



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

ESTUDIO GENOTÓXICO MEDIANTE LA PRUEBA DE
MICRONÚCLEOS DEL COMPUESTO TIOMORFOLÍNICO LQM 319.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A:

YURIANA ROCHA ESPINO

ASESORES:

DR. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

DR. ENRIQUE ÁNGELES ANGUIANO

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEXICO 2008.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Huellas en la Arena

(Anónimo)

Una noche en sueños vi
que con Jesús caminaba
junto a la orilla del mar
hajo una luna plateada.

Soñé que veía en los cielos
mi vida representada
en una serie de escenas
que en silencio contemplaba.

Dos pares de firmes huellas
en la arena iban quedando
mientras con Jesús andaba
como amigos conversando.

Miraba atento esas huellas
reflejadas en el cielo
pero algo extraño observé
y sentí gran desconuelo.

Observé que algunas veces
al reparar en las huellas
en vez de ver los dos pares,
veía sólo un par de ellas.

Observaba también yo
que aquel sólo par de huellas
se advertía mayormente
en mis noches sin estrellas.

En las horas de mi vida
llenas de angustia y tristeza
cuando el alma necesita
más consuelo y fortaleza.

Pregunte triste a Jesús:
"¡Señor, Tú no has prometido
que en mis horas de aflicción
siempre andarías conmigo... ?

Pero noto con tristeza
que en medio de mis querellas
cuando más siento el sufrir
veo sólo un par de huellas.

¿Dónde están las otras dos
que indican Tu compañía
cuando la tormenta azota
sin piedad la vida mía ?

Ay, Jesús me contestó:
con ternura y comprensión;
"Escucha bien, hijo mío,
comprendo tu confusión.

Siempre te amé y te amaré,
y en tus horas de dolor
siempre a tu lado estaré
para mostrarte Mi Amor.

Más si ves sólo dos huellas
en la arena al caminar,
y no ves las otras dos
que se debieran notar,
es que en tu hora affigida,
cuando flaquean tus pasos,
no hay huellas de tus pisadas
porque te llevo en Mis brazos".

AGRADECIMIENTOS.

Doy gracias primeramente a Dios por haber creado el amor que siempre me brinda mi Madre, por permitir que el hombre sea perseverante lo cual se refleja en cada uno de los días de mi Padre.

Por haberme dado la oportunidad de crecer, compartir y aprender, junto a mis maravillosos hermanos: Christopher y Everardo.

A su vez agradezco el capricho del destino que me ha permitido compartir alegrías y algunos minutos de silencio con mis grandes amigos y compañeros de escuela en especial a: Daniela, Zayra , Sandra, Erick, Polo, Mario, Aury, Yeny, Orquidea y Flor.

Agradezco en especial a Dr. Enrique Angeles Anguiano y a Dra. Sandra Diaz Barriga por enseñarme que la grandeza del ser humano se cultiva a través de conocimiento; el cual engrandece la capacidad de brindar apoyo y amor a nuevas generaciones.

Por ultimo agradezco a la FESC-1 por formar a personas con grandes valores que nunca dudan en brindar la mano a un compañero como lo son mis amigas químicas: Alis y Mary.

ÍNDICE

Abreviaturas -----	1
Índice de Cuadros, Gráficas y Figuras -----	2-6
Resumen -----	6-7
Marco teórico de la investigación.	
1.- Toxicología genética -----	8-11
2.- Métodos QSAR y SAR-----	12-16
3.- Compuesto tiomorfolínico LQM 319-----	17-22
4.- Ifosfamida-----	23-25
5.- Prueba de Micronúcleos.-----	26-30
Justificación -----	31
Hipótesis -----	32
Objetivos. -----	33
Material y Métodos -----	34-38
Resultados -----	39-43
Discusión -----	42-48
Conclusiones -----	49
Anexo (Formación del Clorhidrato LQM319) -----	50-54
Glosario -----	55-57
Referencias -----	57-64

Abreviaturas.

ADN	Ácido Desoxirribonucleico.
ARN	Acido Ribonucleico.
LDH	Aldehído deshidrogenasa
DE50	Dosis Efectiva 50.
DL50	Dosis Letal 50.
ENC	Eritrocitos Normocrómicos.
EPC	Eritrocitos Policromáticos.
EPC MN	Eritrocitos Policromáticos micronucleados.
FC	Frecuencia Cardiaca.
IFF	Ifosfamida.
QSAR	Relación Estructura-Actividad Cuantitativa. (Quantitative Structure Activity Relationship)
LQM	Laboratorio de Química Medicinal.
MN	Micronúcleos.
PAD	Presión Arterial Distólica.
PAM	Presión Arterial Media.
PAS	Presión Arterial Sistólica.
SAR	Relación Estructura Actividad.
SN	Sustitución nucleofílica.
SSF	Solución Salina Fisiológica.
T0	Toma de muestra antes de la administración.
T24	Toma de muestra 24 hrs post-administración.
T48	Toma de muestra 48 hrs post-administración.
T72	Toma de muestra 72hrs post-administración.
UV	Ultravioleta.

Índice de Cuadros.

Cuadro 1. Fármacos comerciales desarrollados por el método QSAR.-----	17
Cuadro 2 . Porciento de eficacia y potencia de los compuestos tomando como referencia a un inhibidor de la ECA (Captopril) a dosis de 3.0 mg/kg.-----	19
Cuadro 3. Diagrama de flujo.-----	35
Cuadro 4. Distribución y clasificación de los lotes para prueba de micronúcleos.-----	37
Cuadro 5. Promedios de EPCMN/ENC \pm error estándar medio (e.e.), obtenidos a diferentes tiempos de muestreo en los diferentes lotes.-----	41
Cuadro 6. Promedios EPC/1000(EPC+ENC) \pm error estándar medio (e.e.); obtenidos en todas las dosis y diferentes tiempos de muestreo en los diferentes lotes.-----	42

Índice de Gráficas.

Gráfica 1 . % de EPCMN en todos los lotes a los diferentes tiempos y tratamientos Resultados obtenidos mediante el análisis estadístico de ANOVA.-----	41
Gráfica 2 . % EPC en 1000 eritrocitos totales (EPC+ENC) en todos los grupos y tratamientos. Resultados obtenidos mediante el análisis estadístico de ANOVA.-----	43

Índice de Figuras.

Figura 1. Sitios nucleofílicos en el ADN.-----	9
Figura 2. Formas tautoméricas de las cuatro bases comunes de ADN.-----	10
Figura 3. Gas mostaza (bis-(2-cloroetil)sulfano).-----	11
Figura 4. Pasos del método QSAR.-----	15
Figura 5. Molécula de la Changrolina.-----	18
Figura 6. Estructura del LQM319.-----	19
Figura 7 . Mecanismo de degradación general para compuestos heterocíclicos con nitrógeno por <i>M. aurium</i> .-----	20
Figura 8. Sustitución Electrofílica Aromática (Vía base de Mannich) LQM 319.-	21
Figura 9. Sustitución Electrofílica Aromática (vía Directa) LQM319.-----	22
Figura 10. Estructura de la Ifosfamida.-----	23
Figura 11. Mecanismo de unión de la IFF al ADN.-----	25
Figura 12. Metabolismo de la ifosfamida.-----	25
Figura 13. EPCMN en frotis de sangre periférica de ratón.-----	26
Figura 14. Mecanismo de formación de micronúcleos.-----	30
Figura 15. Posibles intermediarios metabólicos del LQM319.-----	47
Figura 16. Clorhidrato LQM319-----	50

RESUMEN

El compuesto tiomorfolínico LQM319 es un miembro de la serie de exploración para la construcción de un modelo QSAR constituido de 17 compuestos sintetizados a partir de la reacción química entre un fenol sustituido (cabeza de serie), un formaldehído, más una molécula de tiomorfolina y/o morfolina . Dichos compuestos mostraron una acción hipotensora arterial; siendo el compuesto LQM319 el que presentó una mejor potencia y eficacia, disminuyó tanto la presión arterial como la frecuencia cardiaca a dosis menores de 0.001mg/Kg y presentó a su vez una DE50 de 0.4111mg/kg, mediante la construcción de curvas dosis efecto en un modelo de presión arterial invasiva en rata Wistar macho anestesiada.

Todo compuesto nuevo con la posibilidad de ser usado como un agente terapéutico debe someterse a un estudio genotóxico, por lo cual en este trabajo se eligió la prueba de micronúcleos *in vivo* para dicho estudio. Se utilizaron ratones machos cepa CD1; ya que al usar un organismo completo se puede evaluar la toxicidad tanto de la sustancia química original como la de los metabolitos que pueden surgir en el proceso de transformación metabólica.

Como parte inicial de este trabajo se realizó la formación del clorhidrato del compuesto LQM319, con el fin de convertirlo en un compuesto soluble en solución salina fisiológica (SSF).

Se determinó la DL50 del clorhidrato, la cual fue de 471.17 mg/Kg.

Se cuantificó la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMN) en 1000 eritrocitos policromáticos (EPC) al igual que el índice de citotoxicidad por la frecuencia de eritrocitos policromáticos en 1000 eritrocitos totales (EPC + ENC).

Los resultados mostraron que el clorhidrato del compuesto LQM319 no aumenta la frecuencia de EPCMN con ninguna de las dosis a los diferentes tiempos estudiados ya que ésta se mantuvo entre valores de 0 y 3 MN que corresponden a los valores basales del control negativo, al igual que sucedió con el captopril.

En relación al parámetro de citotoxicidad tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo y el Captopril con valores entre 24 y 26 EPC/1000 células para el primero y de 21 a 27 EPC/1000 células en el segundo. En lo que concierne al compuesto LQM319, este tendió a disminuir la frecuencia desde la dosis mínima con valores entre 32 a 20 EPC; hasta la dosis máxima con un rango de 25 a 16 EPC pero esta disminución no fue estadísticamente significativa.

Estos resultados indican que el LQM319 no es clastogénico ni citotóxico a las dosis administradas en este modelo animal.

III. MARCO TEÓRICO.

3.1 Toxicología genética.

Por complicada que sea la arquitectura, y por muy elaborado que sea el mensaje del ADN, no habría vida sobre la tierra si esta extraordinaria sustancia no tuviera la propiedad excepcional y única entre los compuestos químicos; de replicarse (10); debido a que las instrucciones de codificación de todos los organismos vivientes están escritas en el mismo lenguaje genético : los ácidos nucleicos (ADN, ARN) (32).

La toxicología genética es la ciencia que estudia los efectos de los agentes químicos, físicos y biológicos en el material genético (ADN). Las sustancias químicas genotóxicas son compuestos capaces de modificar el genoma regulador del crecimiento y la diferenciación a lo largo de múltiples generaciones de células vivas (17).

Aunque algunas sustancias químicas reaccionan directamente con el ADN, en la mayoría de ellas se precisa una activación metabólica (17, 35).

Las células hepáticas contienen el citocromo P450; el cual es un grupo de enzimas metabólicas que oxidan preferentemente los xenobióticos en reacciones de la Fase I; y por lo general, esta oxidación activa al compuesto volviéndolo más reactivo que la molécula precursora.

En la mayoría de los casos, el metabolito oxidado vuelve a ser metabolizado por otras enzimas en una segunda fase ó Fase II. Estas enzimas conjugan el metabolito con un sustrato endógeno, de manera que la molécula se hace más grande y más polar, lo cual facilita su excreción (35).

Pero existen casos en que los productos de la oxidación por las enzimas citocromo P450 son productos intermedios con propiedades electrofílicas, los cuales tienden a unirse al oxígeno o el nitrógeno del ADN debido a que son sitios nucleofílicos (17). Aunque también son objeto de la modificación química los oxígenos de los grupos fosfato del esqueleto del ADN, se estima que tiene más importancia biológica el daño a las bases, ya que estos grupos están considerados como los elementos primarios de información en la molécula de ADN (figura 1)(35).

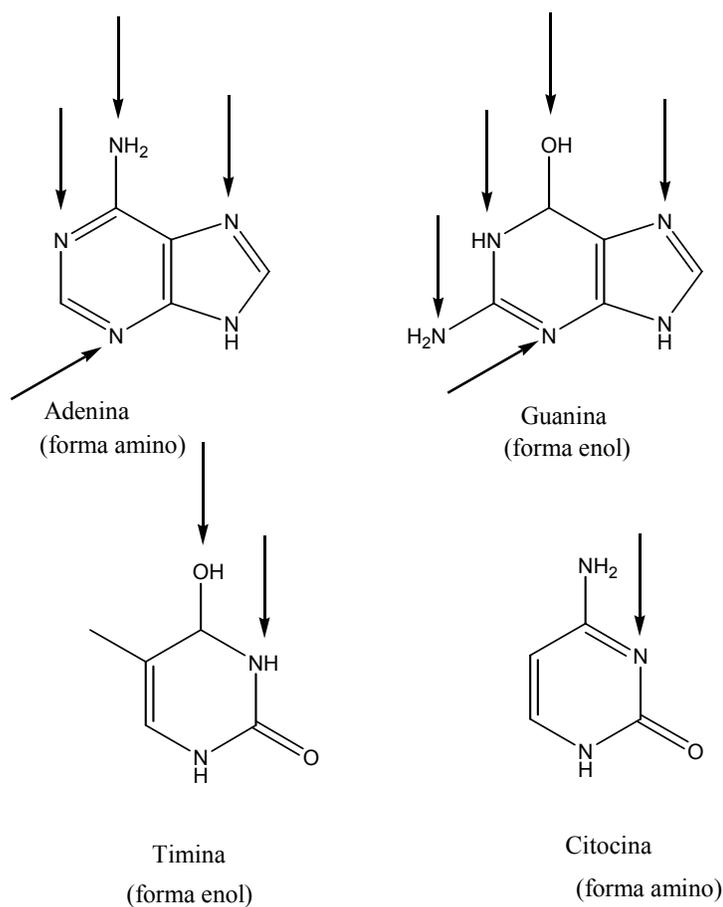


Fig.1. Sitios nucleofílicos en el ADN (35)

Watson y Crick señalaron que las estructuras de las bases del ADN no son estáticas pueden sufrir cambios tautoméricos que aunque son raros es posible que sean de importancia considerable en el metabolismo del ADN, ya que algunos alteran el apareamiento potencial de las bases, por lo cual existen en sus formas de tautómero menos estables sólo por periodos muy cortos (figura 2)(32,35).

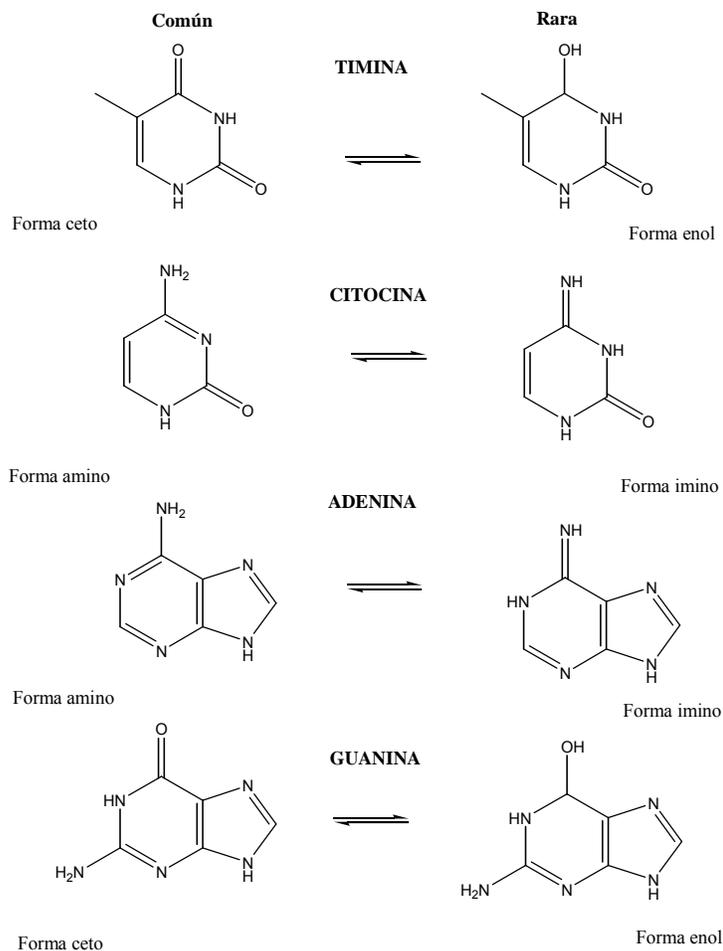


Fig. 2. Formas tautoméricas de las cuatro bases comunes de ADN, las cuales cambian el potencial de las bases para formar pares (32).

Las primeras teorías sobre la forma en que las sustancias químicas interactúan con el ADN, se remontan a los estudios que se realizaron durante el desarrollo del gas mostaza con fines bélicos considerado actualmente como un agente alquilante (figura 3); cuyo mecanismo de unión al ADN se lleva a cabo mediante una sustitución nucleofílica (SN), la cual puede ser de dos tipos: sustitución nucleofílica tipo 1(SN1) y sustitución nucleofílica tipo 2(SN2); la reacción de SN2 es biomolecular y es estrictamente dependiente de la estereoquímica. Este tipo de sustitución involucra un estado de transición donde en el ataque nucleofílico al centro electrofílico se forma un complejo de transición que indica la liberación del grupo saliente. En la reacción SN1 es necesario que se forme un carbocatión electrofílico intermediario. Este intermediario es rápidamente atrapado por el centro nucleofílico para formar una macromolécula mediante un enlace covalente. Bajo este concepto de reactividad, el sitio electrofílico es dependiente de la estabilidad del carbocatión y de la capacidad del grupo saliente (22).



Fig.3. Gas Mostaza (bis-(2-cloroetil)sulfano).

Sin embargo la probabilidad de que una determinada sustancia cause un daño genético depende inevitablemente de diversas variables, como el nivel de exposición del organismo a la sustancia, la distribución y retención de ésta una vez que ha penetrado en el cuerpo, la eficiencia de los sistemas de activación metabólica y/o detoxificación en los tejidos diana y la reactividad de la sustancia o de sus metabolitos con macromoléculas críticas de las células (35).

A su vez para que dicho daño genético produzca una enfermedad depende de dos factores principalmente: la naturaleza del daño y la capacidad que posee la célula de reconocer y suprimir la multiplicación de células aberrantes (22).

III Métodos QSAR y SAR.

La actividad de una sustancia química sobre un organismo viviente depende de su acción física, química o toxicológica en los tejidos biológicos, y la naturaleza de tal acción está relacionada a la vez con la estructura única molecular de aquella sustancia química (5,17).

En 1854 el toxicólogo ruso Pelikan E. V. empezó a estudiar la relación existente entre la estructura química de una sustancia y su actividad biológica, es decir, la relación estructura-actividad (SAR)(35).

La actividad biológica de una sustancia química depende de dos factores: primero, debe ser transportada de su sitio de administración a su sitio de acción; segundo, esta debe reaccionar con el receptor tomando en cuenta que la sustancia química también puede sufrir la transformación metabólica durante estos procesos (17).

Tomando en cuenta que sí se conoce la base biológica de una enfermedad o un desarreglo metabólico, es posible diseñar un fármaco, utilizando un mecanismo de aproximación al proceso patológico en su base molecular. Mediante el conocimiento de las moléculas implicadas es posible diseñar fármacos que interactúen con la molécula responsable, de tal forma que la modifique y se modifique así mismo la patología (9). En los últimos años, la industria farmacéutica ha reorientado sus investigaciones y prestado más atención a aquellos métodos que permitan un diseño racional de nuevos compuestos con propiedades deseadas mediante el diseño molecular asistido por computadora, basados en la interrelación estructura química actividad de las moléculas prototipo o cabeza de serie; las cuales pueden tener dos orígenes: ser los principios activos en drogas utilizadas en la medicina tradicional o ser nuevos compuestos de la síntesis química o de la biotecnología (35,9,43).

Los compuestos prototipo o cabeza de serie deben de contar con las siguientes características (9):

- Ser moléculas identificadas y caracterizadas.
- Contar con métodos estandarizados para su síntesis o aislamiento.
- Conocer sus efectos secundarios o acciones biológicas inesperadas durante su empleo.
- Tener establecido su metabolismo ya que en ocasiones, algunos de los metabolitos de un fármaco presentan una actividad superior o diferente a la del propio fármaco de partida.

Los métodos que relacionan la estructura química con la actividad biológica, asistidos por computadoras pueden dividirse en dos grandes categorías: los Métodos QSAR y SAR que se basan en la identificación de moléculas prototipo o cabeza de serie; a las cuales es posible realizar una modificación estructural que les permitan llegar al diseño de nuevos compuestos que resulten más potentes, más selectivos y menos tóxicos en su acción terapéutica (13).

Los métodos de modelación molecular SAR consideran las propiedades de las moléculas en tres dimensiones mediante gráficos moleculares interactivos que permiten la representación y manipulación de las molécula en tres dimensiones, proporcionando una información espacial que es esencial para estudiar la interacción entre ligando y receptor macromolecular. Estos estudios SAR son utilizados no sólo en el diseño de nuevos fármacos, sino que son aplicables a otras ramas de la ciencia como la ingeniería de proteínas y la química de polímeros (9).

La pauta indispensable para poder llevar acabo un análisis SAR es la búsqueda del farmacóforo, término descrito en 1984 por Emil Fischer quién lo define como la ordenación tridimensional de los grupos funcionales que le confieren a una molécula la característica de presentar actividad biológica (19). Actualmente la búsqueda de los

aspectos estructurales indispensables en una serie de moléculas para lograr la unión al receptor y experimentar una actividad farmacológica, se conoce como la determinación del farmacóforo(9).

Por su parte las siglas QSAR provienen de la expresión en inglés Quantitative Structure Activity Relationship que significa en español “Estudios Cuantitativos de Relación Estructura Actividad”. Para realizar un estudio QSAR debe asumirse que la actividad biológica del fármaco, producto de su interacción con el receptor, está en función de las características estructurales de la molécula (9). Lo cual está descrito por el paradigma de Hansch, el cual establece lo siguiente:

1. La actividad biológica es función de la estructura del fármaco.
2. La estructura del fármaco implica ciertas propiedades globales y locales como la hidrofobicidad, carga neta, estereoquímica, solubilidad etc.
3. Estas propiedades globales y locales pueden ser cuantificadas mediante ciertos parámetros.
4. Siempre existe una función que relaciona los cambios de actividad biológica con los cambios en las propiedades globales y locales, aunque puede ser que no sea sencilla ni evidente.

En base a ello la metodología de investigación en el QSAR sigue, independientemente del modelo que se utilice, pasos comunes que se hallan sintetizados en la figura 4.

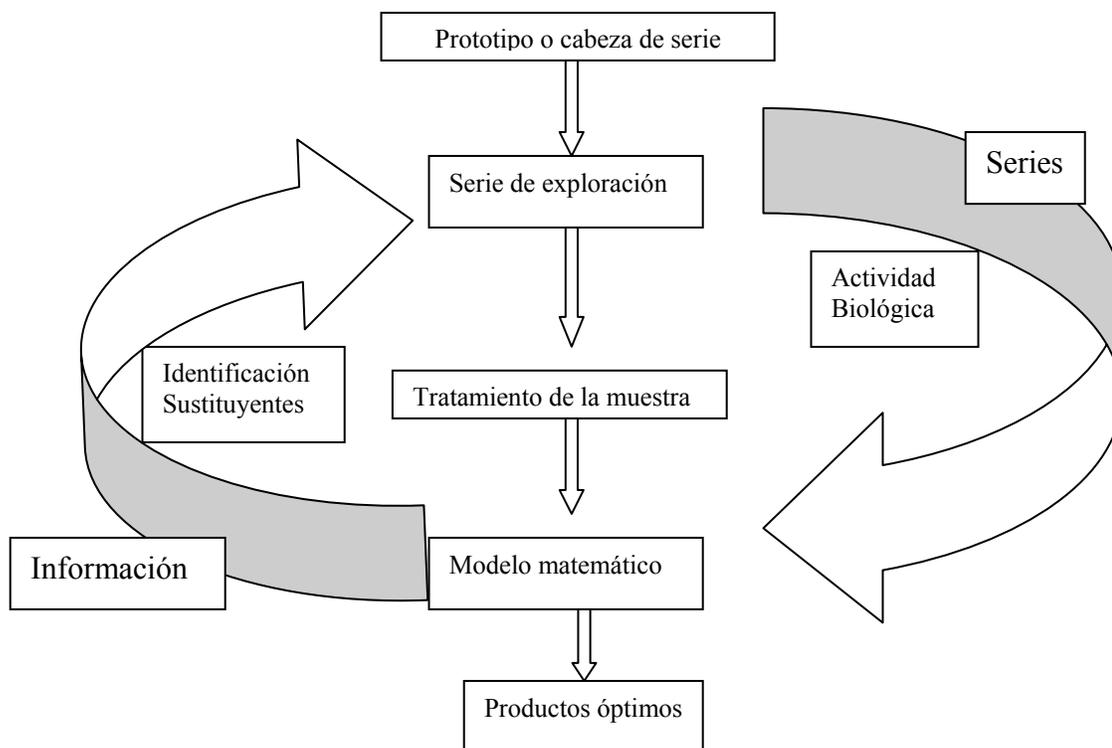


Fig.4.Pasos del método QSAR.

Cuando se dispone de un prototipo, es preciso diseñar una serie de exploración, que está constituida por un conjunto de análogos del prototipo que permiten el establecimiento de las primeras relaciones estructura-actividad. Los miembros de la serie de exploración deben de ser sintetizados y evaluados en lo que respecta a actividad biológica.

Los miembros de la serie de exploración están constituidos por un núcleo común, y por unos sustituyentes o fragmentos variables, que son característicos de cada producto de la serie.

Dichos sustituyentes variables son identificados por descriptores, serán utilizados como variables independientes (D_i) en el modelo. Los valores de la actividad biológica (A) expresados regularmente en forma logarítmica se utilizan como variables dependientes, se obtiene un modelo lineal que describe la dependencia de

la actividad (A) en función del conjunto de descriptores (X_i). La expresión (K) representa alguna transformación matemática establecida empíricamente. La relación entre los descriptores D y la propiedad A puede ser lineal y se obtiene a través de un análisis de regresión múltiple (38).

$$A=f(D_i) + k.$$

Es importante establecer que bajo el término de descriptores se agrupa una serie de parámetros que a través de valores numéricos representan, una información estructural, electrónica ó estérica, así como la hidrofobicidad, la cual es una propiedad fisicoquímica de la molécula en estudio.

En la actualidad existen diferentes técnicas por las que se puede desarrollar un estudio QSAR y se pueden clasificar en:

- QSAR tradicional
- QSAR por redes neuronales
- QSAR tridimensional (COMFA)

Las cuales permiten obtener un modelado molecular en tres dimensiones que describen la actividad biológica como una determinada función matemática de los descriptores moleculares y sus propiedades fisicoquímicas y biológicas asociadas (9).

Desde sus primeras aplicaciones al diseño de fármacos, las herramientas computacionales usadas en los estudios QSAR han contribuido significativamente al desarrollo de fármacos que se han aprobado para su uso clínico. Uno de los primeros casos del éxito de los estudios QSAR lo constituyó el antibacteriano norfloxacin que se comercializó por primera vez en 1983 con el nombre de Noroxin (38).

Cuadro 1. Fármacos comerciales desarrollados por el método QSAR (38).

Compuesto	Nombre comercial	Uso	Método de Síntesis
Norfloxacina	NOROXIN	Antibacteriano	QSAR
Losartán	COZAAR	Antihipertensivo	Modelado molecular QSAR
Captopril	CAPOTEN	Antihipertensivo	Diseño basado en el Receptor. QSAR

IV. Compuesto tiomorfolínico LQM 319.

La historia de este compuesto nace con la investigación iniciada a finales de los años 70's por un grupo de investigadores de la República China, quienes al estar examinando las propiedades antimalariales de los derivados de la febrifugina, notaron que un compuesto en prueba, la Changrolina era un agente antiarrítmico efectivo, con estructura diferente a los agentes conocidos comúnmente a la fecha. (38,15).

La molécula de changrolina puede dividirse en tres regiones: (1) consiste en una molécula, de quinazolina que puede reemplazarse por una gran variedad de heterociclos sin perder la actividad antiarrítmica. En la región (2) el modelo de un 2,6-bis(1-metil-1-il-pirrolidin)fenol tetrasustituido presenta la mejor actividad y si esta región no está completa, la actividad es nula; La región (3), es un enlace entre la región (1) y (2) en el cual pueden incluirse diferentes grupos para tratar de aumentar la actividad y disminuir la toxicidad (38). Así se inició el estudio de relación estructura química actividad biológica (SAR), la cual consistía en cambiar los sustituyentes de la región 2 y

3, encontrando que los anillos pirrolidínicos podían sustituirse por otros anillos heterocíclicos como la morfolina y la tiomorfolina. (figura 5)

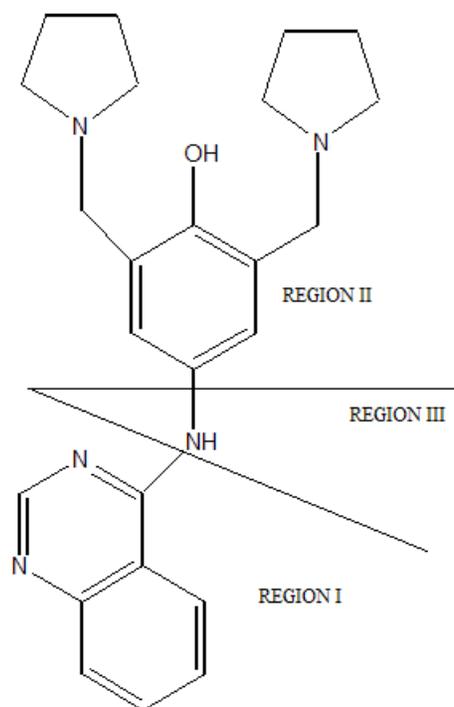


Fig.5. Molécula de la Changrolina, en tres regiones. (I) molécula de quinazolina,(II) (2,6-bis (1-metil-1-il-pirrolidin)fenol; (III) el enlace entre la región 1 y 2 .(38)

Al no ser concluido dicho proyecto, el grupo de investigación del Laboratorio de Química Medicinal de la Unidad de Posgrado en la FESC-1, UNAM; retomó la investigación; procediendo a la síntesis de compuestos análogos de la región (2) de la changrolina mediante la reacción química entre un fenol sustituido (cabeza de serie), un formaldehído más una o dos moléculas de morfolina y/o tiomorfolina. Por medio de los mecanismos de reacción de Sustitución Electrofílica Aromática (vía directa)(figura 6) o (vía base de Mannich) (figura7).

Se obtuvo; así una serie de 17 compuestos de exploración a los cuales se les realizó el estudio de la actividad biológica dentro del Laboratorio de Farmacología del Miocardio de la misma instancia académica, encontrándose que estos compuestos derivados del fenol mostraban una respuesta hipotensora (15,42,45).

El compuesto LQM319 se sintetizó por medio de la reacción estequiométrica entre la tiomorfolina, terbutilfenol y el formaldehído utilizando una lámpara IR como fuente de energía, obteniéndose como producto el 2,6-bis(tiomorfolinometil)-4-terbutilfenol (figura 6)(38,39,40,41).

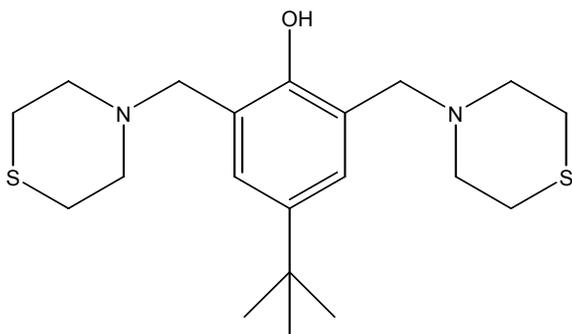


Fig.6 .Estructura del LQM319

Quién a su vez resultó ser el compuesto con mejor eficacia, disminuyendo la PAM (Presión Arterial Media) ,PAD (Presión Arterial Distólica), PAS (Presión Arterial Sistólica), FC (Frecuencia Cardiaca) ; a dosis menores a 0.001mg/Kg siendo aún más potente que los fármacos antihipertensivos comerciales Omapatrilat y Losartán.

Compuesto/ Fármaco	% EFICACIA			
	PAM	PAD	PAS	FC
Captopril	100	100	100	46
LQM319	75.77	96.42	77.81	90.05
Omapatrilat	29.15	32.08	33.34	29.42
Losartán	13.57	45.64	25.28	27.23

Cuadro 2. Por ciento de Eficacia de los compuestos tomando como referencia a un inhibidor de la ECA (Captopril), a dosis de 3.0mg/kg .Siendo PAM (Presión Arterial Media), PAD (Presión Arterial Distólica), PAS (Presión Arterial Sistólica), FC (Frecuencia Cardiaca) (12).

A su vez recientes publicaciones sugieren un mecanismo de degradación común para la morfolína ,Tiomorfolína y piperidina por *Micobacterium Aurium* por la acción del citocromo P450.En donde se sugiere que el primer paso de la degradación de la tiomorfolina es la ruptura del enlace C---N, lo cual conduce a la formación de un

aminoácido intermediario en donde el átomo de azufre sufre cambio a un estado de oxidación convirtiéndose en un sulfóxido antes de la apertura del anillo molecular, produciéndose una desaminación que provoca la apertura del anillo y la formación del ácido tiodiglicólico, un metabolito secundario que tiende a acumularse en este modelo debido a que este ácido dicarboxílico no puede ser completamente metabolizado por las células bacterianas (4).

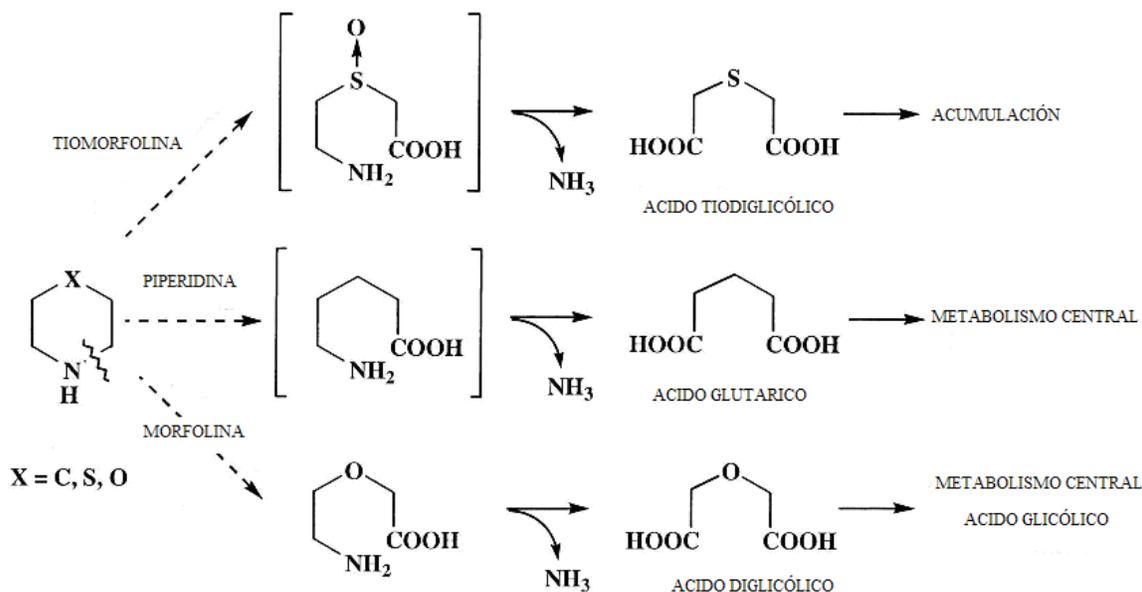


Fig. 7. Mecanismo de degradación general para compuestos heterocíclicos con nitrógeno por M, aurium MO1. (4)

Por otro lado, se sabe que por la acción de CP450 sobre la carbocisteína un agente mucolítico de uso humano también tiene como producto metabólico secundario al ácido tiodiglicólico, el cual es fácilmente metabolizado por enzimas de segunda fase o fase II y es excretado en la orina, en forma del glucoroconjugado S-óxido del ácido tiodiglicólico. (30)

Es así como se inicia el estudio multidisciplinario QSAR para los compuestos etiquetados como LQM (Laboratorio de Química Medicinal), cabe mencionar que la Química Medicinal es la ciencia que se ocupa del descubrimiento o diseño de nuevos compuestos químicos terapéuticos y su desarrollo dentro de la Medicina e involucra los siguientes estudios: síntesis de nuevos compuestos, investigación de la relación entre la estructura de

compuestos naturales y los sintéticos y sus actividades biológicas, elucidación de sus interacciones con receptores de varios tipos incluyendo enzimas y ADN.

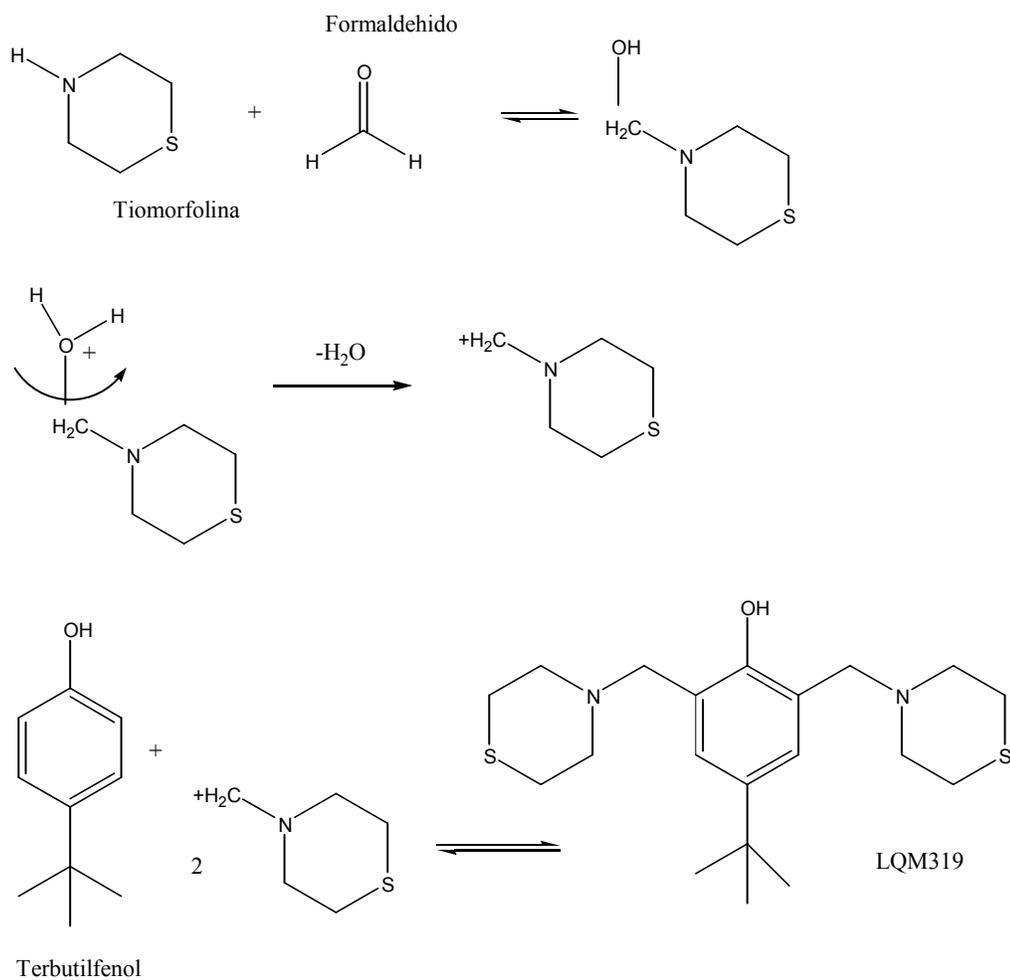


Fig.8. Mecanismo de síntesis por sustitución electrofílica aromática (VIA BASE DE Mannich) LQM 319

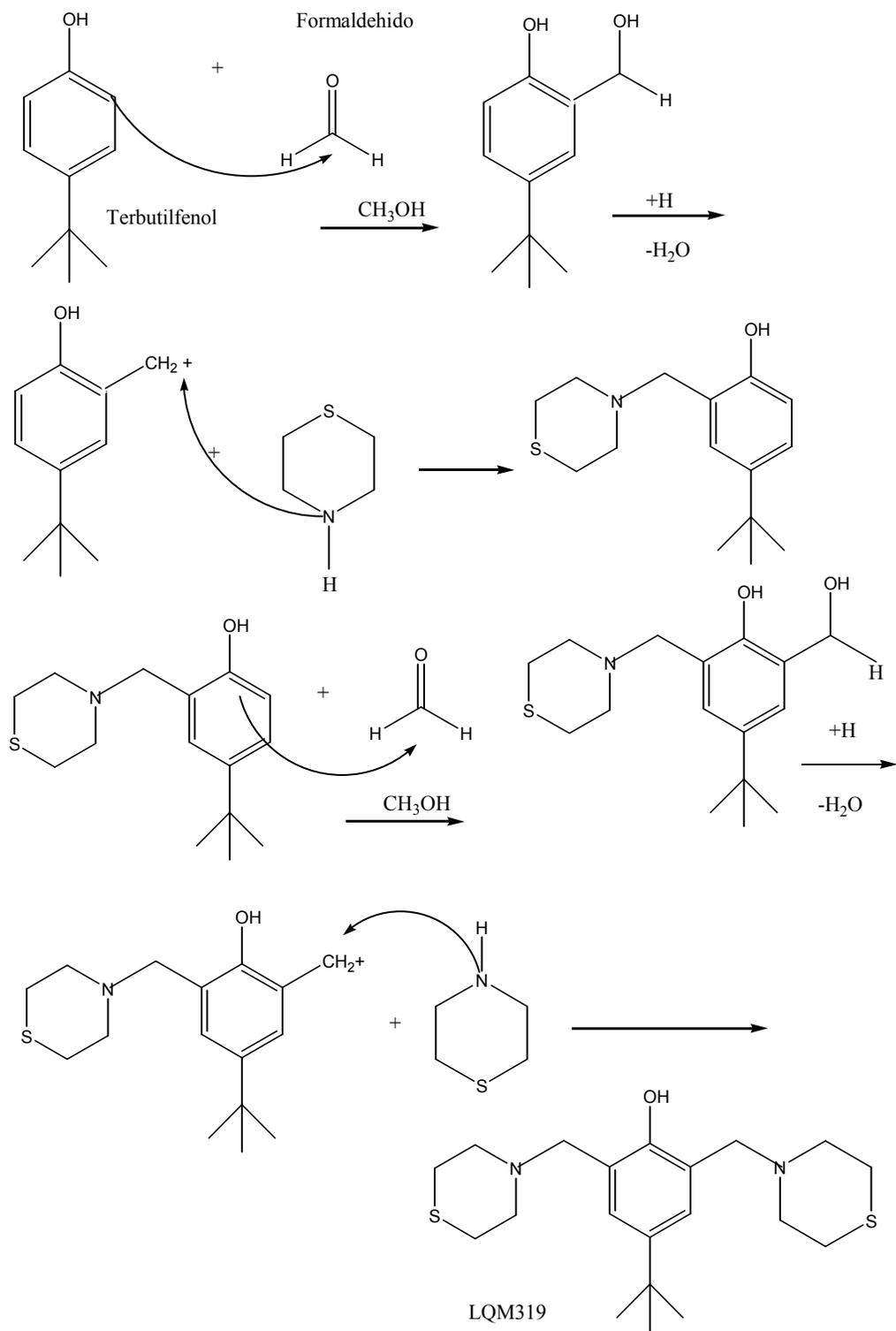


Fig.9. Sustitución Electrofílica Aromática (vía Directa) LQM319.

IV. Ifosfamida.

La ifosfamida (oxafosforina) es un antineoplásico, empleado en el cáncer de pulmón, carcinoma cérvico uterino y linfomas malignos, que como reacciones secundarias, tiene un efecto neurotóxico, nefrotóxico y urotóxico.(28)

Su estructura química [(3-(2cloroetil)-2-2-Cloroetil)-amino]tetrahidro-2H-1,3,2, oxafosforina – 2 – óxido]] se muestra en la figura 10. [34]

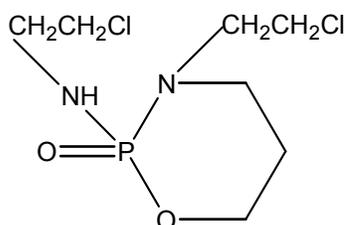


Fig.10. Estructura de la Ifosfamida.

Se ha demostrado que la ifosfamida requiere de una activación metabólica por medio de enzimas microsomales hepáticas con capacidad oxidativa (**CP450**) y de la presencia de la enzima aldehído deshidrogenasa (ALDH) para ejercer su actividad citotóxica. La biotransformación comienza con una hidroxilación producida por las enzimas microsomales (**CYP2C18** **CYP2C9** y **CYP2C19**) en el C4 del anillo oxafosforínico, formándose un intermediario inestable; La 4-hidroxifosfamida que se encuentra en equilibrio con su forma tautomérica, la aldofosfamida la cual es hidrogenada al metabolito inactivo carboxifosfamida o se descompone espontáneamente a la forma de mostaza de isofosforamida (MIFA) y acroleína con actividad citotóxica. Los metabolitos inactivos son reducidos a 4-cetofosfamida por sulfatación al compuesto intermediario 4-tiofosfamida. Los metabolitos son eliminados por vía urinarias. (28,26,25).

Aunque el mecanismo específico de la ifosfamida no se ha descrito, el que corresponde a los agentes alquilantes en general está bien caracterizado. Presumiblemente, la ifosfamida se comporta de forma similar a otros fármacos de esta clase.

Los agentes alquilantes son altamente reactivos, sus blancos primarios son los ácidos nucleicos. En general, la guanina es la base más vulnerable a la alquilación siendo los sitios más frecuentemente atacados el 6-O y el 7-N (11).

La alquilación interfiere con la síntesis y función normal del ADN, causando depuración y apareamiento erróneo de pares de bases, lo cual conduce a la escisión y el entrecruzamiento de las cadenas. Los efectos citotóxicos de los agentes alquilantes se atribuyen fundamentalmente al entrecruzamiento irreparable de las cadenas de ADN, pero además la depuración y la escisión pueden inducir alteraciones permanentes en la estructura del ADN, favoreciendo los procesos de mutagénesis y carcinogénesis. (11)

En el caso específico de la ifosfamida, como resultado de la alquilación del nitrógeno 7 de la guanina (convirtiéndose en un nitrógeno de amonio cuaternario), se convierte en una especie más ácida la cual permite aparearse con timina, llevando así a una codificación errónea, aunado a que la segunda cadena lateral del cloroetilo puede experimentar una reacción de ciclización y alquilar a un segundo residuo de guanina provocando un entrecruzamiento irreparable de las cadenas haciendo imposible la replicación y deteniendo el ciclo celular. (11)

El mecanismo de unión de la ifosfamida al ADN después de su activación metabólica se ilustra a continuación:

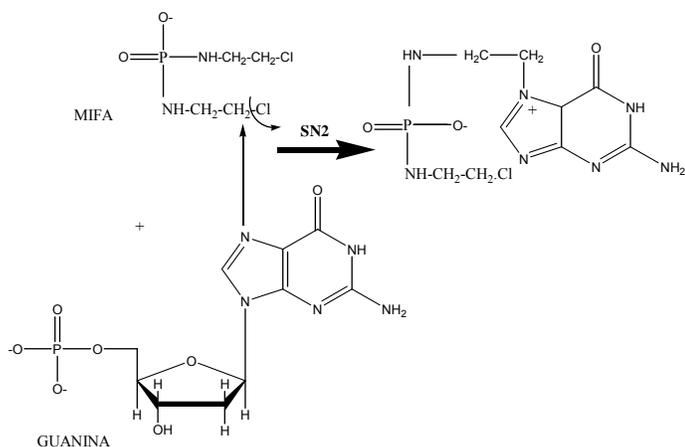


Fig. 11. Mecanismo de unión de la Ifosfamida al ADN.

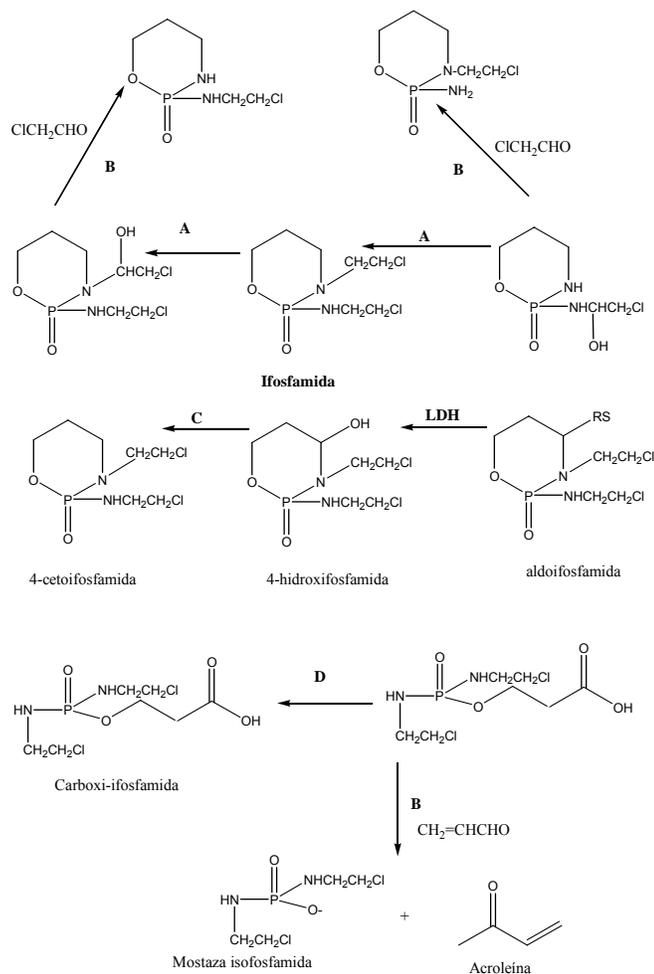


Figura 12. Vías metabólicas de la ifosfamida: (A) Citocromo P450; (B) espontáneo; (C) mecanismo desconocido; (D) aldehído deshidrogenasa. (25).

III. Prueba de Micronúcleos.

El ensayo de micronúcleos (MN), se realiza tanto *in vivo* como *in vitro*, se usa como prueba primaria en el diagnóstico genotóxico; diseñado para proteger a los cromosomas, monitoreando los efectos de sustancias químicas sobre los mecanismos genéticos siendo avalado por las agencias reguladoras como la FDA (12,34,26).

El primero en encontrar un MN fue Howell (1891) en un extendido eritrocitario, posteriormente fue descrito por Jolly (18). Por lo que actualmente se conocen en hematología como cuerpos de Howell-Jolly, descritos como pequeños restos nucleares con forma generalmente redonda o almendrada con un diámetro entre $0.4\mu - 1.6\mu$, de apariencia picnótica igual a la del núcleo al ser teñidos en forma diferencial con el colorante Giemsa (44).

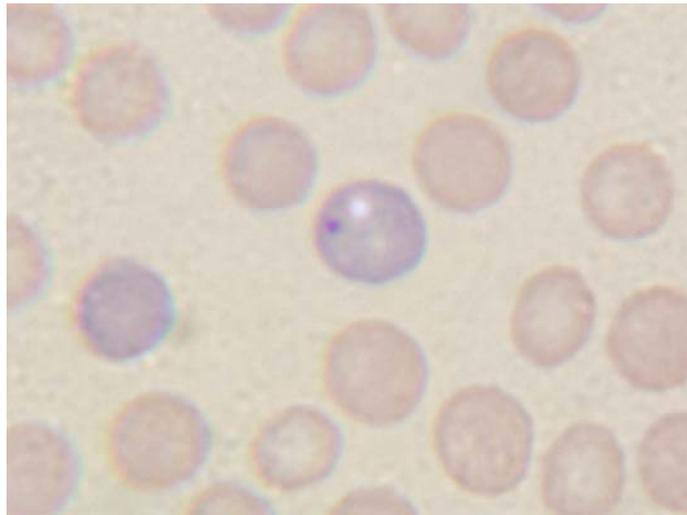


Fig.13. EPCMN en frotis de sangre periférica de ratón

El ensayo de MN fue desarrollado en 1975 por W. Schmid quien originalmente propuso practicarlo en la médula ósea de ratón. Actualmente la técnica se ha estandarizado en una gran variedad de tejidos y especies y se realiza en diferentes tipos celulares como son: cultivos de linfocitos de sangre periférica, eritrocitos policromáticos (EPC), células de la mucosa bucal y hepatocitos de rata, entre otros (35).

En situaciones patológicas aumentan los MN los cuales representan cromosomas o restos de cromosomas que se separaron del huso mitótico durante una mitosis anómala. En condiciones normales los MN surgen de la fragmentación nuclear o como consecuencia de la expulsión incompleta del núcleo. Se observan de manera típica en individuos esplenectomizados, y en anemias megaloblásticas (44).

El estudio de MN se puede realizar utilizando eritrocitos jóvenes (EPC) obtenidos de sangre periférica, los cuales son considerados los más convenientes para dicho estudio, ya que facilitan la identificación del MN debido primeramente a que permanecen jóvenes en un periodo de 24 a 48 horas aproximadamente., carecen de núcleo y se tiñen de manera diferente a los eritrocitos maduros en circulación ya que contienen una mezcla de hemoglobina y ARN presentando así una coloración mezclada de basofilia y eosinofilia por lo que se tiñen de azul violáceo. Son un poco más grandes que los eritrocitos maduros (ENC) los cuales se tiñen de naranja rosado debido a que están constituidos principalmente de hemoglobina (Fig 13) (23,34, 44,16).

El mecanismo de formación de micronúcleos se lleva acabo en la médula ósea junto con la eritropoyesis o ciclo celular del eritrocito, el cual constituye un desarrollo continuo iniciando con la célula totipotencial seguida de la progresión normoblástica hasta llegar al eritrocito maduro (16).

La replicación del pronormoblasto permite el desarrollo potencial de 16 eritrocitos maduros mediante cuatro divisiones mitóticas en un periodo de 72 hrs (figura 14).

El pronormoblasto tiene la función de producir, acumular y proteger a las moléculas de hemoglobina, la cual deja de sintetizarse después de que la célula sufre tres primeras divisiones mitóticas originando la expulsión del núcleo y la diapédesis al interior de los capilares medulares donde el normoblasto ortocromático se transforma en el reticulocito, que conserva las mitocondrias, pequeñas cantidades de ribosomas, el centríolo y vestigios de aparato de Golgi.

Los reticulocitos sintetizan el 20% restante de la hemoglobina para la formación del glóbulo rojo maduro el cual obtiene energía por la glucólisis. El ATP cumple la función de captar glucosa del plasma, conservar las concentraciones adecuadas de calcio y potasio, mantiene la forma bicóncava conservando la hemoglobina en estado reducido.

La vida media del eritrocito es aproximadamente de 120 días pero las células anormales se eliminan de la circulación por tres mecanismos generales:

- 1) Células con pequeñas anomalías (eliminadas por el bazo)
- 2) Células con defectos mayores eliminadas por el bazo y tejido retículo endotelial en otras localizaciones del organismo (ej. Hígado).
- 3) Células con trastornos graves que comprometen la integridad de su estructura se destruyen en circulación periférica liberando sus componentes al plasma (44,3).

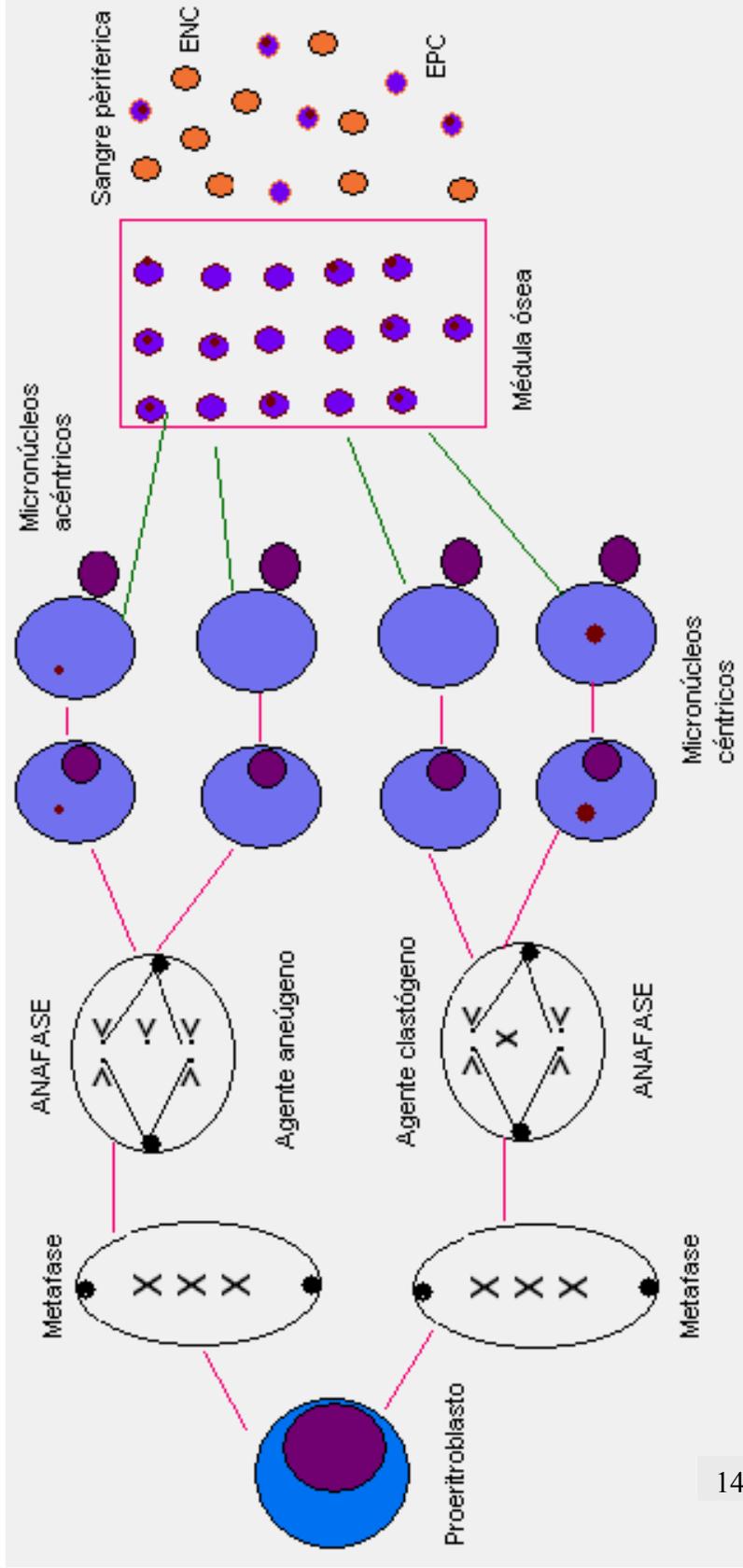
Por lo tanto la presencia de MN en EPC se basa en lo siguiente: en la etapa de anafase del ciclo celular, cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas; sin embargo, los elementos rezagados que pueden ser fragmentos (efecto clastógeno) o cromosomas completos (efecto aneuploidógeno) quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas, y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios conocidos como MN (35).

Los primeros intentos para diferenciar entre los dos mecanismos de generación de MN fueron: utilizando el tamaño del corpúsculo, el bandeo C que marca los centrómeros, así como por la cuantificación de ADN (7). Sin embargo estos métodos no son muy confiables, por lo que actualmente para su estudio se emplean dos métodos moleculares citogenéticos con los cuales se puede identificar la presencia de centrómeros en MN, de tal modo que se pueda diferenciar entre MN de origen clastogénico y/o aneugénicos. Estos métodos son:

- 1) Inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos CREST.
- 2) Hibridación *in situ* con fluorescencia (técnica de FISH) (26).

La FDA es un organismo internacional la cual recomienda que en el ensayo de MN se analicen 200 EPC en médula ósea y 1000 EPC en sangre periférica; por cada animal la frecuencia de MN se cuantifica por la presencia de células MN y no por el número de MN (26). Los animales en general exhiben una gran variación en las frecuencias MN espontáneos en la sangre periférica, por lo que la prueba puede ser utilizada como herramienta taxonómica, con base en que el valor espontáneo de los eritrocitos MN es característico de cada especie y un aumento significativo es representativo de un daño genotóxico (35,26).

Para determinar la citotoxicidad, se examina el índice $EPC / (ENC + EPC)$, ya que las alteraciones de éste, indican que existió o una inhibición de la división o una maduración excesiva de células eritropoyéticas nucleadas de la médula. Se analizan un total de 1000 eritrocitos totales de los cuales la relación $EPC / (EPC + ENC)$ no debe ser menor o mayor al 20% con respecto al valor del control (26).



14 Fig Representación esquemática del mecanismo de formación de micronúcleos en eritroblastos de médula ósea resultado de la formación de fragmentos cromosómicos acéntricos y/o cromosomas rezagados.

IV. JUSTIFICACIÓN.

En el Laboratorio de Química Medicinal de la FESC-1 se han sintetizado un gran número de compuestos orgánicos con diversas aplicaciones, como son: antiparasitarios, inmunoestimulantes, antibióticos, antihipertensivos, entre otros. Actualmente se ha comenzado el estudio multidisciplinario para la formación de un modelo QSAR, para los compuestos etiquetados como LQM. Lo cual tiene como principal objetivo el poder diseñar nuevos compuestos que resulten más potentes, más selectivos y menos tóxicos en su acción terapéutica.

El principal interés de realizar el estudio genotóxico al compuesto LQM319 es que éste tiene una mejor actividad como antihipertensivo, al ser comparado con los fármacos comerciales Omapatrilat y Losartán en dosis menores a 0.001mg/Kg, presentando una DE_{50} de 0.4111mg/kg, datos obtenidos mediante la construcción de curvas dosis-efecto en un modelo de presión arterial invasiva en rata Wistar macho anestesiada. Lo cual permite que el compuesto LQM319 sea catalogado como un posible agente antihipertensivo que requiere de los estudios de toxicidad para continuar con su evaluación preclínica.

V. HIPOTESIS.

Sí el compuesto LQM319 tiene propiedades clastogénicas, es decir que cause rupturas cromosómicas ó bien aneugénicas que induzcan rezago cromosómico, entonces producirá un aumento en la frecuencia de micronúcleos en los eritrocitos de sangre periférica de los ratones tratados con tal compuesto.

VI. OBJETIVOS.

6.1 OBJETIVO GENERAL.

Evaluar la genotoxicidad del compuesto tiomorfolínico LQM319, mediante la prueba de micronúcleos en ratones machos de la cepa CD1, como una de las pruebas de seguridad a nuevos compuestos con capacidad hipotensora.

6.2 OBJETIVOS PARTICULARES.

- 6.2.1 Determinar la frecuencia de micronúcleos en ratones CD1 tratados con el compuesto LQM319 a las dosis de 10, 30 y 60 mg/kg de peso y determinar así mismo, la citotoxicidad.

- 6.2.2 Evaluar la frecuencia de micronúcleos y citotoxicidad, inducida por la ifosfamida, administrando una dosis de 60mg/kg a ratones cepa CD1, para establecer un control positivo.

- 6.2.3 Determinar la frecuencia de micronúcleos en ratones CD1 tratados con Captopril a una dosis de 10mg/kg de peso, determinar así mismo la citotoxicidad, para ser usado como lote comparativo.

VII. MATERIAL Y MÉTODOS.

7.1 MATERIAL BIOLÓGICO.

- Se utilizaron 30 ratones machos de la cepa CD1 con un peso aproximado de 25 g \pm 5g obtenidos del bioterio de la ENCB del IPN, mantenidos bajo las mismas condiciones ambientales y con libre acceso a agua y alimento durante el desarrollo experimental.

7.2 COMPUESTO PROBLEMA.

- Se utilizó el compuesto LQM319 el cual fue sintetizado, purificado y caracterizado en el Laboratorio de Química Medicinal por el grupo de investigadores a cargo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano en la FESC-1.

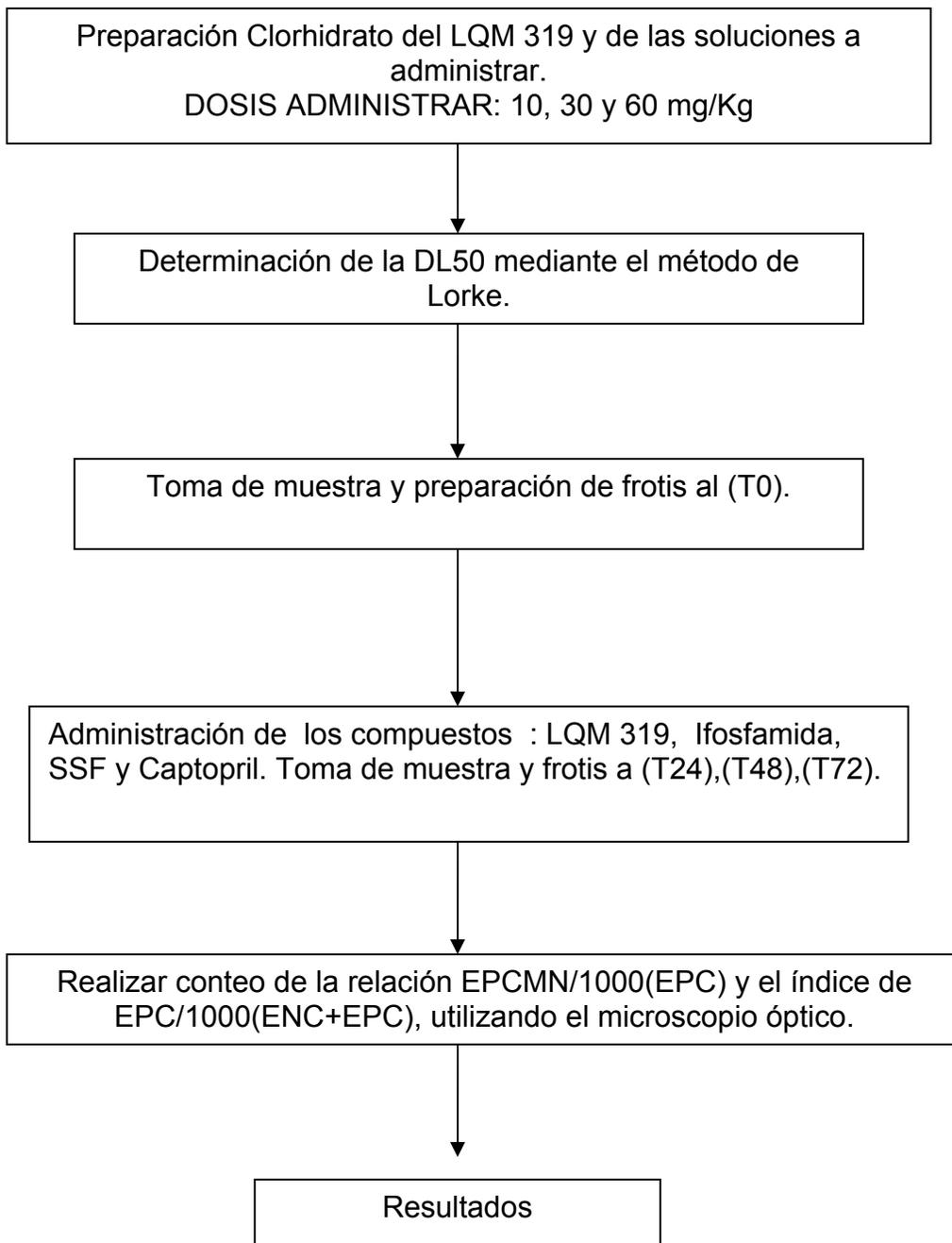
7.3 REACTIVOS:

- Ifosfamida (1g /25mL).
- Captopril
- HCl 39%
- Colorante Giemsa.(SIGMA)
- KH_2PO_4
- NaH_2PO_4
- Metanol absoluto.
- SSF (85% NaCl)
- Agua desionizada.
- Agua destilada
- Tiras de pH.

7.4 MATERIAL

- Microscopio óptico
- Balanza analítica
- Balanza granataria
- pH-metro.
- Pipetas volumétricas de 5 y 10mL
- Piseta
- Probeta 50mL
- Micropipetas
- Estuche de disección
- Jeringas de 1mL
- Viales
- Portaobjetos
- Sonificador
- Vaso Copplín

Cuadro3. DIAGRAMA DE FLUJO



7.5 METODOLOGÍA

A) Preparación del Clorhidrato del LQM 319 (Anexo)

B) Determinación de la toxicidad aguda (DL50) del compuesto mediante el método de Lorke (16).

1.- Se utilizaron ratones cepa CD1 los que se dividieron en tres lotes de tres ratones cada uno y se les administró el clorhidrato del compuesto LQM 319 vía intraperitoneal (ip) en las dosis siguientes:

1er. Lote.- dosis 10mg/kg

2do.Lote.- dosis 100mg/kg

3er.Lote.- dosis 1000mg/kg

2.- Se observaron los animales durante 24hrs esperando signos de intoxicación o muerte.

3.- En relación a lo obtenido en la etapa anterior, se llevó a cabo una segunda fase en la cual se administraron las siguientes dosis por ratón: 140mg/kg, 225mg/kg, 370mg/kg y 600mg/kg

4.- Se observaron los animales nuevamente durante 24hrs y se registraron los signos y la dosis a la cual los animales vivieron o murieron.

5.- Se obtuvo la media geométrica de las dosis para calcular la DL50.

C) Prueba de Micronúcleos. Se determinó la genotoxicidad del clorhidrato del compuesto LQM319, en sangre periférica de 30 ratones cepa CD1 machos con un peso promedio de 25 ± 5 g, los cuales se distribuyeron de la siguiente manera:

Cuadro 4. Distribución y clasificación de los lotes para prueba de micronúcleos.

Lote	Ratones utilizados	Dosis administrada
1.- Control (-)	5	0.5mL (SSF) x Ratón
2.- LQM 319	5	10mg/kg
3.- LQM 319	5	30mg/kg
4.- LQM 319	5	60mg/kg
5. - Control (+)	5	60mg/kg Ifosfamida (SSF)
6.- Comparativo	5	10 mg /kg Captopril (SSF)

1.- Antes de la administración (T0), a cada organismo se le realizó un frotis sanguíneo, cortando la porción terminal de la cola, posteriormente se realiza el tratamiento con una sola inoculación intraperitoneal (ip). Seguida de la posterior toma de muestra de sangre periférica; obtenida de la cola del ratón a (T24), (T48) y (T72) después de la administración.

2.- Se fijaron los frotis sumergiéndolos en metanol absoluto por tres minutos y posteriormente se tiñeron con el colorante correspondiente (Giemsa (1:10) en buffer de fosfatos a pH=6.8).

3.- Se determinó la frecuencia de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPMN) en 1000 eritrocitos policromáticos (EPC) para medir el grado de genotoxicidad del compuesto. Los eritrocitos micronucleados (EPMN), se identificaron por una coloración lila o ligeramente violácea característica de la tinción con Giemsa, en la cual los

micronúcleos se observaron como pequeños cuerpos y redondos inmersos en el citoplasma celular de color morado.

4.- Se determinó el índice de citotoxicidad por la frecuencia de eritrocitos policromáticos en 1000 eritrocitos totales (EPC + ENC). El conteo se realizó con el microscopio óptico utilizando el objetivo de inmersión (1000X).

5.- Se realizó el análisis estadístico ANOVA utilizando el Software creado por Jorge Aceves en 1993 conocido como GraphPad Instat tm. Con un $\alpha = < 0.05$.

VIII. RESULTADOS.

En la primera etapa de este estudio se determinó la DL50 y los animales que recibieron 10 y 100 mg/Kg no fallecieron a causa de la administración de LQM319, en cambio para la dosis de 1000 mg/Kg todos los animales murieron.

Se presentaron los siguientes signos y síntomas con su administración:

-Con la dosis de 10mg/kg no se observó ningún cambio visible en el comportamiento de los ratones.

-Con la dosis de 100mg/kg los animales presentaron una disminución de la actividad general y aletargamiento.

-La dosis de 1000mg/kg causó la muerte de los ratones en un tiempo promedio de cinco minutos manifestándose por una respiración acelerada, pérdida de la movilidad de las patas traseras, seguida de inmovilidad generalizada acompañada de convulsiones terminando con la muerte.

En la segunda etapa, los animales se distribuyeron en 4 dosis diferentes y la muerte se presentó con la dosis de 600mg/kg de peso. Posteriormente para obtener la media geométrica de los resultados se multiplicó 370 por 600= 22000; se extrajo la raíz cuadrada del resultado anterior, obteniéndose la DL50 de 471.1 mg/kg.

Prueba de micronúcleos.

I. Frecuencia de EPCMN

Como parte inicial del ensayo de micronúcleos (MN) se determinó el tiempo de máxima inducción de EPCMN en sangre periférica de ratón macho cepa CD1 por la acción de la IFF cuya dosis fue de 60mg/kg y se observó claramente que la frecuencia de EPCMN empezó a aumentar en forma gradual y estadísticamente significativa al T24 y el T48 de muestreo post-administración con un $\alpha = <0.001$ determinada mediante el análisis estadístico del ANOVA (Gráfica 1). A su vez la máxima inducción de EPMN fue a T48 con un valor promedio de 13.4 EPCMN, posteriormente se observó el descenso en la frecuencia de MN a T72 cuya $P <0.005$ cuyo valor promedio fue de 6.2 EPCMN.

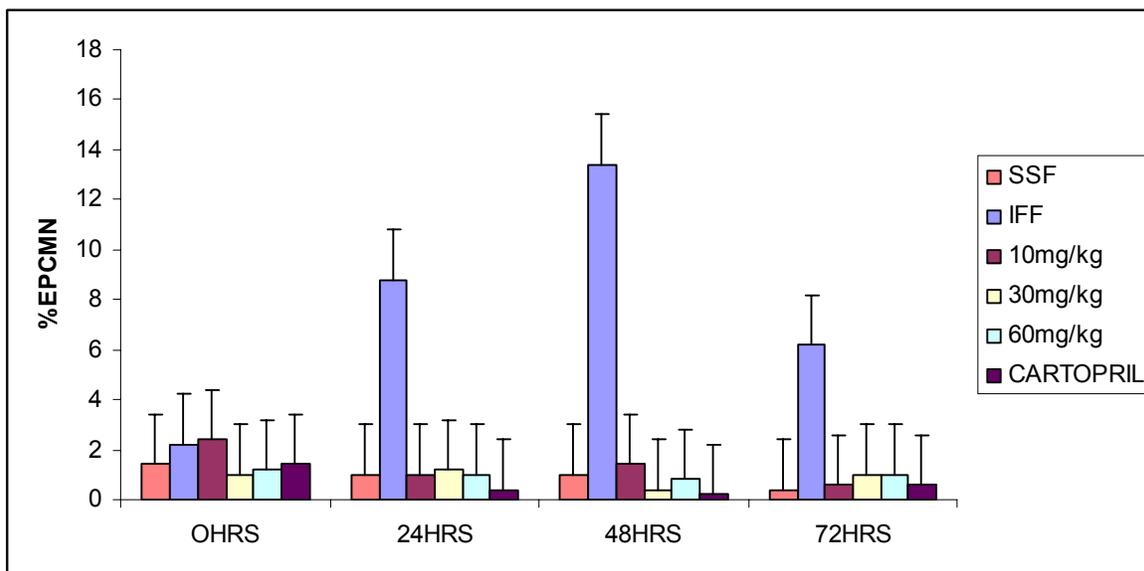
Por otro lado, se pudo observar que la frecuencia de EPCMN fue estadísticamente homogénea, antes de la administración (T0) en todos los lotes, lo cual indica que el trabajo se realizó adecuadamente (Gráfica 1 y Cuadro 6).

En relación al LQM319 se observó que no se incrementó la frecuencia de EPCMN en ninguno de los tiempos estudiados, desde la dosis mínima (10mg/kg) hasta la dosis máxima (60mg/kg), la frecuencia se mantuvo entre valores de 0 y 3 MN que corresponden a los valores basales del control negativo(cuadro 6) .

En cuanto al comportamiento del Captopril se observó al igual que en el caso del comportamiento del LQM319, que éste no ocasionó un aumento en la frecuencia de micronúcleos en ninguno de los tiempos de muestreo.

A su vez al comparar los cinco lotes con el control negativo (SSF), únicamente se presentó diferencia estadísticamente significativa entre el control negativo y el lote de IFF (60mg/Kg) en todos los tiempos, reafirmando lo antes mencionado de que el LQM319 y el Captopril no aumentaron la frecuencia de EPMN.

Cuadro 6. Promedios (χ) de EPCMN/ENC +/- error estándar medio (e.e), obtenidos a diferentes tiempos de muestreo en los diferentes lotes.					
	IFF χ +/- e.e.	10mg χ +/- e.e (LQM)	30mg χ +/- e.e (LQM)	60mg χ +/- e.e (LQM)	CAPTOPRIL
OHRS	2.2+/(0.37)	2.4+/- (0.40)	1+/- (0.0)	1.2+/- (0.20)	1.4+/- (0.24)
24HRS	8.8+/- (1.2)	1+/- (0.31)	1.2+/- (0.20)	1+/- (0.0)	0.4+/- (0.24)
48HRS	13.4+/(0.60)	1.4+/- (0.24)	0.4+/- (0.24)	0.8+/- (0.20)	0.2+/- (0.20)
72HRS	6.2+/- (0.86)	0.6+/- (0.40)	1+/- (0.44)	1+/- (0.44)	0.6+/- (0.24)



Gráfica 1. Porcentaje (%) de Frecuencia de EPCMN en 1000 EPC en el estudio realizado al compuesto LQM319. Resultados obtenidos mediante el análisis estadístico de ANOVA donde $F = 51.129$ y $\alpha < 0.001$ extremadamente significativo.

II. Frecuencia de EPC / (EPC + ENC)

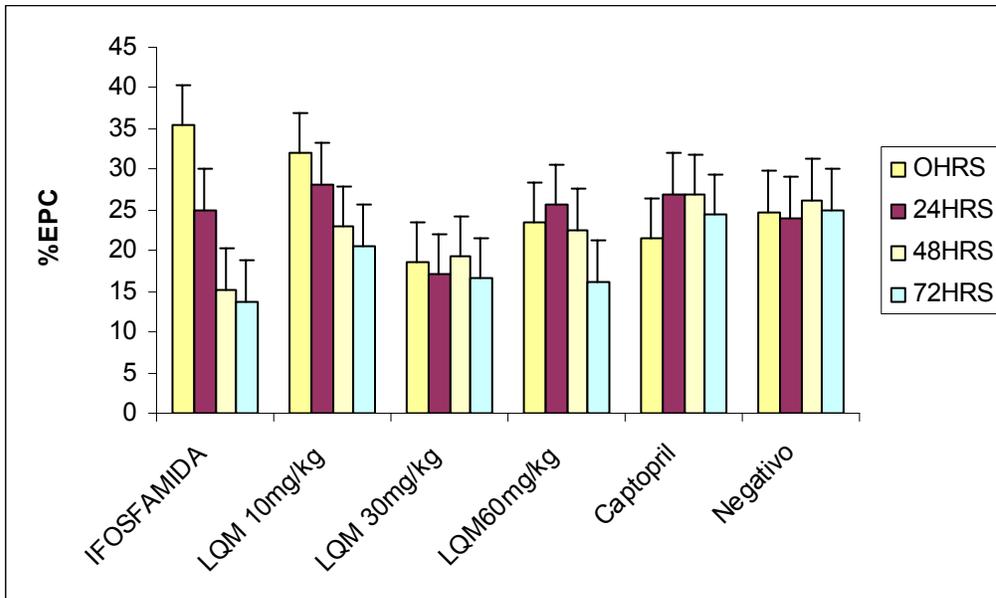
Con lo que respecta a la relación EPC/(EPC+ENC) como parámetro para determinar la citotoxicidad del compuesto, los resultados muestran que el comportamiento del lote control negativo (SSF) tuvo un comportamiento homogéneo, lo cual indica que el trabajo se realizó adecuadamente. (Gráfica 2) (Cuadro 7)

En relación al comportamiento del lote de la IFF (control positivo) se observó una disminución significativa en la frecuencia de EPC entre el (T0) con un valor promedio de 35.4 y el (T48) cuyo valor promedio fue de 15.2 que al ser tratados mediante el análisis estadístico de ANOVA presentaron una $P < 0.05$, pero dicha disminución se hizo aún más significativa al comparar la frecuencia de EPC a (T0) y (T72) cuyo valor promedio fue de 13.8 en donde se obtuvo un valor de $P < 0.01$. Lo cual indica que la diferencia más significativa en cuanto a la disminución de EPC se encuentra al T72 post-administración.

Sin embargo se encontró que el compuesto LQM319 tendió a disminuir la frecuencia de EPC desde la dosis mínima hasta la dosis máxima pero esta disminución no fue estadísticamente significativa como se muestra en los resultados estadísticos obtenidos mediante la prueba de ANOVA.

Es importante hacer notar que el Captopril mostró un comportamiento más homogéneo en todos los tiempos de muestreo.

Cuadro 7. Promedios (χ) EPC/1000EPC+ENC \pm el error estándar medio; obtenidos todas las dosis y diferentes tiempos de muestreo en los diferentes lotes.				
	$\chi \pm e.e$ 0hrs	$\chi \pm e.e$ 24hrs	$\chi \pm e.e$ 48hrs	$\chi \pm e.e$ 72hrs
IFOSFAMIDA	35.4 \pm (4.7)	25 \pm (2.1)	15.2 \pm (1.9)	13.8 \pm (2.6)
LQM 10mg/kg	32 \pm (2.3)	28.2 \pm (3.3)	23 \pm (2.0)	20.6 \pm (0.67)
LQM 30mg/kg	18.6 \pm (2.0)	17 \pm (1.6)	19.2 \pm (1.4)	16.6 \pm (2.54)
LQM60mg/kg	23.4 \pm (4.8)	25.6 \pm (4.2)	22.6 \pm (2.6)	16.2 \pm (2.50)
Captopril	21.4 \pm (2.8)	27 \pm (3.1)	26.8 \pm (3.5)	24.4 \pm (2.3)
Negativo	24.8 \pm (4.7)	24 \pm (4.7)	26.2 \pm (6.2)	25 \pm (4-9)



Gráfica 2. Porcentaje (%) de Frecuencia EPC en 1000 eritrocitos totales (EPC+ENC) para ifosfamida 60mg/kg, Captopril 10mg/kg, SSF (control negativo) y el compuesto LQM319 a sus diferentes dosis y tiempo de muestreo.

Resultados obtenidos mediante el análisis estadístico de ANOVA donde $F=2.344$, considerando un valor de $\alpha < 0.0021$ extremadamente significativo y un valor de $\alpha > 0.05$ no significativo.

IX. DISCUSIÓN.

El compuesto LQM319 el cual mostró ser el miembro de una serie de 17 compuestos con mejor potencia y eficacia para disminuir la PAM, PAD, PAS, FC a dosis menores a 0.001mg/Kg; mostró aún mejor potencia que los fármacos antihipertensivos comerciales Omapatrilat y Losartán (19); este compuesto se puede considerar el mejor candidato para ser usado como un posible agente hipotensor por lo que fue necesario realizarle la prueba de micronúcleos *in vivo* debido a que es la prueba primaria de elección para un estudio genotóxico. (26)

Tanto la determinación de la Dosis letal cincuenta (DL50) como la prueba de micronúcleos se realizaron en ratones machos cepa CD1, ya que al utilizar un organismo completo podemos evaluar la toxicidad tanto de la sustancia química original como de los metabolitos que puedan surgir en el proceso de transformación metabólica (17).

Los métodos que se utilizaron en ambas determinaciones son métodos estandarizados y validados con un alto grado de reproducibilidad lo que respalda los resultados obtenidos en el presente proyecto de investigación.

La determinación de la dosis letal media DL50 regularmente es el parámetro que se evalúa en una nueva sustancia química. La DL50 es la dosis única (deducida con métodos estadísticos) de una sustancia (16), que puede esperarse que produzca la muerte en 50% de los animales (14). A su vez, es un parámetro que clasifica la potencia tóxica de un xenobiótico en forma útil y práctica como se muestra a continuación:

Potencia de un tóxico en función de la DL50 .

	DL50 mg/kg
1.- Extremadamente tóxico	< 1
2.- Altamente tóxico	1-50
3.- Moderadamente tóxico	50-500
4.- Ligeramente tóxico	500-5000
5.- Prácticamente inocuo	5000-15000

Potencia de un tóxico en función de la DL₅₀ (18)(33)

La DL50 del compuesto LQM319| por el método de Lorke resultó ser de 471.1 mg/kg pero debido a que este método no es el procedimiento toxicológico más difundido y aceptado, se ha realizado también la prueba de Probit como un parámetro que respalde dicho resultado. Este estudio fue realizado recientemente por la Maestra en Ciencias Ma. Pilar Márquez quien obtuvo una DL₅₀ de 327.7mg/kg, por lo que el compuesto LQM319 se clasificó como una sustancia moderadamente tóxica.

Sin embargo, hay que recordar que los índices de seguridad en los compuestos comerciales: Captopril y Losartán indican las siguientes DL50 de 1040mg/kg (DE50=0.00062mg/kg) y 1500 mg/kg (DE50=0.02815mg/Kg) respectivamente por lo que resultó tener una toxicidad mayor que éstos, los cuales son ligeramente tóxicos (38)(15)(19).

Al realizar el ensayo de micronúcleos (MN) *in vivo* en sangre periférica de ratón la lfosfamida usada como control positivo presentó un daño genotóxico como era de esperarse, el efecto máximo fue a las 48hrs. post-administración, después de este máximo, el daño disminuyó debido a que después de la administración, las muestras sanguíneas alcanzaron un estado estacionario en la frecuencia de EPCMN entre 48 y

72 horas post-administración como se observó en los resultados. Con respecto a la citotoxicidad, la Ifosfamida mostró la tendencia citotóxica que se esperaba por ser un agente alquilante pues su acción sobre el ADN causa la muerte de células neoplásicas.

Ninguna de las dosis administradas del compuesto LQM319 incrementó significativamente la frecuencia de EPMN en comparación con el aumento gradual en la frecuencia de EPCMN con un máximo de inducción a las 48hrs post-administración de la dosis de 60mg/kg de Ifosfamida, lo cual deja en claro que dicho compuesto no es un agente clastógeno o anéugeno que pueda causar un efecto genotóxico.

Al comparar del mismo modo la frecuencia de EPC se observó que no existe una disminución significativa en ninguno de los lotes administrados con el compuesto LQM319, lo cual lo excluye de ser un agente citotóxico en relación con el comportamiento del lote administrado con Ifosfamida, en el cual, se tuvieron descensos significativos en los tiempos de muestreo de 48 y 72 hrs. Post-administración obteniéndose una mayor significancia a las 72hrs.

En cuanto a los datos representados en la gráfica 2 podemos observar claramente que el lote comparativo al cual se le administró Captopril muestra un comportamiento constante en los diferentes tiempos de muestreo. Esto refuerza lo antes mencionado, en cuanto a la clasificación de la potencia tóxica de Captopril cuya DL_{50} es 1040 mg/kg (36) por cual resulta ser menos tóxico que el LQM319 con una DL_{50} 471.1 mg/kg. Sin embargo aún siendo de mayor toxicidad el LQM319 que el Captopril y el Losartán; no produce daño al material genético. Una posible explicación del comportamiento del LQM319 en relación a la disminución en la frecuencia de EPC aún y cuando no resulta ser significativa, puede deberse al metabolismo del compuesto LQM319, el posee dos moléculas de tiomorfolina las cuales pueden ser metabolizadas por citocromo P450, formando así los dos posibles intermediarios metabólicos: 2,6-bis (metilamino)-4-terbutilfenol y el ácido tioglicólico.

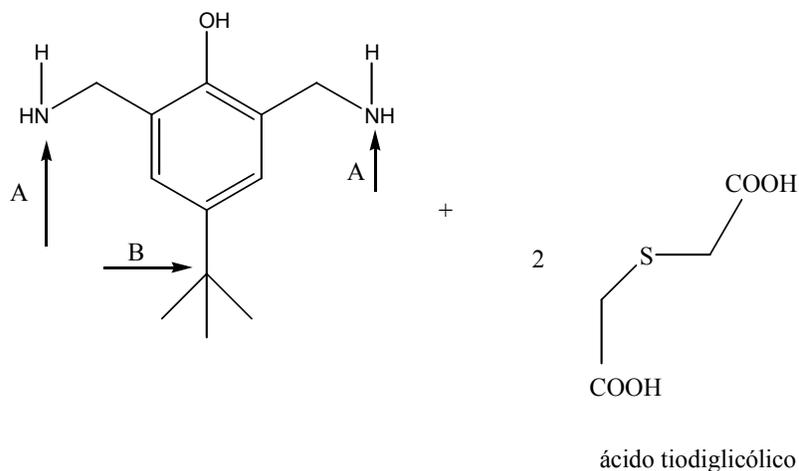


Fig.15 .Posibles intermediarios metabólicos del LQM319 ((A) centros nucleofílicos, (B) centro electrofílico), 2 moléculas de ácido tiodiglicólico.

El metabolismo del ácido tiodiglicólico en *M. aurium* MO1, mostró que éste no pudo ser metabolizado por las bacterias, causando su acumulación y por ende su toxicidad; pero tomando en cuenta la presencia de enzimas endógenas de la fase II en el ratón, capaces de unirse a heteroátomos ricos en electrones (O, N, S) para llevar a cabo los procesos de glucoronidación o conjugación con glutatión, permitiendo la excreción de los dos posibles intermediarios metabólicos vía renal, por lo cual tal vez puede inhibirse la acumulación y no presentar un efecto genotóxico o citotóxico.

Esto permite justificar por un lado, que el efecto genotóxico quizás no se produce debido a la falta de un intermediario con propiedades electrofílicas producto de la oxidación por las enzimas citocromo P450 que tendiera a unirse al oxígeno o al nitrógeno del ADN.

Por lo cual se puede suponer que existe una relación con la presencia de átomos de azufre en la molécula del LQM319 y la toxicidad moderada de dicho compuesto, ya que al formarse ácido tiodiglicólico y al no ser excretado rápidamente podría producir cierto efecto en las células y esto cause una DL_{50} con valores dentro del rango de 50 a 500mg/kg, en el cual entran los compuestos moderadamente tóxicos como el LQM319.

El resultado de esta investigación pone de manifiesto que el compuesto LQM319 requiere de otros estudios para poder ser considerado como una alternativa efectiva, terapéuticamente hablando y de menor costo para el control de la hipertensión y la insuficiencia cardiaca.

XI. CONCLUSIONES.

- 8.1 Mediante la prueba de micronúcleos el compuesto tiomorfolínico LQM319 no presentó actividad genotóxica, ni citotóxica a las dosis y con el modelo biológico utilizado, por lo que se considera un compuesto seguro para su posible uso como hipotensor.
- 8.2 La Ifosfamida a la dosis de 60mg/kg usada como control positivo produjo un efecto citotóxico y genotóxico como se esperaba al ser un agente alquilante cuya acción sobre el ADN causa la muerte de células neoplásicas.
- 8.3 El Captopril usado como una sustancia comparativa a la dosis de 10mg/kg no produjo efectos citotóxicos y/o genotóxicos. Al ser comparado con el LQM319 a la misma dosis, éste último resultó ser un compuesto de toxicidad más elevada.

XI. Anexo.

A) Formación del clorhidrato LQM319 (Prueba de micronúcleos).

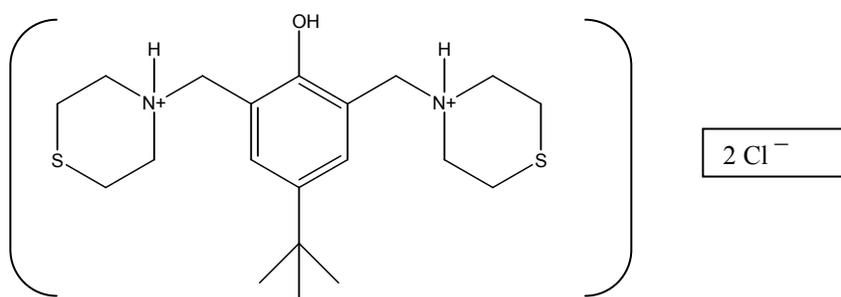


Fig. 16. CLORHIDRATO LQM (319).

Clorhidrato.- Sal formada entre una base orgánica y el ácido clorhídrico que tiene como finalidad volver dicha base más soluble en agua.

La reacción para formar el clorhidrato es una reacción de equilibrio ácido-base por lo que es necesario obtener el número de equivalentes para que esta se pueda llevar a cabo. (2) (14)

Equivalente = (moles de la sustancia) / n

En sustancias que participan en reacciones ácido-base n es el número de H⁺ o OH⁻ que se pueden ceder o aceptar. Por lo tanto n = 2 para la formación del clorhidrato del LQM319.

Cálculos para la formación del clorhidrato.

Datos:

LQM: Peso molecular = 380 g/ mol

HCl : Peso molecular = 36.46 g /mol

Pureza = 38%

Densidad= 1.192 g /mL

Ratón: Peso promedio 25g.

Volumen permitido para administrarse por vía intraperitoneal (ip)
= 0.3 mL a 0.5mL.

Dosis: 10mg, 30mg y60mg/k de peso.

Distribución por lote: 5 elementos.

Dosis 10mg/k de peso.

Lote de 5 elementos de 25g cada uno (25gr x 5 = 125gr).

10mg ----- 1000mg

X ----- 125mg

X= 1.25 mg ó 0.00125g (cantidad de LQM 319 a pesar para obtener la dosis correspondiente).

380g LQM 319 ----- 2 equivalentes HCl

0.00125 g LQM 319 ----- X

X= 6.57x10⁻⁶ equivalentes (HCl necesario para la formación del clorhidrato LQM319).

$$0.00000657 \quad eqHCl \quad \frac{(36.46 \text{ g})}{(eqHCl)} \left(\frac{100 \%}{38 \%} \right) \left(\frac{1 \text{ mL}}{1.192 \text{ g}} \right) \approx 0.00052 \text{ mL}$$

0.000528mL HCl ó 0.52 µL HCl necesarios para formar el clorhidrato LQM 319.

Dilución realizada para poder obtener la concentración de HCl.

5.2µL ----- 10,000µL

0.52µL ----- X

X= 1000µL (cantidad de ácido clorhídrico a tomar para formar el clorhidrato del LQM 319).

Pero el volumen a administrar es de 1.5mL de los cuales 0.5 esta designado para cada elemento, por lo que se agregan 1000µL de agua desionizada realizar la solución en un sonificador. Al realizar la medición de pH por medio de tiras reactivas este es de pH = 3.0

Dosis 30mg/kg de peso.

Lote de 5 elementos de 25gr cada uno (25gr x 5 = 125gr).

30mg ----- 1000mg

X ----- 125mg

X= 3.75 mg ó 0.00375gr (cantidad de LQM 319 a pesar para obtener la dosis correspondiente).

380g LQM 319 ----- 2 equivalentes HCl

0.00375 g LQM 319 ----- X

X= 1.97x10⁻⁵ equivalentes (HCl necesaria para la formación del clorhidrato LQM319).

$$0.000019 \text{ eqHCl} \left(\frac{36.46 \text{ g}}{\text{eqHCl}} \right) \left(\frac{100 \%}{38 \%} \right) \left(\frac{1 \text{ mL}}{1.192 \text{ g}} \right) \approx 0.00152 \text{ mL}$$

0.00152mL HCl ó 1.5 µL HCl necesarios para formar el clorhidrato LQM 319.

Dilución realizada para poder obtener la concentración de HCl.

15µL ----- 10,000µL

1.5µL ----- X

X= 1000µL (cantidad de ácido clorhídrico a tomar para formar el clorhidrato del LQM 319).

Pero el volumen a administrar es de 1.5mL de los cuales 0.5 esta designado para cada elemento, por lo que se agregan 500µL de agua desionizada realizar la solución en un liofilizador. Al realizar la medición de pH por medio de tiras reactivas este es de pH = 3.0

Dosis 60mg/kg de peso.

Lote de 5 elementos de 25g cada uno (25g x 5 = 125g).

60mg ----- 1000mg

X ----- 125mg

X= 7.5 mg ó 0.0075g (cantidad de LQM 319 a pesar para obtener la dosis correspondiente).

380g LQM 319 ----- 2 equivalentes HCL

0.0075 g LQM 319 ----- X

X= 3.94×10^{-5} equivalentes (HCl necesaria para la formación del clorhidrato LQM319).

$$0.000039 \text{ eqHCl} \frac{(36.46 \text{ g})}{(\text{eqHCl})} \left(\frac{100 \%}{38 \%} \right) \left(\frac{1 \text{ mL}}{1.192 \text{ g}} \right) \approx 0.00313 \text{ mL}$$

0.00313mL HCl ó 3.1 µL HCl necesarios para formar el clorhidrato LQM 319.

Dilución realizada para poder obtener la concentración de HCl.

30µL ----- 10,000µL

3.1µL ----- X

X= 1033µL (cantidad de ácido clorhídrico a tomar para formar el clorhidrato del LQM 319).

El volumen a administrar fue de 1.5mL de los cuales 0.5 esta designado para cada elemento, por lo que se agregan 467µL de agua desionizada realizar la solución en un liofilizador. Al realizar la medición de pH por medio de tiras reactivas este es de pH = 3.0

Glosario.

Aberración cromosómica : Son cambios estructurales que puede ser observados en la metafase del ciclo celular y que tienen su origen en roturas (procesos clastogénicos) de las cadenas de ADN no reparadas o mal reparadas.

ADN (Ácido desoxirribonucleico): Macromolécula que normalmente está formada por una doble cadena ligada por los enlaces débiles entre los pares de nucleótidos. Los cuatro nucleótidos en el ADN contienen las bases: adenina(A), guanina (G), citosina (C), y el timina (T).

Ácidos Nucléicos: Biomoléculas formadas por nucleótidos. Está presente en todas las células y constituye la base material de la herencia. Existen dos tipos, el ácido desoxirribonucleico, ADN, y el ácido ribonucleico, ARN.

Anafase Estadio de la mitosis durante la cual las cromátidas hermanas (o pares homólogos en la meiosis I) se separan y se alejan (se segregan) hacia los polos del huso.

Aneuploide: Célula o individuo con un número de cromosomas que no es múltiplo exacto del número haploide. Los ejemplos más frecuentes son las trisomías o monosomías.

Aneuploidía: Adición o pérdida de uno o más cromosomas, que da lugar a un desequilibrio del complemento cromosómico, o cualquier número de cromosomas que no sea un múltiplo exacto del número haploide.

Bandas: Áreas alternantes claras y oscuras, visibles en los cromosomas tras aplicar ciertos tipos de tinción.

Bandas C: Tinción cromosómica que realza la heterocromatina constitutiva que se localiza en los centrómeros y en sus proximidades.

Biomedicina: Área de investigación que sigue un camino ascendente desde el fenotipo hasta el genotipo, desde la expresión de un gen en una proteína hasta el papel que ésta desempeña en una vía metabólica. La Biomedicina fundamenta su existencia en el soporte que proporciona el conocimiento de los procesos biológicos a nivel molecular para entender las manifestaciones clínicas de una patología.

Cáncer: Enfermedades en las cuales las células anormales se dividen y crecen desenfrenadas. El cáncer puede separarse de su sitio original a otras partes del cuerpo y puede ser fatal.

Carcinogénesis: Proceso de desarrollo del cáncer.

Células madres o primitivas hematopoyéticas: Las células madres hematopoyéticas son las más primitivas de todas las células sanguíneas. La mayoría de estas células no se están dividiendo. Pero a través de su vida conservan la capacidad de dividirse y autorenovarse para poder dar origen a las células maduras de la sangre, tales como eritrocitos, granulocitos, linfocitos y plaquetas.

Centrómero: Secuencia de ADN necesaria para la segregación adecuada de cromosomas durante la mitosis y la meiosis; región de los cromosomas mitóticos donde se forma el cinetocoro y que parece una constricción, es decir, es una región especializada del cromosoma en la cual las fibras del huso se unen durante la división de célula. Región del cromosoma que separa los dos brazos y en la que se unen las dos cromátides.

Citogenética: Estudio de la estructura, función y anomalías de los cromosomas. Parte de la Genética que estudia la apariencia microscópica de los cromosomas y sus anomalías en la enfermedad.

Cromosoma: Estructura física, también llamada cromatina, que consiste en una molécula de ADN compactado y proteínas, organizada en genes y mantenida por proteínas llamadas cromatina.

División celular: Separación de una célula en dos células hijas. En los eucariontes superiores comprende la división del núcleo (mitosis) y el citoplasma (cinetocinesis); a menudo se utiliza el término mitosis para referirse tanto a la división nuclear como a la citoplasmática.

Entrecruzamiento (sinónimo: recombinación): Intercambio de un segmento de DNA entre los dos cromosomas homólogos durante la meiosis, su resultado es una combinación nueva de material genético en el gameto.

Estereoquímica: Parte de la química orgánica que se encarga de explicar las diferentes reacciones químicas que pueden llevar a cabo aquellas moléculas que poseen la misma fórmula molecular pero diferente estructura conocidas como isómeros. Se clasifican en isómeros estructurales y estereoisómeros.

FISH *Fluorescent in situ hybridization* (hibridación in situ con fluorescencia): Técnica que se utiliza para identificar, en una muestra problema, la presencia de Cromosomas determinados o regiones específicas de Cromosomas cuya secuencia es conocida, (sondas de **ADN**), y que marcamos con fluorescencia.

Gen: Unidad básica de herencia que ocupa una posición concreta en el genoma (locus) y está constituido por una secuencia de ADN cuya existencia se puede conformar por variantes alélicas y que codifica un ARN funcional para la transcripción de un polipéptido.

Genética: Ciencia que trata de la reproducción, herencia, variación y el conjunto de fenómenos y problemas relativos a la descendencia. El estudio de los patrones de la herencia de rasgos específicos.

In vitro: Estudios realizados en el exterior un organismo vivo, hechos dentro de un laboratorio.

In vivo: Estudios realizados en organismos vivos.

Interfase: período en el ciclo de la célula cuando la ADN se repliega en el núcleo; seguido por mitosis. Período del ciclo celular comprendido entre dos divisiones sucesivas

Metafase: Segunda fase de la división celular, en la que los cromosomas (o tétradas en la primera división meiótica) se colocan en el plano ecuatorial del huso acromático.

Micronúcleos: Fragmentos del cromosoma que no se incorporan en el núcleo en la división de la célula.

Mutación: Cualquier alteración hereditaria producida en un gen con respecto a su estado natural; puede ser patológica o una variante no patológica.

Mutágeno: Un agente que causa un cambio genético permanente en una célula. No incluye los cambios que ocurren durante la recombinación genética normal.

Tautómero: Isómeros estructurales que difieren sólo en la posición de un átomo de hidrógeno, o protón. Puesto que los tautómeros se pueden transformar rápidamente en soluciones acuosas mediante la transferencia de protones, suelen estar en equilibrio entre sí. Los isómeros cetónico y enólico son ejemplos frecuentes de tautómeros.

XII. REFERENCIAS.

1. Abramsson L.Z., Svensson K. (2005). "Semicarbazide is not genotoxic in the flow cytometry-based micronucleus assay in vivo. *Toxicology Letters* **155**: 211-217.
2. Barcelo R. J. (1982). "Diccionario de Terminología Química". 2da. Ed. Alambra. Madrid (España).
3. Brown A. B. (1976). "Técnicas de Laboratorio de Hematología". España.
4. Combourieu B., Besse P., Sancelme M., Godin JP., Monteil A., Veschambre H., (2000). Common Degradative Pathways of Morpholine, Thiomorpholine, and Piperidine by *Mycobacterium aurum* MO1: Evidence from ¹H-Nuclear Magnetic Resonance and Ionspray Mass Spectrometry Performed Directly on the Incubation Medium. *Applied and Environmental Microbiology* **66(8)**:3187-3193.
5. Cortina M. JH., Ferro F.VR., Morris Q. HJ., Echevarria D.L., Poveda C. LA. (2004) Estudio cualitativo de relación estructura-actividad de aldehídos aromáticos, potenciales agentes *antisickling*. *Revista Cubana Investigación. Biomédica*. **23 (1)** Suplemento.1.
6. P.L.M. (2006). "Diccionario de Especialidades Farmacéuticas.
7. Drets E. M. (2002). "Una saga citogenética: El descubrimiento de los métodos de bandeado cromosómico. Significado y proyección biomédica". *Revista Médica Uruguay*. **18**: 107-121.

8. Díaz Lanciego M. A.(2003). Estudio genotípico del citocromo P450 en una cohorte de pacientes con cáncer de pulmón en el área sanitaria de Mérida. <http://dialnet.unirioja.es/servlet/tesis?codigo=198>
9. Escalona J.C; Carrasco R; Padrón J.A;(2004) “Introducción al diseño de Fármacos”.Folleto para la docencia de la asignatura de Farmacia. Universidad de Oriente. <http://www.fq.uh.cu/investig/lqct/imagenes2/disenio.pdf>
10. Flores R. PN. (1988). “Los mecanismos moleculares de las mutaciones”. Tesis de licenciatura FESC-1.UNAM.
11. Gardner J, Simmons J, Snustad P. (2005). Principios de Genética. 4ta. Ed. Limusa. México.
12. Gopala K., Makoto H.(2000). In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conducts and data interpretation. *Mutation Research*.**455**:155-166.
13. Guerra T., Bello P. R. González D. H. (2001). Construcción de un modelo de predicción para la propiedad farmacocinética *excreción urinaria* en fármacos orgánicos .*MEDISAN*. **5(2)**:16-23
14. Hackhs (1969). “Chemical Dictionary”. 4ta.Ed. Mc. Graw-Hill Interamericana. México.
15. Herrera, Salazar Alma (2005). Evaluación de la actividad hipotensora de ocho compuestos dimorfolínicos en rata wistar. Tesis de licenciatura FESC-1 UNAM.

16. Hirai O., Miyamae Y., Fujino Y., Izumi H., Miyamoto A. (1991). "Prior bleeding enhanced the sensitivity of the in vivo micronucleus test". *Mutation Researches*. **264**, 109-114.
17. Klaassen D.C;Watkins III B.J;(2001). CASARETT & DOULL "Manual de Toxicología".5ta. Ed. Mcgraw-Hill Interamericana. México.
18. Loomis A. T. Ph. D., M.D. (1984). "Fundamentos de Toxicología" .Ed. Acribia . Zaragoza (España).
19. López T. Ma.E.(2006).Determinación del efecto hipotensor de la serie de los compuestos Diseñados por computadora Dimorfolínicos y Tiomorfolínicos .Tesis de licenciatura. FESC-1. UNAM.
20. Lorke.P.(1983)." A new approach to practical acute toxicity testing". *Archives of Toxicology* **54**:275-278.
21. Makoto Hayashi, Takkeshi Morita, Yukio Kodoma,(1990) ."The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutation Research*. **245**: 245-249.
22. Márquez B. Ma.P. (1997).Estudio de la capacidad antigenotóxica del ácido norhidroguayaretico Evaluada *in vivo* con las pruebas de micronúcleos y la frecuencia de intercambio de cromátidas hermanas. Tesis Profesional. FESC-1 UNAM.
23. Martin D Barratt and Rosemary A Rodford. (2001) "The computational prediction of toxicity". *Current Opinion in Chemical Biology*, **5**:383–388

24. Meza I, Frixione E. (1996). Máquinas vivientes ¿Cómo se mueven las células?. Ed. F.C.E. México.
http://www.jcce.org.cu/libros/Libros_3/ciencia3/143/htm/maquinas.htm
25. Misiura K., Kusnierczyk H., Kinas W.R. (2002) Studies on the Side-chain Hydroxylation of Ifosfamide and Its Bromo Analogue. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* .**12(3)**:427-431.
26. F.D.A (Redbook 2000). "Principios toxicológicos para la seguridad de alimentos":
<http://www.cfsan.fda.gov/~redbook/redivc1d.html>.
27. Página Web 2006: <http://www.monografias.com/trabajos14/dosis-letal.shtml>.
28. Página Web. 2006. Pfizer.
29. http://www.pfizer.com.ar/productos/prod_detalle.asp?id=70
30. Página Web (2007) "Evaluación nocturna del metabolismo del S-carboximetil-L-isteína en seres humanos".
<http://cat.inist.fr%3DafficheN%26cpsidt%3D1940266&sa=X&oi=translate&resnum=/&ct=result&prev=/search%3Fq%3Dcarbocisteina%2Bfarmacocinetica%26hl%3Des%26sa%3DX>.
31. Pecina Ramiro Cesar Adrián (2004). "Síntesis, caracterización y modelaje molecular de derivados morfolínicos con potencial en la actividad cardiovascular". Tesis de Licenciatura FESC-1 UNAM.
32. Pierce, Benjamín A. (2005). Genética Un enfoque conceptual .Ed. Médica Panamericana. España.
33. Repetto M. (1981). "Toxicología Fundamental" Ed. Científico-Médica". Barcelona (España).

34. Schmid W.(1975). "The micronucleus test". *Mutation Researches*.**31**:915.
35. Silbergeld. K. E. "Enciclopedia de Salud y seguridad en el trabajo .Capitulo "Toxicología genética". <http://www.mtas.es/insht/EncOIT/pdf/tomo1/33.pdf>
36. The Merck Index.12 ed. Merck & CO.INC.E.U.A.
37. Thomas, K., Chang, L., Laurel, P., Waxman, D. 1997. Enhanced cyclophosphamide and ifosfamide activation in primary human hepatocyte cultures: response to cytochrome P450.Inducers autoinduction by oxaphosphorines. *Cancer Research*. **57**:1946-1954.
38. Velázquez S. A.Ma. (2007). "Diseño asistido por computadora, síntesis y actividad antihipertensiva de Derivados morfolinicos del fenol". Tesis de Doctorado. FESC-1 UNAM.
39. Velázquez A.Ma; Martínez L; Abrego V; Balboa M; Torres A; Camacho B; Díaz B; Romero A; Lopez; Angeles E. (2007). Synthesis and antihypertensive effects of new methylthiomorpholinphenol derivaties. *European Journal of medicinal Chemistry*.(en prensa).
40. Velázquez A.Ma; Torres A; Díaz G; Ramírez A; Hernández R; Santillán H; Martínez L. Martínez I; Díaz S, Abrego V; Balboa M; Camacho B, López R. Dueñas G; Cabrera G and Angeles E (2006)." A novel one pot, solvent_free Mannich síntesis of methylpiperidinyl phenols, methyphenylmorpholinyl phenols and methylthiophenylmorpholinyl phenols using infrared irradiation. *ARKIVOC* 150-161.
41. Velázquez A.Ma; Valencia A; Pecina A; Menconi I; Martínez L; Ramirez A;

Hernández R; López R. Olvera , Angeles E.(2005) “ Síntesis of 4-tert-butyl-2-(thiomorpholin-4-methyl)phenol,and 4-tert-butyl-2,6-bis(thiomorpholin-4-methyl)phenol.*Molbank* 401.

42.Villegas Frias (2005). “Determinación de la actividad hipotensora de ocho compuestos dimorfolínicos en rata wistar”.FESC-1 UNAM.

43.Wei L.,Brossi A., Kendall R., Bastow K.F., Morris N., Qian Shi and Kuo-Hsiun Lee.(2006). “Antitumor agents 251: Synthesis, cytotoxic evaluation, and structure–activity relationship studies of phenanthrene-based tylophorine derivatives (PBTs) as a new class of antitumor agents”. *Natural Products Research Laboratories, School of Pharmacy, University of North Carolina, Chapel Hill, NC 27599, USA*

44.William J. W.,Beutler E., Erslev J.A.,Rundles W.R.(1875).Hematología .Salvat Editores. Barcelona (España).

45.Wong Salas Francisco Roberto (2005).”Determinación del efecto hipotensor de los compuestos: LQM 501 y 502, en el modelo de rata conciente. Tesis de licenciatura FESC-1 UNAM.

