

56



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y ANTIINFLAMATORIA
EN DERIVADOS DE PIRAZOLINA**

**T E S I S
PARA OBTENER EL TÍTULO DE BIÓLOGO**

**Presenta:
Susana Enriqueta Frías González**

**Director de tesis
Dr. Cecilio Álvarez Toledano**

**Asesoría
M. en C. Ma. Teresa Ramírez Apan**



Facultad de Estudios Superiores Iztacala

2001 2

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



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.

PAGINACION DISCONTINUA

“ Estudiad el “ abecé ” de las ciencias antes de intentar alcanzar las cimas. No emprendáis jamás un nuevo capítulo si no sabéis perfectamente el precedente. No tratéis jamás de compensar la insuficiencia de vuestros conocimientos con suposiciones e hipótesis, ni siquiera las más audaces...

Aprended a ser observadores y pacientes. Habituaos a hacer los trabajos científicos más ordinarios. Estudiad, comparad, acumulad hechos... Sin los mismos no podréis nunca elevaros, sin los mismos vuestras teorías serán esfuerzos vanos. Pero aún estudiando, experimentando, observando, esforzaos por no quedar en la superficie de los hechos. Tratad de penetrar el misterio de su origen, buscad con perseverancia las leyes que los regulan. En segundo lugar modestia. Jamás penséis saberlo todo ya... No permitáis que el orgullo se apodere de vosotros; os hará obstinar cuando sería necesario ceder; os hará rechazar un consejo útil y una ayuda amigable y os hará perder la medida de la objetividad... En tercer lugar, pasión. Recordad que la ciencia exige al hombre toda su vida. Y si tuvierais dos vidas, las mismas no serían suficientes. Es una fuerte tensión y una gran pasión lo que la ciencia exige del hombre...”

Isábél Parlos
(1849-1936)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ÍNDICE

	Página
Índice de contenidos	i
Dedicatorias	iii
Lista de abreviaturas	1
Introducción	2
Índice de contenidos	
Síntesis de compuestos	3
Estudios previos de compuestos con el grupo pirazolina	5
Generalidades y bioensayos aplicados en farmacognosia	6
Justificación	12
Objetivos	
Objetivo General	13
Objetivos particulares	13
Material y método	
Toxicidad en <i>Artemia salina</i>	14
Citotoxicidad	15
Actividad antiinflamatoria	16
Óxido nítrico	17
Reacción de anti-radicales	17
Resultados	
Resultados del bioensayo con <i>artemias</i>	19

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resultados citotoxicidad	21
Resultados Antiinflamación	27
Resultados producción de óxido nítrico	28
Resultados del efecto antioxidante	29
Discusión de resultados	30
Conclusiones	40
Recomendaciones	43
Referencias bibliográficas	44

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Agradecimientos

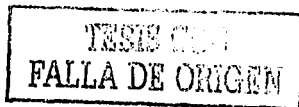
Gracias primeramente a quien creó este maravilloso mundo que he podido conocer y disfrutar, por toda la libertad para vivir, por la capacidad de aprender y colaborar con un granito de arena en la gran labor de llegar al conocimiento perfecto de las cosas.

Gracias a mi querida U.N.A.M. y F.E.S. Iztacala, sede de mi formación académica.

Gracias a mi Director de Tesis, **Dr. Cecilio Álvarez Toledano**, a CONACYT e Instituto de Química (Proyecto 27500) por el apoyo financiero para la realización de esta Tesis.

Gracias a la **M. en C. María Teresa Ramírez Apan** por la asesoría y colaboración en este trabajo, porque su esfuerzo y dedicación son dignos de reconocimiento, gracias por los consejos, sugerencias y sobre todo Tere, porque encontré en ti más que a una maestra, a una gran amiga.

Gracias a los Doctores, Guillermo Penieres, Carlos Céspedes y Marcos Martínez; a mis amigas, Alicia Ramírez, Eugenia y todos los compañeros del laboratorio Inorgánica 4, así como de la Unidad de Investigación en Plantas Medicinales; Anita, Rogelio, Lupita y Toño que fueron de gran apoyo, compañerismo y ejemplo durante mi estancia en el IQ.



Gracias especialmente a mis padres **Luis Enrique Frías Aguirre y Rosalía González Hernández** porque sin ellos no existiría, gracias porque con su esfuerzo han logrado formar la familia que somos y me han dado a mi y a mis hermanos, la dicha de sabernos amados y apoyados en todo momento; a ellos, a Claudia, Quique y Marco les doy las gracias por darme la bendición de tener una familia y con todo mi amor les dedico este trabajo.

Gracias a mi amor, con quien he compartido muchísimos momentos de mi vida, con quien he crecido y madurado como persona, quien ha estado presente en momentos claves de mi vida, quien me ha enseñado todo lo que el amor puede lograr, pues seguimos juntos por sobre todo lo adverso. Eres una persona maravillosa **Carlos Palmerín A.**, tu nobleza, rectitud y sinceridad me hacen confiar plenamente en ti, espero que igualmente pueda estar apoyándote en la culminación de tu carrera y siempre.



Dedicatorias

Esta Tesis está dedicada al hombre que más admiro, un hombre inteligente, sabio, trabajador y un padre amoroso que ha sido en gran parte mi motivo de inspiración, un hombre merecedor de altos honores y digno de todo respeto, quiero, a pesar de lo poco que lo veo y de que lo poco expresiva que he sido, demostrarle mi amor con este trabajo a mi abuelito **Enrique Frías Núñez**.

Dedico esta tesis a mis amados sobrinos Oscar Ivan e Israel Alvarado Frías, a los que vendrán y a mis incontables primos, pues como una de las mayores, espero les sirva de ejemplo y motivación para la realización de sus estudios.

Quiero dedicar mi tesis a todos mis tíos y tías González y Frías por su cariño y apoyo, a mi tío Jaime Aguirre y su familia quienes forman parte de mis mejores recuerdos de la infancia.

Con cariño a mi tío Goyo (†) que desgraciadamente fue una víctima más del cáncer.

Susy

iii

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>BW755C</i>	<i>3-amino-1-[m-trifluorometil]-2-pirazolina</i>
<i>CI₅₀</i>	<i>Concentración inhibitoria (50%)</i>
<i>CL₅₀</i>	<i>Concentración letal media (50% de muertes)</i>
<i>COX</i>	<i>Enzimas ciclooxigenasas</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimetilsulfóxido</i>
<i>DO</i>	<i>Densidad óptica</i>
<i>DPPH</i>	<i>Difenil-p-picrilhidrazil</i>
<i>EDRF</i>	<i>Factor derivado del endotelio</i>
<i>FUMP</i>	<i>Fluorouridina monofosfato</i>
<i>HeLa</i>	<i>Línea de células de cáncer cervicouterino</i>
<i>Hep-2</i>	<i>Línea tumoral de células epidermoides de laringe</i>
<i>IC21</i>	<i>Línea de macrófagos murinos</i>
<i>K562</i>	<i>Línea de células de leucemia</i>
<i>KD679</i>	<i>1-(3,3-difenilpropil)-3-amino-2-pirazolina</i>
<i>KD785</i>	<i>1-(3,3-difenilpropil)- 3 amino-5 metil-2-pirazolina</i>
<i>LOX</i>	<i>Lipooxigenasa</i>
<i>LPS</i>	<i>lipopolisacárido</i>
<i>MCI-186</i>	<i>3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona</i>
<i>NO</i>	<i>Oxido Nítrico</i>
<i>NOS</i>	<i>Oxido Nítrico Sintasa</i>
<i>NSAID</i>	<i>Antiinflamatorios no esteroideos</i>
<i>PC-3</i>	<i>Línea de células tumorales de próstata</i>
<i>PGs</i>	<i>Prostaglandinas</i>
<i>PMNs</i>	<i>Polimorfonucleares</i>
REACTIVO DE	
<i>GRIESS</i>	<i>Sulfanilamida/N-(1-naftil) etilendiamino</i>
<i>RNOS</i>	<i>Especies reactivas de óxido de nitrógeno</i>
<i>SNC</i>	<i>Sistema Nervioso Central</i>
<i>SO₄</i>	<i>Sulfato</i>
<i>SRB</i>	<i>Sulforrodamina</i>
<i>TCA</i>	<i>Tricloro acético</i>
<i>TPA</i>	<i>12-O-teradecanoilforbol-13-acetato</i>
<i>U251</i>	<i>Células Gila del Sistema Nervioso Central (tumorales)</i>

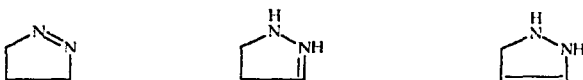
1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCIÓN

Las pirazolininas son compuestos coloridos caracterizados por su estructura cíclica con dos átomos de nitrógeno y la presencia de un doble enlace; en general presentan un punto de ebullición elevado cuando están en forma líquida y un bajo punto de fusión si son sólidos. Su bajo peso molecular le permite ser soluble en agua pero mientras éste se incrementa, se vuelve más soluble en disolventes orgánicos.

El procedimiento general de síntesis, es la reacción de hidrazinas alifáticas o aromáticas en presencia de compuestos α,β -insaturados. Esta reacción se lleva a cabo en una gran variedad de condiciones (Encyclopedia of Chemical Technology, 1982).



Estructura de las tres formas tautoméricas conocidas de pirazolinina

El valor en el área de síntesis radica en parte por la generación de compuestos con actividad terapéutica, área en la que continuamente se realizan estudios destinados a la búsqueda de nuevos medicamentos. En México, esta búsqueda de nuevos principios activos se encuentra aún en pleno desarrollo ya que hay cientos de plantas y compuestos sintéticos que ameritan ser estudiados. Para ello se realizan pruebas biológicas de selección, las cuales consisten en la determinación del efecto biológico de los compuestos mediante bioensayos estandarizados que permiten seleccionar los compuestos que presentan actividad (Mata, 2000).

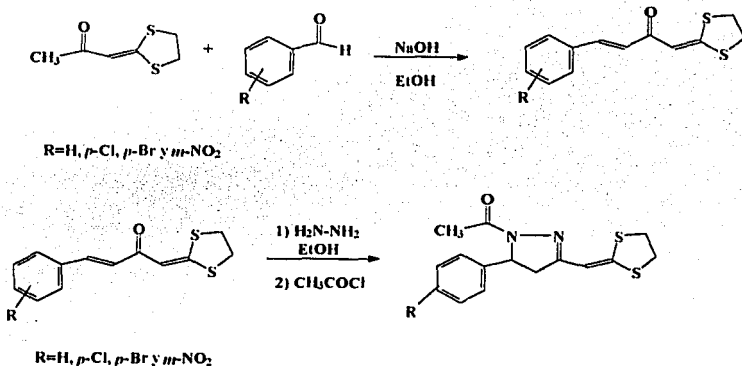
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ANTECEDENTES

SÍNTESIS DE COMPUESTOS

Los compuestos evaluados en el presente trabajo fueron sintetizados por los Químicos Fernando Ortega Jiménez y Cariño Morales en el Laboratorio de Inorgánica 4 del instituto de Química de la UNAM siguiendo el método de A. Thullier, en donde la condensación de una molécula de acetona y una molécula de disulfuro de carbono, genera el intermediario 1-(1,3-ditiolan-2-iliden)-acetona el cual, en medio básico, da origen al compuesto II. En la siguiente fase, el uso de hidrazina adicionado al compuesto II permitió la formación de un pirazol, el cual posteriormente se acetyló con cloruro de acetilo con el objeto de tener una mayor estabilidad en la molécula y así dar origen a los derivados de pirazolina (Thullier,1959)

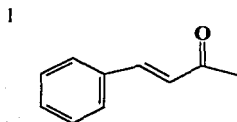
Esquema 1. Mecanismo de síntesis



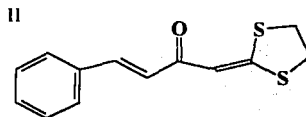
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

De las moléculas evaluadas, el compuesto I, Trans-4-fenil-3-buten-2-ona ya es conocido y comercializado por Aldrich®. El II sólo se diferencia del primero por la presencia del ditiolan. La estructura general presentada por el compuesto III que contiene además del núcleo pirazol, un grupo acetilo; permanece en los siguientes compuestos pero con la adición de el sustituyente *meta*-nitro se generó el compuesto IV y con los halógenos *para*-Br y *para*-Cl se generaron los compuestos V y VI respectivamente. La caracterización de estas estructuras se realizó mediante métodos espectroscópicos.

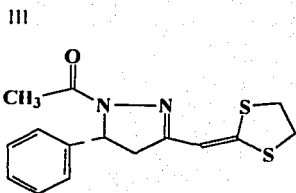
Esquema II. Estructuras de las moléculas evaluadas. I: materia prima, II: precursor, III-VI: derivados de pirazolina (dihidropirazoles).



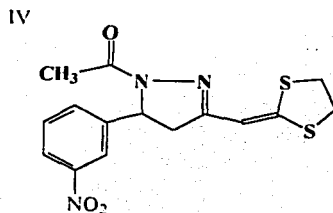
I- Trans-4-fenil-3-buten-2-ona



Trans-4-fenil-1-(1,3-ditiolan-2-iliden)-3-buten-2-ona



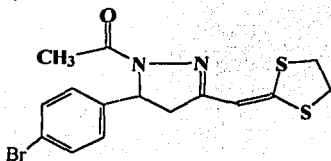
I-Acetil-5-fenil-3-(1,3-ditiolan-2-iliden)-1H-4,5-dihidropirazol



I-Acetil-5-fenil-3-(1,3-ditiolan-2-iliden)-1H-4,5-dihidropirazol

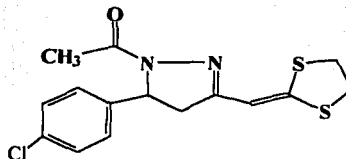
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

V



1-Acetil-5-(4-bromofenil)-3-(1,3-ditiofan-2-iliden)-1H-4,5-dihidropirazol

VI



1-Acetil-5-(4-clorofenil)-3-(1,3-ditiofan-2-iliden)-1H-4,5-dihidropirazol

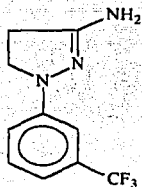
ESTUDIOS PREVIOS DE COMPUESTOS CON EL GRUPO PIRAZOLINA

El uso de pirazolininas se ha sugerido para fluorescentes ópticos, también se han reportado derivados con actividad insecticida y algunas pirazolininas sulfonilurea han mostrado actividad hipoglucémica en ratas (Encyclopedia of Chemical Technology, 1982).

En la década de los setenta el grupo de Higgs reportó que el compuesto derivado de pirazolina BW755C inhibía las enzimas COX y LOX de las plaquetas (Higgs, 1979). Posteriormente en modelo *in vivo* de inflamación el BW755C mostró una significativa actividad antiinflamatoria y una importante inhibición sobre la migración de leucocitos (Higgs, 1980). Por otra parte Robak y Duniek compararon la actividad del BW755C y 2 derivados : KD 785 y KD 679 sobre COX y LOX de vesículas seminales y microsomas plaquetarios. Los resultados confirmaron la significativa actividad inhibitoria del BW 755C sobre LOX y COX, en cambio los compuestos KD mostraron poseer una pobre actividad inhibitoria; estos resultados sugirieron que la actividad del BW se debía al sustituyente trifluorometil y probablemente a una acción como atrapador de radicales libres (Robak, 1982). En la inflamación inducida con ácido araquidónico en la oreja de ratón, el BW755C también ha mostrado actividad antiinflamatoria, esta actividad se ha atribuido a su acción inhibitoria sobre ambas enzimas, así como a su capacidad para atrapar radicales libres que se generan durante la biotransformación del ácido araquidónico (Robak, 1982. Carlson, 1985).

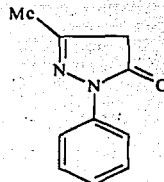
5

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



BW755C

3-amino-1-[m-trifluorometil]-fenil-2-pirazolina



MCI-186

3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona.

La peroxidación lipídica causada por especies reactivas de oxígeno juega un papel importante en el desarrollo del edema cerebral y tejidos isquémicos. El MCI-186 ha mostrado ampliamente efectos ventajosos sobre varios modelos de isquemia en cerebro. La inyección intravenosa de este compuesto atenúa el edema isquémico y postisquémico inducido en cerebro por la oclusión de arterias cerebrales de rata. Además de la acción anti-isquémica del 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona también se le ha atribuido actividad como atrapador de radicales libres (Satoshi, 1997). Recientemente, Gülhan y colaboradores sintetizaron 1-(4-ariltiazol-2-il)-3,5-diaril-2-pirazolina y más de 30 derivados, de los cuales evaluaron 13 sobre la actividad hipotensiva usando el método de oclusión de la vena caudal en rata. Todos los compuestos examinados presentaron apreciable actividad antihipertensiva (Gülhan, 2000).

GENERALIDADES Y BIOENSAYOS APLICADOS EN FARMACOGNOSIA

Entre las principales causas de mortalidad mundial se encuentra el cáncer, enfermedad caracterizada por un crecimiento irregular de células; destaca en ella la invasión a los tejidos que rodean el punto inicial y su propagación a otras partes del cuerpo que pueden ser tejidos o sistemas (King, 1997). Muchas de las células que derivan de tumores son capaces de multiplicarse y expresar en los cultivos descendientes algunas de las propiedades de la célula de origen, tales células pueden ser propagadas indefinidamente como línea celular. Por lo general crecen

mejor si están unidas a una superficie lisa y típicamente dejan de crecer cuando se ha formado una capa continua o confluyente sobre la superficie de la placa o frasco de cultivo (Alberts, 1994).

Actualmente se conocen mejor los requerimientos nutricionales de las células eucariontes, las cuales pueden crecer en un medio sintético con el agregado de una pequeña cantidad de suero (Davidson, 1979). Se distinguen tres tipos de cultivos: primarios, secundarios y líneas establecidas. Estas últimas se han adaptado al crecimiento *in vitro* por una transformación cancerosa. Las líneas establecidas son muy útiles como modelo para el estudio del cáncer, siendo HeLa una de las mejor conocidas y estudiadas (De Robertis, 1988).

En la investigación sobre el cáncer, se han dedicado muchos esfuerzos a la búsqueda de formas para curar la enfermedad exterminando las células cancerosas sin afectar a las células normales (King, 1997) por lo que se han buscado sustancias y técnicas novedosas, útiles en el tratamiento del cáncer y así, el Instituto Nacional de Cáncer ha implementado una investigación *in vitro* orientada al descubrimiento de fármacos con actividad anticancerígena en el que se mide la actividad citotóxica o inhibidora de crecimiento sobre una amplia diversidad de líneas celulares de tumores humanos (Alley, 1988).

Las pruebas *in vitro* proporcionan la CI_{50} , lo que va a servir como parámetro de selectividad y potencia respecto a los fármacos de referencia (Monks, 1991). El ensayo emplea un método colorimétrico en el que se mide el contenido de proteínas de las células que se adhieren a la base de una microplaca de 96 pozos utilizando SRB, un colorante aniónico que se une a residuos de aminoácidos básicos en células que han sido fijadas con ácido tricloroacético, así, entre mayor sea la Densidad Óptica, mayor será el contenido de proteínas y por ende menor la inhibición del crecimiento celular (Alley, 1988. Monks, 1991).

Por otra parte, entre los bioensayos empleados para pruebas de selección, destaca por su sencillez y economía la determinación de la letalidad producida por distintos compuestos en *Artemia salina* (Meyer, 1982. Solis, 1993). Este organismo es un

crustáceo perteneciente a la Subclase *Braquiopoda*, el cual vive en medio acuático y de alta salinidad, posee un ciclo de vida dependiente de las temperaturas e igualmente lo es su habilidad para producir quistes de los cuales eclosionan las larvas luego de permanecer 48 hrs. a una temperatura entre 22 y 28°C (Dexter, 1959), además es un material biológico valioso tanto para la investigación como para la enseñanza de disciplinas como genética, biología molecular, fisiología, embriología y toxicología entre otras (Castro, 1993).

Debido a su hábitat limitado, no existe gran diversidad de especies pero la sencilla capacidad de cultivo y su corto ciclo de vida la han hecho adecuada para numerosos estudios ecológicos como el monitoreo de la calidad del agua, toxicidad de mezclas químicas, metales, aceites dispersantes y micotoxinas (Meyer, 1982). En el campo de la toxicología se han realizando estudios para comparar el efecto tóxico de compuestos en ésta y otras especies con fines predictivos, también se han evaluado los efectos, dinámica y acumulación de contaminantes en distintos niveles tróficos (Sorgeloos, 1997).

Otro proceso involucrado en numerosas lesiones y enfermedades es la inflamación, que es una reacción local del tejido conectivo y vascular que se desencadena a consecuencia de una lesión celular (Bowman, 1984). Los medios y/o sistemas para provocar la respuesta inflamatoria incluyen traumatismo mecánico, radiación, lesión química directa, lesión secundaria química o bioquímica, organismos invasores y finalmente reacciones de tipo antígeno-anticuerpo. Las reacciones inflamatorias generalmente se dividen en dos tipos: agudas y crónicas (Bowman, 1984). La inflamación aguda, a nivel microscópico involucra una serie de eventos que incluye la dilatación de arterias, venas y capilares con un incremento en la permeabilidad vascular, liberación de fluidos y proteínas plasmáticas, así como la migración de leucocitos polimorfonucleares hacia el área afectada (Litter, 1988). Cuando la inflamación aguda persiste, ésta puede desarrollarse en un proceso crónico siendo capaz entonces de producir daño, algunas veces aún mayor que el agente productor, por lo que es necesario frenar dicho proceso mediante fármacos

antiinflamatorios (Litter, 1988). Los fármacos más conocidos y utilizados para combatir los signos de la inflamación son los NSAID. Esta categoría incluye muy diversos compuestos que casi nunca tienen relación estructural alguna pero comparten algunas actividades terapéuticas y efectos colaterales. Casi todos ellos inhiben las actividades de COX-1 y COX-2, y con ello, inhiben también la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos. Los antiinflamatorios de esta categoría casi nunca inhiben la formación de eicosanoides como los leucotrienos que contribuyen a la inflamación, ni modifican la síntesis de otros mediadores inflamatorios (Goodman & Gilman, 1996).

Se han desarrollado numerosos modelos para evaluar la actividad antiinflamatoria tanto *in vivo* como *in vitro*. Los modelos *in vitro* proporcionan información acerca de los posibles mecanismos de acción de los compuestos, mientras que los modelos *in vivo* permiten estimar la potencia y la eficacia de compuestos antiinflamatorios (Cirino, 1998).

Los modelos animales de inflamación *in vivo*, pueden ser de tipo vascular, celular, inmunológico, así como de proliferación y diferenciación. La proliferación epidermal puede ser fácilmente estimulada en piel de animales (rata o ratón) con aplicaciones tópicas de n-hexano o ésteres de forbol, de éstos, el TPA ha sido utilizado para inducir edema y evaluar la acción de sustancias potencialmente antiinflamatorias (Payá, 1993. Young, 1983). Aunque no está bien definida su acción en la inducción de inflamación por aplicación tópica de agentes irritantes, se tienen evidencias de que el TPA incrementa los niveles de endoperóxido y PGG₂ formados a partir del ácido araquidónico los cuales se asocian con el edema (Young, 1983).

Por otra parte, el NO es sintetizado del átomo terminal guanidino nitrógeno del aminoácido L-arginina por la enzima NOS (Ialenti, 1992). Esta molécula es un potente agente vasodilatador producido por el endotelio, participa como regulador de la presión sanguínea y también es un constituyente tóxico de la contaminación ambiental y el humo del cigarro, reacciona con el oxígeno para generar RNOS que

pueden ejercer graves efectos sobre los sistemas biológicos (Nims, 1996). Los métodos más comúnmente empleados para el análisis del NO en soluciones acuosas son: 1) análisis de nitritos por el reactivo de Griess, 2) quimioluminiscencia y 3) reacciones con oxihemoglobina (Wink, 1996). *In vitro*, el NO es liberado por el endotelio vascular de las células en respuesta a una variedad de sustancias como bradiquinina e histamina. También es formado por macrófagos activados por lipopolisacárido (LPS) o citocinas, además, algunos agentes como glicógeno, carragenina y mediadores de inflamación (Leucotrieno B4) inducen o incrementan la formación y liberación de EDRF/NO a partir de células PMNs (Lyons, 1995).

El NO participa en cada uno de los eventos que ocurren durante la inflamación como son vasodilatación, alteraciones en la integridad endotelial, adhesión vascular y migración de células inflamatorias, como molécula protectora en inmunoregulación y mediador del dolor (Lyons, 1995). El papel del NO en la inflamación puede depender no sólo de su habilidad para incrementar la permeabilidad vascular o formación del edema, posiblemente por incremento local del flujo sanguíneo; sino también de la biosíntesis de PGs pro inflamatorias debido a la activación de COX (Sautebin, 1995).

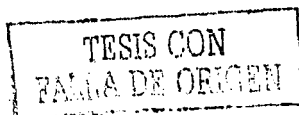
El macrófago murino estimulado con Lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) o bien con citosina, produce grandes cantidades de NO porque en éstas células abunda la NOS inducible. El ensayo de Griess es un método simple para determinar la producción de óxido nítrico cuantificado como nitritos en cultivos celulares. El reactivo de Griess adicionado al sobrenadante de los cultivos celulares convierte el nitrito a un grupo azo púrpura el cual se cuantifica fotométricamente (Green, 1982).

Un mecanismo relacionado con los procesos anteriores es el efecto antioxidante cuyas especies químicas involucradas son los radicales libres. Estos radicales pueden ser un átomo o molécula que contiene uno o más electrones no apareados. El adjetivo libre ha sido usado para subrayar el hecho de que un radical

puede ser capaz de existir independientemente. Estos radicales libres son producidos continuamente en células como productos del metabolismo y también existen fuentes exógenas. La reacción más importante de los radicales libres en células aerobias involucra al oxígeno molecular y sus radicales derivados -anión superóxido y radical hidroxilo-, peróxido y metales de transición (Loeckie, 1999). Se ha observado la intervención de los radicales libres derivados del oxígeno, como mediadores importantes de la lesión y daño celular, no solamente son especies químicas altamente reactivas sino que también se involucran directa o indirectamente en varios desórdenes clínicos tales como la aterosclerosis, cáncer, inflamación, ulceración gástrica entre otros, además, juegan un papel importante en algunos procesos de desorden del SNC (Balz Frei, 1994. Roberfroid, 1995).

Las células han desarrollado un mecanismo de defensa antioxidante para prevenir la formación de radicales libres y limitar sus efectos dañinos. Estos mecanismos incluyen enzimas para inactivar peróxidos, proteínas para secuestrar metales de transición y una variedad de compuestos para atrapar radicales libres (Loeckie, 1999).

Como se ha mencionado previamente, los leucocitos y otras células fagocíticas combaten agentes biológicos extraños al organismo con $\cdot\text{NO}$, O_2^- , H_2O_2 y $\cdot\text{OCl}$, una poderosa mezcla oxidante. Estos protegen al hombre de la muerte por infección, pero causa mutaciones y daño oxidativo al DNA, además contribuye al proceso carcinogénico. Los antioxidantes aparecen para inhibir algunas de las patologías de la inflamación (Balz Frei, 1994), mientras que algunos agentes diversos como la infección crónica, niveles altos de hormonas particulares, o químicos a ciertas dosis causan daño celular resultando en incremento de la división celular y por consiguiente un mayor riesgo de cáncer. Los oxidantes forman una clase importante de agentes que estimulan la división en la célula lo cual puede relacionarse al estímulo que ocurre durante el proceso inflamatorio que acompaña la curación de heridas. Los antioxidantes pueden disminuir la mutagénesis y por consiguiente, la carcinogénesis, de dos maneras: reduciendo el daño oxidativo de



ADN y disminuyendo la división de las células lo que disminuiría la incidencia de una amplia variedad de cánceres humanos. Antioxidantes como los tocoferoles, ascorbato y β -caroteno pueden neutralizar la inducción de cáncer en roedores por una variedad de carcinógenos. Dos de las mayores causas de cáncer, humo del cigarro e inflamación crónica, parecen involucrar oxidantes en su mecanismo de acción. Casi todos los estudios epidemiológicos que han examinado la relación entre los niveles de antioxidante y el cáncer pulmonar inducido por cigarro muestra significancia estadística del efecto protector de los antioxidantes y además ayudan a proteger contra los efectos carcinogénicos de la inflamación crónica (Balz Frei, 1994).

JUSTIFICACIÓN

Existen muchos compuestos que se sintetizan para revisar métodos empleados, probar nuevas reacciones, corroborar y mejorar técnicas; pero la mayoría de ocasiones no se les busca utilidad o actividad alguna. En el Instituto de Química se llevan a cabo numerosas síntesis y en este caso, en el laboratorio de Inorgánica 4 se ha trabajado con el grupo pirazol, fue así que, recopilando información acerca de este núcleo, se encontraron pocas referencias enfocadas a su papel biológico, tomando entonces la decisión de evaluar compuestos que poseyeran este grupo con diversos sustituyentes; teniendo también la posibilidad de ser compuestos nuevos y por tanto conocer algunas de sus propiedades en sistemas biológicos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVOS

Con base en la información recopilada y expuesta anteriormente en introducción y antecedentes, se plantean los siguientes objetivos.

GENERAL

*Evaluar la actividad citotóxica y antiinflamatoria en derivados de pirazolina (dihidropirazoles)

PARTICULARES

* Determinar en el bioensayo con larvas de *Artemia salina* la CL₅₀ de los derivados de pirazolina

* Determinar en líneas celulares cancerosas la CL₅₀ de los dihidropirazoles

* Evaluar la actividad antiinflamatoria de derivados de pirazolina en el modelo de edema inducido con TPA en la oreja de ratón

* Determinar si los derivados de pirazolininas inhiben la producción de NO en cultivos de macrófagos murinos

* Determinar si los derivados de pirazolina poseen actividad antioxidante

* Correlacionar los índices de toxicidad y actividad antiinflamatoria obtenidos de los bioensayos *in vivo* e *in vitro* de los derivados de pirazolina

MATERIAL Y MÉTODOS

Toxicidad en *Artemia salina*. Para el experimento se emplearon quistes de *Artemia salina* (Brine shrimp) comerciales. El medio para incubar los quistes fue agua de mar artificial (Instant Ocean, 38g/l) preparada con agua destilada, filtrada y conservada en refrigeración hasta su uso. En un recipiente se colocaron aproximadamente 100ml de la solución de agua de mar artificial y 5mg de quistes de *Artemia* (Brine shrimp), la mitad del recipiente fue cubierta con papel aluminio para proporcionar oscuridad y mantenida en incubación a una temperatura de 25 - 28°C durante 48 horas, después de este tiempo, las larvas eclosionadas se colectaron con una pipeta Pasteur y se transfirieron a un vial de cristal transparente de 10 ml para facilitar su observación. Con una micropipeta Eppendorf se colectaron 10 larvas en 100 μ l y se depositaron suavemente en los pocillos de una microplaca de 96 pozos. Con el compuesto puro se preparó una solución madre 20mM en DMSO, a partir de ésta se preparó una serie de soluciones a las siguientes concentraciones: 2000, 620, 200, 62 y 20 μ M en solución de agua de mar, con el fin de que al agregar 100 μ l al pocillo, se diluyera al 50% con los 100 μ l previamente depositados con las larvas, quedando las concentraciones finales de 1000, 310, 100, 31 y 10 μ M. Las soluciones para los controles positivos se prepararon a las mismas concentraciones y de la misma manera empleando los siguientes fármacos como referencia: Adriamicina, Dactinomicina, Colchicina, Podofilotoxina y 6-mercaptopurina en el mismo disolvente; el grupo blanco llevó únicamente solución de agua de mar. Por triplicado se adicionaron 100 μ l de cada concentración de didhidropirazoles y de los fármacos de referencia y la hora fue registrada. Se repitió el procedimiento para los diferentes compuestos y el grupo testigo. Transcurridas 24 hrs. se procedió a contar el número de larvas muertas en cada pocillo empleando la lupa de un microscopio Nikon DIAPHOT 300, considerándose muertas al encontrar inmóviles cada uno de sus apéndices (antenas, anténulas y mandíbulas). Una vez contadas,

se fijaron agregando 100µl de metanol en cada pozo empleando una multipipeta; y una vez muertas todas se cuenta el total de larvas para confirmar el número de éstas en cada pozo (Colegate, 1993).

La evaluación del porcentaje de mortalidad de las larvas fue una curva concentración-respuesta de tipo cuantil, analizada por el método Reed-Muench.

Con el programa FINNEY'S, el cual es un análisis de probit, se calculó la CL_{50} empleando los datos proporcionados en la relación muertos-totales de la tabla de Reed-Muench.

Citotoxicidad.

Cada una de las líneas celulares tiene un número determinado de células/pozo, esto depende del tiempo de duplicación de las mismas. Partiendo de los cultivos confluentes de HEp-2, PC-3, HeLa, K562 y U251 se hicieron suspensiones conteniendo 5000 o 7500 células en 100µl, los cuales se depositaron en los pozos de una placa experimental e igualmente en una placa cero o blanco. Ambas se incubaron a 37°C. Después de 24 horas, se agregó a cada pozo de la placa experimental 100 µl de los mismos compuestos y fármacos de referencia empleados en el ensayo anterior, preparados con medio a concentraciones entre un rango de 20 a 620 µM, para que la concentración final sea de 10 a 310µM y a la placa cero se le agregó la misma cantidad de medio. Continúo la incubación por 48 hrs. más. Al finalizar dicho periodo las placas fueron fijadas con TCA al 50% durante 60 min. a 4°C, se lavaron los pocillos con agua corriente y se dejaron secar por 24 hrs. Posteriormente se tiñeron las células con SRB durante 30 min. y se lavaron con ácido acético al 0.1%.

Se dejaron secar las placas al ambiente durante 24 hrs. Transcurrido este tiempo se solubilizó el colorante SRB con tris-base, se agitaron las placas por 30 minutos y finalmente se tomó lectura en un lector de microplacas Bio Kinetics (EL 340 de BIO-TEK™) a 515nm.

Se obtuvieron tres datos de densidad óptica: los de la placa al tiempo cero (T_0) (tiempo al cual los fármacos son añadidos), densidad óptica del control (C) y densidad óptica de los tratamientos (T). Usando estas medidas, la respuesta celular fue calculada por inhibición del crecimiento.

Si T es mayor o igual que T_0 , el cálculo es % inhibición = $[(T-T_0)/(C-T_0)]$. Si T es menor que T_0 , la muerte de células se calcula mediante la ecuación

$$\% \text{ de inhibición} = 100 \times [(T-T_0)/T_0]$$

La CI_{50} es la concentración que causa una inhibición o reducción del 50% en la proteína evaluada hasta el final de la incubación, comparada con la inicial. Este valor se obtuvo mediante regresión lineal (Alley, 1998. Monks, 1991).

Actividad antiinflamatoria.

Se emplearon grupos de 5 ratones albino macho cuyo peso osciló entre 22 a 25 g los cuales fueron anestesiados vía intraperitoneal con un anestésico de uso veterinario (Sedalphorte®) diluido con solución salina isotónica. En la oreja derecha se aplicó con una jeringa Hamilton 10 μ l de una solución de TPA cuya concentración final fue de 2.5 μ M. En la oreja izquierda del animal se aplicaron 10 μ l de etanol. Inmediatamente de la aplicación del agente irritante y el etanol, se aplicó en la oreja derecha 20 μ l del agente de prueba en acetona y 20 μ l del solvente en la oreja izquierda. Tanto los agentes de prueba (compuestos I-VI) como el control positivo inhibidor de inflamación (Indometacina) fueron aplicados a las concentraciones de 0.5 mg/oreja.

La inflamación se desarrolla por espacio de 4 horas, y al finalizar dicho periodo, los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se tomó de la porción central de cada oreja un pedazo de tejido de 9mm de diámetro con la ayuda de un sacabocado.

La medida de la respuesta antiinflamatoria se obtuvo por diferencia de peso entre la oreja tratada con el agente de prueba y el peso de la oreja control (a la que sólo se le aplicó el agente inductor de la inflamación TPA y el solvente).

Para obtener el peso se utilizó una balanza analítica OHAUS. El porcentaje de inhibición de la inflamación se obtuvo de la siguiente manera: % de inhibición = [(A/B) x 100] - 100

Donde A es el promedio del peso de las orejas del grupo tratado y B es el promedio del peso de las orejas del grupo control (De Young, 1989).

Óxido nítrico.

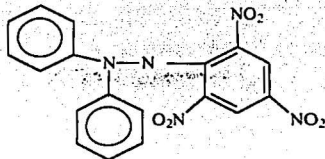
Se emplearon cultivos confluentes de macrófagos murinos de la línea celular IC21. En placas de 96 pozos se depositaron 8×10^5 células/ml, $50 \mu\text{l}$ LPS ($10 \mu\text{l}$ /ml) y $50 \mu\text{l}$ de medio con el agente de prueba ($100 \mu\text{M}$). Los pozos del control positivo (aminoguanidina) y los testigos contenían células con LPS más medio, mientras que en los pozos blanco se colocaron células sin LPS más medio.

Cada uno de los tratamientos (compuestos I-VI), controles positivo y blanco se realizaron por triplicado. La placa se incubó por 48 hrs. a temperatura de 37°C en un ambiente de CO_2/O_2 . Después del período de incubación, en otra placa de 96 pozos se tomaron $100 \mu\text{l}$ del sobrenadante y se adicionaron $100 \mu\text{l}$ de reactivo de Griess. Se dejó incubar por 10 minutos a temperatura ambiente y terminado dicho período se procedió a leer en un lector de placas a una longitud de onda de 515 nm la Densidad Óptica (DO) del producto de la reacción.

Los valores de densidad óptica se sustituyeron en la ecuación regresión lineal obtenida por una curva de calibración Densidad óptica-concentración conocida de NaNO_2 para así determinar los μM de NO (Green, 1982.; Miles, 1996. y Schulz, 1999).

Reacción de anti-radicales

El Difenil-p-picrilhidrazil (DPPH) es un radical estable conocido que en presencia de atrapadores de radicales libres se reduce, provocando la desaparición de su color violeta después de un intervalo de tiempo.



1,1-difenil-2-picrilhidrazil
DPPH

Para determinar si los compuestos tenían actividad atrapadora de radicales libres (antioxidante), se preparó en un tubo de Eppendorf una solución del dihidropirazol a evaluar y de los compuestos de referencia Quercetina y α -tocoferol a $120\mu\text{M}$ diluido en etanol partiendo de la solución madre de cada uno de ellos, los testigos se prepararon empleando la misma cantidad de DMSO tomada para las diluciones problema. En una placa de 96 pozos se agregó por triplicado $50\mu\text{l}$ de estas diluciones con una micropipeta Eppendorf, cubriendo de la luz con papel aluminio. Una vez hecho esto, se preparó rápidamente una solución de DPPH a $100\mu\text{M}$ en etanol y se agregaron $150\mu\text{l}$ en cada uno de los pozos. La concentración final de los compuestos fue de $30\mu\text{M}$. Se cubrió nuevamente para mantener en agitación durante 30 minutos. Posteriormente se leyó la placa a 515 nm en un lector de microplacas (EL 340 de BIO-TEK™) y los valores de densidad óptica obtenidos se evaluaron mediante la siguiente ecuación:

$$\% \text{ de reducción del DPPH} = [100 - (A / B) \times 100]$$

Donde

A = Promedio de las muestras problema

B = Promedio de los controles (Waffo, 1998. Cotelle, 1996).

RESULTADOS

RESULTADOS DEL BIOENSAYO CON ARTEMIAS

La Figura I muestra la curva concentración-respuesta de los compuestos evaluados en cinco concentraciones. Como se observa, la respuesta de letalidad mostró ser dependiente de la concentración. El derivado de pirazolina IV fue el menos efectivo posiblemente debido a la presencia del grupo NO_2 o porque precipitó en contacto con la solución salina, mientras que I y III presentaron un aumento disparado en su toxicidad a la concentración de $31 \mu\text{M}$.

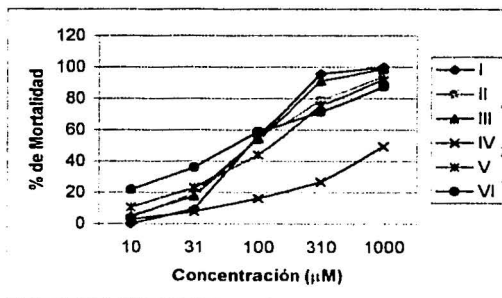


Figura I. Curva concentración-respuesta en *Artemia salina* dada por los derivados de pirazolina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

A partir de la curva concentración-respuesta se obtuvieron los valores de CL_{50} que se muestran en la siguiente tabla.

COMPUESTO	$CL_{50} \mu M$
I	86.76
II	100.75
III	90.68
IV	>1000
V	115.13
VI	67.57

Tabla 1. CL_{50} de los derivados de pirazolina en el ensayo de *Artemia salina*

Como se observa en la Tabla 1, la presencia de un grupo ditiolan en la estructura II, disminuyó discretamente el efecto tóxico respecto al compuesto que no lo presenta (I). Los compuestos III y IV difieren estructuralmente en que el IV presenta un grupo nitro en posición *meta* lo cual le hace perder su capacidad tóxica como se observa por los valores de CL_{50} : 90.68 y >1000 μM respectivamente. El dihidropirazol más letal para estos organismos fue el VI, el cual tiene en su estructura un átomo de cloro en posición *para*, en cambio, el sustituyente Br en la misma posición resultó ser menos tóxico.

En La figura II, la longitud de las barras representa una proporción inversa con el grado de toxicidad de los compuestos; por tanto, podemos decir que la toxicidad de Dactinomicina es muy elevada respecto a los fármacos de referencia y los derivados de pirazolina. Los compuestos I-VI, con excepción del IV resultaron con importante actividad letal en *Artemia salina*. Los fármacos de referencia Colchicina y 6-mercaptopurina, así como el derivado de pirazolina IV (ver también la Tabla 3), prácticamente no son tóxicos para estos organismos.

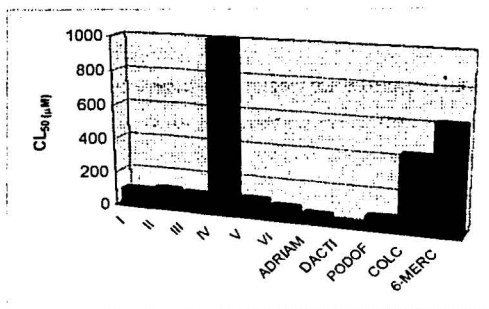


Figura II. Comparación de las CL₅₀ de los compuestos I-VI y de los fármacos de referencia en Artemia salina

RESULTADOS CITOTOXICIDAD

COMP.	CI ₅₀ (µM)				
	HeLa	HEp-2	K562	PC-3	U251
I	62.9	64.75	62.58	Sin Activ.	57.38
II	8.1	14.44	109.39	1.032	42.36
III	12.94	95.54	31.79	31.62	14.55
IV	9.74	13.14	7.21	13.54	106.75
V	40	45	13.54	0.226	56
VI	46.62	54.78	16.07	36.84	44.64

Tabla 2. CI₅₀ de cada uno de los compuestos en las diferentes líneas celulares

En la Tabla 2 podemos observar que el compuesto I mostró una citotoxicidad similar en la mayoría de las líneas celulares excepto para la línea PC-3 donde fue nula su actividad. El compuesto II al poseer el grupo ditiolan tuvo un incremento en la potencia citotóxica siendo notablemente relevante en la línea PC-3 y prácticamente careció de actividad en la línea K562 pues la CI₅₀ es mayor a 100µM. Con o sin ditiol, las moléculas tuvieron el mismo efecto en la línea U251.

Al introducir el núcleo pirazol en el compuesto III, la citotoxicidad se vio disminuida para las líneas celulares HeLa, HEp-2 y PC-3 pero se incrementó en K562 y U251 lo cual muestra una variación en la selectividad.

La adición del grupo NO₂ en posición *meta* en el compuesto IV confirió mayor selectividad y potencia a la molécula en la mayoría de las líneas, exceptuando U251 donde este compuesto no tuvo actividad citotóxica.

La presencia de los halógenos en los compuestos V y VI restó la citotoxicidad de éstos siendo la línea K562 una de las que mostraron mayor grado de sensibilidad a los halógenos. Se puede decir que en general los valores de CI₅₀ se mantuvieron constantes y es relevante hacer notar que el compuesto V fue muy selectivo contra la línea PC-3 lo cual indica que estas células fueron sensibles ante la presencia del Br.

Los fármacos de referencia evaluados presentan perfiles de citotoxicidad importantes como se muestra en la siguiente tabla.

FÁRMACOS	CI ₅₀ (µM)					
	HeLa	HEp-2	K562	PC-3	U251	Artemia
ADRIAMICINA	4.6X10 ⁻⁴	5.3X10 ⁻⁴	14.2	5.2X10 ⁻⁴	0.77X10 ⁻⁴	0.0013
DACTINOMICINA	1.94X10 ⁻⁶	1.28X10 ⁻⁶	0.16X10 ⁻⁶	0.3X10 ⁻⁶	0.24X10 ⁻⁶	39.99
PODOFILOTOXINA	44.9X10 ⁻⁶	530X10 ⁻⁶	0.288	4.12X10 ⁻⁶	8.63	60.12
COLCHICINA	30.5X10 ⁻⁸	6.6X10 ⁻⁸	1650X10 ⁻⁸	9.24X10 ⁻⁸	15.7X10 ⁻⁸	427.18
6MERCAPTOPURINA	0.86X10 ⁻³	0.52X10 ⁻³	16x10 ⁻³	75x10 ⁻³	75x10 ⁻³	615.54
5-FLUOROURACILO	-----	-----	-----	-----	-----	>1000

Tabla 3. CI₅₀ de los fármacos de referencia en las diferentes líneas celulares

La Adriamicina y la Dactinomicina a pesar de que son intercaladores del DNA, su perfil de actividad citotóxica difiere en las líneas celulares. En general la Dactinomicina resultó ser más potente que la Adriamicina, y la primera muestra selectividad sobre la K562, PC-3, y U251. La Adriamicina mostró importante actividad citotóxica sobre la U251 y bajo efecto citotóxico sobre la línea de leucemia.

Los valores de CI₅₀ mostraron que la Colchicina es más potente que la Podofilotoxina en las 5 líneas evaluadas, mostrando la Colchicina mayor selectividad sobre la línea HEp-2. En el caso de la Podofilotoxina, en las líneas de leucemia y en la línea U251 se observó pobre selectividad citotóxica. La 6-

mercaptapurina, agente que inhibe la síntesis de DNA por incorporarse como falsos sustratos resultó ser el fármaco menos citotóxico contra las líneas de cáncer, no obstante mostró selectividad para las líneas epitelial y epidermoide. Se observó también que la línea de leucemia fue la menos sensible a la Adriamicina. En las siguientes figuras se muestra la relación de actividad citotóxica versus actividad tóxica para cada uno de los derivados de pirazolina.

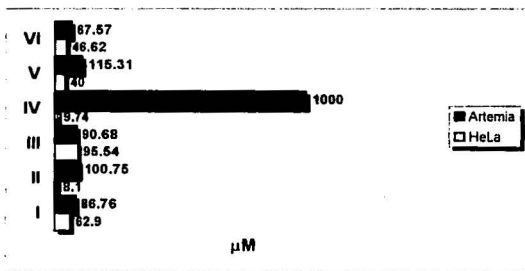


Figura III. Comparación de las CI₅₀ de cada uno de los compuestos en la línea celular HeLa y CL₅₀ en *Artemia salina*.

Como se observa en la Figura III, el compuesto IV es el menos tóxico para las artemias y altamente activo sobre la línea HeLa. Los compuestos II y III prácticamente no mostraron diferente actividad tóxica sobre las larvas, pero en las células HeLa, el II resultó más citotóxico.

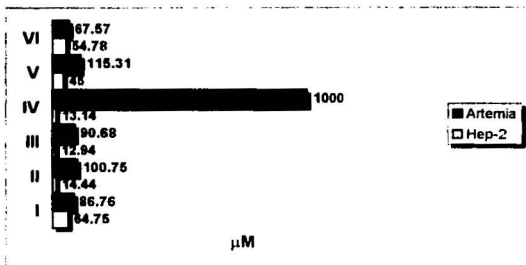


Figura IV. Comparación de las CI_{50} de cada uno de los compuestos en la línea celular HEP-2 y CL_{50} en *Artemia salina*.

En la figura IV se observa que los compuestos II, III y IV mostraron tener la misma susceptibilidad sobre la línea HEP-2 y prácticamente no hubo diferencia entre el compuesto I y el VI en las células, sin embargo el grado de toxicidad tiene un comportamiento semejante en *Artemia salina*.

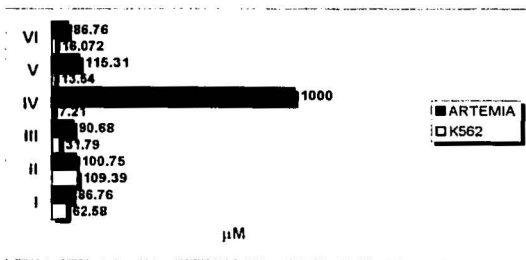


Figura V. Comparación de las CI_{50} de cada uno de los compuestos en la línea celular K- 562 y CL_{50} en *Artemia salina*

En la figura V se observa que el compuesto de mayor citotoxicidad fue el IV pero prácticamente no produjo toxicidad en las larvas; tuvo además una notable selectividad sobre esta línea. El compuesto II mostró un grado de toxicidad y

citotoxicidad cercanos, sin embargo, fue el menos activo sobre la línea de leucemia.

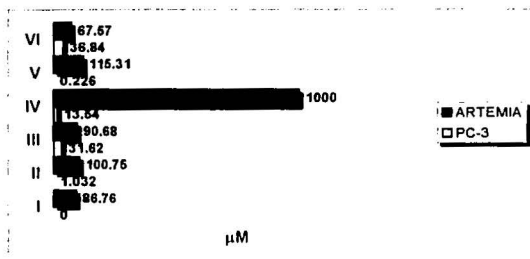


Figura VI. Comparación de las CI₅₀ de cada uno de los compuestos en la línea celular en PC-3 y CL₅₀ en *Artemia salina*.

Exceptuando al compuesto I que no presentó citotoxicidad, todos los derivados de pirazolina tuvieron actividad citotóxica importante sobre la línea celular PC-3, siendo más notorio para los compuestos II y V. Los compuestos III y VI tuvieron una citotoxicidad similar para la línea de cáncer de próstata. La toxicidad que presentaron en las larvas de *Artemia* es semejante en la mayoría de los compuestos excepto el VI que fue más tóxico y IV que carece de actividad (Figura VI).

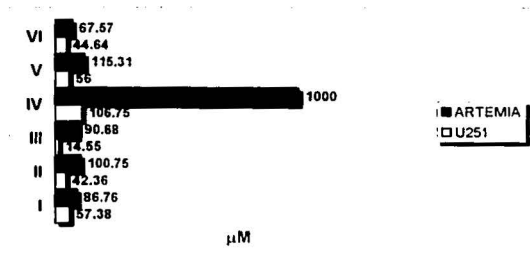


Figura VII. Comparación de las CI₅₀ de cada uno de los compuestos en la línea celular U251 y CL₅₀ en *Artemia salina*.

Aparentemente al ir adicionando más grupos funcionales a la molécula precursora (I), la presencia del ditiolan (II) y el pirazol (III) aumenta la potencia citotóxica. El sustituyente m-NO₂ (IV) reduce la potencia citotóxica y tóxica, en cambio, la presencia de los halógenos proporciona un incremento en ambos sistemas. Esto sugiere que los derivados de pirazolina poseen selectividad sobre células gliales del SNC (Figura VII).

En la Tabla 4 se muestran los coeficientes de correlación entre los valores de CI₅₀ de cada una de las líneas celulares comparada con la CL₅₀ obtenida en la prueba de toxicidad en *Artemia*. Cuando el valor de P es mayor a 0.05 no existe una relación significativa entre las dos variables como ocurrió en cuatro de las líneas. El par de variables con coeficiente de correlación positiva y valor de P por debajo de 0.05 indica que hay una tendencia de ambas a incrementar como lo mostraron los valores de la línea U251 y *Artemia salina* que fueron de 0.863 y 0.0267 respectivamente.

Línea celular	Coefficiente de correlación	Valor de P
HeLa	-0.445	0.377
Hep-2	-0.554	0.254
K562	-0.4028	0.428
PC-3	-0.0404	0.939
U251	0.8635	0.026

Tabla 4. Coeficientes de correlación de Pearson entre la CI₅₀ de cada una de las líneas celulares y CL₅₀ en *Artemia salina*

RESULTADOS ANTIINFLAMACIÓN

En la Tabla 5 se muestra el efecto antiinflamatorio que presentaron los derivados de pirazolina sobre el edema inducido con TPA en la oreja de ratón. Los compuestos I, II, III y VI resultaron ser los menos activos como agentes antiinflamatorios.

COMPUESTO 0.5mg/oreja	% DE INHIBICIÓN
I	12.01
II	23.18
III	22.99
IV	75.82
V	63.92
VI	15.50
INDOMETACINA	60.50

Tabla 5. Efecto de los compuestos y fármaco de referencia sobre la inflamación en oreja de ratón inducida con TPA.

Aparentemente la presencia del ditiolan y el grupo pirazol mejora dicha actividad respecto al compuesto que carece de ellos. La presencia del grupo nitro en posición *meta* aumenta el efecto antiinflamatorio de manera significativa siendo superior a la de la Indometacina (fármaco de referencia). El hecho de sustituir el Br (V) por el Cl (VI) reduce de manera importante la actividad antiflogística. El porcentaje de inhibición del edema dado por el compuesto V es comparable con el de Indometacina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO

COMPUESTOS 100 μ M	CANTIDAD DE NITRITOS 24 horas	CANTIDAD DE NITRITOS 48 horas
I	0.555	0.664
II	0.593	0.663
III	0.602	0.617
IV	0.615	0.622
V	0.578	0.570
VI	0.581	0.622
Aminoguanidina	0.512	-----

Tabla 6. Efecto de los derivados de Pirazolina y fármaco de referencia (L-aminoguanidina) sobre la producción de NO en macrófagos murinos.

El estímulo en la producción de óxido nítrico en la línea de macrófagos IC-21 fue muy baja como se puede observar en la Tabla 6. Se realizó la prueba tanto a 24 como a 48 hrs. para observar el comportamiento y efectivamente el estímulo se incrementó ligeramente, la respuesta en ambos tiempos es equivalente. Tal parece que el radical *p*-Br en el compuesto V y *p*-Cl en el VI no proporcionan diferencia alguna para esta prueba. El derivado de pirazolina que estimula la mayor producción de NO es el que presenta el sustituyente *m*-NO₂ (IV), supera a los compuestos que no tienen el grupo pirazol y a los que lo tienen, pero que además poseen algún otro sustituyente en el fenil, incluso también supera al fármaco de referencia L-Aminoguanidina. La baja actividad tanto de los derivados de pirazolina, como del fármaco de referencia indica que el efecto no se está manifestando adecuadamente en esta prueba tal vez por parte de los macrófagos, pues si así fuera, al menos la Aminoguanidina habría tenido una mayor actividad lo cual no ocurrió.

RESULTADOS DEL EFECTO ANTIOXIDANTE

En esta prueba ninguno de los derivados de pirazolina tuvo actividad importante como reductor del DPPH; en los compuestos I, II y VI, el porcentaje de reducción fue de cero, mientras que los compuestos III, IV y V mostraron baja capacidad antioxidante. El grupo pirazol añadido a partir del compuesto III proporcionó este ligero incremento en la capacidad atrapadora de radicales libres con respecto a los compuestos I y II que no lo presentan. En el compuesto VI donde el sustituyente es *p*-Cl, la actividad antioxidante no se presentó. Esta falta de actividad reductora puede atribuirse directamente a los compuestos, ya que los fármacos empleados como referencia: α -tocoferol y Quercetina sí tuvieron actividad considerable con un porcentaje de reducción de DPPH de 62.95 y 63.27 respectivamente.

COMPUESTO 30 μ M	% DE REDUCCIÓN DE DPPH 100 μ M
I	0
II	0
III	8.38
IV	7.09
V	8.16
VI	0
α -TOCOFEROL	62.95
QUERCETINA	63.27

Tabla 8. Porcentaje de reducción del Difenil-p-picrilhidrazil (100 μ M) por efecto de los compuestos evaluados y los respectivos fármacos de referencia.

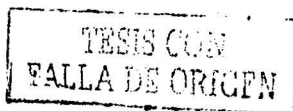
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En el presente trabajo se reporta que diferentes derivados de pirazolina poseen actividad citotóxica y antiinflamatoria la cual está relacionada con su estructura química. En primer lugar se evaluó la actividad tóxica que poseen estos compuestos en un ensayo *in vivo* en el que se usa como organismo a larvas de *Artemia salina*. Este ensayo proporciona la evidencia de la presencia y/o ausencia de actividad biológica de un compuesto (Solis, 1993). Así, partiendo del precursor de los compuestos sintetizados (II) [Trans-4-fenil-1-(1,3-ditioalan-2-iliden)-3-buten-2-ona], éste presentó actividad tóxica sobre estos organismos, sin embargo, cuando esta molécula carecía del grupo tiol (benciliden-acetona)(I) la toxicidad era mayor por lo que se sugiere que los átomos de azufre reducen la toxicidad. A partir del compuesto II al cual se le adicionó hidrazina (H_2N-NH_2) se sintetizó el compuesto III con la presencia de un pirazol; al adicionar a éste un grupo nitro en posición *meta* (IV), o bien átomos de Br y Cl en posición *para* se formaron los compuestos V y VI respectivamente.

Solis y colaboradores (Solis, 1993) han propuesto que la concentración máxima de un compuesto de prueba para ser evaluado en las artemias es de $1000\mu M$, además, Mata ha sugerido que los compuestos se consideran bioactivos cuando la CL_{50} de estos es inferior a $200\mu g/ml$ (Mata, 2000). En base a este criterio se puede observar que con excepción del compuesto IV, todos los derivados de pirazolina fueron bioactivos. Como se mostró en la Tabla 1. La presencia del grupo nitro produjo una pérdida de la toxicidad de la molécula; en cambio, la presencia del bromo en el compuesto V la redujo, mientras que el cloro en el compuesto VI aumentó notablemente la toxicidad.

De acuerdo con el criterio que establece el Instituto Nacional del Cáncer de los Estados Unidos, para que un compuesto puro se considere citotóxico debe tener una CI_{50} menor o igual a $100\mu M$ puesto que concentraciones mayores probablemente produzcan efecto de saturación del sistema más que un efecto



citotóxico. Así, sólo los compuestos II y IV en las líneas K562 y U251 respectivamente rebasaron discretamente esta concentración pero, en general, todos los compuestos fueron citotóxicos y en algunos casos selectivos sobre una línea celular en particular (Tabla 3). Los compuestos II y IV mostraron ser selectivos y mejores citotóxicos sobre las líneas HeLa y HEP-2, sin embargo, en la línea de leucemia el compuesto IV fue el más selectivo y potente, mientras el II redujo de manera importante la citotoxicidad pero la incrementó en PC-3.

En la línea de cáncer de SNC, el compuesto IV resultó ser menos citotóxico a diferencia de lo que se observó con las artemias donde careció de toxicidad, pero es claro que el grupo nitro fue importante para la actividad citotóxica.

Tanto el compuesto II como el V mostraron una importante actividad citotóxica sobre la línea PC-3 y el grado de toxicidad en las artemias fueron muy parecidos.

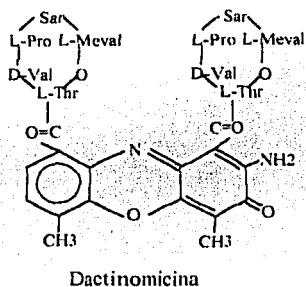
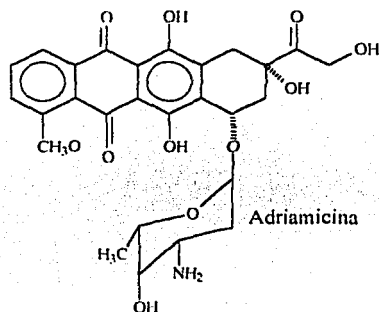
Los derivados con Br y Cl (V y VI respectivamente) prácticamente no difirieron de manera importante en la actividad citotóxica excepto para la línea de próstata donde el compuesto V fue altamente selectivo.

Como parte de los objetivos era correlacionar el grado de toxicidad de los derivados de pirazolina y su capacidad para causar citotoxicidad en líneas celulares cancerosas, fue necesario evaluar la toxicidad que tienen los fármacos antitumorales de referencia en el bioensayo con *Artemia salina*. Como se muestra en la Tabla 2, la Dactinomicina resultó ser el fármaco más tóxico en las larvas siendo al menos 3000 veces más potente que el resto de los mismos, en cambio el 5-fluorouracilo no produjo letalidad en dichos organismos.

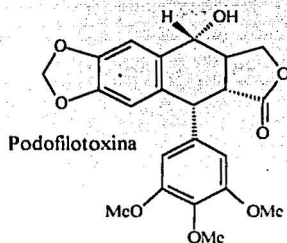
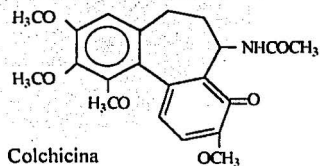
Al comparar la actividad tóxica y citotóxica de los fármacos de referencia y los derivados de pirazolina se hizo el siguiente análisis. La Dactinomicina fue el fármaco más activo en ambos sistemas biológicos, mostrando mayor selectividad citotóxica sobre las líneas celulares de leucemia (K562), próstata (PC-3) y células gliales (U251). La actividad de este fármaco se explica porque tiene la capacidad de intercalarse en el DNA formando un complejo estable y, por ende, inhibe su síntesis. La Adriamicina, fármaco que también se intercala en el DNA presentó



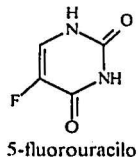
menor grado de actividad en ambos sistemas pero muestra selectividad sobre la línea U251. A diferencia de la Dactinomicina, de la que se sabe que forma un complejo estable con el DNA e inhibe su síntesis por el rompimiento de la cadena, la Adriamicina también genera radicales libres y esto podría explicar en parte la diferencia citotóxica de ambos fármacos (Essential Drugs, 1994. Arcamone, 1981).



La Podofilotoxina resultó ser selectiva sobre la línea celular de próstata mientras que el sistema *in vivo* mostró ser más sensible a este fármaco que el sistema *in vitro*. La toxicidad en las artemias causada por Colchicina fue siete veces menor a la producida por Podofilotoxina y en las líneas celulares mostró mayor potencia mostrando mayor selectividad para las líneas HEP-2 y PC-3. Estos dos fármacos son agentes que interrumpen la división celular desorganizando el huso mitótico y se ha reportado que al fijarse a proteínas de los microtúbulos provocan la disolución de éstos interrumpiendo la metafase y, por ende, causa muerte celular (Bowman, 1984. Lorenzo-Velazquez, 1987). Estas diferencias entre Colchicina y Podofilotoxina no pueden ser explicadas fácilmente porque ambos interrumpen la división celular



En cuanto a los dos fármacos restantes, la 6-mercaptopurina y el 5-fluorouracilo son antimetabolitos pero el primero, resultó más tóxico que el segundo en las artemias. Parte del efecto tóxico y citotóxico de la 6-mercaptopurina podría explicarse debido a que interfiere con la biosíntesis de purina al inhibir el primer paso de ésta y por bloquear la conversión de ácido inosínico a ácido adenílico o guanílico. Se podría explicar la carencia de actividad del 5-fluorouracilo para matar a las artemias basándose en su mecanismo de acción, se ha reportado que *in vivo* este fármaco puede ser convertido a fluorouridina monofosfato (FUMP) el cual es un metabolito activo. Esta FUMP se incorpora al RNA inhibiendo su procesamiento y función, los metabolitos de nucleótidos trifosforilados son incorporados en el DNA y se reporta que esto puede también estar involucrado en el efecto citotóxico del fármaco ya que el 5-fluorouracilo es conocido por esta capacidad (Neal, 1993. SIGMA, 1999. A.M.A., 1986). La potencia de la 6-mercaptopurina como agente citotóxico no fue tan relevante como el resto de los fármacos pero sí mostró selectividad hacia las líneas HeLa y HEp-2.



La baja toxicidad de estos fármacos sobre las larvas es explicable porque el metabolismo de las purinas es marcadamente distinto en células de mamífero y al ser estos agentes análogos de las bases nucleicas, es posible que la activación intracelular que ocurre en el hombre no puede tener lugar en las larvas.

Como se ha explicado anteriormente, en el sistema *in vitro* los valores de concentración efectiva son menores que en el sistema *in vivo* porque las moléculas están directamente en contacto con las células y dependiendo de sus propiedades lipofílicas se facilita o no permeabilidad en ellas.

El efecto tóxico mostrado por estas moléculas pudiera ser directo o ser dependiente de algún metabolito del fármaco y las artemias pudieron ser afectadas porque el compuesto permaneció en su forma original alcanzando concentraciones tóxicas o porque fue metabolizado en otro producto.

Estos resultados mostraron que el bioensayo con las larvas de *Artemia* es un sistema sensible para reconocer agentes citotóxicos con diferente mecanismo de acción.

Desafortunadamente no es posible interpretar el modo de acción de los compuestos en términos estrictamente biológicos y esto hace formular la pregunta de ¿porqué unas moléculas son tóxicas para un sistema y no para otro?; pero la toxicidad y citotoxicidad selectiva se encuentra asociada con la diferencia en el metabolismo del fármaco, el cual depende de su naturaleza química y la capacidad metabólica de los tejidos donde interactúan.

Esta prueba forma parte de los primeros pasos en el desarrollo de la quimioprevención del cáncer, para posteriormente pasar a modelos *in vivo*, lo cual constituye un continuo progreso en el descubrimiento de agentes preventivos eficientes pues considero que, aunque muy general, el estudio es amplio por haber abarcado varias líneas celulares de distintos carcinomas.

Por otra parte, aunque no está bien definida la acción del TPA en la inducción de inflamación por aplicación tópica, se tienen evidencias de que incrementa los niveles de eicosanoides formados a partir del ácido araquidónico los cuales están asociados con el edema (Young, 1983).

De los derivados de pirazolina evaluados en este trabajo los que presentaron mayor porcentaje de inhibición del edema a una concentración de 0.5mg por oreja fueron el IV y V que presentan los grupos *m*-NO₂ y *p*-Br, respectivamente, inclusive superando la actividad producida por la Indometacina.

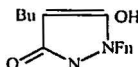
El pirazol tiene una estructura muy semejante a la del imidazol, y ambos son conocidos por sus propiedades antipiréticas; el pirazol y sus derivados se encuentran muy poco en la naturaleza, pero existen algunos NSAID generalmente llamados pirazonas como la fenilbutazona, oxifenbutazona, antipirina, aminopirina, butazolidina y dipirona, cuyos efectos antiinflamatorios son semejantes a los de los salicilatos pero poseen toxicidad en grado notable por lo que su utilidad es limitada (Goodman & Gilman, 1996).



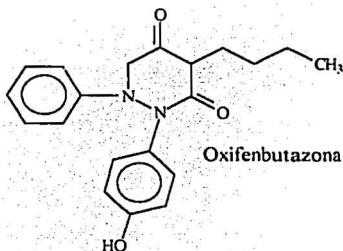
Pirazol



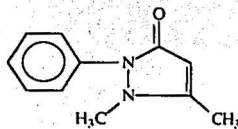
Imidazol



Butazolidina



Oxifenbutazona

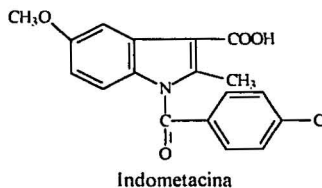
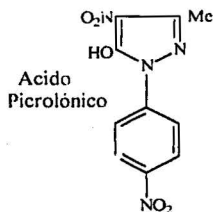


Antipirina

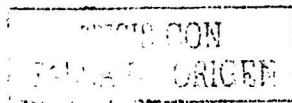
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Otro compuesto con un grupo nitrofenil unido a un pirazol es el ácido picrolónico, pero no se le reporta actividad sobre sistemas biológicos. El derivado IV, con un grupo nitro en posición *meta*, proporcionó a la molécula mayor capacidad antiinflamatoria, sin embargo, no se puede deducir que es precisamente esta parte de la molécula lo que produjo el efecto antiinflamatorio, pero es importante hacer notar que las evaluaciones *in vivo* e *in vitro* mostraron que el grupo nitro es importante para reducir la actividad inflamatoria.

Con respecto al halógeno Bromo, tampoco se conocen muchos fármacos que lo contengan y los reportados se refieren a una acción agonista dopaminérgica (Acheson, 1981).

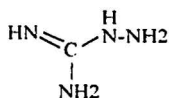


La Indometacina por su parte es un potente inhibidor de la prostaglandina sintasa, así como también anula la movilidad de los polimorfonucleares (Tsurufuji, 1980); el valor que obtuvo como antiinflamatorio es equivalente al dado por el compuesto V, cuyos porcentajes de inhibición del edema inducido con TPA en oreja de ratón fueron de 60.50 y 63.92 respectivamente, por lo que se podría pensar que posiblemente éste tenga también actividad sobre dichas enzimas. La Indometacina y el derivado de pirazolina V no tienen semejanzas estructurales pero es claro que la actividad antiinflamatoria fue proporcionada por el halógeno Br pues el derivado de pirazolina VI, a pesar de poseer el halógeno Cloro en la misma posición (*para*) como la molécula de Indometacina, no tuvo el mismo efecto. Estos resultados hacen notar que no son sólo los grupos sino también el arreglo quien está proporcionando la actividad antiinflamatoria.



Aunque no se pretendió relacionar esta prueba con la de toxicidad en *Artemia salina* es curiosa la observación de que los derivados de pirazolina menos tóxicos en las larvas resultaron ser más eficientes como antiinflamatorios.

En la prueba con macrófagos murinos, debido a la participación del NO en procesos inflamatorios, se esperaba actividad de los compuestos IV y V, los cuales mostraron ser antiinflamatorios en la prueba del TPA. Debido a que no se observó una representativa inhibición en la producción de NO con la incubación de las placas con macrófagos durante 24 se extendió el tiempo a 48 hrs. Los valores fueron muy bajos e incluso también el del fármaco de referencia Aminoguanidina y no se consideraron confiables porque el sistema no ha sido completamente validado, así que no se puede afirmar o negar la capacidad de los compuestos para inhibir la producción de NO.



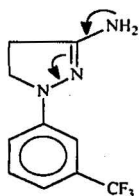
Aminoguanidina

la pasiva producción de NO de los macrófagos puede ser un indicador de los resultados que se obtuvieron en este experimento, ya que los macrófagos son células altamente sensibles a los solventes etanol y DMSO.

Inflamación, óxido nítrico y radicales libres son términos estrechamente relacionados; ya previamente se mencionó la producción de NO por los macrófagos, endotelio y monocitos; pues bien, este NO reacciona con el anión superóxido en solución acuosa para formar peroxinitrito. Bajo condiciones fisiológicas, el peroxinitrito es fácilmente fotonado para formar su ácido y, después de esto, el ácido se descompone en el radical hidroxilo y es precisamente con quien reacciona el 3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona (MCI-186) (Kawai, 1997).

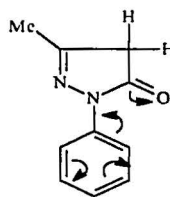
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Previamente también se ha sugerido que este compuesto actúa en el edema inducido por ácido araquidónico (AA) en isquemia cerebral, especialmente en el sistema de la lipooxigenasa en la cascada del AA (Watanabe, 1994). La capacidad como atrapadores de radicales libres puede estar dada por el grupo carbonilo en el compuesto MCI-186, un Hidrógeno del grupo amino en el compuesto BW 755C y la presencia del doble enlace en ambas estructuras, pues hacen posible el fenómeno de resonancia permitiéndoles la interacción con el radical DPPH generando así un radical estable.



BW755C

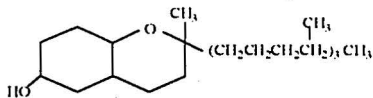
3-amino-1-[m-trifluorometil]-fenil-2-pirazolina



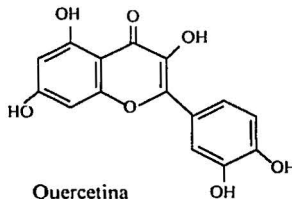
MCI-186

3-metil-1-fenil-2-pirazolin-5-ona

La estructura de los compuestos I y II, así como los derivados de pirazolina III-VI, no permitieron éste fenómeno y, por ende, no fueron atrapadores de radicales libres. Los fármacos de referencia α -tocoferol y Quercetina tuvieron porcentajes de reducción del DPPH más considerables de 62.95 y 63.27% respectivamente.



Alfa tocoferol



Quercetina

Es importante también hacer énfasis en que esta prueba determina la capacidad antioxidante por medio de una reacción (colorida) en donde se mide la Densidad Óptica del nuevo complejo formado y no se puede conocer el efecto que las moléculas I-VI tienen en un sistema biológico como las pruebas en que determinaron esta capacidad de los compuestos MCI-186 y BW 755C.

Es interesante observar que, a pesar de tener el grupo funcional pirazolina considerado como uno de los responsables de la actividad, cada compuesto tiene un efecto distinto, además, las estructuras de las moléculas I-VI son totalmente diferentes a las de los principales derivados de pirazolina ya conocidos y estudiados, MCI-186 y BW755C pero son éstos de los pocos compuestos similares encontrados, lo que incrementa la posibilidad de que los compuestos III-VI sean de nueva síntesis y por ende, estos resultados, los primeros reportes de su actividad sobre sistemas biológicos ya que manifestaron actividad en tres de las pruebas realizadas.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA 39**

CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados obtenidos pueden concluirse los siguientes puntos:

1.

- a) No existe correlación significativa entre los métodos para evaluar toxicidad *in vivo* con *Artemia salina* y citotoxicidad *in vitro* con las líneas celulares HeLa, HEP-2, PC-3 y K562.
- b) La toxicidad de los derivados de pirazolina en *Artemia salina* y la citotoxicidad en la línea celular U251 se encuentran relacionados positivamente con un coeficiente de correlación de 0.863.
- c) Los compuestos que son selectivos como inhibidores del crecimiento celular pueden no serlo en sistemas celulares más organizados como son las artemias debido a los factores que presentan como absorción y metabolismo.

2. Tomando como base al compuesto precursor de los derivados de pirazolina (II)

- a) La presencia del grupo pirazol y el acetilo que lo estabiliza proporcionan mayor actividad tóxica sobre las larvas de *Artemia salina*.
- b) El grupo nitro en posición *meta* reduce significativamente la toxicidad de la molécula 1-Acetil-5-(4-nitrofenil)-3-(1,3-ditiolan-2-iliden)-1H-4,5-dihidropirazol sobre las larvas.
- c) El halógeno Bromo en posición *para* proporciona actividad tóxica a la molécula 1-Acetil-5-(4-bromofenil)-3-(1,3-ditiolan-2-iliden)-1H-4,5-dihidropirazol pero en menor grado que el halógeno Cl.
- d) La presencia del halógeno Cloro en posición *para* es quien proporciona la mayor toxicidad con respecto al resto de los derivados de pirazolina y precursores evaluados debido probablemente a su electronegatividad.

- e) La CL_{50} del benciliden acetona I, del precursor II y de los derivados de pirazolina III-VI evaluados fue más alta que la de los fármacos de referencia porque se requirió $10^4 - 10^6$ veces más cantidad de estos compuestos para causar la muerte del 50% de las larvas.

3. La mayoría de las moléculas tuvieron actividad citotóxica sobre cultivos celulares de células cancerosas, pero con variable selectividad y potencia y considerando la adición de sustituyentes:

- a) El compuesto I Trans-4-fenil-3-buten-2-ona no resultó citotóxico para la línea celular PC-3.
- b) El precursor II fue selectivo contra la línea PC-3 pero no hacia K562; mientras que en las líneas HeLa y HEp-2 mostró mayor selectividad con CI_{50} de 8.1 y 14.44 μ M respectivamente.
- c) Al ser el compuesto III menos citotóxico que el compuesto que sólo presenta el grupo ditiolan se puede inferir que el complejo pirazol-acetilo reduce el potencial citotóxico en las líneas HeLa, HEp-2 y PC-3 pero lo incrementó en K562 y U251.
- d) El grupo *m*-NO₂ del compuesto IV incrementó la citotoxicidad en la mayoría de las líneas excepto U251, línea donde fue muy baja su actividad.
- e) El halógeno *p*-Br hizo a la molécula más citotóxica y selectiva para la línea PC-3.
- f) La presencia del *p*-Cl no proporcionó diferente citotoxicidad para las líneas HeLa, HEp-2, PC-3 y U251, pero hizo a la molécula selectiva para la línea K562.
- g) La CI_{50} de benciliden-acetona, del precursor y de los derivados de pirazolina evaluados fue más alta que la de los fármacos de referencia, o sea que se requiere mayor cantidad de estos compuestos para inhibir el crecimiento del 50% de las células tumorales.

4. Los compuestos IV y V fueron capaces de reducir el edema inducido con TPA en la oreja de ratones en un 75.82 y 63.92% respectivamente, incluso superando ligeramente al fármaco de referencia Indometacina cuyo porcentaje de inhibición del edema fue de 60.5.

5. Los resultados de los derivados de pirazolina como inhibidores de la producción de NO en macrófagos murinos de la línea IC21 no son confiables debido a que la técnica aún no ha sido validada.

6.

- a) Los derivados de pirazolina en una concentración de 31 μ M no fueron capaces de atrapar al radical libre DPPH.
- b) La prueba de DPPH no está destinada a conocer la actividad antioxidante sobre sistemas biológicos, pero en términos químicos es poco probable que los derivados de pirazolina III-VI puedan atrapar radicales libres.

7. No fue posible establecer una correlación entre la actividad antiinflamatoria en los modelos *in vivo* e *in vitro* debido a que los resultados obtenidos en la prueba con macrófagos murinos no fueron confiables.

8. Como se ve, el presente trabajo se ha enfocado a la primera etapa en el campo de la investigación farmacológica, que es el de la síntesis de compuestos con probable actividad biológica y las pruebas preliminares correspondientes.

RECOMENDACIONES PARA TRABAJOS POSTERIORES

*Con las pruebas realizadas se observa que sí es posible sintetizar derivados de pirazolina con actividad biológica siempre y cuando mantengan el grupo y los sustituyentes que están proporcionando dicha actividad, por lo que se sugiere sintetizar las sales para mejorar la solubilidad en agua, lo que evitaría alguna interferencia causada por los disolventes.

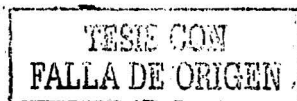
*Es necesario realizar pruebas que indiquen el comportamiento de estos derivados de pirazolina para conocer si son transportados en la célula u organismo, si es metabolizado y en qué metabolitos se transforma, así como algunos estudios que busquen la relación estructura-actividad ya que serían de utilidad en la síntesis de nuevos compuestos derivados de los ya estudiados.

*Se sugiere estandarizar la prueba de inhibición de la producción de óxido nítrico en macrófagos murinos de la línea IC21 proporcionando el tiempo necesario para su estabilización y realizando continuamente curvas de crecimiento, así como también observar su desarrollo con la intervención de distintos disolventes.

*Continuar o complementar el presente trabajo probando el efecto inhibitor de la actividad de la COX-2 de los diferentes derivados de la pirazolina.

REFERENCIAS

- Acheson, R.M.** 1981. *Química Heterocíclica*. Publicaciones Cultural, México, D.F.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J. D.** 1994. *Biología molecular de la célula*. 2ª Ed. Omega, Barcelona.
- Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., Boyd, M.R.** 1988. Feasibility of Drug screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Research* (48): 589-601
- A.M.A. American Medical Association.** 1986. *Drug evaluation*. 6th Ed. Saunders Company, Phyladelphia. U.S.A.
- Arcamone, F.** 1981. *Doxorrubicin, Anticancer Antibiotics*. Academic Press, New York.
- Balz Frei.** 1994. *Natural Antioxidants in Human Health and Disease*. Academic Press. California.
- Bowman, W.C. y Rand, M.J.** 1984. *Farmacología, bases bioquímicas y patológicas*. 2ª Ed. Interamericana, México.
- Carlson, R.P., O'Neill-Davis, L., Chang, J., Lewis, A.J.** 1985. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. *Agents and Actions* 17(2):197-204
- Castro, B.T., Gallardo, R. C.** 1993. *Cuadernos CBS 31. Artemia sp.* Coordinación de Educación Continua y Publicaciones CBS. UAM Xochimilco, México, D.F.
- Cirino Giuseppe.** 1998. Multiple Controls in Inflammation. *Biochemical Pharmacology* 55: 105-111
- Colegate, S.M., Molyneux, R.J.** 1993. *Bioactive Natural Products*. CRC. Boca Raton, Florida.
- Cotelle, N., Bernier, J-L., Catteau, J-P., Pommery, J., Wallet, J-C. and Gaydou, E. M.** 1996. Antioxidant Properties of Hidroxy-Flavones. *Free Radical Biology & Medicine* 20 (1): 35-43.
- Davidson, M.D., Henry, J.B.** 1979. *Todd-Sanford. Diagnóstico clínico por el laboratorio*. 6ª Ed. Salvat, Barcelona.
- De Robertis, E.D.P., De Robertis, E.M.F.** 1988. *Biología celular y molecular*. El Ateneo, Buenos Aires.
- De Young, L.M., Kheifets, J.B., Young, J.M.** 1989. Edema and cell infiltration in the phorbol ester-treated mouse ear are temporally separate and can be differentially modulated by pharmacologic agents. *Agents and Actions* 26(3-4):335-41
- Dexter, R.W.** 1959. *Anostraca En Edmondson. Ward an Whipple Freshwater Biology*. Wiley, New York.



Encyclopedia of Chemical Technology. 1982. 3rd Ed. Volume 19. John Wiley & Sons. Inc. U.S.A.

Essential Drugs for Cancer Chemotherapy. 1994. Bulletin of the World Health Organisation Mondiale de la Santé 72: 693-698

Goodman & Gilman, A., Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W. 1996. *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* Volumen 1. 9^a Ed. Mc Graw Hill-Interamericana, México.

Green, L.C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S. and Tannenbaum, S. R. 1982. [¹⁵N] Nitrate in Biological Fluids. *Analytical biochemistry* 126: 131-138

Gülhan Turan-Zitouni, Pierre Chevallet, Fatma S. Kiliç, Kevsler Erol. 2000. Synthesis of some thiazolyl-pyrazoline derivatives and preliminary investigation of their hypotensive activity. *European Journal of Medicin Chemistry* 35: 635-641

Higgs, G.A., Eakins, K.E., Mugridge, K.G., Moncada, S. y Vane, J.R. 1980. The effects of non-steroid anti-inflammatory drugs on leukocyte migration in carragenin-induced inflammation. *European Journal of Pharmacology* 66: 81-86

Higgs, G.A., Flower, R.J., Vane, J.R. 1979. A new approach to anti-inflammatory drugs. *Biochemical Pharmacology* 28: 1959-1961

Ialenti, A., Ianaro, A., Moncada, S., Di Rosa, M. 1992. Modulation of Acute Inflammation by Endogenous Nitric Oxide. *European Journal of Pharmacology* 211: 177-182

Kawai, H., Nakai, H., Suga, M., Yuki, S., Watanabe, T., Saito, K. 1997. Effects of a Novel Free radical Scavenger, MCI-186, on Ischemic Brain Damage in the Rat Distal Middle Cerebral Artery Occlusion Model. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 281: 921-927

King, R.J.B. 1997. *Cancer Biology.* Longman. Singapoore.

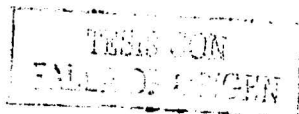
Litter, M. 1988. *Farmacología experimental y clínica.* 7^a Ed. El Ateneo, Buenos Aires.

Loeckie L. de Zwart, Meerman, J. H. N., Commandeur, J. N. M., Vermeulen, N. P. E. 1999. Biomarkers of Free Radical Damage Applications In Experimental Animals and in Humans. *Free Radical Biology & Medicine* 26 (112):202-226

Lorenzo-Velazquez, B. 1987. *Farmacología y su proyección a la clínica.* 15^a Ed. Editorial Oteo, Madrid

Lyons, C.R. 1995. The Role of Nitric Oxide in Inflammation. *Advances in Immunology.* Vol. 60. pp. 323-371.

Mata E. R., Rivero C. J. 2000. *Curso teórico de farmacognosia.* UNAM. Fac. de Química. México, D.F.



Meyer, B.N., Ferrigni, N.R., Putnam, J.E., Jacobsen, L.B., Nichols, D.E. y McLaughlin, J.L. 1982. Brine Shrimp- A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. *Planta Medica* 45: 31-34

Miles, A., Wink, D., Cook, J. y Grisham, M. 1996. Determination of Nitric Oxide Using Fluorescence Spectroscopy. *Methods in Enzymology*. Vol. 268

Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., Gray-Goodrich, M., Campbell, H., Mayo, J., Boyd, M. 1991. Feasibility of a High-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines. *Journal of the National Cancer Institute* 83 (11): 757-766

Neal, M. J. 1993. *Medical Pharmacology at a Glance*. 3ª Ed. Blackwell Science, London.

Nims, R.W., Cook, J.C., Krishna, M.C., Christodoulou, D., Poore, C.M.B, Miles, A.M., Grisham, M.B. y Wink, D.A. 1996. Colorimetric Assays for Nitric Oxide and Nitrogen Oxide Species Formed from Nitric Oxide Stock Solutions and Donor Compounds. *Methods in Enzymology* 268: 12-31

Payá, M., Ferrándiz, M.L., Sanz, M.J., Bustos, G., Blasco, R., Ríos, J.L., Alcaraz, M.J. 1993. Study of the antioedema Activity of some Seaweed and Sponge Extracts from the Mediterranean Coast in Mice. *Phytotherapy Research* 7: 159-162

Robak, J. y Duniec, Z. 1982. The influence of some 3-amino-2-pyrazoline derivatives on ciclooxigenase and lipoxidase activities. *Biochemical Pharmacology* 31 (11): 1955-1959

Roberfroid, M., Calderon, P.B. 1995. *Free radicals and oxidation phenomena in biological system*. Marcel Dekker. U.S.A.

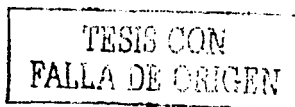
Ono, S., Okazaki, K., Sakurai, M., Inoue, Y. 1997. Density Functional Study of the Radical Reactions of 3-Methyl-1-phenyl-2-pyrazolin-5-one (MCI-186): Implication for the Biological Function of MCI-186 as a Highly Potent Antioxidative Radical Scavenger. *Journal of physicochemistry* 101: 3769-3775

Sautebin, L., Ialenti, A., Ianaro, A., Di Rosa, M. 1995. Modulation by Nitric Oxide of Prostaglandin Biosynthesis in the Rat. *British Journal of Pharmacology*. Vol. 114. pp. 323-328

SIGMA. 1999. *Reactivos y productos químicos*.

Solis, P.N., Wright, C.W., Anderson, M.M., Gupta, M.P., Phillipson, J.D. 1993. A Microwell Cytotoxicity Assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). *Planta Medica* 59: 250-252

Sorgeloos, P., Bengston, D.A., Declair, W.Y., Jaspers, E. 1987. *Artemia, Research and its Applications*. Universa press. Wetteren, Belgium. Vol. 1-3



Schulz, K., Kerber, S.S. and Kelm, M. 1999. Reevaluation of the Griess Method for Determining NO/NO₂ in Aqueous and Protein-Containing Samples. Nitric Oxide. *Biology and Chemistry* 3 (3): 225-234

Thullier A., J-Vialle, 1959. *Bulletin Society. Chim. France.*

Tsurufuji, S., Surgio, K., Takemasa, F., Yoshizawa, S. 1980. Blockade by Antigluco-corticoids, Actinomycin D and Cycloheximide of Anti-Inflammatory Action of Dexamethasone against bradykinin. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 212 (2): 225-231

Waffo, T.P., Fauconneau, B., Deffieux, G., Huguette, F., Vercauteren, J., Mèrillon, J.-M. 1998. Isolation, Identification, and Antioxidant Activity of Three Stilbene Glucosides Newly Extracted from *Vitis vinifera* Cell Cultures. *J Nat Prod* 61: 655-657

Watanabe, T., Egawa, M. 1994. Effects of antistroke agent MCI-186 on cerebral arachidonate cascade. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 271 (3): 1624-1629

Wink, D.A., Grisham, M.B., Mitchell, J.B., Ford, P.C. 1996. Direct and Indirect Effects of Nitric Oxide in Chemical Reactions Relevant to Biology. *Methods in Enzymology.* 268: 12-31

Young, J.M., Bonnie, M.W., Spires, D.A. 1983. Tachyphylaxis in 12-O-Tetradecanoylphorbol Acetate- and Arachidonic Acid-Induced Ear Edema. *The Journal of Investigative Dermatology* 80: 48-52