupo de las dosis baja del compuesto de cobalto NB5H02 que presenta diferencias estadísticas con relación a los grupos de las dosis alta del compuesto de cobre NB5H08 y el grupo alimentado con la dieta alta en grasa (ANDEVA( $F_{147,0.05}=3.431$ ;  $p < 0.019$ )), los cuales presentaron los mayores IMC (Figura 24). En cuanto a los valores de masa grasa y masa libre de grasa no se encontraron diferencias importantes entre los grupos.

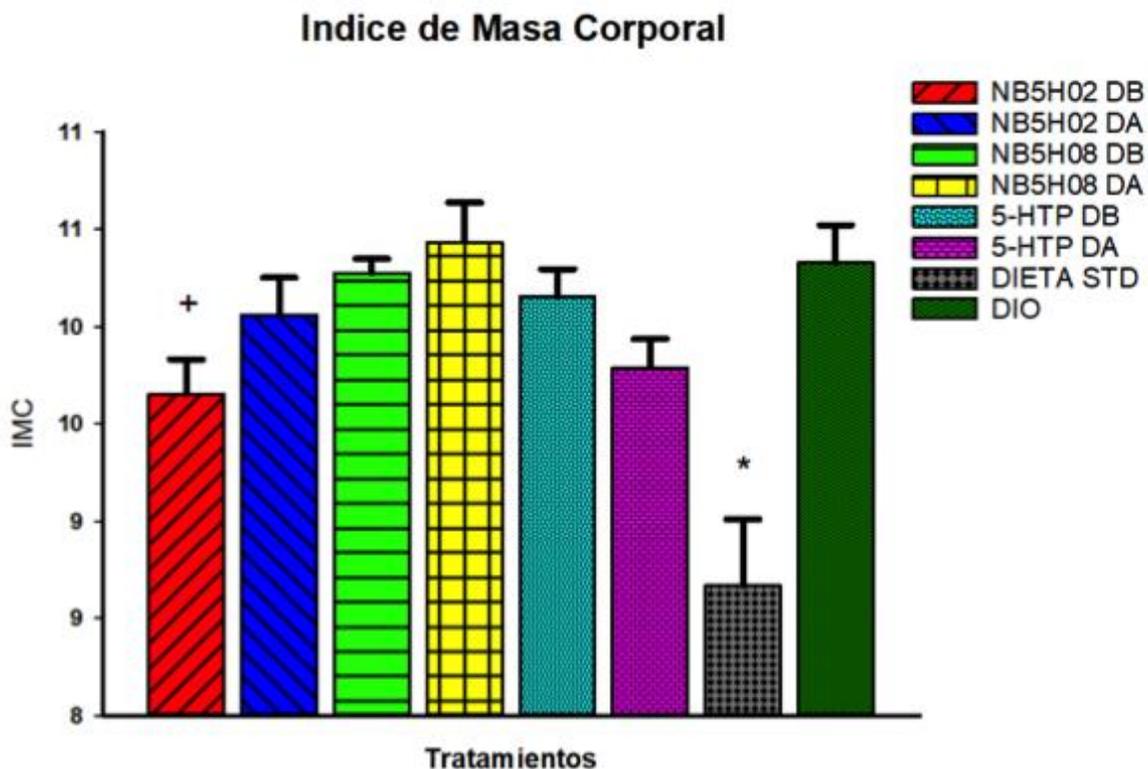


Figura 24. Índice de masa corporal. Cada barra representa el promedio de los valores de índice de masa corporal  $\pm$  E.E. para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), 3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DA), dieta estándar (Dieta *STD*) y dieta inductora de obesidad (*DIO*), en el tercer muestreo (12 semanas). +NB5H02 DB Vs. NB5H08 DA y *DIO* diferencias significativas (ANDEVA  $p < 0.019$ ); \*Dieta *STD* Vs. NB5H02 DB y DA, NB5H08 DB y DA, 5-HTP DB y DA y *DIO* diferencias significativas (ANDEVA  $p < 0.001$ ).

### Presión arterial

Para los valores obtenidos de presión arterial no se encontraron cambios importantes entre muestreos ni diferencias significativas entre grupos tanto para la presión diastólica ni para la presión sistólica.

## Bioquímica sanguínea

Así mismo, se realizaron análisis de bioquímica sanguínea en los que se midieron algunos analitos asociados a la obesidad. Con base en la medición de triglicéridos se presentaron diferencias importantes, se puede observar una marcada elevación en los niveles de este analito en el grupo control con dieta hipercalórica y en el grupo de la dosis alta de 5-HTP siendo este aumento más notable en el último muestreo (12 semanas) (ANDEVA( $F_{290,0.05}=0.864$ ;  $p<0.05$ )) (Figura 25).

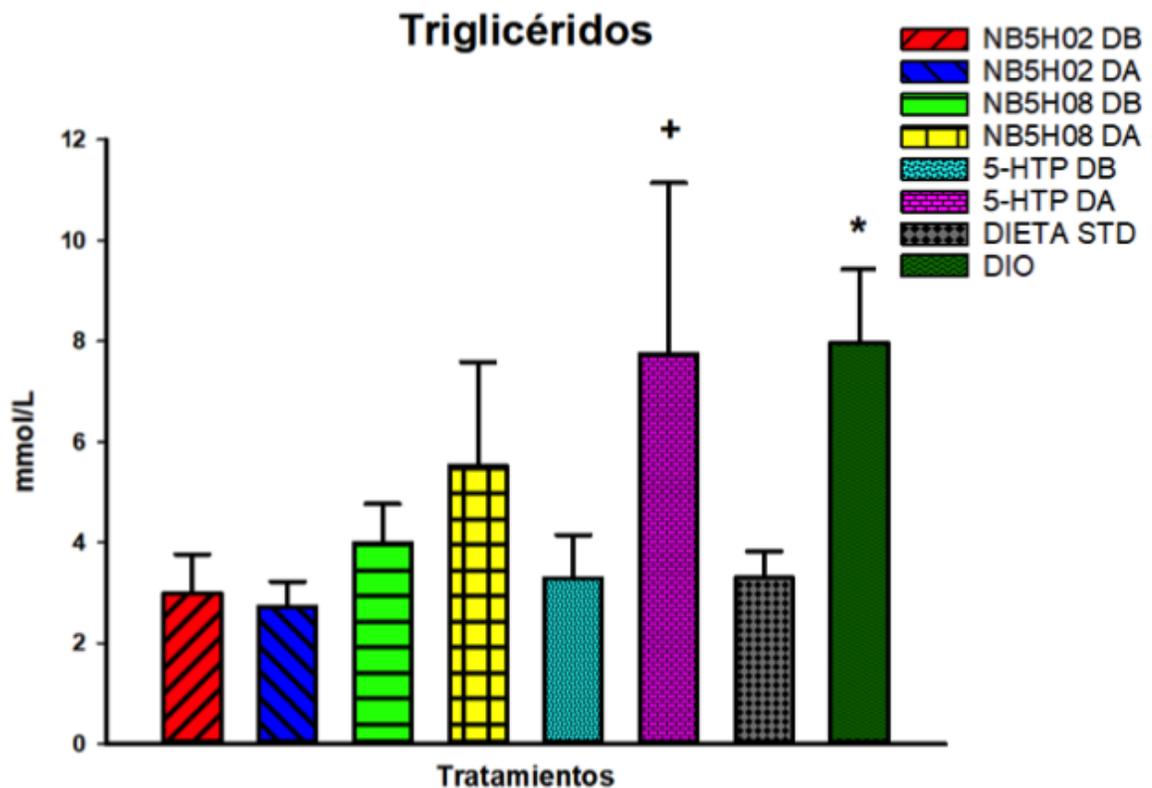


Figura 25. Triglicéridos. Cada barra representa el promedio de los valores de triglicéridos (mmol/L)  $\pm$  E.E. para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), 3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DA), dieta estándar (Dieta *STD*) y dieta inductora de obesidad

(DIO), en el tercer muestreo (12 semanas). \*DIO Vs. NB5H02 DB y DA, 5-HTP DB Y Dieta STD diferencias significativas (ANDEVA  $p < 0.036$ ); +5-HTP DA Vs. NB5H02 DB, NB5H02 DA y 5-HTP DB diferencias significativas (ANDEVA  $p < 0.05$ ).

Los resultados arrojan un patrón similar para los valores de colesterol y colesterol HDL puesto que en los dos analitos existe una disminución significativa de los valores a partir del primer muestreo (4 semanas) y que se mantienen disminuido hasta el final (12 semanas). Esto sucede en casi todos los grupos a excepción del grupo control de la dieta estándar el cual mantiene valores similares al basal durante los muestreos posteriores (Figura 26).

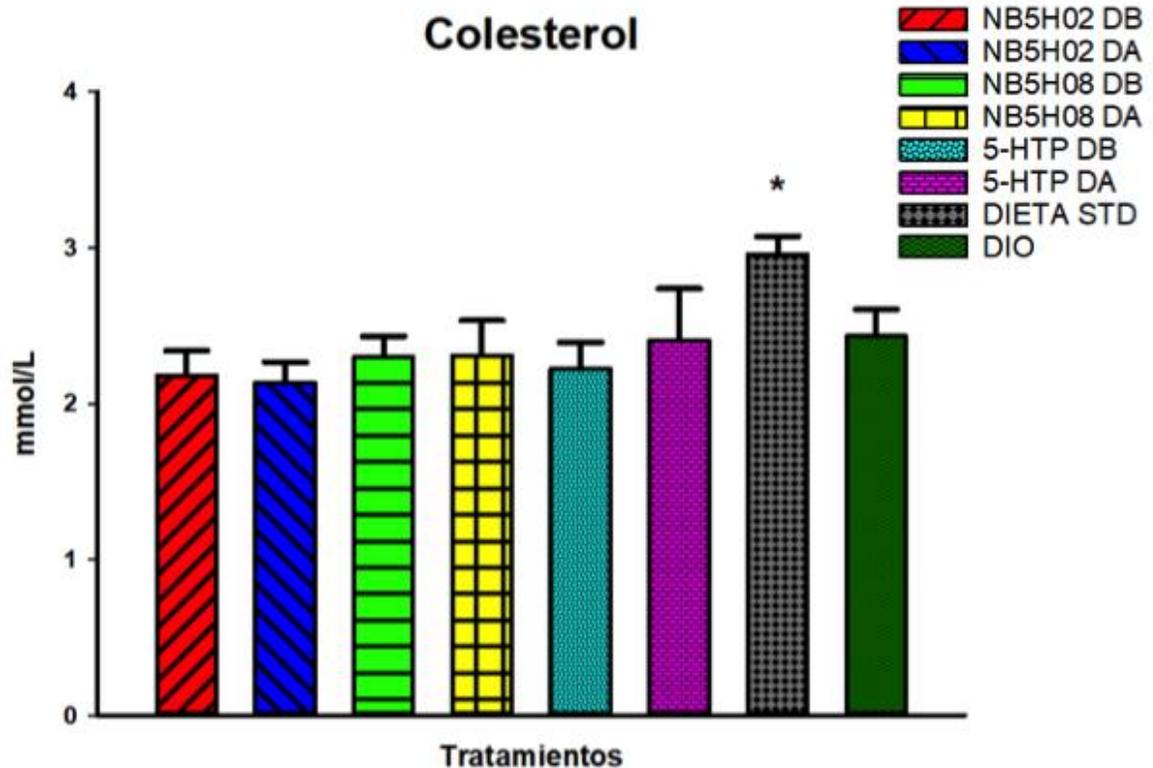


Figura 26. Colesterol. Cada barra representa el promedio de los valores de colesterol (mmol/L)  $\pm$  E.E. para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg

del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), 3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), dieta estándar (Dieta *STD*) y dieta inductora de obesidad (*DIO*), en el tercer muestreo (12 semanas). \*Dieta *STD* Vs. NB5H02 DB, NB5H02 DA y 5-HTP DB diferencias significativas (ANDEVA ( $F_{290,0.05}=0.674$ ;  $p<0.014$ )).

En cuanto al colesterol LDL también se observa una disminución de los valores de todos los grupos a partir del primer muestreo y hasta el final, a diferencia de que en el último muestreo los valores del grupo control con la dieta hipercalórica aumentan ligeramente en comparación con los demás grupos (Figura 27).

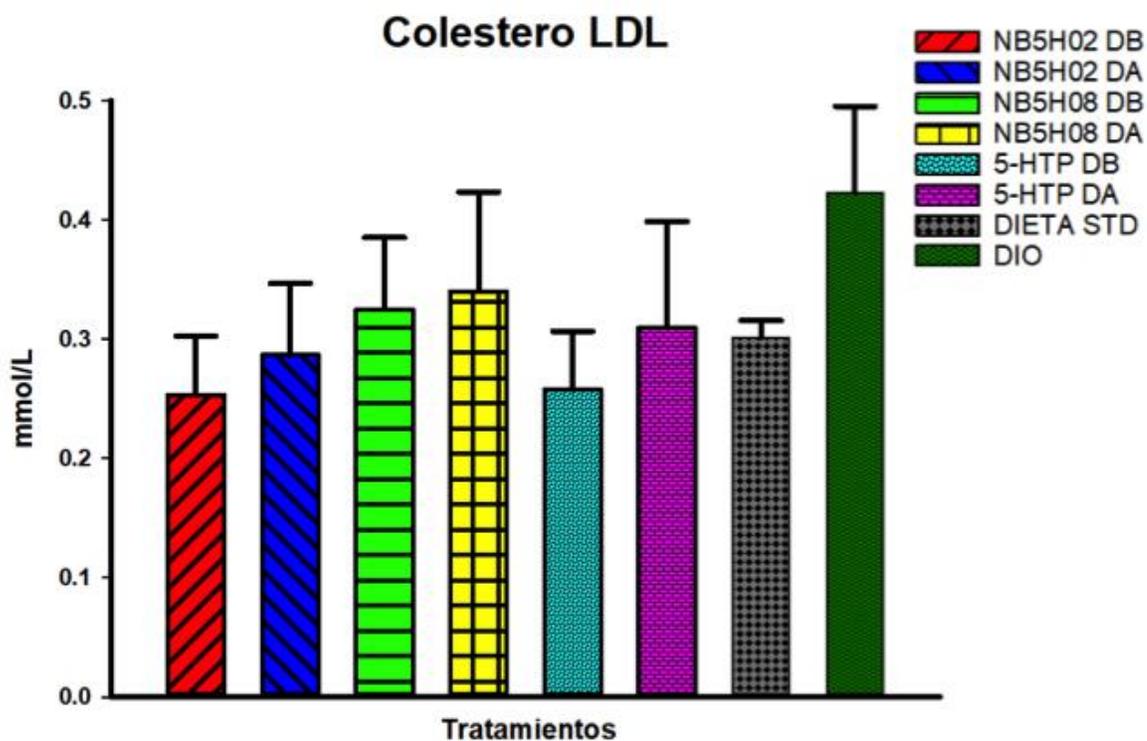


Figura 27. Colesterol LDL. Cada barra representa el promedio de los valores de colesterol LDL (mmol/L)  $\pm$  E.E. para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB),

3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), dieta estándar (Dieta *STD*) y dieta inductora de obesidad (*DIO*), en el tercer muestreo. No se encontraron diferencias significativas a  $p < 0.05$ .

En la medición bioquímica de la concentración de glucosa en sangre se encontraron las principales diferencias en el muestreo de las 12 semanas en donde el grupo control con dieta alta en grasa y los grupos administrados con el compuestos de cobre son los que presentaron valores mayores (superiores a 10 mmol/L) comparado con los grupos del compuesto de cobalto, el grupo de la dosis alta de 5-HTP y el grupo control de dieta estándar, los cuales presentaron valores considerablemente menores (por debajo de 9 mmol/L) (Figura 28). Además, se realizó la medición de glucosa en sangre mediante un glucómetro convencional en donde se encontró que los grupos control de dieta estándar y los dos grupos administrados con el compuesto de cobalto son los que presentaron valores de glucosa significativamente por debajo del grupo control de dieta alta en grasa (t de Student ( $t_{17} = -3.268$ ;  $p = 0.00454$ )), siendo los valores de los grupos de cobalto menores incluso que el control de dieta estándar (Figura 29).

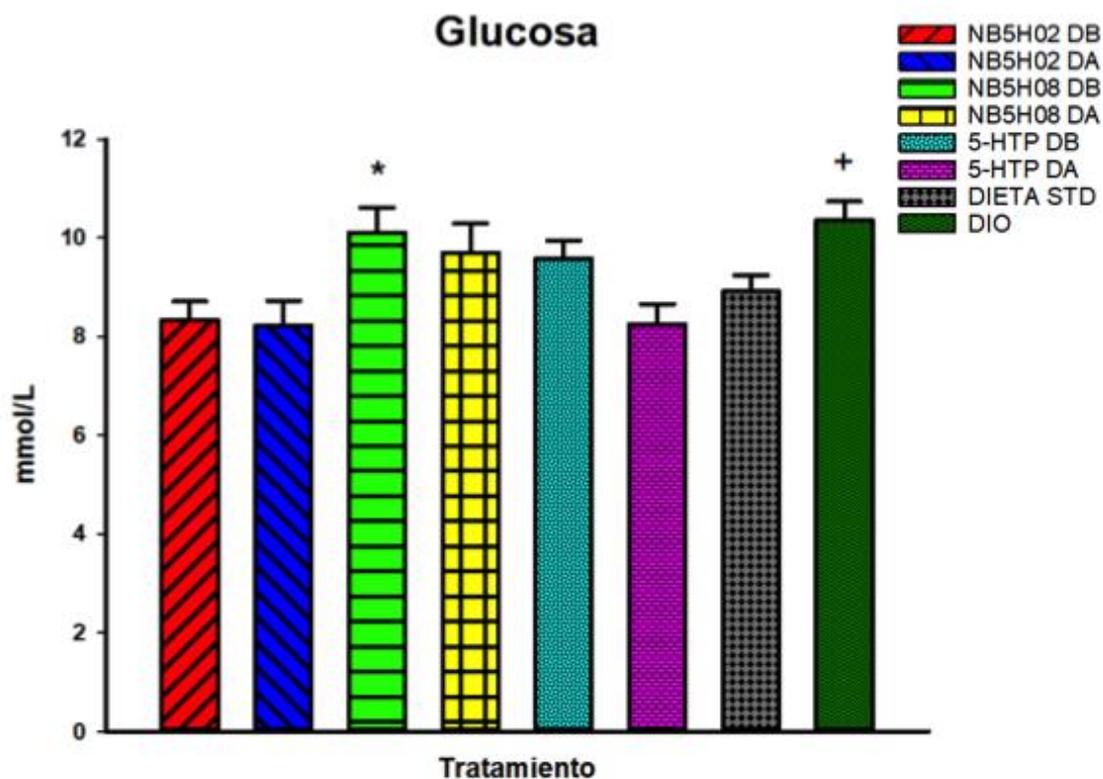


Figura 28. Glucosa, medición por espectrofotometría. Cada barra representa el promedio de los valores de Glucosa (mmol/L)  $\pm$  E.E. para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), 3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DA), dieta estándar (Dieta *STD*) y dieta inductora de obesidad (*DIO*), en el tercer muestreo (12 semanas). +*DIO* Vs. NB5H02 DB, NB5H02 DA y 5-HTP DA diferencias significativas (ANOVA,  $F_{290,0.05}=1.918$ ,  $p<0.003$ ); \*NB5H08 DB Vs. NB5H02 DB, NB5H02 DA y 5-HTP DA diferencias significativas (ANOVA,  $F_{290,0.05}=1.918$ ,  $p<0.038$ ).

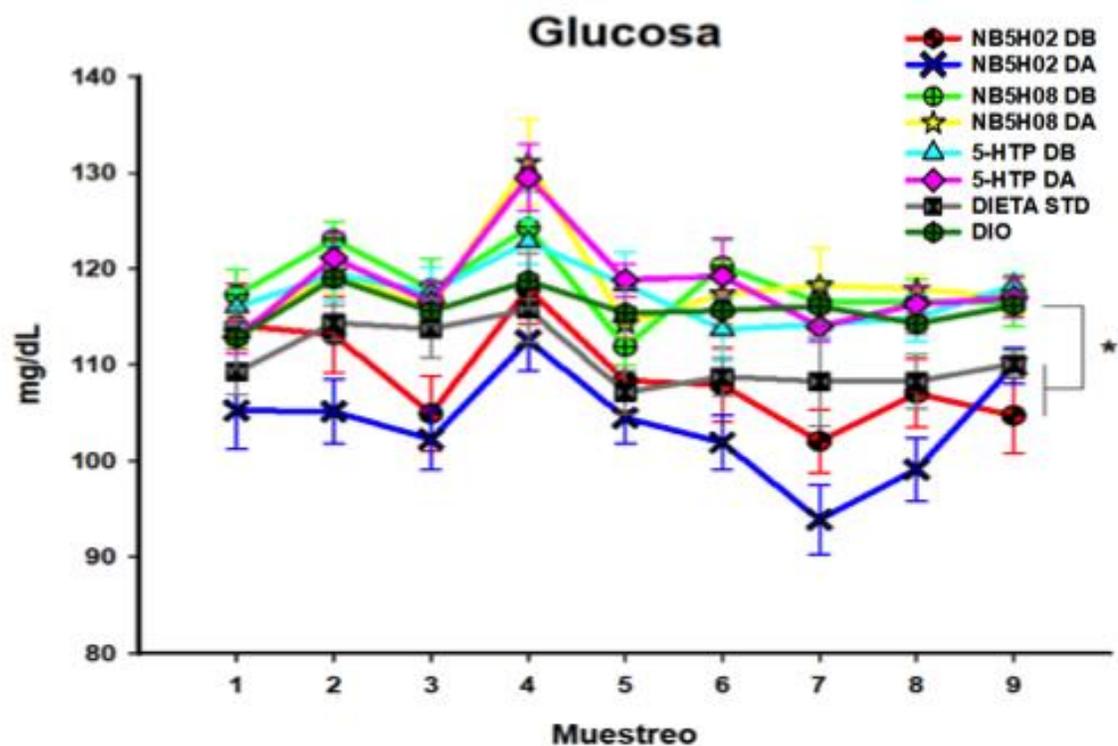


Figura 29. Glucosa, medición por glucómetro convencional. Cada punto representa el promedio de los valores de glucosa (mg/dL)  $\pm$  E.E. para los grupos administrados con: 2.6 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobalto (NB5H02 DA), 2.6 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DB), 3.8 mg/Kg del compuesto de cobre (NB5H08 DA), 2.6 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DB), 3.8 mg/Kg de 5-hidroxitriptófano (5-HTP DA), dieta estándar (Dieta *STD*) y dieta inductora de obesidad (*DIO*), durante 9 muestreos. \**DIO* Vs. NB5H02 DB, NB5H02 DA y Dieta *STD* diferencias significativas (t de Student,  $p=0.00454$ ).

## Discusión y Conclusiones

---

En este estudio se realizó la evaluación de la seguridad y la eficacia de dos compuestos de coordinación sintetizados para el tratamiento de la obesidad, estos compuestos presentan un centro metálico ya sea de cobalto o de cobre y contienen como ligante al 5-hidroxitriptófano. Inicialmente se realizaron pruebas de toxicidad aguda para conocer el potencial toxicológico a corto plazo de la administración de una única dosis de los compuestos de coordinación. Se logró obtener la dosis letal 50 de ambos compuestos tanto en ratones como en ratas. Los valores en ratón fueron de 613.8 mg/kg para el compuesto de cobalto NB5H02 y 341 mg/kg para el compuesto de cobre NB5H08, ambos valores son superiores al de 298 mg/kg por lo que resultan menos tóxicos de forma aguda que lo reportado como  $DL_{50}$  en ratón vía intraperitoneal para el ligante sólo (5-HTP) (64). En cuanto a las ratas, se había estimado una  $DL_{50}$  teórica de 306.9 mg/kg para el compuesto de cobalto con base en las constantes metabólicas, pero el valor obtenido fue menor (95.9 mg/kg), de la misma forma que para el compuesto de cobre para el que se le había estimado una  $DL_{50}$  teórica de 170.5 mg/kg, y la obtenida fue de 122.8 mg/kg experimentalmente, y que al igual que para ratón, estas están por encima de los 91 mg/kg reportados en la literatura como  $DL_{50}$  vía intraperitoneal en rata para el ligante 5-HTP sólo (65).

A partir de estos datos podemos señalar que los dos compuestos presentan una toxicidad mayor en ratas que en ratones, inclusive mayor al valor estimado mediante la conversión con base en la constante metabólica, lo cual puede atribuirse a diferencias en el proceso farmacocinético (absorción, distribución, biotransformación y excreción), en la sensibilidad farmacodinámica de los receptores tisulares, o en las respuestas fisiológicas compensadoras (66).

Por otro lado, se observa una toxicidad menor de ambos compuestos comparada con la que presenta el 5-hidroxitriptófano por sí sólo (65), así como una toxicidad marcadamente menor a la  $DL_{50}$  reportada para cada uno de los metales (Co: 35 mg/kg; Cu: 20 mg/kg) (67, 68).

Esto posiblemente es debido a que cada compuesto lo constituyen sólo un porcentaje de cada componente que aunado con el resto forman el 100 % de la dosis total administrada de cada fármaco lo que disminuye la toxicidad conjunta. Además, se sabe que los complejos metálicos de ligantes biológicamente activos a veces logran presentar una toxicidad menor que la del ligando libre, debido a que las propiedades del metal pueden mejorar la distribución de éste, mediante la formación de complejos estables, solubles y no tóxicos evitando su acumulación en tejidos específicos (42, 45).

Durante la evaluación de la toxicidad aguda de los compuestos de coordinación también se observó que los animales presentaron algunos signos clínicos y comportamientos específicos los cuales responden a los síntomas característicos presentes en el síndrome serotoninérgico tales como: ansiedad, hiperactividad, comportamiento agresivo, incoordinación, contracción de los miembros posteriores, ataxia, rigidez, convulsiones, disnea e hipoactividad, los cuales pueden deberse al incremento en los niveles de serotonina producido por la administración de las dosis más elevadas de los compuestos basados en el 5-HTP (69, 70).

La evaluación de la toxicidad subcrónica se realizó con el objetivo de conocer los efectos de la administración de múltiples dosis de los compuestos durante tiempos prolongados, dato que es muy importante puesto que posiblemente la utilización del fármaco sería de manera crónica en la práctica clínica. Todos los animales fueron revisados diariamente durante toda la ejecución del estudio para detectar los síntomas o comportamientos que pudieran evidenciar la presencia de algún indicio de toxicidad debido a la administración de los compuestos. No se observó ningún signo o manifestación clínica, lo cual indica que a este nivel no se presentó una toxicidad importante en ninguno de los grupos experimentales.

En cuanto a los resultados obtenidos en los estudios bioquímicos se cree que las diferencias existentes en las concentraciones de fosfatasa alcalina entre niveles de muestreo se observan debido a que en el muestreo basal los valores de FA son mayores en comparación con los demás

muestreos en todos los grupos y de hecho sobrepasan los valores de referencia (95-254 UI/L) (71). Esto puede estar asociado a la edad de las ratas, pues se sabe que animales jóvenes tienen una actividad enzimática de fosfatasa alcalina de origen óseo mayor que animales adultos (72). Sin embargo, para los grupos de las dosis alta del compuesto de cobalto, dosis baja y alta del compuesto de cobre, dosis baja de 5-HTP y *DIO* se observa un incremento de fosfatasa alcalina a las 8 semanas del estudio que no puede ser asociado al crecimiento de los animales pues al tiempo de este muestreo ya son considerados adultos, lo anterior es indicativo de que el origen de este incremento es hepático, derivado de una disminución en el flujo biliar, este aumento persiste en los grupos correspondientes a las dosis altas de ambos compuestos, mientras que en los otros disminuyen a las 12 semanas. Esto no quiere decir que el flujo biliar se haya restablecido, pues al observar las diferencias en bilirrubina total y correlacionándolas con la fosfatasa alcalina se observa que en todos los grupos existe un incremento de bilirrubina total dependiente del transcurso del tiempo; para los grupos de la dosis baja del compuesto de cobalto y ambas dosis del compuesto de cobre este incremento se observa hasta el tercer muestreo (12 semanas), mientras que en los demás grupos, si bien las concentraciones de bilirrubina están por afuera del valor de referencia (1.32-3.28  $\mu\text{mol/L}$ ) (71), disminuyen ligeramente a las 12 semanas pero no vuelven a valores normales. Lo anterior sugiere fuertemente que el flujo biliar se afectó en este estudio, aunado al hecho de que se observó ligera ictericia en el suero de 27 animales de los 64 que recibieron el alimento alto en grasa lo que le da mayor peso a estos hallazgos. Si bien el grupo control alimentado con dieta estándar presenta valores de bilirrubina mayores en el segundo y tercer muestreo (8 y 12 semanas) estos no son de la magnitud de los demás grupos, además la fosfatasa alcalina en este grupo no se encuentra alterada.

Por otro lado, al realizar la comparación entre grupos, dosis y muestreos de las concentraciones de AST se encontró que no tuvieron diferencias significativas y no se observan tendencias en el transcurso del tiempo. Mientras que en las concentraciones de ALT todos los grupos, a excepción del grupo control de dieta estándar, tienden a disminuir principalmente en el primer muestreo (4 semanas) manteniéndose estable en los muestreos posteriores. Lo anterior es un cambio no esperado ya que en la evaluación histopatológica se evidenció degeneración hepatocelular de leve a severa lo cual tendría que incrementar las concentraciones séricas de ALT. Debido a que no se realizaron más mediciones que nos ayuden a observar con mejor precisión la cinética enzimática no

podemos decir que no existió un incremento de ALT secundario a un daño agudo; se sabe que cuando la degeneración hepática es crónica las concentraciones de ALT pueden encontrarse en valores de referencia y que además el grado de pérdida de masa hepática funcional también ejerce un efecto negativo sobre las concentraciones de esta enzima. Este último punto podría explicar la disminución de ALT en los grupos con degeneración hepática en comparación con el grupo control el cual no tuvo disminución en las concentraciones de esta enzima. Para definir si realmente la pérdida de la masa funcional hepática es la causante de este hallazgo es necesario determinar analitos que evalúen función hepática, tales como gamma glutamil transferasa, albumina, tiempo de protrombina y globulinas. Por otro lado se sabe que la actividad de dichas enzimas es proporcional al contenido de proteínas de la dieta, por lo cual una dieta con un contenido muy alto de grasa en relación con el de proteínas puede generar condiciones catabólicas que promuevan una disminución en la actividad de estas enzimas, proceso que podría explicar los resultados obtenidos (73).

Los resultados observados en relación a la biometría hemática nos indican una elevación de los parámetros asociados a la línea roja en los grupos tratados con el compuesto NB5H02. Se sabe que algunas de las causas de la eritrocitosis son la deshidratación, el estrés y el aumento en la producción de eritrocitos (72), y dado a que estos grupos fueron administrados con un compuesto basado en cobalto se puede atribuir este incremento en la cantidad de eritrocitos circulantes a un aumento en la producción de eritrocitos secundaria a la administración crónica de cobalto, pues se sabe que este elemento participa de forma importante en el proceso de hematopoyesis (74, 75).

De acuerdo a la evaluación anatomopatológica, tampoco se encontraron importantes signos de toxicidad, y aunque en la mayoría de los animales se presentaba cierto grado de degeneración hepática, la cual se presenta por una alteración en la membrana de los hepatocitos, esta fue leve en los grupos control y grupos de dosis bajas, mientras que en todos los grupos que recibieron las dosis altas se presentó una degeneración mayor, ya sea de moderada a severa. Estos hallazgos indican que la administración crónica de los agentes en estudio, provocó inclusive, cierto grado de degeneración grasa, la cual se da por un proceso adaptativo en la disposición del metabolismo de

los lípidos por una cierta toxicidad debida a una exposición prolongada a agentes externos, pero que en ningún caso fue de una importancia relevante (76, 77).

En cuanto al modelo de obesidad empleado para evaluar la eficacia de los compuestos, podemos constatar que fue adecuado para la realización de este estudio, pues como se mencionó en la revisión bibliográfica, la alimentación con una dieta alta en grasa (40%) indujo en los animales un importante aumento de peso en comparación con la curva de crecimiento reportada por ENVIGO para esta estirpe de ratas (78) en comparación con el grupo alimentado con dieta estándar (6.2% de grasa), a pesar de que en este grupo, el consumo de alimento promedio de los animales fue significativamente mayor que en los grupos alimentados con la dieta hipercalórica, posiblemente debido a la palatabilidad de este alimento. Además, los animales alimentados con la dieta alta en grasa presentaron un importante aumento tanto en el índice de masa corporal como en los triglicéridos y en los niveles de glucosa comparado con el grupo control, características particulares del fenotipo de los individuos con obesidad, lo cual nos dará un mejor acercamiento de los efectos terapéuticos que pudieran tener los fármacos una vez que sean utilizados en la clínica.

Dentro de los grupos experimentales podemos destacar que, el grupo con la dosis baja del compuesto de cobalto (2.6 mg/kg), fue el que tuvo un incremento de peso e índice de masa corporal significativamente menor, mientras que los grupos de las dosis altas (3.6 mg/kg) de 5-HTP y del compuesto de cobre fueron los que tuvieron un incremento de peso mayor y por lo tanto mayor IMC. Esto teniendo en cuenta que todos los grupos experimentales, así como el grupo control de la dieta alta en grasa no presentaron diferencias estadísticamente significativas en el consumo de alimento.

A partir de los resultados obtenidos en los análisis bioquímicos del perfil lipídico podemos destacar que en cuanto a los niveles de triglicéridos, todos los grupos muestran una tendencia al incremento con base en el tiempo. Este comportamiento es el esperado en ratas alimentadas con dietas altas en grasa. Las principales diferencias significativas se observan en el último muestreo en el que el

grupo control con dieta hipercalórica y el grupo de la dosis alta de 5-HTP tienen concentraciones séricas muy por encima de los demás grupos, mientras que los grupos administrados con el compuesto de cobalto son quienes tienen menores concentraciones de este analito. Aunado a esto, al analizar los datos obtenidos de la medición de las concentraciones de colesterol, colesterol HDL y colesterol LDL se observa que en los tres analitos se presentó la misma tendencia en todos los grupos: los valores disminuyen significativamente a partir del muestreo de 4 semanas a excepción del grupo control alimentado con dieta estándar, en el cual sus concentraciones séricas se mantienen constantes durante los cuatro muestreos a lo largo de todo el estudio. Este hallazgo se puede atribuir a la disminución en el consumo de alimento que se suscitó en todos los grupos experimentales alimentados con la dieta con un alto contenido energético después de la tercera o cuarta semana de ingesta, pues corresponde con el muestreo en el que se registró la disminución en los valores mencionados. Otra posible causa de esta reducción puede ser la amplia capacidad de las ratas de mantener las concentraciones séricas de colesterol, aun consumiendo dietas ricas en grasa, al activar un mecanismo compensatorio en la eliminación del colesterol vía hepática y por lo cual no se observó hipercolesterolemia en los grupos alimentados con esta dieta especial (79).

Aun con estos sucesos se puede observar que los grupos administrados con el compuesto de cobalto NB5H02 tienen una tendencia a presentar valores más bajos que los demás grupos. Aunque hasta la finalización de estudio las diferencias no eran estadísticamente significativas, estos ligeros cambios se pueden atribuir a los efectos del fármaco sobre estos analitos.

Conforme a lo observado en los resultados del análisis de glucosa obtenidos mediante el equipo de química húmeda y los arrojados por la medición con el glucómetro convencional, podemos destacar que en los grupos tratados con el compuesto de cobalto NB5H02 en sus dos niveles de dosis se observan mediciones (NB5H02 LD 8.3 mmol/L, NB5H02 LD 8.2 mmol/L) por debajo de las presentadas en los demás grupos experimentales. Y aunque en todos los casos, los valores se encuentran dentro del rango de referencia (6-14 mmol/L) (78), se observa una tendencia de los grupos de cobalto a disminuir. Esto se observó particularmente en la medición con el glucómetro

en la que estadísticamente existen diferencias, lo que sugiere que el tratamiento con el compuesto basado en cobalto tiene efectos en el control de la glucemia en ratas obesas.

Los hallazgos mencionados anteriormente se complementan con lo observado en el análisis histopatológico en el que se observó un mayor grado de degeneración celular en las dosis altas de cada compuesto y 5-HTP, encontrando incluso cierta degeneración grasa con presencia de vacuolas anfólicas de gran tamaño. Se sabe que estas se desarrollan por la acumulación de lípidos provenientes de fuentes energéticas con alto contenido de grasa y no de carbohidratos (76); mientras que entre los diferentes tratamientos, en los grupos correspondientes al compuesto NB5H02 se encontró este tipo de degeneración en menor grado de presencia y severidad.

Al conjuntar los resultados obtenidos podemos destacar que en las variables analizadas el compuesto de cobalto NB5H02 presenta mayor efecto que el compuesto de cobre NB5H08 y el 5-Hidroxitriptófano solo, pero que en relación a cada tratamiento, las dosis bajas, en todos los casos, muestran una mayor eficacia que las dosis altas. Este fenómeno puede explicarse conforme a lo encontrado en diversas fuentes bibliográficas, en las que se menciona que, al administrar dosis muy elevadas de triptófano en ratas, suficientes para elevar los niveles de triptófano cerebral mucho más allá de su rango normal, la actividad de las neuronas del núcleo de rafe liberadoras de serotonina disminuye marcadamente como parte de un sistema de retroalimentación para mantener la liberación de serotonina dentro de un rango fisiológico. Sin embargo, si las ratas reciben pequeñas dosis de triptófano suficientes para elevar ligeramente los niveles de triptófano cerebral, pero no más allá de sus picos normales, no se produce una disminución en la actividad de las células pertenecientes al núcleo de rafe. En general este es un proceso muy común con diversas sustancias en las que se desarrolla cierta tolerancia farmacodinámica determinada por los cambios adaptativos en los sistemas afectados por el fármaco, disminuyendo la respuesta a una concentración específica de dicha sustancia ya sea por modificaciones en la densidad de los receptores o en la eficiencia de los mismos (11. 66).

A partir de la realización de este estudio, se da la pauta para continuar con la evaluación de estos compuestos en trabajos posteriores en los que se podrá ampliar la información en cuanto a su toxicidad y posibles efectos sobre el comportamiento reproductivo (conducta de apareamiento, reproducción, preñez, parto, descendencia, teratogénesis y defectos congénitos), así como algún posible potencial carcinogénico o mutagénico, además de otras pruebas de toxicología. Así mismo, es recomendable un ajuste de dosis con base en las utilizadas en este estudio y que presentaron mejor respuesta ante las variables relacionadas con la obesidad, así como diferentes esquemas y vías de administración principalmente del compuesto NB5H02 para potenciar su eficacia. Además, se sugiere hacer nuevos estudios enfocados en ampliar la información relacionada con la farmacocinética y farmacodinamia de estas moléculas, pues aún resta un largo camino de esfuerzos, investigaciones y conocimientos en el desarrollo de estos nuevos agentes terapéuticos.

**En Conclusión, podemos mencionar que se logró obtener las DL<sub>50</sub> vía intraperitoneal de los compuestos de coordinación sintetizados, tanto en ratones Hsd:ICR (CD1®) (en los que el compuesto de cobre NB5H08 presentó una mayor toxicidad) como en ratas HsdHan®:WIST (en las que el compuesto de cobalto NB5H02 presentó una toxicidad más elevada) y que para ambos compuestos la toxicidad fue mayor en rata que en ratón. Además, los dos compuestos presentaron una menor toxicidad aguda en comparación con la reportada para el 5-Hidroxitriptófano solo. Así mismo, en la evaluación de la toxicidad subcrónica vía intraperitoneal a dosis repetidas de los compuestos de coordinación y el 5-Hidroxitriptófano en ratas HsdBLu:LE no se logró observar a simple vista signos de toxicidad en la salud física o el comportamiento de los animales, mientras que en el análisis a nivel bioquímico y anatomopatológico el compuesto de cobalto NB5H02 fue el que mostró menores indicios de toxicidad comparado con el compuesto de cobre y el 5-Hidroxitriptófano.**

**El modelo de obesidad inducida por la dieta alta en grasa fue adecuado para evaluar la eficacia antiobesidad de los compuestos de coordinación puesto que emularon el fenotipo adquirido por los individuos con obesidad. Con esto se logró conocer que las dosis bajas de todos los tratamientos farmacológicos fueron las que presentaron una mejor respuesta antiobesidad, y que**

el compuesto de cobalto NB5H02 fue el que en general mostró mayor eficacia tanto en disminución de peso como en índice de masa corporal, triglicéridos, y glucosa, comparado con el compuesto de cobre NB5H08 y el 5-hidroxitriptófano solo.

# Referencias

---

1. Rivera D. J., *Obesidad en México: recomendaciones para una política de Estado*, Academia Nacional de Medicina de México, México, 2013.
2. WHO, *Obesidad y sobrepeso*, Nota descriptiva, N° 311, Junio, 2016, disponible en <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs311/es/>.
3. Hernández J. S., *Fisiopatología de la obesidad*, Gac Méd Méx, Vol. 140, No. 2, México, 2004.
4. Barrera, C. A. Rodríguez, G.A. Molina, A. M. *Escenario actual de la obesidad en México*, Rev Med Inst Mex Seguro Soc. Vol. 51, No. 3, Pp. 292-99, México, 2013.
5. González, H. M., Ambrosio M. K., Sánchez, E. S., *Regulación neuroendócrina del hambre, la saciedad y mantenimiento del balance energético*, Investigación en Salud, Vol. 8, No. 3, Pp. 191-200, 2006.
6. Hall, R. V. Quesada, M. M. Milania R. P. *Obesidad, Fisiología y Abordaje Terapéutico*, Centro Nacional de Información de Medicamentos, Costa Rica, 2002.
7. Morales, G. J., *Obesidad, un enfoque multidisciplinario*, Universidad Autónoma de Estado de Hidalgo, México, 2010
8. Lizarbe, B., Cerdán, S., *Control Hipotalámico de las interacciones neuroendocrinas, Fisiología y Control Del Comportamiento*, An. Real Acad. Farm. Vol 79, No. 1, 90-110, España, 2013.
9. Vega, R. F. Sánchez, C. M., Zaragoza, H. F. *Actualización En El Tratamiento Farmacológico De La Obesidad*, Revista de la Facultad de Ciencias de la Salud, Vol. 8, España, 2013.
10. Yadav, V.K., Oury, F., Suda, N., Liu, Z.W., Gao, X.B., Confavreux C., *A serotonin-dependent mechanism explains the leptin regulation of bone mass, appetite, and energy expenditure*, Cell, No. 138, Pp. 976–89, 2009.
11. Wurtman, R., Wurtman, J., *Serotonergic mechanisms and obesity*, Nutr. Biochem. Vol. 9, Pp. 511–515, 1998.
12. Rodríguez, S. L., *Obesidad: fisiología, etiopatogenia y fisiopatología, Enfoque actual*, Hospital Docente "Calixto García", Rev Cubana Endocrinol, Vol. 14, No. 2, 2003.

13. Lam, D., Garfield, A., Marston, O., Shaw, J., Heisler, L., Brain serotonin system in the coordination of food intake and body weight, *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, No. 97, Pp. 84–91, 2010.
14. OECD, *Health at a Glance 2015: OECD Indicators*, OECD Publishing, Paris, 2015. [http://dx.doi.org/10.1787/health\\_glance-2015-en](http://dx.doi.org/10.1787/health_glance-2015-en)
15. Kopelman, G. P., Obesity as a medical problem, *Nature*, Vol. 404, Pp. 634-43, London, 2000.
16. Vandevijvere, S., Chow, C.C., Hall, K. D., Umali, E., Swinburn, B. A., Increased food energy supply as a major driver of the obesity epidemic: a global analysis, *Bulletin of the World Health Organization*, No. 93, Pp. 446–456, 2015.
17. OECD, *Obesity Update*, OECD Health Statistics, 2014, [www.oecd.org/health/healthdata](http://www.oecd.org/health/healthdata).
18. OECD, *Health at a Glance 2017: OCDE Indicators*, OCDE Publishing, Paris, 2017, [http://dx.doi.org/10.1787/health\\_glance-2017-en](http://dx.doi.org/10.1787/health_glance-2017-en)
19. OCDE, *Obesity Update 2017*, OCDE Publishing, Paris, 2017 <http://www.oecd.org/health/obesity-update.htm>.
20. Sassi, F., *Obesity and the Economics of Prevention FIT NOT FAT*, OECD, 2010.
21. González, D. M., Bernal, L. Diagnóstico y manejo de la obesidad en perros: una revisión, *Revista CES Medicina Veterinaria y Zootecnia*, Vol. 6, No. 2, Pp. 91-102, Colombia, 2011.
22. Miller, D. La Conexión Entre la Obesidad y la Esterilización en los Animales de Compañía, *Banfield Journal*, 2012.
23. Tvarijonaviciute, A. Martinez, S. S. Ceron, M. J. Métodos para medir el grado de la obesidad en perros: entre la física y la bioquímica, *Anales de Veterinaria de Murcia*, No. 24, Pp. 17-30, España, 2008.
24. German, A. Martin, L. *Obesidad Felina: Epidemiología, Fisiopatología y Manejo*, Enciclopedia de la Nutrición Clínica Felina, Royal Canine. Paris, 2009.
25. Ballesteros, A. J., Dal, S. M., Pérez, F. N., Villar, V. C., La estrategia para la nutrición, actividad física y prevención de la obesidad: estrategia NAOS. *Rev Esp Salud Publica*. 81, 443, España, 2007.
26. Organización Mundial de la Salud *Dieta, nutrición y prevención de enfermedades crónicas: informe de una Consulta Mixta de Expertos OMS/FAO*, Serie de Informes Técnicos 916, Ginebra, 2003.

27. Socarrás S. M. Dra. Míriam Bolet A. M. Licea P. M., Obesidad: Tratamiento No Farmacológico y Prevención, Rev Cubana Endocrinol, Vol. 13, No. 1, Pp. 35-42, 2002.
28. Galicia, M. I. Simal, A. A. Tratamiento farmacológico de la obesidad, Información Terapéutica del Sistema Nacional de Salud Vol. 26, No. 5, 2002.
29. Barrera, C. A. Ávila, J. L. Cano, P. E. Molina, A. M. Parrilla, O. J. Ramos, H. R. Sosa, C. M. Sosa, R. M. Gutiérrez, A. J., Guía de práctica clínica Prevención, diagnóstico y tratamiento del sobrepeso y la obesidad exógena, Rev Med Inst Mex Seguro Soc. Vol. 51, No. 3, Pp 344-57, 2013.
30. Trueta, C. Cercós, M. Regulación de la liberación de serotonina en distintos compartimientos neuronales, Salud Mental, No. 35, Pp. 435-443, 2012.
31. Cobos, G. I., Dossier: Un examen exhaustivo de las aplicaciones y usos del 5-hidroxitriptófano, Departamento Técnico de Lamberts Española S.L.
32. Pytliak M. Vargová V. Mechírová V. Serotonin Receptors – From Molecular Biology to Clinical Applications, Physiol. Res. Vol. 60 Pp 15-25, 2011.
33. Mohammad, Z. L., Moses, L., Gwaltne, B. S., Serotonin: a review. J. vet. Pharmacol. Therap. 31, 187–199, 2008.
34. Watanabe, H., T. Nakano, R. Saito, D. Akasaka, K. Saito, H., Serotonin improves high fat diet induced obesity in mice. Plos One, Vol. 11, No. 1, 2016.
35. Lightowler, S., Wood, M., Brown, T., Glen, A., Blackburn, T., Tulloch, I., Kennett, G., An investigation of the mechanism responsible for fluoxetine-induced hypophagia in rats, European Journal of Pharmacology, No. 296, Pp. 137-143, 1996.
36. Curzon, G., Serotonin and appetite, Ann NY Acad Sci, No. 600, Pp. 521-530, 1990.
37. Cangiano C. Ceci F. Cascino A. Del Ben M. Laviano A. Muscaritoli M. Antonucci F. Rossi F., Conductas alimentarias y adherencia a prescripciones dietéticas en sujetos adultos obesos tratados con 5-hidroxitriptófano Am J Clin Nutr, Vol. 56, No. 5, Pp 863-7, Italia, 1992.
38. Ochai, E. Química Bioinorganica Editorioal Reverté, S.A. Ochisi. E. -I., "Bioinorganic Chemistry: An Introduction: Allp and Bacon. Inc., 1977.
39. Lippard, S., Metals in Medicine, Massachusetts Institute of Technology, United States, 1990.
40. Hoekstra, W.G., Suttie, J.W., Ganther, H.E., Mertz, W., Trace Elements Metabolism in Animals, Lippincott Company, United States, 1980.
41. Seven, MJ, Johnson, LA. Metal-binding in medicine. J. B. Lippincott, USA, 1960.

42. López, T. L., Estudio De Complejos Metálicos Con Ligandos De Interés Biológico, Tesis Doctoral, Universidad Nacional De La Plata, Argentina, 2016.
43. Abrams, M. J., Murrer, B. A., Metal compounds in therapy and diagnosis, Science No. 261, Pp. 725-730, 1993.
44. Guo, Z., Sandler P. J., Adv. Inorg. Chem., No. 49, Pp. 183-306, 2000.
45. Jones, C., Thornback, J. Medicinal Applications of Coordination Chemistry, Platinum Metals Rev, Vol. 52, No. 1, Pp. 21–22, 2008.
46. Thompson, K., Orvig, C., Metal complexes in medicinal chemistry: new vistas and challenges in drug design, Dalton Transactions, No. 6, Pp. 761–764, 2006.
47. Fricker, S., Metal based drugs: from serendipity to design, Dalton Transactions, No. 43, 2007.
48. Gilles, G., Metzler-Nolte, N., The potential of organometallic complexes in medicinal chemistry, Current Opinion in Chemical Biology, Vol. 16, No. 1-2, Pp. 84-91, 2012.
49. Merck Sharp and Dohme, Proceso de investigación, desarrollo y aprobación de un fármaco, Merck & Co. Inc, España 2016.
50. World Health Organization, Handbook Quality practices in basic biomedical research, 2016.
51. Bustamante, C., Fases del desarrollo de un nuevo fármaco. Estrategias de investigación, Medicina clínica. Manual Moderno, P. 131, Colombia, 2001.
52. Rang, H. P. Dale, M. M. Ritter, J. M. Flower, R. J. Henderson, G. Farmacología, 6 Ed., Elsevier, España, 2012.
53. Organización De Cooperación Y Desarrollo Económicos, Principios de Buenas prácticas de laboratorio de la OCDE, Serie sobre Principios de Buenas prácticas de laboratorio y verificación de su conformidad, Dirección del Medio Ambiente, Número 1, París, 1998.
54. Alcalá-Bejarano C. J., Estudio experimental del efecto de ingredientes alimentarios funcionales sobre la ingesta de alimento, peso corporal y utilización digestiva y metabólica de nutrientes. Posible utilización en dietas para sobrepeso y obesidad, tesis doctoral, Universidad de Granada, España, 2014.
55. Lutz, T.A., Woods, S.C., Overview of animal models of obesity, Curr Protoc Pharmacol, No. 61, 2012.
56. Speakman, j., Hambly, C., Mitchell, S., Krol, E., The contribution of animal models to the study of obesity. Lab Anim No. 42, 2008.

57. Scacchi B. P., Síndrome metabólico y melatonina: estudio de dos modelos experimentales en ratas. Tesis para optar al título de doctor en ciencias biomédicas, pontifica universidad católica argentina, Argentina, 2012.
58. Li, S., Zhang, H.-Y., Hu, C. C., Lawrence, F., Gallagher, K. E., Surapaneni, A., Estrem, S. T., Calley, J. N., Varga, G., Dow, E. R., Chen, Y., Assessment of Diet-induced Obese Rats as an Obesity Model by Comparative Functional Genomics, *Obesity*, No. 16, Pp. 811–818, 2008.
59. Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, 2001.
60. OECD, Test No. 423: Acute Oral toxicity - Acute Toxic Class Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, Paris, 2002.
61. Nair, A.B., Jacob, S., A simple practice guide for dose conversion between animals and human. *Journal of Basic and Clinical Pharmacy*, No. 7, Pp. 27–31, 2016.
62. Gutierrez, A. R. Dong-Hoon, K. Woods, S. C. Seeley, R. J. Expression of New Loci Associated With Obesity in Diet-Induced Obese Rats: From Genetics to Physiology *Obesity*, Vol. 20, No. 2, Pp. 306–312, 2011.
63. Envigo, Teklad Global 18% Protein Rodent Diet (Sterilizable), 2015, <http://www.envigo.com/resources/data-sheets/2018s-datasheet-0915.pdf>.
64. Kenkyu, I., Study of Medical Supplies, Vol. 6, P. 307, 1975.
65. Yakurigaku, Z. N., Japanese Journal of Pharmacology. Vol. 69, Pg. 523, 1973.
66. Ruiz, B. J., Factores fisiológicos que modifican la acción de los fármacos en medicina veterinaria, *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*, Vol. 14, No. 1, Colombia, 2001.
67. Sigma-Aldrich, Cobalt(II) chloride hexahydrate, Safety data sheet, 2006, <http://www.bioeng.nus.edu.sg/cellular/msds/255599.pdf>.
68. Sigma-Aldrich, Cupper(II) sulfate, Safety data sheet, 2010, <http://aui.ma/personal/~S.ElHajjaji/Labmanual/MSDS/sheets/CupricSulfate.pdf>.
69. González, A. R., El Síndrome Serotoninérgico, *Revista Médica de la Universidad de Costa Rica*, Vol. 3, No. 2, Costa Rica, 2009.
70. Peñalva, R. G., Neurotransmisión serotoninérgica en el hipocampo : Interacciones con el sistema de la hormona liberadora de corticotrofina y el ciclo de vigilia-sueño en roedores, Tesis Doctoral, Universidad de Buenos Aires, Argentina, 2001.

71. Envigo, Hematology and clinical chemistry — female long Evans, USA, <https://www.envigo.com/resources/data-sheets/blu-le-7-8-wk-female-cbc.pdf>.
72. Loeb, F.W., Quimby, W. F., The clinical chemistry of laboratory animals, 2<sup>º</sup> Ed, Taylor and Francis, USA, 1999.
73. González, M. M., Vicuña, F. N., Modificación de enzimas hepáticas en ratas desnutridas tratadas con acetaminofén, Gaceta Médica Méx, Vol. 139 No. 5, Venezuela, 2003.
74. Viglierchio, M., Aportes de la bioquímica a la interpretación del metabolismo del cobalto, Anuario, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Nacional de la Pampa, 2000.
75. Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades, Resumen de salud pública. Cobalto, Departamento de salud y servicios humanos de los EE.UU., Servicio de Salud Pública, EUA, 2004.
76. López, P. R. Enfermedad hepática grasa. Aspectos patológicos, Rev Col Gastroenterol. Vol. 29, No. 1, Pp. 82-8, Colombia, 2014.
77. Tejada, C. F. Hepatotoxicidad por Fármacos. Revista Clínica de Medicina de Familia, Vol. 3, No. 3, Pp. 177-191, España, 2010.
78. Envigo, HsdBlu:LE Long evans (blue spruce) outbred rat, Growth Curve, USA, 2011, <https://www.envigo.com/resources/growth-curves/le-gc-sept2015.pdf>.
79. Navarro, M. A., Arbonés, J. M., Acín, S., Carnicer, R., Sarría, A. J., Surra, J. C., Arnal, C., Martínez, M. V., Osada, J., Animales de experimentación utilizados como modelos en la investigación de la arteriosclerosis, Clin Invest Arterioscl., Vol 17, No. 2, Pp. 82-93, España, 2005.

# Anexos

## A1. Análisis probit de la toxicidad aguda de los compuestos NB5H02 y NB5H08 en ratones Hsd:ICR (CD1<sup>®</sup>)

### Estimaciones de los parámetros

| Parámetro                        | Estimación | Error típico | Z      | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|----------------------------------|------------|--------------|--------|------|-------------------------------|-----------------|
|                                  |            |              |        |      | Límite inferior               | Límite superior |
| PROBIT <sup>a</sup> Dosis        | 4,804      | 2,842        | 1,690  | ,091 | -,767                         | 10,375          |
| Intersección <sup>b</sup> NB5H02 | -13,393    | 7,938        | -1,687 | ,092 | -21,331                       | -5,455          |
| NB5H08                           | -12,167    | 7,791        | -1,562 | ,118 | -19,958                       | -4,376          |

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

b. Corresponde a la variable de agrupación Compuesto

**Límites de confianza**

|               |      | Límites de confianza al 95%<br>para Dosis |                 |                 | Límites de confianza al 95%<br>para log(Dosis) <sup>a</sup> |                 |                 |
|---------------|------|---|-----------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|
|               |      | Estimación                                | Límite inferior | Límite superior | Estimación  | Límite inferior | Límite superior |
| PROBIT NB5H02 | ,010 | 201,275                                   | .               | .               | 2,304   | .               | .               |
|               | ,020 | 229,371                                   | .               | .               | 2,361   | .               | .               |
|               | ,030 | 249,197                                   | .               | .               | 2,397   | .               | .               |
|               | ,040 | 265,233                                   | .               | .               | 2,424   | .               | .               |
|               | ,050 | 279,036                                   | .               | .               | 2,446   | .               | .               |
|               | ,060 | 291,348                                   | .               | .               | 2,464   | .               | .               |
|               | ,070 | 302,590                                   | .               | .               | 2,481   | .               | .               |
|               | ,080 | 313,023                                   | .               | .               | 2,496   | .               | .               |
|               | ,090 | 322,824                                   | .               | .               | 2,509   | .               | .               |
|               | ,100 | 332,116                                   | .               | .               | 2,521   | .               | .               |
|               | ,150 | 373,523                                   | .               | .               | 2,572   | .               | .               |
|               | ,200 | 410,083                                   | .               | .               | 2,613   | .               | .               |
|               | ,250 | 444,288                                   | .               | .               | 2,648   | .               | .               |
|               | ,300 | 477,429                                   | .               | .               | 2,679   | .               | .               |
|               | ,350 | 510,343                                   | .               | .               | 2,708   | .               | .               |
|               | ,400 | 543,670                                   | .               | .               | 2,735   | .               | .               |

|        |      |          |   |   |       |   |   |
|--------|------|----------|---|---|-------|---|---|
|        | ,450 | 577,985  | . | . | 2,762 | . | . |
|        | ,500 | 613,869  | . | . | 2,788 | . | . |
|        | ,550 | 651,981  | . | . | 2,814 | . | . |
|        | ,600 | 693,132  | . | . | 2,841 | . | . |
|        | ,650 | 738,396  | . | . | 2,868 | . | . |
|        | ,700 | 789,300  | . | . | 2,897 | . | . |
|        | ,750 | 848,178  | . | . | 2,928 | . | . |
|        | ,800 | 918,923  | . | . | 2,963 | . | . |
|        | ,850 | 1008,868 | . | . | 3,004 | . | . |
|        | ,900 | 1134,649 | . | . | 3,055 | . | . |
|        | ,910 | 1167,310 | . | . | 3,067 | . | . |
|        | ,920 | 1203,857 | . | . | 3,081 | . | . |
|        | ,930 | 1245,366 | . | . | 3,095 | . | . |
|        | ,940 | 1293,419 | . | . | 3,112 | . | . |
|        | ,950 | 1350,490 | . | . | 3,130 | . | . |
|        | ,960 | 1420,768 | . | . | 3,153 | . | . |
|        | ,970 | 1512,196 | . | . | 3,180 | . | . |
|        | ,980 | 1642,907 | . | . | 3,216 | . | . |
|        | ,990 | 1872,237 | . | . | 3,272 | . | . |
| NB5H08 | ,010 | 111,822  | . | . | 2,049 | . | . |

|  |      |         |   |   |       |   |   |
|--|------|---------|---|---|-------|---|---|
|  | ,020 | 127,431 | . | . | 2,105 | . | . |
|  | ,030 | 138,446 | . | . | 2,141 | . | . |
|  | ,040 | 147,355 | . | . | 2,168 | . | . |
|  | ,050 | 155,023 | . | . | 2,190 | . | . |
|  | ,060 | 161,863 | . | . | 2,209 | . | . |
|  | ,070 | 168,109 | . | . | 2,226 | . | . |
|  | ,080 | 173,905 | . | . | 2,240 | . | . |
|  | ,090 | 179,350 | . | . | 2,254 | . | . |
|  | ,100 | 184,513 | . | . | 2,266 | . | . |
|  | ,150 | 207,517 | . | . | 2,317 | . | . |
|  | ,200 | 227,828 | . | . | 2,358 | . | . |
|  | ,250 | 246,831 | . | . | 2,392 | . | . |
|  | ,300 | 265,244 | . | . | 2,424 | . | . |
|  | ,350 | 283,529 | . | . | 2,453 | . | . |
|  | ,400 | 302,045 | . | . | 2,480 | . | . |
|  | ,450 | 321,109 | . | . | 2,507 | . | . |
|  | ,500 | 341,045 | . | . | 2,533 | . | . |
|  | ,550 | 362,219 | . | . | 2,559 | . | . |
|  | ,600 | 385,081 | . | . | 2,586 | . | . |
|  | ,650 | 410,228 | . | . | 2,613 | . | . |

|  |      |          |   |   |       |   |   |
|--|------|----------|---|---|-------|---|---|
|  | ,700 | 438,509  | . | . | 2,642 | . | . |
|  | ,750 | 471,219  | . | . | 2,673 | . | . |
|  | ,800 | 510,523  | . | . | 2,708 | . | . |
|  | ,850 | 560,493  | . | . | 2,749 | . | . |
|  | ,900 | 630,373  | . | . | 2,800 | . | . |
|  | ,910 | 648,518  | . | . | 2,812 | . | . |
|  | ,920 | 668,823  | . | . | 2,825 | . | . |
|  | ,930 | 691,884  | . | . | 2,840 | . | . |
|  | ,940 | 718,580  | . | . | 2,856 | . | . |
|  | ,950 | 750,287  | . | . | 2,875 | . | . |
|  | ,960 | 789,331  | . | . | 2,897 | . | . |
|  | ,970 | 840,125  | . | . | 2,924 | . | . |
|  | ,980 | 912,744  | . | . | 2,960 | . | . |
|  | ,990 | 1040,152 | . | . | 3,017 | . | . |

a. Base del logaritmo = 10.

*A2. Análisis probit de la toxicidad aguda del compuesto NB5H02 en ratas HsdHan:WIST®*

**Estimaciones de los parámetros**

| Parámetro                        | Estimación | Error típico | Z      | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|----------------------------------|------------|--------------|--------|------|-------------------------------|-----------------|
|                                  |            |              |        |      | Límite inferior               | Límite superior |
| PROBIT <sup>a</sup> Dosis        | 12,404     | 2,970        | 4,176  | ,000 | 6,582                         | 18,225          |
| Intersección <sup>b</sup> NB5H02 | -24,582    | 5,943        | -4,136 | ,000 | -30,525                       | -18,639         |

a. Modelo PROBIT:  $\text{PROBIT}(p) = \text{Intersección} + BX$  (Las covariables X se transforman utilizando el logaritmo en base 10.000.)

b. Corresponde a la variable de agrupación Compuesto

**Límites de confianza**

| Probabilidad | Límites de confianza al 95% para Dosis |                 |                 | Límites de confianza al 95% para $\log(\text{Dosis})^a$ |                 |                 |
|--------------|--|-----------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|
|              | Estimación                             | Límite inferior | Límite superior | Estimación  | Límite inferior | Límite superior |
| PROBIT ,010  | 62,271                                 | 39,621          | 75,184          | 1,794   | 1,598           | 1,876           |
| ,020         | 65,504                                 | 43,406          | 78,139          | 1,816   | 1,638           | 1,893           |
| ,030         | 67,641                                 | 45,974          | 80,109          | 1,830   | 1,663           | 1,904           |

|      |         |        |         |       |       |       |
|------|---------|--------|---------|-------|-------|-------|
| ,040 | 69,294  | 47,992 | 81,645  | 1,841 | 1,681 | 1,912 |
| ,050 | 70,669  | 49,688 | 82,933  | 1,849 | 1,696 | 1,919 |
| ,060 | 71,861  | 51,172 | 84,058  | 1,856 | 1,709 | 1,925 |
| ,070 | 72,922  | 52,502 | 85,068  | 1,863 | 1,720 | 1,930 |
| ,080 | 73,886  | 53,717 | 85,992  | 1,869 | 1,730 | 1,934 |
| ,090 | 74,773  | 54,841 | 86,849  | 1,874 | 1,739 | 1,939 |
| ,100 | 75,600  | 55,891 | 87,654  | 1,879 | 1,747 | 1,943 |
| ,150 | 79,119  | 60,394 | 91,161  | 1,898 | 1,781 | 1,960 |
| ,200 | 82,033  | 64,139 | 94,182  | 1,914 | 1,807 | 1,974 |
| ,250 | 84,618  | 67,451 | 96,976  | 1,927 | 1,829 | 1,987 |
| ,300 | 87,009  | 70,489 | 99,671  | 1,940 | 1,848 | 1,999 |
| ,350 | 89,285  | 73,342 | 102,352 | 1,951 | 1,865 | 2,010 |
| ,400 | 91,499  | 76,070 | 105,083 | 1,961 | 1,881 | 2,022 |
| ,450 | 93,694  | 78,713 | 107,920 | 1,972 | 1,896 | 2,033 |
| ,500 | 95,905  | 81,308 | 110,918 | 1,982 | 1,910 | 2,045 |
| ,550 | 98,169  | 83,883 | 114,142 | 1,992 | 1,924 | 2,057 |
| ,600 | 100,523 | 86,471 | 117,668 | 2,002 | 1,937 | 2,071 |
| ,650 | 103,017 | 89,106 | 121,594 | 2,013 | 1,950 | 2,085 |
| ,700 | 105,711 | 91,834 | 126,060 | 2,024 | 1,963 | 2,101 |
| ,750 | 108,698 | 94,719 | 131,275 | 2,036 | 1,976 | 2,118 |

|      |         |         |         |       |       |       |
|------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|
| ,800 | 112,123 | 97,863  | 137,583 | 2,050 | 1,991 | 2,139 |
| ,850 | 116,252 | 101,447 | 145,623 | 2,065 | 2,006 | 2,163 |
| ,900 | 121,664 | 105,862 | 156,827 | 2,085 | 2,025 | 2,195 |
| ,910 | 123,009 | 106,917 | 159,720 | 2,090 | 2,029 | 2,203 |
| ,920 | 124,486 | 108,059 | 162,946 | 2,095 | 2,034 | 2,212 |
| ,930 | 126,131 | 109,311 | 166,597 | 2,101 | 2,039 | 2,222 |
| ,940 | 127,994 | 110,705 | 170,802 | 2,107 | 2,044 | 2,232 |
| ,950 | 130,153 | 112,293 | 175,767 | 2,114 | 2,050 | 2,245 |
| ,960 | 132,735 | 114,157 | 181,834 | 2,123 | 2,058 | 2,260 |
| ,970 | 135,980 | 116,448 | 189,648 | 2,133 | 2,066 | 2,278 |
| ,980 | 140,417 | 119,503 | 200,664 | 2,147 | 2,077 | 2,302 |
| ,990 | 147,706 | 124,357 | 219,559 | 2,169 | 2,095 | 2,342 |

a. Base del logaritmo = 10.

*A3. Análisis probit de la toxicidad aguda del compuesto NB5H08 en ratas HsdHan:WIST®*

**Estimaciones de los parámetros**

| Parámetro                 | Estimación | Error típico | Z      | Sig. | Intervalo de confianza al 95% |                 |
|---------------------------|------------|--------------|--------|------|-------------------------------|-----------------|
|                           |            |              |        |      | Límite inferior               | Límite superior |
| PROBIT <sup>a</sup> Dosis | .044       | .014         | 3.193  | .001 | .017                          | .071            |
| Intersección              | -5.416     | 1.874        | -2.890 | .004 | -7.290                        | -3.542          |

a. Modelo PROBIT:  $PROBIT(p) = \text{Intersección} + BX$

**Límites de confianza**

| Probabilidad             | Límites de confianza al 95% para Dosis |                 |                 |
|--------------------------|--|-----------------|-----------------|
|                          | Estimación                             | Límite inferior | Límite superior |
| PROBIT <sup>a</sup> .010 | 70.101                                 | .               | .               |
| .020                     | 76.285                                 | .               | .               |
| .030                     | 80.210                                 | .               | .               |
| .040                     | 83.161                                 | .               | .               |
| .050                     | 85.563                                 | .               | .               |
| .060                     | 87.606                                 | .               | .               |

|      |         |   |   |
|------|---------|---|---|
| .070 | 89.398  | . | . |
| .080 | 91.003  | . | . |
| .090 | 92.462  | . | . |
| .100 | 93.805  | . | . |
| .150 | 99.367  | . | . |
| .200 | 103.787 | . | . |
| .250 | 107.579 | . | . |
| .300 | 110.984 | . | . |
| .350 | 114.140 | . | . |
| .400 | 117.134 | . | . |
| .450 | 120.031 | . | . |
| .500 | 122.882 | . | . |
| .550 | 125.733 | . | . |
| .600 | 128.630 | . | . |
| .650 | 131.624 | . | . |
| .700 | 134.780 | . | . |
| .750 | 138.185 | . | . |
| .800 | 141.977 | . | . |
| .850 | 146.397 | . | . |
| .900 | 151.958 | . | . |

|      |         |   |   |
|------|---------|---|---|
| .910 | 153.302 | . | . |
| .920 | 154.761 | . | . |
| .930 | 156.365 | . | . |
| .940 | 158.157 | . | . |
| .950 | 160.201 | . | . |
| .960 | 162.602 | . | . |
| .970 | 165.554 | . | . |
| .980 | 169.478 | . | . |
| .990 | 175.663 | . | . |

a. Se utiliza un factor de heterogeneidad.

*A4 Toxicidad aguda de NB5H02 en ratones Hsd:ICR (CD-1®)*

| <b>Toxicidad aguda de NB5H02 en ratones Hsd:ICR (CD1®)</b> |  |                         |
|--|--|-------------------------|
| <b>Dosis (mg/kg)</b>                                       | <b>Observaciones</b>   | <b>Animales muertos</b> |
| 10   |  | 0 de 3                  |
| 50   | Postración   | 0 de 3                  |
| 100  | Postración   | 0 de 3                  |
| 500  | Postración, saltos, dificultad de movimiento en los miembros posteriores, dificultad para respirar | 1 de 3                  |
| 750  | Postración, saltos, dificultad de movimiento en los miembros posteriores, dificultad para respirar | 2 de 3                  |

*A5.Toxicidad aguda de NB5H08 en ratones Hsd:ICR (CD-1®)*

| <b>Toxicidad aguda de NB5H08 en ratones Hsd:ICR (CD1®)</b> |  |                         |
|--|--|-------------------------|
| <b>Dosis (mg/kg)</b>                                       | <b>Observaciones</b>   | <b>Animales muertos</b> |
| 10   |  | 0 de 3                  |
| 50   | Postración   | 0 de 3                  |
| 100  | Postración, dificultad de movimiento en los miembros posteriores                           | 0 de 3                  |
| 500  | Postración, dificultad de movimiento en los miembros posteriores, dificultad para respirar | 2 de 3                  |
| 750  | Postración, dificultad de movimiento en los miembros posteriores, dificultad para respirar | 3 de 3                  |

*A6. Toxicidad aguda de NB5H02 en ratas HsdHan<sup>®</sup>:WIST*

| <b>Toxicidad aguda de NB5H02 en ratas HsdHan<sup>®</sup>:WIST</b> |   |                         |
|---|---|-------------------------|
| <b>Dosis (mg/kg)</b>  | <b>Observaciones</b>  | <b>Animales muertos</b> |
| 50  | Letargia, agresividad hacia el experimentador   | 0 de 5                  |
| 75  | Letargia, agresividad hacia el experimentador, postración   | 1 de 5                  |
| 100   | Letargia, agresividad hacia el experimentador, dificultad para respirar, dificultad de movimiento en los miembros posteriores, postración | 3 de 5                  |
| 125   | Letargia, agresividad hacia el experimentador, dificultad para respirar, dificultad de movimiento en los miembros posteriores, postración | 4 de 5                  |
| 150   | Letargia, agresividad hacia el experimentador, dificultad para respirar, dificultad de movimiento en los miembros posteriores, postración | 5 de 5                  |

*A7. Toxicidad aguda de NB5H08 en ratas HsdHan®:WIST*

| <b>Toxicidad aguda de NB5H08 en ratas HsdHan®:WIST</b> |   |                         |
|--|---|-------------------------|
| <b>Dosis (mg/kg)</b>                                   | <b>Observaciones</b>  | <b>Animales muertos</b> |
| 100  | Hiperactividad, agresividad hacia el experimentador, letargia                                       | 0 de 5                  |
| 125  | Hiperactividad, agresividad hacia el experimentador, letargia                                       | 0 de 5                  |
| 130  | Letargia, dificultad para respirar, postración  | 5 de 5                  |
| 135  | Letargia, dificultad para respirar, postración  | 5 de 5                  |
| 140  | Letargia, dificultad para respirar, postración  | 5 de 5                  |
| 145  | Letargia, dificultad para respirar, postración  | 4 de 5                  |
| 150  | Hiperactividad, agresividad hacia el experimentador, letargia, dificultad para respirar, postración | 5 de 5                  |
| 175  | Hiperactividad, agresividad hacia el experimentador, letargia, dificultad para respirar, postración | 4 de 5                  |
| 200  | Hiperactividad, agresividad hacia el experimentador, letargia, dificultad para respirar, postración | 5 de 5                  |