



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN
COORDINACIÓN GENERAL DE POSGRADO

Evaluación *in vivo* de la dosis letal 50 de nuevos α -aminofosfonatos

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN MEDICINA MOLECULAR

QUE PRESENTA:

C.D. EDUARDO MARCO ANTONIO REYNOSO RIOS

DIRECTORA DE TESIS: Dra. Gabriela Castañeda Corral

Cuernavaca, Morelos, México a 9 de diciembre del 2022

Lugar y fecha de realización

El presente proyecto se realizó de enero del 2021 a enero del 2022 en el laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos.

Agradecimientos por el financiamiento

En el presente proyecto se contó con el apoyo de la **beca de maestría No. 1034186** otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT).

El presente proyecto fue financiado gracias al proyecto **No. CF- 2019-140607** otorgado por el CONACYT.

Miembros del comité tutorial

Tutor principal: Dra. Gabriela Castañeda Corral

Tutor personal: Dr. Juan José Acevedo Fernández

1er vocal: Dra. Luz María González Robledo

2do vocal: Dr. Iván Romero Estudillo

3er vocal: Dr. Jesús Santa-Olalla Tapia

Miembros del jurado de examen

Presidente: Dra. Gabriela Castañeda Corral, FM-UAEM

Secretario: Dr. Juan José Acevedo Fernández, FM-UAEM

1er vocal: Dr. Iván Omar Romero Estudillo, CIQ, UAEM

2do vocal: Dr. Pablo Noé Nuñez Aragón, CEP-CSAEGRO

3er vocal: Dr. Gerardo Sandoval Maruri, Servicios de Salud Morelos

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, en especial su Facultad de Medicina y a su Instituto de Investigaciones Químicas, ya que este trabajo fue posible gracias a sus áreas de investigación.

Agradezco personalmente a mi Tutora de tesis la Dra. Gabriela Castañeda, a mi tutor personal el Dr. Juan José Acevedo y a los vocales la Dra. Luz María González, el Dr. Iván Romero, el Dr. Gerardo Sandoval, el Dr. Pablo Núñez y el Dr. Jesús Santa-Olalla Q.E.P.D., ya que esta tesis es resultado de su conocimiento y dedicación en conjunto.

Por último, agradezco al CONACYT por los recursos otorgados para la realización de este proyecto con el cual se aporta evidencia científica como parte del Proceso de Descubrimiento y Desarrollo de nuevos fármacos que en un futuro podrían beneficiar a la sociedad.

RESUMEN

Antecedentes. El descubrimiento y desarrollo de un nuevo medicamento es un proceso que garantiza la eficacia, la seguridad, y la tolerabilidad de este antes de salir al mercado. Es en la fase preclínica de este proceso en la que se realizan los primeros estudios de seguridad a nuevos compuestos utilizando células, tejidos, y animales. Estudios preclínicos han demostrado que los nuevos α -aminofosfonatos desarrollados en el Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM tienen actividad antiinflamatoria y analgésica, sin embargo, aún se desconoce su perfil toxicológico.

Objetivo. Comparar la DL_{50} de los α -aminofosfonatos 1A, 1E Y 1F tras su administración aguda por vía intraperitoneal, con su DL_{50} tras su administración aguda por vía oral, en ratones hembra CD1.

Material y métodos. Se realizará la prueba de toxicidad aguda “up and down” 425 de la OECD en ratones hembra de la cepa CD1, administrando vía oral o intraperitoneal nuevos α -aminofosfonatos con actividad antiinflamatoria y analgésica.

Resultados. La DL_{50} del compuesto 1A por vía i.p. fue 1098 mg/kg, la DL_{50} del compuesto 1E por vía i.p. fue mayor a 2000 mg/kg y la DL_{50} por vía i.p. del compuesto 1F fue igual a 2000 mg/kg; los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F tienen una DL_{50} por vía oral mayor a 2000 mg/kg. El 79.31% de los animales que sobrevivieron presentó cambios conductuales reversibles.

Conclusión. Los α -aminofosfonato 1A, 1E y 1F tiene una $DL_{50} > 2000$ mg/kg de peso al ser administrados por vía oral lo anterior permite clasificarlos como inofensivos de acuerdo con la categorización de la OECD. En contraste los α -aminofosfonatos 1A, 1F y 1E tiene una DL_{50} de 1098, 2000 y, > 2000 mg/kg de peso respectivamente, al ser administrados por vía oral. Lo anterior sugiere que la vía de administración es un factor determinante de la toxicidad de estos compuestos.

Palabras clave. α -aminofosfonatos, dosis letal 50, vía intraperitoneal, vía oral.

ÍNDICE

RESUMEN	5
ÍNDICE DE FIGURAS	10
ÍNDICE DE TABLAS.....	10
ABREVIATURAS.....	12
1. INTRODUCCIÓN	13
1.1. Descubrimiento y desarrollo de medicamentos.....	13
1.1.2. Pruebas de seguridad farmacológica en la etapa preclínica.....	15
1.2. Toxicología	16
1.2.1. Toxicocinética	16
1.2.1.1. Absorción.....	17
1.2.1.2. Distribución.....	18
1.2.1.3. Bioacumulación	19
1.2.1.4. Metabolismo	20
1.2.1.5. Eliminación	24
1.2.2. Toxicodinamia	24
1.2.3. Toxicidad.....	26
1.2.3.1. Factores que afectan la toxicidad de una sustancia	27
1.2.3.2. Pruebas de toxicidad <i>in vitro</i>	31
1.2.3.2.1. Pruebas <i>in vitro</i> de toxicidad reproductiva y del desarrollo.....	31
1.2.3.2.2. Pruebas <i>in vitro</i> de toxicidad neuronal	32
1.2.3.2.3. Pruebas <i>in vitro</i> de toxicidad hepática.....	32
1.2.3.2.4. Pruebas <i>in vitro</i> de toxicidad cardíaca.....	32
1.2.3.2.5. Pruebas <i>in vitro</i> de genotoxicidad en líneas germinales.....	33
1.2.3.2.6. Modelo epitelial de vías aéreas <i>in vitro</i> para evaluar toxicidad por inhalación	33
1.2.3.3. Pruebas de toxicidad <i>in vivo</i>	33
1.2.3.3.1. Pruebas <i>in vivo</i> de toxicidad aguda.....	34
1.2.3.3.2. Pruebas <i>in vivo</i> de toxicidad aguda para sustancias volátiles o preparaciones en aerosol.....	37
1.2.3.3.3. Pruebas <i>in vivo</i> de toxicidad aguda para preparaciones tópicas	38

1.2.3.4. Prueba <i>in vivo</i> de toxicidad subaguda	39
1.2.3.5. Prueba <i>in vivo</i> de toxicidad subcrónica.....	40
1.2.3.5. Prueba <i>in vivo</i> de toxicidad crónica	40
1.2.3.7. Pruebas <i>in vivo</i> de carcinogenicidad	41
1.2.3.8. Pruebas <i>in vivo</i> de toxicología de la reproducción.....	41
1.2.3.9. Pruebas <i>in vivo</i> de toxicidad en el desarrollo.....	42
1.2.3.10. Prueba <i>in vivo</i> de toxicidad genética	43
1.2.3.11. Pruebas <i>in vivo</i> de neurotoxicidad en roedores.....	43
1.2.3.11.1. Evaluación del estado general de salud y de las funciones neurofisiológicas	44
1.2.3.11.2. Evaluación de las funciones motoras	44
1.2.3.11.3. Evaluación del aprendizaje y de la cognición.....	44
1.2.3.11.4. Evaluación de la actividad exploratoria y de la conducta.....	45
1.2.3.11.5. Evaluación de la nocicepción	45
1.2.3.12. Toxicidad gastrointestinal	46
1.2.3.12.1. Pruebas de toxicidad gastrointestinal	46
2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS	48
2.1. α -aminofosfonatos.....	48
2.1.1. Potencial bioactivo de los α -aminofosfonatos	48
2.1.2. Efecto antiinflamatorio y analgésico de los α -aminofosfonatos de interés	50
2.1.3. Toxicidad de los α -aminofosfonatos.....	54
2.1.4. Toxicidad de los α -aminofosfonatos de interés	69
3. JUSTIFICACIÓN	71
Pregunta de investigación.....	73
4. HIPÓTESIS.....	73
5. OBJETIVOS.....	74
5.1. Objetivo general	74
5.2. Objetivos específicos.....	74
6. MATERIALES Y MÉTODOS	75
6.1. Animales.....	75

6.2. Compuestos.....	75
6.3. Prueba de toxicidad aguda 425 de la OECD para determinar la DL ₅₀	76
6.3.1. Prueba límite: 2000 mg/kg de peso corporal.....	77
6.3.2. Prueba principal	78
6.3.3. Cálculo de la DL ₅₀	79
6.6. Presentación y análisis de resultados	79
7. RESULTADOS	81
7.1 Determinación de la DL ₅₀ i.p. de los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F por el método 425 de la OECD.....	81
7.2 Efectos conductuales observados después de la administración i.p. de los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F.....	84
7.3 Toxicidad oral aguda de los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F	86
8. DISCUSIÓN.....	89
9. CONCLUSIONES	92
10. PERSPECTIVAS	93
11. BIBLIOGRAFÍA.....	94

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases del Proceso de Descubrimiento y Desarrollo de un Medicamento.....	15
Figura 2. Síntesis de las fosfoserinas α -metiladas A= 1a-f, B= 2a-c). Modificada de Romero- Estudillo et al., 2018 [3].....	52
Figura 3. Método de "Arriba y Abajo" 425 de la OECD.	77
Figura 4. Prueba límite (2000 mg/kg).....	78
Figura 5. Prueba principal UPD 425 OECD.	80
Figura 6. Peso corporal de los ratones hembra CD1 antes y después de ser administrados con los α - aminofosfonatos 1a, 1E y 1F.....	86

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación de la OECD de la toxicidad de una sustancia con base en la DL ₅₀ y la vía de administración [12].....	27
Tabla 2. Pruebas para determinar la DL ₅₀ de una sustancia química [70, 72]	36
Tabla 3. α -aminofosfonatos reportados con actividad biológica.....	49
Tabla 4. α -aminofosfonatos con actividad antiinflamatoria y/o analgésica	51
Tabla 5. Toxicidad hemolítica y artemia salina de α -aminofosfonatos	55
Tabla 6. Estudios de antitumorales y toxicológicos de S12363	58
Tabla 7. Estudios de citotoxicidad y toxicidad de diferentes tipos de α -aminofosfonatos	63
Tabla 8. Estructura y nombre química de los α -aminofosfonatos estudiados.....	76
Tabla 9. Número de ratones utilizados para determinar la toxicidad aguda por vía i.p. de los α - aminofosfonatos 1A, 1E y 1F.....	81
Tabla 10. Resultados de la evaluación de la toxicidad aguda de CMC al 0.5% por vía i.p.	82
Tabla 11. Desenlace de los ratones administrados por vía i.p. con el compuesto 1A durante la prueba principal	82

Tabla 12. Desenlace de los ratones administrados por vía i.p. con el compuesto 1E durante la prueba límite.....	83
Tabla 13. Desenlace de los ratones administrados por vía i.p. con el compuesto 1F durante la prueba principal	84
Tabla 14. Cambios conductuales observados después de la administración i.p. de los α -aminofosfonatos en los ratones sobrevivientes.	85
Tabla 15. Desenlace de los ratones administrados por vía oral con el compuesto 1A durante la prueba límite.....	87
Tabla 16. Desenlace de los ratones administrados por vía oral con el compuesto 1F durante la prueba límite.....	87
Tabla 17. Desenlace de los ratones administrados por vía oral con el compuesto 1E durante la prueba principal.	87
Tabla 18. Cambios conductuales observados después de la administración oral con los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F.....	88

ABREVIATURAS

ABC	Transportadores dependientes de adenosín trifosfato
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AINE	Antiinflamatorio no esteroide
ATC	Toxicidad aguda categorizada
ATP	Adenosín trifosfato
COMT	Catecol O-metiltransferasa
CYP450s	Citocromos P450s
DDM	Descubrimiento y desarrollo de medicamentos
DL ₅₀	Dosis letal 50
GI	Gastrointestinal
GST	Glutación S-transferasa
i.p.	Intraperitoneal
NEQ	Nueva entidad química
NOAEL	Nivel sin efecto adverso observable
NRU	Captación de rojo neutro
OECD	Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo
p.o.	Intraoral
pH	Medida del grado de acidez o alcalinidad
pKa	pH en el que existe la misma cantidad de sustancia ionizada y no ionizada
UDP	Uridina difosfato
UDP	Método de arriba y abajo
UGT	Glucoroniltransferasa

1. INTRODUCCIÓN

Actualmente existe un gran número de investigaciones cuyo objetivo es la búsqueda de nuevos blancos moleculares que sirvan como dianas terapéuticas para el Descubrimiento y Desarrollo de Medicamentos (DDM). Este proceso ha ido acompañado de la búsqueda diseño y síntesis de nuevas entidades químicas (NEQs) [1], cuyo fin es diagnosticar, tratar y/o prevenir enfermedades [2]. Uno de los puntos más importantes durante el DDM es la evaluación de la toxicidad de las NEQs con actividad biológica, con la finalidad de garantizar su seguridad para su uso en humanos. La evaluación de la toxicidad se realiza desde etapas tempranas del DDM, principalmente en la fase preclínica a través de diversas pruebas de toxicidad *in vitro* e *in vivo* encaminadas a determinar la letalidad, el perfil de efectos adversos agudos y crónicos de las NEQs [3], así como su capacidad de generar efectos genómicos negativos tales como mutagenicidad, teratogenicidad y carcinogenicidad [4]. Si los resultados de las pruebas toxicológicas indican un riesgo bajo y los beneficios terapéuticos superan el riesgo, es posible continuar con los estudios de la fase clínica para finalmente lograr la aprobación del fármaco como medicamento. Hoy en día se buscan fármacos eficaces para tratar el dolor y/o la inflamación, ocasionados por diversas enfermedades crónico-degenerativas. Dentro de esta búsqueda los α -aminofosfonatos, considerados los análogos más relevantes de los α -aminoácidos, han mostrado ser efectivos. Estudios realizados por nuestro grupo de investigación en el Centro de Investigaciones Químicas y en la Facultad de Medicina de la UEAM, han demostrado que los nuevos α -aminofosfonatos derivados de diversas aminas alifáticas, poseen actividad antiinflamatoria [5] y analgésica [6]. Sin embargo, la evaluación de su toxicidad se encuentra en etapas preliminares y aún se desconoce si son seguros cuando se administran por vía sistémica. Con base en lo anterior, en el presente trabajo, se determinará su toxicidad aguda cuando se administran por vía intraperitoneal y se identificarán los efectos adversos más frecuentes.

1.1. Descubrimiento y desarrollo de medicamentos

El DDM es un proceso cuyo objetivo es determinar experimentalmente la eficacia, la seguridad y la tolerabilidad de un medicamento antes de ser aprobado para su uso en humanos, sus etapas y los objetivos de estas se muestran en la Figura 1. El objetivo principal de la primera fase o fase de diseño como su nombre lo indica es diseñar una NEQ acorde con

la identificación y validación de un blanco terapéutico. Tradicionalmente una enfermedad se consideraba un blanco, sin embargo, hoy en día es casi indispensable identificar un blanco a nivel molecular. Para esto, es necesario conocer las alteraciones en los procesos bioquímicos, vías de señalización, así como las moléculas implicadas en los procesos fisiopatológicos, de tal manera que un blanco terapéutico puede ser una molécula o vía de señalización específica [7]. Actualmente, los blancos terapéuticos más comunes son receptores, enzimas, transportadores, elementos dentro de los sistemas de expresión genética, o bien eventos particulares de cascadas de señalización intracelular. Una vez identificado el blanco terapéutico el siguiente paso en el DDM es la selección y/o el desarrollo de una prueba de bioevaluación que permita determinar e identificar las NEQs que posean la actividad biológica de interés, y que permita descartar aquellas que sean inactivas [2]. Las diferentes pruebas de bioevaluación se pueden agrupar en dos tipos: 1) de alto rendimiento, estos métodos de alta tecnología (robótica, informática, etc.) permiten realizar millones de pruebas químicas, genéticas y farmacológicas en horas o días, logrando evaluar un gran número de moléculas y su afinidad con uno o varios blancos terapéuticos y por ende su actividad biológica [8]; y 2) de bajo rendimiento, en donde se estudia el efecto terapéutico por semanas o meses de las NEQs preseleccionadas, en tejidos, órganos o animales. El segundo objetivo es identificar el compuesto HIT (compuesto con mayor eficacia deseada) [2]. Una vez que el HIT está definido, se evalúa su efectividad y seguridad mediante diversos bioensayos *in vitro*, *in vivo* e *in silico* seleccionados, implementados y validados previamente. A este proceso se le conoce como fase preclínica. Los objetivos de esta fase incluyen caracterizar mediante diversos bioensayos *in vivo*, *in vitro* e *in silico* la afinidad, selectividad y el mecanismo de acción de la molécula por el blanco terapéutico seleccionado. Así como los parámetros farmacocinéticos, los procesos farmacodinámicos y las vías de administración. Adicionalmente se determina si es seguro para los posibles usuarios. Si los resultados de los estudios de farmacocinética, farmacodinamia y seguridad realizados en la etapa preclínica son favorables, el compuesto HIT, puede denominarse fármaco, y puede ser registrado y patentado. Posteriormente se presenta a la agencia regulatoria correspondiente de cada país y que en México es la Comisión Federal para la Protección Contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), la solicitud para comenzar la fase clínica. La solicitud está respaldada por la evidencia que sustenta la eficacia y seguridad del fármaco para su uso en humanos [9]. La

fase clínica comprende una serie de estudios clínicos que se realizan en voluntarios sanos y sujetos con la patología de interés (voluntarios no sanos). La fase clínica a su vez se divide en cuatro fases. En la fase I se estudia la seguridad, la farmacocinética y la farmacodinamia en un pequeño número de voluntarios sanos o en algunos casos de enfermos. La segunda fase incluye entre 100 y 400 enfermos, se evalúa la seguridad, la relación dosis-respuesta y la eficacia. En la tercera fase la muestra es de gran tamaño, heterogénea y representativa, una vez más la seguridad y eficacia son evaluadas, al igual que los beneficios a la salud, siendo esta fase el soporte para la autorización de la comercialización del fármaco como un medicamento. La fase IV también conocida como farmacovigilancia comienza una vez que el medicamento se comercializa, la seguridad continúa siendo evaluada al igual que la eficacia, y pueden encontrarse nuevas indicaciones.

NEQs	HIT	Fármaco	HIT	Medicamento
Fase de diseño o desarrollo NEQs	Fase preclínica	Fase clínica	Revisión (*)	Farmacovigilancia
Relación estructura actividad Estabilidad Pureza	Bioensayos • Eficacia • Farmacodinamia • Farmacocinética	Voluntarios Sanos c/patología (-) (+)		Población Heterogénea
5.000 – 10.000 compuestos	250 compuestos	5 compuestos	COFEPRIS	Eficacia Seguridad Tolerabilidad
Pruebas de actividad: • Alto rendimiento • Bajo rendimiento	• Seguridad pruebas de toxicidad: • <i>in vitro</i> • <i>in vivo</i>	Eficacia Seguridad Tolerabilidad Fase I Fase II Fase III		Fase IV
4 – 6 años	1 año	6 – 7 años	0,5 – 2	Continuo

Figura 1. Fases del Proceso de Descubrimiento y Desarrollo de un Medicamento.

1.1.2. Pruebas de seguridad farmacológica en la etapa preclínica

A principios de los años 60's, miles de bebés nacieron con defectos congénitos ocasionados por el uso de la talidomida. A partir de este suceso todas las agencias regulatorias alrededor del mundo establecieron como requisito para la aprobación de una NEQ como medicamento, determinar su perfil toxicológico, e hicieron obligatoria la presentación de estos perfiles para todas las nuevas moléculas en proceso de DDM. Dos décadas después, la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD) en conjunto con la Conferencia

Internacional de Armonización (ICH), publicó los lineamientos para realizar pruebas de toxicidad a posibles nuevos fármacos. En la fase preclínica, a estas pruebas de seguridad se les denomina Evaluación de Seguridad No Clínica (ESNC). Su propósito es evaluar *in vitro* e *in vivo* la toxicidad de un compuesto de prueba. *In vitro* se utilizan frecuentemente distintas líneas celulares en las que se evalúa el efecto citotóxico del compuesto a diferentes concentraciones. *In vivo*, se determina el efecto de la administración aguda del compuesto de prueba, en al menos dos especies animales, a dosis variables, y por distintas vías de administración [10]. El objetivo es determinar el Nivel Sin Efecto Adverso Observable (*NOAEL por sus siglas en inglés*) y la Dosis Tóxica Mínima (DTM), parámetros que nos ayudan a calcular el factor de seguridad. El NOAEL se define como la dosis más elevada de una sustancia que no produce efectos tóxicos al ser administrada en un animal, mientras que la DTM es la dosis más baja de una sustancia que produce efectos tóxicos al ser administrada en un animal [3]. Todas las pruebas toxicológicas se deben llevar a cabo con aprobación de un Comité de Ética, en laboratorios certificados y siguiendo los lineamientos de las Buenas Prácticas de Laboratorio, para asegurar la calidad e integridad de los resultados. Esto permite armonizar protocolos, información y la documentación de los procedimientos mediante los cuales se determina si un fármaco es eficaz y seguro [11].

1.2. Toxicología

La toxicología es la ciencia que estudia los efectos adversos causados por agentes químicos, físicos o biológicos (incluyendo fármacos y medicamentos) en los seres vivos, mediante estudios conductuales, histológicos, toxicocinéticos, toxicodinámicos, etcétera [12].

1.2.1. Toxicocinética

La toxicocinética estudia cuantitativamente los procesos que experimenta un compuesto tóxico en el organismo en función del tiempo y la cantidad administrada. La toxicocinética puede dividirse para su estudio en: absorción, distribución, bioacumulación, metabolismo y eliminación. Para estudiar estos procesos el organismo se puede considerar como un solo compartimento (toxicocinética monocompartmental) cuando el compuesto estudiado no presenta afinidad particular por ningún tejido, sino que se distribuye instantánea y homogéneamente a todo el organismo. Si el compuesto en estudio se distribuye lentamente de forma heterogénea en los tejidos, el organismo debe considerarse como dos o más

compartimentos. En este modelo existe un compartimento central (tejidos con mayor irrigación: digestivo, pulmonar, renal, cerebral, cardiaco y glandular) y otro periférico (tejidos con menor irrigación: adiposo, muscular y cutáneo) [13].

1.2.1.1. Absorción

La absorción es el proceso a través del cual el compuesto o xenobiótico pasa desde el medio exterior a los fluidos biológicos del organismo, para lo cual tiene que atravesar una serie de membranas biológicas [14]. El paso a través de las membranas se lleva a cabo por diversos mecanismos que incluyen: filtración, difusión facilitada por transportadores o canales, transporte activo y endocitosis. Para que se lleven a cabo estos mecanismos, las membranas biológicas cuentan con proteínas transmembranales que se clasifican en dos superfamilias: transportadores dependientes de ATP (ABC) y transportadores acarreadores de solutos (SLC). Los ABC dependen de la energía del ATP para transportar el compuesto de un lado a otro de la membrana celular, mientras que los SLCs facilitan el paso de ciertos solutos (ej.: azúcares o aminoácidos) a través de la membrana y activamente transportan otros solutos en contra de sus gradientes de concentración emparejando el proceso con otro soluto o ion. Conceptualmente, los transportadores de entrada transfieren moléculas del exterior al interior de la célula y los transportadores de salida transfieren las moléculas al exterior de la célula [15]. El intestino expresa transportadores de entrada y de salida, factor relevante en la biodisponibilidad sistémica de los xenobióticos administrados por vía oral. La sobreexpresión de transportadores de salida en el lumen intestinal puede llevar a la baja biodisponibilidad del xenobiótico en cuestión, mientras que su sobreexpresión en la superficie abluminal puede incrementar la biodisponibilidad sistémica. En el intestino los transportadores actúan como compuertas que impiden el paso de toxinas hacia la circulación sanguínea favoreciendo su eliminación [16].

La estructura de las membranas celulares posee un marcado carácter lipofílico, por lo que las sustancias apolares o liposolubles logran atravesarlas fácilmente. Sin embargo, esto también dependerá de que la sustancia se encuentre o no ionizada, de aquí que la capacidad de ionización sea decisiva en la absorción. La capacidad de los compuestos de atravesar las membranas biológicas se ve afectada por pH del medio y del pKa del compuesto. El pKa es

una constante que indica el pH del medio en el que existe la misma cantidad de sustancia ionizada y no ionizada [14].

La vía de administración es otro factor importante que determina la velocidad de absorción del xenobiótico y por lo tanto su biodisponibilidad. La vía de administración que presenta una absorción más rápida y completa es la intravascular, seguida de la pulmonar, la intraperitoneal, la oral, la intramuscular, la subcutánea y finalmente la percutánea. La vía de administración más frecuente de compuestos que serán potencialmente nuevos medicamentos es la vía oral. Todo compuesto administrado por vía oral se absorbe por el lumen intestinal y a través de los enterocitos pasará a la circulación portal para llegar al hígado. Aquí será metabolizado antes de llegar a la circulación sistémica, proceso conocido como efecto de primer paso y que resulta en la disminución de la biodisponibilidad de la sustancia. Una vez en la circulación sistémica el compuesto será susceptible de distribuirse en los tejidos [13]. La vía de administración intraperitoneal evita el paso del compuesto por el tracto gastrointestinal y su potencial degradación antes de ser absorbido. La absorción en este caso se lleva a cabo a través del peritoneo cuya superficie es similar a la de la piel [17]. El peritoneo está conformado por una capa de células mesoteliales escamosas y por una membrana basal [18] que soporta a una red vascular sanguínea y linfática compleja pero eficiente [19], la cual en su porción visceral es irrigada por las arterias mesentéricas y drenada por el sistema venoso hacia la vena porta; la porción parietal en cambio es irrigada por las arterias ilíaca, lumbar, intercostal y epigástrica, y drenada hacia la vena cava inferior [20], lo que aumenta la biodisponibilidad sistémica del compuesto (F) [21]. Aquí la F es resultado del producto de la fracción absorbida (F_{ab}), por la fracción que escapa al metabolismo intestinal (F_i), y por la fracción que escapa al metabolismo hepático (F_h) para alcanzar la circulación sistémica, $F = F_{ab} \times F_i \times F_h$ [22].

1.2.1.2. Distribución

Una vez que el compuesto tóxico es absorbido, se distribuye a todo el cuerpo a través de la circulación. Así la distribución se define como el paso del compuesto del torrente sanguíneo al organismo. El corazón de un adulto bombea 6 litros de sangre por minuto, justo la cantidad de sangre que tiene el organismo, por lo que en dicho tiempo la sangre ha recorrido todo el sistema vascular. Generalmente los compuestos son transportados unidos a proteínas

plasmáticas, siendo las más relevantes la albúmina, la α -glicoproteína ácida y algunas lipoproteínas que tienen afinidad con moléculas no polares [13]. Es importante mencionar que mientras los compuestos están unidos a las proteínas plasmáticas no pueden atravesar membranas y por lo tanto no pueden pasar a los tejidos para ejercer sus efectos deletéreos, es decir, se consideran inactivos. Por lo tanto, en procesos patológicos que se caracterizan por una disminución de la cantidad de proteínas plasmáticas existe una proporción mayor de compuesto libre y por lo tanto con mayor potencial tóxico [13]. La unión de los compuestos a las proteínas plasmáticas generalmente es reversible. Al igual que en los otros procesos, existen distintos factores que afectan la distribución de los compuestos tóxicos. El principal factor que condiciona la distribución es el grado de irrigación entre los distintos órganos. La velocidad de entrada de un compuesto en los diferentes tejidos depende de la velocidad relativa de entrada de la sangre a través del correspondiente lecho capilar y de la permeabilidad de las moléculas del agente tóxico. La entrada a los tejidos se lleva a cabo a través de membranas, por lo cual el compuesto utiliza los mismos mecanismos de la absorción. Para determinar el grado de distribución se calcula el coeficiente de reparto tisular del compuesto entre los tejidos y los fluidos es decir la concentración de compuesto en sangre [13]. Conforme aumenta el grado de distribución de un compuesto tóxico aumenta su capacidad de ocasionar efectos tóxicos.

1.2.1.3. Bioacumulación

Una vez distribuido la toxicidad del compuesto dependerá de su localización tisular. En este contexto de puede producir el proceso de bioacumulación, es decir, almacenamiento sucesivo que conduce en un determinado momento a un aumento de la concentración de una sustancia, ya que la velocidad de captación excede a la de eliminación [13]. Si el compuesto se localiza en el tejido diana, el efecto observado será el esperado; mientras que al almacenarse en un tejido distinto al tejido diana, el compuesto ejercerá una acción distinta a la esperada, favoreciendo su potencial tóxico. La sangre arterial favorece la distribución del compuesto a los órganos, y la venosa lo extrae. Sin embargo, son las propiedades fisicoquímicas del compuesto tóxico las que determinan la acumulación selectiva del compuesto tóxico en los distintos órganos. Por ejemplo, las sustancias altamente liposolubles se almacenan principalmente en tejido nervioso y adiposo; las sustancias coloidales en el sistema

reticuloendotelial, los metales en los huesos y riñones, mientras que los compuestos con grupos fosfonatos suelen acumularse en el tejido óseo. La toxicidad del compuesto tras su bioacumulación dependerá de la capacidad del tejido para metabolizarlo [13].

1.2.1.4. Metabolismo

El metabolismo es un proceso a través del cual se lleva a cabo la transformación de compuestos mediante reacciones enzimáticas, si este proceso transforma un compuesto ajeno al organismo (xenobiótico) entonces se denomina biotransformación. El objetivo del metabolismo es convertir al xenobiótico en compuestos más hidrofílicos que la molécula original para facilitar su eliminación. Los productos del metabolismo se denominan metabolitos y estos pueden ser activos o inactivos [23]. En ocasiones los medicamentos son administrados en su forma inactiva y su activación depende de las enzimas metabólicas. Un ejemplo es el de la ampicilina, la cual se administra como pivampicilina para mejorar su biodisponibilidad, una vez en el torrente sanguíneo es transformada mediante hidrólisis a su forma activa (ampicilina) [24].

El metabolismo de xenobióticos consta de 2 fases. En la fase 1 participan las enzimas de la familia de citocromos P450s (CYP450s). Estas enzimas se encuentran principalmente en el retículo endoplásmico, en la membrana citoplasmática y en la mitocondria de los hepatocitos [25]. Los CYP450s catalizan diversas reacciones incluyendo la sulfoxidación, hidroxilación aromática, hidroxilación alifática, N-desalquilación, desaminación y oxidación. Esta última es la más relevante, para que esta se lleve a cabo uno o más átomos de oxígeno se adicionan al xenobiótico. Algunas isoformas CYP450s catalizan reacciones de hidrólisis para metabolizar compuestos que contienen en su estructura química ésteres y amidas. En el citosol es donde se lleva a cabo la mayoría de las reacciones catalizadas por los CYP450s, para que estas se lleven a cabo se requieren cofactores como la citocromo-NADPH 450 reductasa, la citocromo-b₅ reductasa y/o la citocromo-c reductasa, esenciales para llevar a cabo las reacciones metabólicas. El hierro también es importante en la función de las CYP450s, ya que este metal se encuentra presente en el centro del sitio de unión entre la enzima y el sustrato [24]. Los diferentes estados de todos estos cofactores afectan la actividad funcional de los CYP450s, resultando en una variabilidad inter e intraindividual de la capacidad metabólica en una población. Así las diferencias en la respuesta toxicológica a la

misma dosis de un xenobiótico frecuentemente son resultado de las diferencias en el metabolismo y consecuente eliminación [26]. Otra reacción metabólica de la fase 1 es la reducción, reacción que es catalizada por los enzimas citocromo-b₅ NADH reductasa o citocromo-c NADPH reductasa. Otras enzimas que pueden contribuir al metabolismo de compuestos en la fase 1 son las: monooxigenasas, la monoamino oxidasas, alcohol deshidrogenasas, aldoceto reductasas, NADPH: quinona reductasas y otras enzimas hidrolíticas. Es importante mencionar que la expresión y la actividad de los CYP450s puede ser inducida por algunos medicamentos, lo que conlleva a un incremento en el metabolismo de ciertos sustratos, reduciendo su tiempo de exposición y por lo tanto su toxicidad. Ejemplos de algunos compuestos que actúan como inductores son el fenobarbital y los inhibidores de la calcineurina como el sirolimus y la rifampicina [27]. Por el contrario, algunos medicamentos pueden inhibir la expresión y la actividad de los CYP450s, lo que resulta en la disminución del metabolismo de diversos sustratos y en el incremento de los niveles plasmáticos de estos, favoreciendo así la toxicidad. Ejemplos de inhibidores de los CYP450s son el ketoconazol, ritonavir, y algunos medicamentos para el tratamiento de la hepatitis C [28].

La fase II del metabolismo conjuga compuestos o metabolitos con compuestos endógenos de naturaleza hidrofílica con ayuda de enzimas transferasas. Las enzimas de fase 2 más comunes son las uridinas difosfato (UDP) glucoroniltransferasas (UGTs), sulfotransferasas (SULTs), N-acetiltransferasas (NATs), glutathione S-transferasas (GSTs), tiopurina S-metiltransferasa (TPMTs) y catecol O-metiltransferasa (COMTs). La glucoronidación llevada a cabo por las UGTs es la vía predominante de la fase 2 del metabolismo, conjugando aproximadamente 40 a 70% de los compuestos endógenos y exógenos [29], esto se lleva a cabo en el citoplasma cuando la glucosa-1 fosfato reacciona con la uridina trifosfato para formar ácido glucurónico uridina difosfato (UDPGA), un cosustrato que es transportado dentro del retículo endoplásmico por proteínas transmembranales. Dentro del retículo endoplásmico las UGTs unen a los UDPGA con sus respectivos sustratos formando compuestos glucoronizados. Las UGTs son miembros de una superfamilia de proteínas expresadas principalmente en el intestino y en el hígado cuya actividad es controlada por la cantidad de cosustrato disponible, algunos medicamentos como el fenobarbital o la rifampina incrementan su expresión [30]. Las SULTs catalizan la reacción entre 3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfato (PAPS) y átomos de

nitrógeno, oxígeno o azufre en los compuestos diana. La expresión de las SULTs en humanos ocurre en casi todos los órganos, predominando en el hígado, intestino, pulmones, glándulas adrenales, riñones, células sanguíneas, cerebro y placenta. De las 13 SULTs identificadas en humanos la SULT1A1 es la más estudiada, y se sabe que metaboliza fenoles, alcoholes y aminas. Se ha reportado que el jugo de uva, el de naranja, el té verde y el té negro, al igual que la curcumina y algunos AINEs inhiben a las SULTs, mientras que el ácido retinoico y el metotrexato tienen capacidad de inducirlos [31] [32]. Las NATs son enzimas citosólicas que utilizan al acetil coenzima A como cofactor de la reacción metabólica. Se clasifican en 2 subfamilias: NAT1 y NAT 2, siendo NAT 1 predominante en casi todos los tejidos como una ubiquitina. A diferencia de otras enzimas los metabolitos resultantes de la reacción mediada por NATs son más lipofílicos, por lo que pueden resultar más tóxicos que el compuesto metabolizado. Los principales sustratos de las NAT 1 son el ácido paraaminobenzoico y el paraaminoglutamato, mientras que para las NAT 2 los principales sustratos son sulfametazina, isoniacida, hidralazina y sulfonamidas. Los compuestos polifenólicos son los principales inhibidores de las NATs [33]. Las GSTs son cruciales para la detoxificación de radicales libres producidos endógenamente, de tal manera que protegen al cuerpo del estrés oxidativo, existe una superfamilia de estas enzimas que se encuentran en el citosol y en la mitocondria, son llamadas GSTs solubles, la otra superfamilia se encuentra asociada a membranas y se asocia al metabolismo de glutatión y eicosanoides, esta familia de GSTs recibe el nombre de transferasas microsomales [34]. Las GSTs se expresan en hígado, riñón, corazón, cerebro, pulmón e intestino, los sustratos para estas enzimas son epóxidos, sulfóxidos, ésteres y peróxidos. Los inhibidores de las GSTs incluyen a fenoles, quinonas, dopamina y ácido retinoico trans; como inductores se han reconocido al brócoli y a la col [35]. La TMPT es una enzima importante en el tratamiento del cáncer ya que cataliza la S-metilación de compuestos que contienen sulfhidrilo heterocíclicos aromáticos, incluyendo medicamentos inmunosupresores y oncológicos, un ejemplo es la azatioprina que en primer lugar es convertida a su forma activa por la hipoxantina fosforribosil transferasa, sin embargo, el metabolito resultante es citotóxico y debe ser metabolizado por la TMPT mediante metilación a su forma no tóxica. La TMPT es una enzima citosólica encontrada en hígado, riñón, pulmones y eritrocitos. La inhibición de la TMPT ocasiona acumulación de metabolitos tóxicos llevando a mielosupresión tras el tratamiento con azatioprina. El

naproxeno, el ácido mefenámico y el tolfenámico inhiben a la TMPT de manera competitiva [36]. Las COMTs son enzimas responsables de transferir un grupo metilo de una S-adenosilmetionina al sustrato. Esta metilación es una de las vías principales del metabolismo de catecolaminas, incluyendo neurotransmisores como la dopamina, epinefrina y norepinefrina. Existen dos tipos de COMTs, las soluble (S-COMT) y las asociadas a membranas (MB-COMT), estructuralmente tienen secuencias muy similares, la diferencia radica en que las MB-COMT tienen 10 veces más afinidad por la dopamina y noradrenalina que las S-COMT. La inhibición de las COMT lleva a la acumulación de sus sustratos, esto es aprovechado en el tratamiento de algunas enfermedades, por ejemplo, en la enfermedad de Parkinson. Los inhibidores de las COMTs más usados son capone, tolcapone y los flavonoides [37].

Como ya se mencionó el metabolismo de xenobióticos tiene como objetivo transformarlos en metabolitos hidrofílicos, lo anterior facilita su transporte a través de las membranas. En el hígado los principales transportadores de entrada son el polipéptido cotransportador de NA^+ taurocholate (NTPC), el transportador de cationes orgánicos 1 (OCT 1), el transportador de aniones orgánicos 2 (OAT 2) y los polipéptidos transportadores de aniones orgánicos. Los transportadores de salida hepáticos son la glucoproteína-P 1 (Pgp), la bomba exportadora de sales biliares (BSEP) y la proteína asociada a resistencia a múltiples fármacos 2 (MRP 2) [38].

La mayor parte de las enzimas metabólicas se encuentran en el hígado, por lo que es considerado el principal órgano responsable del metabolismo. Los transportadores son de vital importancia ya que facilitan la entrada de moléculas a los hepatocitos y su salida hacia la bilis. Los compuestos grandes y/o con carga, normalmente son transportados por transportadores ABCs o SLCs. Algunos compuestos secretados en la bilis son reabsorbidos de vuelta por el intestino, siendo transformados nuevamente en el compuesto original por la β -glucuronidasa presente en el intestino y este compuesto puede ser reabsorbido. Este fenómeno es conocido como circulación enterohepática, un proceso que prolonga la permanencia de un compuesto en el organismo. Además del hígado el intestino juega un papel importante en el metabolismo de primer paso de los compuestos administrados por vía oral [39]. La función principal del tracto gastrointestinal es absorber nutrientes, electrolitos

y moléculas. El intestino también tiene funciones metabólicas que impactan en la biodisponibilidad sistémica de ciertos compuestos ya que expresa enzimas de ambas fases del metabolismo, siendo el duodeno, yeyuno e íleon las zonas con mayor expresión. Dentro de las CYP450 expresadas en el intestino la familia CYP3A representa aproximadamente el 80% [40]. Las enzimas de la fase 2 del metabolismo de xenobióticos que predominan en el intestino son las UGTs, la biodisponibilidad de los xenobióticos es afectada significativamente por estas enzimas; el raloxifeno es un modulador de los receptores de estrógeno, usado en el tratamiento de la osteoporosis y del cáncer de mama, su biodisponibilidad tras su administración oral es de solo el 2%, siendo UGT1A8 y UGT1A10 las enzimas responsables de reducir su biodisponibilidad sistémica [41]. El metabolizar xenobióticos tiene como propósito obtener metabolitos hidrófilos que puedan ser eliminados por el cuerpo, detener la actividad farmacológica y disminuir su potencial tóxico.

1.2.1.5. Eliminación

Los xenobióticos se eliminan del cuerpo sin modificaciones o transformados en metabolitos. Los principales órganos encargados de esta función son los riñones, siendo la nefrona la unidad funcional de estos, en esta se lleva a cabo la filtración glomerular. Para que suceda lo anterior, los xenobióticos son secretados en los túbulos proximales, y en ocasiones reabsorbidos por los túbulos distales. Los transportadores ABC y SLC son indispensables en estos procesos, llevando las moléculas a través de las membranas en contra de su gradiente de concentración para completar su eliminación [42]. De especial atención en la estructura de las membranas biológicas son las glicoproteínas P, formadas por un carbohidrato y una molécula de proteína, estas proteínas bombean compuestos al exterior de la célula evitando su acumulación y por ende disminuyendo su potencial tóxico. En resumen, la administración enteral a diferencia de las parenteral metaboliza y/o elimina al xenobiótico antes de llegar al torrente sanguíneo, disminuyendo así su biodisponibilidad y de ser el caso sus efectos tóxicos.

1.2.2. Toxicodinamia

La toxicodinamia estudia mediante un enfoque mecanístico los procesos tóxicos. Lo anterior se estudia a nivel molecular, es decir, probando la unión del compuesto tóxico con una biomolécula, en caso de referirnos al ADN o ARN, se denominará genotoxicología quien se

encargue de su estudio. Si el interés se dirige a constituyentes subcelulares se empleará la toxicología celular, mientras que, en los efectos específicos sobre determinados órganos, la toxicología órgano-específica será la rama que nos ayudará a entender los mecanismos que ocasionan el daño. El estudio de los efectos nocivos puede alcanzar diferentes niveles de profundidad: a) síntomas o daños que se aprecian, b) mecanismos fisiopatológicos, y c) mecanismos moleculares. Los efectos nocivos pueden ser reversibles de carácter subletal y funcional e irreversibles de carácter letal. Los mecanismos básicos de toxicidad se dividen en: a) los que alteran la estructura celular, ocasionando lesiones en la membrana celular o en órganos subcelulares; y en b) los que alteran la función celular, incluyendo modificaciones de la permeabilidad de la membrana, de las actividades enzimáticas y de la reproducción celular [13].

Los mecanismos de toxicidad generalmente incluyen más de un acontecimiento bioquímico o molecular; suelen consistir en secuencias de pasos o cascadas de reacciones con complejos mecanismos de retroalimentación que constituyen una entramada red de reacciones moleculares, de las que en nuestros días se trata de llegar a identificar los genes implicados. La necrosis, la oncosis y la apoptosis son el punto sin retorno de la lesión celular, al que se llega por múltiples mecanismos, que incluye producción de metabolitos reactivos, estrés oxidativo, enlaces covalentes, activación de señales desde los receptores, lesión mitocondrial, etc. La necrosis es una muerte pasiva accidental caracterizada por inflamación de los organelos celulares, con fragmentación, condensación y lisis del núcleo, formación de vesículas en la membrana y rotura total. Sus mecanismos son: estrés oxidativo, lesión mitocondrial, depleción de ATP, activación de proteasas dependientes de Ca^{2+} , de fosfolipasas y de endonucleasas. La insuficiencia de ATP inactiva las bombas de iones de la membrana plasmática y del retículo endoplásmico, lo que causa rápida alteración de la homeostasis de Na^+ , K^+ , Mg^{2+} y Ca^{2+} . Tiene dos fases: la de iniciación, en que el compuesto reacciona con algún componente celular, y la de progresión, en que el daño se propaga por el tejido circundante, lo que puede llevar horas o días. La fase de progresión se debe a la liberación de enzimas proteolíticas y lipolíticas al espacio extracelular; entre estas enzimas, las calpaínas son activadas por proteasas y entonces atacan al citoesqueleto. Estas enzimas reciben el nombre de proteínas de muerte. La apoptosis supone un proceso altamente organizado que incluye la activación de genes. Comienza por la activación de proteasas

específicas, las caspasas, aunque en algunos mecanismos no intervienen las caspasas. Estas son de dos clases: una es de activadoras de las segundas, que son las ejecutoras, activan a endonucleasas que fragmentan al ADN. La iniciación es realizada por numerosos compuestos, entre ellos diversos metales, incluyendo compuestos como dimetil y trimetilarsina, capaces de generar ROS. En la apoptosis se describen los siguientes pasos: 1) Ciertos receptores de membrana, de las superfamilias TNF (factor de necrosis tumoral), que poseen un dominio extracelular rico en cisteína, reciben una señal, la cual experimenta una transducción. También participan otras proteínas extracelulares, que por agregación y trimerización desencadenan la cascada de caspasas, 2) las mitocondrias liberan factores de activación, 3) las caspasas inician, propagan y ejecutan la apoptosis, 4) el proceso puede ser controlado por otros factores como las proteínas Bcl-2 [13].

Por su parte, el calcio es un mineral que no interviene en los procesos redox y no participa en el estrés oxidativo, pero activa numerosas enzimas y proteínas y actúa como segundo mensajero. La concentración de iones Ca^{++} en el citosol y en las mitocondrias es regulado por la bomba de calcio y por las vesículas del retículo endoplásmico; cuando algún tóxico, como el tetracloruro de carbono o el tributil estaño lesiona a estos elementos, generalmente por unión a sus grupos tioles, la concentración citosólica se incrementa y se inicia una cascada de activaciones de proteasas, endonucleasas y lipasas con deterioro de la célula. Unas de las proteasas más interesantes son las calpaínas (proteínas de cisteína dependientes de calcio), que se implican en la destrucción del citoesqueleto. Son enzimas proteolíticas no lisosómicas que, en presencia de calcio, se transforman en heterodímeros activos. Contribuyen a la apoptosis al colaborar con las caspasas en el proceso proteolítico. La activación de endonucleasas dependientes de calcio conduce a la ruptura del ADN y la muerte celular, y en la mitocondria, el exceso de calcio disminuye la NAD^+ y el ATP y colapsa el potencial de membrana mitocondrial, que lleva a la muerte de la célula [13].

1.2.3. Toxicidad

La toxicidad es la capacidad inherente en una sustancia química de producir efectos adversos en los seres vivo. Esto puede provocar lesiones patológicas que afectan el funcionamiento del organismo y reducen su capacidad de respuesta a factores de riesgo o estrés. Generalmente, se relaciona con la Dosis Letal media (DL_{50}), que es la dosis, a la cual muere

el 50% de los organismos de una población expuesta experimentalmente. La OECD clasifica a las sustancias de acuerdo con su potencial tóxico es decir su DL₅₀ y su vía de administración (Tabla 1) [43].

Tabla 1. Clasificación de la OECD de la toxicidad de una sustancia con base en la DL₅₀ y la vía de administración [12].

Toxicidad	DL ₅₀ mg/kg			
	Muy tóxicas	Tóxicas	Nocivas	Inofensivas
Oral	0-25	25-200	200-2000	> 2000
Cutánea	0-50	50- 400	400-2000	> 2000
Por inhalación	0-0.5	0.5-2	2-20	> 20

1.2.3.1. Factores que afectan la toxicidad de una sustancia

La toxicidad de una sustancia depende de varios factores que afectan su toxicocinética y su toxicodinamia. Estos factores están ambos relacionados con el compuesto, el individuo expuesto y con la vía y frecuencia de administración.

Los factores intrínsecos al compuesto incluyen peso molecular, estructura, solubilidad, estado físico y grado de oxidación. Estos modifican la absorción, distribución, metabolismo y eliminación del compuesto de prueba, y por lo tanto determinan su concentración en el organismo y por ende su toxicidad. Por ejemplo, el ácido zoledrónico es un medicamento utilizado en el tratamiento y/o prevención de la osteoporosis, sin embargo, incrementa el riesgo de osteonecrosis debido a que su tiempo de eliminación supera los 200 días [44]. El tiempo de eliminación tan largo se debe a que el zoledronato es un análogo estructural del pirofosfato inorgánico presente en el tejido óseo donde se almacena. También las propiedades biológicas y el volumen del vehículo, es decir la sustancia en la que se disuelve el compuesto para su administración son factores que contribuyen a la toxicidad del compuesto tras su ingesta, inhalación o exposición tópica [14].

Por otro lado, es importante destacar que los efectos tóxicos ocasionados por un compuesto tras una administración única (exposición aguda) en comparación con los efectos producidos tras administraciones repetidas (exposición crónica) son distintos. La exposición aguda a un

compuesto puede producir únicamente efectos tóxicos inmediatos y en muchos casos visibles y/o letales, mientras que la exposición crónica además de producir efectos tóxicos inmediatos también puede producir efectos tóxicos por acumulación. Por ejemplo, la principal manifestación de la intoxicación aguda al benceno, un solvente ampliamente utilizado en la industria química y farmacéutica es la depresión del SNC. Sin embargo, la exposición a dosis repetidas produce toxicidad en la médula ósea incrementando el riesgo de desarrollar leucemia [43]. Otro factor relevante asociado a la caracterización temporal de un compuesto tóxico es la frecuencia de la administración, ya que un compuesto que produce efectos tóxicos con una dosis única podría no ocasionar efectos adversos, si la misma dosis total es administrada en intervalos de tiempo considerables, debido a que el organismo eliminará parte o la totalidad del compuesto entre cada administración.

De forma similar, la especie del sujeto experimental a la que se le administra el compuesto de prueba también es un factor que afecta la toxicidad [45]. Cabe destacar que incluso entre sujetos de la misma especie, pueden presentarse diferencias en la respuesta a la exposición a un compuesto. Lo anterior se debe en parte, a que al menos en el 1% de la población existen diferencias heredadas llamadas polimorfismos genéticos, siendo relevantes cuando estos se presentan en las CYP450s [43]. Existe un gran número de evidencias que muestran que diferentes especies responden de forma distinta ante los agentes tóxicos. Esto debido a que cada especie tiene características propias, tanto anatómicas como fisiológicas, por lo que es necesario identificar los mecanismos biológicos que originan las distintas respuestas ante un mismo compuesto.

La edad es otro factor que afecta la toxicidad de un compuesto. Por ejemplo en neonatos, la actividad catalítica de las CYP450s es menos de la mitad que en adultos [46]. Conforme los neonatos maduran la capacidad metabólica aumenta. Así los niños pequeños (6-8 años) tienen una capacidad metabólica incrementada para ciertos xenobióticos en comparación con los adultos jóvenes (19-25 años) [45]. Las reacciones de conjugación también pueden ser afectadas por la edad. Un ejemplo de esto es el hecho de que en neonatos el aclaramiento de la bilirrubina es lento debido a que las UGTs no se expresan por completo a esa edad, lo que puede favorecer el desarrollo de ictericia neonatal. Por otro lado, cabe mencionar que en edades avanzadas la expresión y función de las enzimas que participan en el metabolismo de

xenobióticos no está afectada significativamente. Sin embargo, la combinación de un riego sanguíneo hepático disruptivo, la consecuente falta de oxigenación, el incremento de depósitos hepáticos de grasa y el uso de diversos medicamentos (polifarmacia) puede modificar el metabolismo de los xenobióticos [45, 46].

El género es otro factor que debe tomarse en cuenta cuando se habla de toxicidad. Gran cantidad de evidencia muestra que, en humanos los efectos adversos son hasta dos veces más comunes en mujeres que en hombres [47]. Esto se explica por el impacto de las hormonas sexuales, el peso corporal, el porcentaje de grasa corporal, el volumen de distribución de los xenobióticos y diferencias en la expresión de las CYP450s. Por ejemplo, se ha reportado que la CYP2D6 y la CYP1A2 se expresan más en los hombres que en las mujeres, siendo lo contrario para la CYP3A4 [48] resultando en una discrepancia en la biotransformación de xenobióticos entre ambos géneros.

El embarazo es otro factor que está asociado a múltiples cambios fisiológicos que alteran la toxicocinética de xenobióticos, en particular el metabolismo y la eliminación [49]. Por ejemplo, el aumento de la actividad de la isoforma CYP3A4 disminuye el tiempo de vida media de ciertos fármacos como la fenitoína, midazolam, y metoprolol. De forma similar una disminución de la actividad de la isoforma CYP1A2 disminuye el aclaramiento de sustancias como la cafeína [50].

El estado fisiopatológico del individuo es otro factor determinante en la respuesta ante un compuesto, por ejemplo, en una persona con insuficiencia renal la capacidad de metabolizar y excretar penicilinas se ve comprometida drásticamente por lo que en caso de requerirse, debe ajustarse la dosis del medicamento o en su defecto elegir otro grupo de antibióticos para evitar efectos adversos [43]. Las enfermedades hepáticas son otro ejemplo de patologías que claramente afectan el metabolismo de los xenobióticos lo que favorece su toxicidad. Esto debido a que pueden modificar la circulación sanguínea hepática, la expresión de enzimas que participan en el metabolismo de xenobióticos, la viabilidad de los cosustratos y/o la unión de los xenobióticos a proteínas plasmáticas, lo que resulta en alteraciones en el metabolismo hepático [51].

Además de los factores ya mencionados, la interacción entre xenobióticos afecta la toxicidad de estos. Con base en lo anterior, la FDA solicita que a todos los compuestos en proceso de desarrollo se les evalúe su posible actividad como sustrato, inhibidores o inductores de enzimas que participan en el metabolismo de xenobióticos [52]. Los inhibidores actúan principalmente compitiendo por el sitio activo de la enzima y entonces se les conoce como inhibidores competitivos. Sin embargo, también pueden bloquear la actividad catalítica de la enzima al unirse a un sitio diferente al sitio activo y entonces se denominan inhibidores no competitivos. Usualmente en presencia de inhibidores, el tiempo de eliminación de un xenobiótico incrementa. Los inductores actúan incrementando la transcripción genética, lo que resulta en un incremento de la expresión de la enzima, lo que se traduce en un aumento en el rango metabólico y una disminución en el tiempo de eliminación de un xenobiótico [53].

Para estudiar la toxicidad de una sustancia se debe tomar en cuenta que existen efectos tóxicos reversibles e irreversibles. Esto depende en gran medida de la habilidad del tejido dañado para regenerarse. Otra distinción entre los de efectos adversos que ocasiona una sustancia es la extensión y zona en la que se producen. Con base en lo anterior encontramos efectos adversos locales que son aquellos que ocurren en el primer sitio de contacto entre el compuesto y el sistema biológico; y efectos sistémicos que ocurren después de la absorción y distribución del compuesto en un punto distante al sitio de administración [13].

Como se ha descrito hasta el momento, existen una gran cantidad de variables que influyen en la toxicidad de un compuesto, por lo que se han desarrollado diversas pruebas que nos permiten caracterizar el perfil toxicológico de una sustancia con la finalidad de realizar una evaluación riesgo beneficio y determinar si dicho compuesto es seguro para ser administrado en humanos.

El DDM requiere que se realicen pruebas de seguridad a todas las nuevas moléculas con potencial farmacológico. Lo anterior con la finalidad de garantizar que los usuarios obtengan únicamente los efectos deseados, sin presentar efectos adversos que pongan en peligro su salud. Para lograr tal objetivo, es importante seleccionar las pruebas de toxicidad preclínicas acordes a las características de la nueva molécula tomando en cuenta su(s) actividad(es)

biológica(s), su mecanismo de acción (si se conoce) y su(s) posible(s) vía(s) de administración.

1.2.3.2. Pruebas de toxicidad *in vitro*

Las pruebas *in vitro* permiten estudiar los efectos tóxicos de un compuesto de prueba sin utilizar un animal completo. Estas pruebas pueden realizarse utilizando rebanadas de tejido, órganos aislados, cultivos primarios de células, líneas celulares e incluso fracciones subcelulares como las mitocondrias, microsomas e incluso membranas [54]. Si bien los resultados de las pruebas *in vitro* no pueden extrapolarse al animal completo y mucho menos al humano, ofrecen una serie de ventajas con los modelos *in vivo*. Estas incluyen un menor costo, la factibilidad de establecer ensayos rápidos, confiables y fácilmente reproducibles, aunado al hecho de que se puede manejar un mayor número de muestras en un menor tiempo [55].

Las metas y las oportunidades de estudiar la toxicología *in vitro* incluyen la caracterización del o los mecanismos de acción toxicológicos. Esto permite estudiar procesos aislados, en tiempo relativamente corto, en comparación con los estudios *in vivo*, permitiendo evaluar varios agentes de manera consistentemente rigurosa en forma paralela. Es importante tener en cuenta que, a pesar de estas ventajas, los estudios *in vitro* carecen de las interacciones entre las células, el órgano y el cuerpo completo, sin embargo, esta desventaja se puede reducir mediante estudios *in vitro* con dos o más líneas celulares [56]. Al igual que las pruebas *in vivo*, las pruebas *in vitro* permiten determinar el perfil toxicológico de una sustancia en distintos órganos y sistemas, así como diferentes estados del desarrollo. Algunas de las pruebas más comunes se describen a continuación.

1.2.3.2.1. Pruebas *in vitro* de toxicidad reproductiva y del desarrollo

Las células madre han surgido como una alternativa para analizar la toxicidad en el desarrollo, esto debido a su capacidad para diferenciarse en células endodérmicas, mesodérmicas y ectodérmicas, retomando características del desarrollo embrionario temprano. La prueba con células madre embrionarias es una prueba *in vitro* que ha sido ampliamente empleada para medir la toxicidad potencial en el desarrollo de un rango amplio de compuestos, incluidos aquellos con potencial farmacéutico [56].

1.2.3.2.2. Pruebas *in vitro* de toxicidad neuronal

Los cultivos de cortes de cerebro son un modelo de estudio relevante, ya que derivan directamente del cerebro y por lo tanto retienen porciones de la organización tridimensional del sistema nervioso central. Tal organización y el contacto entre células permiten generar estructuras y conexiones sinápticas análogas al tejido original. Generalmente los cortes se obtienen de roedores jóvenes (12 días de edad), y pueden cultivarse durante 60 días. Este modelo *in vitro* es una alternativa a los modelos de toxicidad neuronal *in vivo*, que permite obtener datos asociados a los mecanismos de acción toxicológicos, tales como activación o inhibición de sinapsis neuronales, y pérdida o mantenimiento de la organización neuronal[57].

1.2.3.2.3. Pruebas *in vitro* de toxicidad hepática

Las lesiones de hígado inducidas por fármacos son la principal causa de disfunción hepática aguda. Este efecto adverso, ocasiona la salida del mercado de más de 80 fármacos previamente aprobados alrededor del mundo [58]. Lo anterior se debe a que la mayoría de los fármacos que ocasionaron lesiones de hígado, no mostraron ser hepatotóxicos al ser evaluados en modelos *in vivo*. Es por esta razón que se han desarrollado diversos modelos *in vitro*, por ejemplo el de mitocondria hepática aislada, líneas celulares de origen hepático, cultivo primario de hepatocitos, y hepatocitos derivados de células madre humanas pluripotenciales inducidas para mejorar la predicción y elucidar los mecanismos que ocasionan lesiones de hígado inducidas por fármacos, como hepatitis colestásica, hepatitis lobular (aguda), hepatitis portal (crónica) [59-61].

1.2.3.2.4. Pruebas *in vitro* de toxicidad cardiaca

La toxicidad cardiovascular fue la razón principal que ocasionó dificultades o suspensiones en el proceso de DDM entre el año 2000 y 2010 [62]. Para mejorar la detección de toxicidad cardiaca se ha desarrollado un modelo basado en cardiomiocitos derivados de células madre humanas pluripotenciales inducidas, con el cual se evalúa de manera temprana, a bajo costo y con información relevante, el potencial de toxicidad cardiaca (ej.: miocarditis, fibrosis de miocardio de un nuevo compuesto [63] [64].

1.2.3.2.5. Pruebas *in vitro* de genotoxicidad en líneas germinales

La espermatogénesis es un proceso complejo, existen compuestos que pueden dañar los testículos e inducir mutaciones germinales que de ser transmitidos a la progenie pueden resultar en anormalidades físicas, desórdenes neurológicos, cáncer e inclusive la muerte [65]. El modelo organoide testicular 3-D (policapa), replica el sistema reproductivo masculino, y permite que las secciones del tejido testicular puedan completar la espermatogénesis y producir espermatozoides competentes para la fertilización [66], aproximándose bastante a la fisiología *in vivo* del órgano completo en procesos como la respuesta al tratamiento farmacológico, mutaciones de ADN, daño celular, renovación de tejido y a las funciones celulares de nicho, adicionalmente las células se mantienen genéticamente estables por largos periodos de cultivo, característica relevante en las pruebas de genotoxicidad *in vitro* [67].

1.2.3.2.6. Modelo epitelial de vías aéreas *in vitro* para evaluar toxicidad por inhalación

El epitelio de las vías aéreas es el primer sitio de contacto para los tóxicos por vía aérea. Este tipo de exposición puede resultar en enfermedades específicas del sistema respiratorio, como bronquitis, Enfermedad Pulmonar Obstructiva Crónica (EPOC), asma, y cáncer de pulmón, además, los compuestos tóxicos que entran al organismo por vías aéreas son capaces de llegar fácilmente a la circulación sistémica causando graves efectos adversos a la salud. El estudio de la toxicidad por inhalación *in vitro* utiliza cultivos 2-D de líneas celulares de pulmón transformadas, estos cultivos son útiles para entender la toxicodinamia de los compuestos de interés. Usualmente estos cultivos se sumergen en medios que contienen el compuesto a dosis mayores a las que podría experimentar un humano, con el objetivo de evaluar la citotoxicidad, la genotoxicidad, el estrés oxidativo, cambios en la secreción de mucina, y respuestas inflamatorias [68].

1.2.3.3. Pruebas de toxicidad *in vivo*

Las pruebas de toxicidad en animales se pueden realizar utilizando diferentes vías de administración (oral, intraperitoneal, tópica, intravenosa, etc.). De acuerdo con el tiempo de exposición al compuesto se clasifican en 4 categorías:

- 1) Prueba de toxicidad aguda: Se define como la exposición a un compuesto de prueba por un máximo de 24 horas. En este tipo de pruebas usualmente se realiza una

administración única. Sin embargo, se puede administrar más de una dosis dentro de las primeras 24 horas en caso de que exista evidencia que sugiera que el compuesto es inofensivo. Usualmente se observa si se produce la muerte del sujeto experimental o cambios conductuales gruesos que indiquen posibles efectos adversos.

- 2) Prueba toxicidad subaguda: en este tipo de pruebas el compuesto de prueba se administra al sujeto experimental cada 24 horas por al menos un mes. El objetivo es obtener información tras administraciones repetidas del compuesto. La información obtenida también se utiliza para calcular la dosis que se empleará en prueba de toxicidad subcrónica.
- 3) Pruebas de toxicidad subcrónica: en estas pruebas se realiza la administración del compuesto de prueba durante un periodo de 1 a 3 meses. El principal objetivo es establecer el NOAEL e identificar el o los órganos afectados tras la administración repetida.
- 4) Pruebas de toxicidad crónica: en estas pruebas la administración del compuesto se realiza por al menos 3 meses, pero pueden ser hasta de 24 meses, comparte los objetivos de la prueba subcrónica y además evalúa posibles efectos carcinogénicos [43].

1.2.3.3.1. Pruebas *in vivo* de toxicidad aguda

Las pruebas de toxicidad aguda se llevan a cabo para determinar los efectos adversos de una dosis única en una especie animal en particular. Los objetivos de estas pruebas son: 1) proveer un estimado de la toxicidad intrínseca de la sustancia, a menudo expresada como la DL_{50} ; 2) generar información sobre los órganos blanco afectados y otras manifestaciones clínicas de toxicidad; 3) identificar diferencias entre especies; 4) establecer si el o los efectos tóxicos son reversibles; y 5) proveer información de utilidad para el diseño y selección dosis a emplear en estudios subcrónicos y crónicos [43]. Uno de los métodos para llevar a cabo la prueba de toxicidad aguda es el desarrollado por J.W. Trevan, en el cual, el compuesto en investigación es administrado a diferentes dosis y para detectar posibles efectos adversos los animales se observan durante 14 días cuando el animal sobrevive. Se registra tanto la muerte como y los efectos tóxicos, que pueden incluir cambios morfológico [69], bioquímicos, y/o patológicos, que se detectan mediante estudios de laboratorio e histológicos respectivamente.

El registro del número de muertes permite calcular la DL_{50} del compuesto de prueba. Sin embargo, una de sus desventajas es el gran número de animales que requiere y el hecho de que la principal respuesta que se observa es la muerte del sujeto experimental, es decir existe un alto grado de mortalidad. Con base en lo anterior y con el objetivo de reducir el número de animales utilizados se desarrollaron nuevas pruebas como por ejemplo, el método de dosis ajustada 420 (*FDP por sus siglas en inglés*), el método de toxicidad aguda categorizada (*ATC por sus siglas en inglés*) [70], el método de arriba y abajo 425 (*UDP por sus siglas en inglés*) de la *OECD* [69, 71], y el método de Lorke [72] (Tabla 2).

En las pruebas de toxicidad *in vivo* tras la administración del compuesto de prueba, regularmente se realiza una observación clínica general al menos una vez al día y se registra el peso del animal, preferentemente a la misma hora. Lo anterior teniendo en cuenta que el período en el que se observa y detectan con mayor frecuencia los efectos previstos son las horas posteriores a la administración. Adicionalmente, los animales se observan al menos dos veces el día para detectar si se produce la muerte de los animales o bien para detectar a los animales moribundos y/o que padezcan dolor o sufrimiento grave. De ser así, estos se sacrifican de forma compasiva y se someten a necropsia. Los signos que se registran incluyen, cambios en la piel, ojos, membranas mucosas, presencia de secreciones, excreciones y actividad neurovegetativa (por ejemplo, lagrimeo, piloerección, frecuencia respiratoria respiración anormal). Se lleva a cabo el registro de peso y se mide el consumo de alimento y agua.

Tabla 2. Pruebas para determinar la DL₅₀ de una sustancia química [70, 72]

	420 FDP	423 ATC	425 UDP	Lorke
Características de la especie	Ratones 6-8 semanas de edad, de un solo sexo. Preferiblemente hembras			
Metodología	Se administra una dosis única por vía oral con volumen o concentración constante			
Observaciones clínicas	Peso corporal y mortalidad durante 14 días. Se realiza necropsia al terminar			
Estudio cualitativo	Si	No	No	No
Dosis empleadas (mg/kg); no. de ratones empleados por dosis	5, 50, 300, 2000; 5 ratones	5, 50, 300, 2000; 3 ratones	Consta de 2 etapas. Etapa 1. Prueba límite: se administra una dosis de 2000 o 5000; 5 ratones Etapa 2. Prueba principal: sigue el método UPD, iniciando con dosis de 175; 1 ratón	Consta de 2 fases. Fase I: 10, 100, 1000; ratones Fase II: Las dosis dependen de la mortalidad observada en la fase I; 3 ratones por dosis
Objetivo Determinar:	La dosis más baja que ocasiona toxicidad evidente	La dosis más baja que ocasiona mortalidad	La DL ₅₀ Loa efectos adversos visibles	

Además, se recomienda realizar los siguientes exámenes clínicos hematológicos: hematocrito, concentración de hemoglobina, recuento de eritrocitos, recuento de leucocitos y fórmula leucocitaria, recuento de plaquetas y tiempos de coagulación. Las muestras de sangre se toman justo antes del sacrificio de los animales (o como parte del método de

sacrificio), y se conservan en condiciones adecuadas. Existen otras determinaciones bioquímicas para investigar efectos tóxicos importantes en el riñón y el hígado, incluyendo: concentraciones de sodio, potasio, glucosa, colesterol total, urea, creatinina, proteínas totales, albúminas, y enzimas indicadoras de los efectos hepatocelulares (alanina aminotransferasa, aspartato aminotransferasa, fosfatasa alcalina, gamma-glutamil transpeptidasa, o sorbitol deshidrogenasa). Aunado a esto se practica una necropsia macroscópica completa y detallada a todos los animales utilizados en el estudio, incluyendo aspectos como un examen atento de la superficie corporal externa, todos los orificios, y las cavidades craneana, torácica y abdominal con su contenido. El hígado, los riñones, cápsulas suprarrenales, testículos, epidídimos, timo, bazo, cerebro y corazón de todos los animales se separan de los tejidos adyacentes, según convenga, determinando su peso húmedo lo antes posible tras la disección, a fin de evitar su desecación [69].

Los tejidos obtenidos se pueden conservar en el medio de fijación adecuado en caso de que se realice posteriormente examen histopatológico con la finalidad de identificar efectos tóxicos *in situ*, considerando la vía y el tiempo de exposición. Por ejemplo, el encéfalo (zonas representativas, como cerebro, cerebelo y protuberancia anular), médula espinal, estómago, intestino delgado y grueso (incluidas las placas de Peyer), hígado, riñones, cápsulas suprarrenales, bazo, corazón, timo, tiroides, tráquea y pulmones se pueden conservar mediante inflado con fijador, seguido de inmersión en cloroformo.

1.2.3.3.2. Pruebas *in vivo* de toxicidad aguda para sustancias volátiles o preparaciones en aerosol

Esta prueba se utiliza principalmente para determinar la concentración de aquellas sustancias volátiles o en aerosol que ocasiona la muerte del 50% de los animales expuestos (CL_{50}). Los animales se mantienen en una cámara cerrada, con un flujo de aire de 12-15 cambios por hora con adecuada oxigenación (19%/h). Los animales son expuestos a la sustancia de prueba por un mínimo de 4 horas, privándolos de comida, pero con acceso libre a agua durante ese tiempo. La concentración inicial se selecciona de uno de los cuatro niveles fijos correspondientes a las categorías del Sistema Globalmente Armonizado de Clasificación y Etiquetado de Productos Químicos (*GHS por sus siglas en inglés*) 1-4 para gases, vapores o aerosoles. Posteriormente son monitoreados durante 14 días, prestando atención a la

aparición de signos como temblores, convulsiones, salivación, diarrea, letargia, sueño, coma o muerte. Al terminar el estudio con el número de muertes se calcula la CL₅₀. A todos los animales (muertos por el compuesto o sacrificados), se les realiza una necropsia y estudios histopatológicos [73].

1.2.3.3.3. Pruebas *in vivo* de toxicidad aguda para preparaciones tópicas

La prueba de irritación ocular y la prueba de irritación cutánea agudas son importantes para evaluar la toxicidad de compuestos formulados en preparaciones tópicas, como por ejemplo, las pomadas: preparaciones en las que los excipientes son grasos; las cremas: preparados tipo emulsión compuestas por el principio activo, excipientes, emulgentes y agua; los geles: formados por líquidos gelificados por la acción de agentes gelificantes, del tipo de los polímeros; las pastas: preparados semisólidos de consistencia blanda y con un alto contenido en polvos absorbentes. Estas pruebas suelen realizarse en conejos y cerdos.

La prueba de irritación ocular es importante para evaluar las características tóxicas de una sustancia, ya que la información obtenida de esta prueba sirve para indicar los posibles daños que pueden presentarse tras la exposición a los ojos y a las membranas mucosas asociadas. Generalmente se realiza en conejos albinos adultos sanos, sin signos de irritación ocular. Se administran 0.5 mL del compuesto de prueba en el saco conjuntival manteniendo los párpados cerrados tras la aplicación de la sustancia en un ojo, el otro ojo actúa como control. Los ojos no deben lavarse durante 24 horas. La duración de la prueba debe ser suficiente para permitir la evaluación completa de la reversibilidad o irreversibilidad de las lesiones, siendo como mínimo de 72 horas sino hay signos de irritación y como máximo de 21 días, por lo que las observaciones se realizan a 1, 24, 48 y 72 horas tras la exposición, con observación prolongada a los 7 y 21 días si existiese afectación corneal u otros signos de irritación ocular, para poder determinar la progresión de las lesiones. Si con el animal utilizado inicialmente se encontrase efecto irritante intenso (reversible) o corrosivo (irreversible), no deben realizarse más pruebas. Se buscan signos como el enrojecimiento, lagrimeo, ulceraciones, hemorragias, descargas y ceguera.

De manera similar, la prueba de irritación cutánea o prueba de Draize se basa en la aplicación de una dosis del producto de ensayo a la piel de varios animales de experimentación, cada

uno de los cuales sirve como su propio control. El grado de irritación se lee y determina a intervalos específicos y se describe completamente. Generalmente esta prueba se realiza con una única dosis, pero puede solicitarse la realización de un ensayo de dosis repetidas tras completar el ensayo de una dosis. Consiste en aplicar 0.5 g de la sustancia de prueba en una porción de la superficie de la piel del animal. Se compara la apariencia de los lugares de contacto con el producto, comparada con los lugares de contacto de los controles. Esto debe observarse diariamente durante 3 días, asignándole una valoración cualitativa y cuantitativa (0 a 4), para describir y cuantificar el tipo de eritema o edema, que pudieran aparecer y vigilar por máximo 14 días [74], [75].

En ambas pruebas se debe evitar evaluar sustancias muy ácidas ($\text{pH} < 2$) o alcalinas ($\text{pH} > 5$) ya que se predice su naturaleza corrosiva.

1.2.3.4. Prueba *in vivo* de toxicidad subaguda

La toxicidad subaguda incluye los efectos que aparecen en los animales de laboratorio cuando reciben repetidamente dosis diarias de una sustancia o cuando están expuestos diariamente a la misma durante un periodo de tiempo breve, en comparación con sus expectativas de vida. Consisten en administrar el compuesto de prueba por vía oral, por al menos 28 días, regularmente en un horario específico. Usualmente se lleva a cabo en roedores de cualquier género con una edad de 6-8 semanas, cuyo peso corporal no debe variar más de 20%. Se utiliza un grupo control que solo recibe el vehículo y un grupo que recibe una dosis elevada del compuesto de prueba. Inicialmente se

registran los parámetros bioquímicos y conductuales basales, para dar seguimiento a estos durante el estudio e identificar cambios inducidos por la administración del compuesto. Al finalizar el estudio se obtienen tejidos de los órganos de interés y se registran los cambios histopatológicos. Se pueden realizar estudios de inmunotoxicidad, como hipersensibilidad de tipo retardado, respuestas proliferativas de linfocitos estimuladas por mitógenos o antígenos, función de macrófagos, y respuesta primaria de anticuerpos al antígeno dependiente de células T, para determinar los efectos adversos en el sistema inmune [76].

1.2.3.5. Prueba *in vivo* de toxicidad subcrónica

La prueba de toxicidad subcrónica tienen una duración de 30 a 90 días. El estudio de 90 días aporta información sobre los peligros que puede presentar para la salud una exposición continuada durante un periodo prolongado, que abarque la maduración posterior al destete y el crecimiento hasta la edad adulta. La información obtenida se refiere a los efectos tóxicos principales, los órganos diana y la posibilidad de acumulación, y puede proporcionar una estimación de la dosis de exposición sin efectos adversos observados, que puede emplearse para seleccionar la dosis de los estudios de toxicidad crónica y establecer los criterios de inocuidad de la exposición humana. En este tipo de pruebas se administra el compuesto de prueba todos los días por vía oral, regularmente en un horario específico. Se puede realizar en roedores y no roedores, entre los cuales el peso corporal no debe variar más de 20%. Se realiza una comparación con un grupo satélite. Posteriormente se realiza el mismo procedimiento que en las pruebas de toxicidad subaguda [77].

1.2.3.5. Prueba *in vivo* de toxicidad crónica

El estudio de toxicidad crónica según la norma OECD 452, proporciona información sobre los posibles peligros para la salud que probablemente surjan de la exposición repetida durante una parte considerable de la vida útil de la especie utilizada [78]. Los objetivos de este estudio son: identificar la toxicidad crónica de un producto; identificar los órganos diana; caracterizar la relación dosis-respuesta; identificar el NOAEL, o un punto de partida para el establecimiento de una Dosis de referencia (BMD); predecir los efectos de la toxicidad crónica en los niveles de exposición humana; y obtener información para aprobar la hipótesis sobre el modo de acción. Además, se descarta que el compuesto genere tumores. Se realiza generalmente en roedores (preferentemente ratas), aunque pueden emplearse otras especies de roedores y no roedores, si se justifica su elección. Se deben usar al menos tres niveles de dosis y un control, excepto en los casos en los que se realice una prueba límite. Para roedores, normalmente se deben usar al menos 20 animales de cada sexo por grupo en cada nivel de dosis, mientras que para no roedores se recomienda un mínimo de 4 de cada sexo por grupo. El producto de prueba se administra diariamente a los animales, normalmente por vía oral, o bien con la alimentación, el agua de bebida, o por sonda por un periodo de tiempo de más de 6 meses y el animal se observa periódicamente. La duración debe ser lo suficientemente

larga como para permitir que se manifiesten los efectos de la toxicidad acumulativa, evitando los efectos de los cambios por la edad del animal. Los niveles de dosis empleados suelen basarse en los resultados de estudios de toxicidad subcrónicos y deben tener en cuenta los datos toxicológicos y toxicocinéticos existentes disponibles para el compuesto de prueba. La dosis más alta permitirá identificar los principales órganos diana y los efectos tóxicos, pero debe evitarse el sufrimiento, la toxicidad grave, la morbilidad o la muerte de los animales. La dosis máxima no debe exceder los 1000 mg/kg de peso corporal/día. Tras determinar el mayor nivel de dosis, se debe seleccionar una secuencia descendente de niveles de dosis, generalmente las reducciones entre 2 a 4 veces son apropiadas para estos ensayos, aunque dependería de las características del producto de prueba. Los periodos de evaluación más comunes son 6, 9, 12, 18 y 24 meses. Los animales son observados diariamente y deben registrarse los cambios en el peso corporal, consumo de agua y alimento. Además, se deben realizar análisis hematológicos, de bioquímica clínica y análisis de orina a los 3, 6 y 12 meses, en al menos 10 hembras y 10 machos de cada grupo en el caso de los roedores. Al término del estudio, los animales son sacrificados y sometidos a una necropsia completa. Se analiza el peso de los órganos y se realiza un examen histopatológico de todos los órganos y tejidos corporales [79].

1.2.3.7. Pruebas *in vivo* de carcinogenicidad

Estas pruebas requieren más tiempo y dinero, por lo cual se lleva a cabo cuando el compuesto se administrará por periodos prolongados en la práctica terapéutica [43]. Se realiza en una especie de roedores y otra de no roedores, además de que debe llevarse a cabo durante gran parte de la vida del animal. Durante y después de la exposición a las sustancias a prueba, los animales se vigilan en búsqueda de signos de toxicidad y desarrollo de tumores. De no encontrarse lo anterior, la prueba debe realizarse por un máximo de 18 meses en ratones y 24 meses en ratas, con pruebas hematológicas a los 12 y a los 18 meses respectivamente. Los animales se sacrifican al terminar la prueba para realizar estudios histopatológicos de todos los tejidos [69].

1.2.3.8. Pruebas *in vivo* de toxicología de la reproducción

Las pruebas toxicológicas de reproducción son experimentos que se llevan a cabo para estudiar la ocurrencia de efectos adversos en los sistemas reproductivos masculino y

femenino y en la descendencia, como resultado de la exposición a agentes químicos o físicos [43]. Este tipo de pruebas incluyen estudios de toxicidad reproductiva en una o dos generaciones:

Prueba *in vivo* de toxicidad reproductiva en una generación: aquí el compuesto a prueba se administra tanto al macho como a la hembra de la especie seleccionada. En el macho se administra durante un ciclo completo de espermatogénesis y en la hembra durante dos ciclos menstruales. Después del periodo de administración los animales se aparean. Posteriormente las hembras se les continúa administrando el compuesto de prueba durante el periodo de embarazo y lactancia. Los espermatozoides de los animales machos se colectan para analizar su morfología y movilidad. Durante todo el estudio se debe prestar atención a la aparición de signos de toxicidad. Tras el parto se registran el número y sexo de las crías, así como el número de crías muertas y vivas. Las últimas son pesadas por la mañana y por la tarde los primeros 4 días. Al terminar el estudio, todos los animales son sacrificados y los órganos se sujetan a pruebas histopatológicas [80].

Prueba *in vivo* de toxicidad reproductiva en dos generaciones: El compuesto a prueba se administra de la misma forma y en la misma temporalidad que el ensayo anterior, evaluando los espermatozoides del macho y prestando atención a la aparición de signos de toxicidad. Tras el parto se registran los nacimientos, el sexo de las crías, número de crías muertas y vivas (generación F1), los últimos son pesados por la mañana y por la tarde los primeros 4 días. De la generación F1 se elige un macho y una hembra para repetir el proceso de administración del compuesto y obtener la generación F2. Al terminar el estudio, todos los animales son sacrificados y se obtienen los órganos para llevar a cabo exámenes histopatológicos [80-82].

1.2.3.9. Pruebas *in vivo* de toxicidad en el desarrollo

Las pruebas toxicológicas del desarrollo estudian los efectos adversos que se presentan en un organismo durante cualquier momento de su vida como resultado de la exposición a agentes químicos y físicos desde antes de la concepción (es decir, exposición de cualquiera de los padres), durante el desarrollo prenatal, el postnatal, o durante la pubertad. Tal es el caso de la:

Pruebas *in vivo* de embriotoxicidad en donde al realizar esta prueba el compuesto es administrado en roedores entre el día 8 y el 14 del embarazo, en el día 21 se realiza una cesárea y se registran malformaciones y mortalidad de las crías [83].

1.2.3.10. Prueba *in vivo* de toxicidad genética

La mutagenicidad es la capacidad que tiene un compuesto de ocasionar cambios en el material genético dentro del núcleo celular de manera que los cambios se transmiten durante la división celular, lo cual puede resultar en la muerte celular o en la transmisión de un defecto genético a otras células a través de la división mitótica. La prueba se realiza en diversas especies incluyendo plantas, microorganismos y animales. Los roedores son el modelo preferido. Las pruebas más comunes incluyen el ensayo de cromosoma de roedor, el ensayo letal dominante, la prueba de translocación heredable y ensayo de intercambio de cromátides hermanas [4].

1.2.3.11. Pruebas *in vivo* de neurotoxicidad en roedores

La evaluación de los efectos de un nuevo compuesto sobre la conducta, la coordinación y la actividad motora es un componente muy importante de los estudios *in vivo* durante el proceso de DDM. Tal evaluación incluye el monitoreo el estado general de salud, las funciones sensoriales, y las habilidades motoras, antes de llevar a cabo pruebas conductuales específicas. Por lo anterior se debe diseñar una estrategia viable para llevar a cabo los experimentos, minimizando el riesgo de resultados falsos (positivos y/o negativos). El diseño debe tomar en cuenta que ciertas pruebas deben preceder a otras, por ejemplo, si un compuesto induce ceguera en un ratón, su desempeño será negativo en pruebas de exploración o de aprendizaje, ya que estas requieren del uso y almacenamiento de información visual. Cada conclusión basada en los resultados de un experimento conductual debe estar sustentada por las pruebas de que el animal cuenta con las correspondientes habilidades sensoriales y motoras. El primer paso para analizar el comportamiento es obtener un número suficiente de animales para cada prueba (10-12), cuyo rango de edad no varíe más de 10 días, los animales deben ser adultos (en el caso de ratones 10-12 semanas) para obtener resultados generales y reproducibles, que no estén influenciados por procesos endocrinos [84].

1.2.3.11.1. Evaluación del estado general de salud y de las funciones neurofisiológicas

Esta evaluación incluye examen físico y varias pruebas conductuales con el objetivo de detectar cualquier anomalía general, tales como déficits sensoriales y motores que puedan intervenir con las pruebas conductuales. En primer lugar, se registra el peso y la temperatura corporal del animal. Además, se presta atención a los siguientes puntos: mal aseo, ausencia de pelaje, alteración en la respiración, y ausencia de bigotes. Un ratón, ciego, sordo o sin olfato, no podrá llevar a cabo experimentos que requieran de sus sentidos, por lo cual es necesario realizar las siguientes pruebas para detectar disfunciones neurológicas severas [85]: 1) análisis de conductas espontáneas anormales en entornos nuevos por periodos cortos de tiempo (2-5 min); 2) evaluación de la conducta ante objetos extraños; 3) prueba del acantilado (visión); 4) prueba de olfato; y 5) medición de diversos reflejos por ejemplo: equilibrio, enderezamiento, parpadeo, y contracción de orejas [86]. Una vez realizada la evaluación completa evaluadas y comprobadas las funciones sensoriales es posible incluir al animal en las pruebas que ayudarán a evaluar las funciones motoras.

1.2.3.11.2. Evaluación de las funciones motoras

La actividad locomotora se evalúa en primer lugar, ya que su aumento o disminución afectara de manera inespecífica el desempeño de otras pruebas conductuales complejas. Al evaluar las funciones motoras se toma en cuenta que estas son sensibles al ritmo circadiano, el cual se debe considerar al llevar a cabo los experimentos. La siguiente lista provee un número considerable de pruebas que se realizan para obtener información asociada a las funciones motoras de los ratones [85].

1.2.3.11.3. Evaluación del aprendizaje y de la cognición

El aprendizaje es un fenómeno complejo que involucra la actividad de diversas regiones cerebrales. Algunos aspectos del aprendizaje que pueden ser medidos en ratones incluyen: atención, memoria de trabajo (memoria a corto plazo usada cuando se lleva a cabo una prueba), consolidación de la memoria, y memoria de referencia (memoria a largo plazo: 24 h-toda la vida del animal). Se han desarrollado varias pruebas para evaluar uno u otro de estos aspectos del aprendizaje [87].

1.2.3.11.4. Evaluación de la actividad exploratoria y de la conducta

La conducta y la actividad exploratoria se evalúan al menos mediante dos pruebas diferentes. La más común en ratones es la prueba de campo abierto. Este paradigma depende de la locomoción, por lo que la actividad del ratón es evaluada. Tomando en cuenta que estos experimentos tienen como base la exposición del ratón a un nuevo ambiente, se realiza una sola vez, a fin de evitar falsos positivos y/o negativos [84].

1.2.3.11.5. Evaluación de la nocicepción

Para evaluar los efectos de los compuestos que presumen tener efectos analgésicos, los ratones deben ser evaluados previamente mediante pruebas estandarizadas de nocicepción [88]. Las dos pruebas más comunes son:

La prueba de retiro de cola la cual consiste en aplicar una estimulación térmica nociva en la cola del roedor evaluando su respuesta [89], la cual depende de un reflejo que depende de 4 variables: el tiempo de activación de los nociceptores cutáneos por el estímulo térmico; el tiempo de la conducción aferente del impulso a través de las astas dorsales de la médula espinal; la conducción dentro del sistema nervioso central o retraso central; y el tiempo de conducción aferente del impulso por las astas ventrales y la subsecuente activación de los músculos de la cola. Para aplicar el estímulo térmico (calor), se utiliza un haz de fotones dirigido a la cola. Se cuenta el tiempo que tarda en retirar la cola el animal, repitiendo el procedimiento en 3 ocasiones con un intervalo de 5 minutos, a fin de obtener un promedio del tiempo de latencia. Si en algún procedimiento el ratón no retira la cola en un tiempo de 15 minutos, se da por concluido el procedimiento para evitar daños permanentes en el animal. Cada procedimiento se realiza en una zona distinta de la cola para minimizar el posible daño a los tejidos [90] [91].

La prueba de superficie caliente es una de las más utilizadas para determinar la eficacia analgésica de nuevos compuestos en roedores [92]. Para realizar esta prueba el ratón se coloca en una superficie que se mantiene a 52.5 °C [93]. Una estructura de plástico rodea la superficie para que el ratón no pueda salir. Se registra la latencia de lamidas y/o sacudidas

de pata, además se registran brincos. Si el ratón no responde en 15 minutos la prueba se da por concluida para evitar daños innecesarios al ratón [94].

1.2.3.11.6. Evaluación de la agresividad

Para evaluar este comportamiento un macho adulto es aislado durante 14 días. Después de este periodo el ratón es colocado en una caja neutral junto con un ratón naïve, macho, adulto, de peso similar y de la misma cepa. A continuación, se registra la frecuencia y la latencia de los comportamientos agresivos (mordidas, amenazas, erguimientos, etc.) al igual que el de los comportamientos sociopositivos (olfateo, aseo, etc.), durante 10 min.

1.2.3.12. Toxicidad gastrointestinal

Los efectos adversos gastrointestinales (GI) son los signos de toxicidad más comunes asociados a los fármacos que se administran por vía oral. Entre estos fármacos destaca el grupo de los Antiinflamatorios No esteroideos (AINEs), por la alta incidencia de toxicidad gastrointestinal que producen [14]. Los efectos adversos GI generados por los AINEs se pueden categorizar en tres grupos: 1) “molestias” (reflujo, náuseas, dispepsia, vómito, y dolor abdominal); 2) lesiones en la mucosa observadas mediante endoscopia o rayos X; y 3) complicaciones GI serias (úlceras, perforaciones, y sangrado que requieran hospitalización). El uso de este grupo de fármacos se asocia principalmente a eventos GI en porciones superiores y úlceras gástricas, y en menor frecuencia a eventos GI en porciones inferiores: 1) inflamación y cambios en la permeabilidad del tubo digestivo bajo; 2) hemorragia del íleon, duodeno, y colon; 3) perforación; y 4) formación de constricciones [95]. Estos son el resultado de la inhibición de la síntesis de prostaglandinas (PG'S) por parte de los AINEs, mediadores lipídicos que juegan un factor clave en el mantenimiento de la mucosa gástrica. La PGE₂ y la PGI₂ incrementan la secreción de moco encargado de proteger la mucosa gástrica, reducen la secreción de ácido gástrico y regulan la liberación de pepsina.

1.2.3.12.1. Pruebas de toxicidad gastrointestinal

Para estudiar la toxicidad gastrointestinal de un compuesto usualmente se determina si este es capaz de ocasionar lesiones o alteraciones en la mucosa gástrica tras su administración oral aguda, subaguda o crónica en roedores. Si la inducción de lesiones gástricas es aguda, los animales se dejan en ayuno con acceso libre a agua, generalmente entre 18 y 24 horas

previo a la administración del compuesto. Otra opción es dejar un periodo de ayuno de 4 horas, previo a cada administración con acceso libre a agua. Posteriormente, 4-6 horas después de la única o última administración, se sacrifica a los animales por un método aprobado y enseguida se abre el abdomen mediante una incisión en la línea media para remover el estómago se lava gentilmente utilizando solución salina, posteriormente con una cánula o jeringa se llena con una solución fijadora (formaldehído al 4%) y se coloca en un recipiente que contiene la misma solución. Después de 15 minutos, se abre el estómago a lo largo de la curvatura mayor, y se extiende sobre una superficie de contraste para obtener, fotografías que permitirán posteriormente cuantificar el número de lesiones y el porcentaje del área lesionada. Las lesiones pueden identificarse y cuantificarse en distintas modalidades con ayuda de un software de análisis de imagen (ImageJ), y que incluye: 1) cuantificar el área lesionada, con lo que se obtiene el porcentaje de estas últimas, expresando el resultado en términos de índice de ulceración (IU, en % de área); 2) determinando la severidad de las lesiones a través de escalas mediante las cuales se asignan puntajes a los siguientes signos: coloración roja (puntaje = 0.5), úlceras puntuales (puntaje =1), manchas hemorrágicas (puntaje =1.5). Si se encuentran tres o cuatro úlceras se añaden dos puntos más, si se encuentran 5 o más úlceras se añaden 3 puntos más, al finalizar se suman los puntos y el valor final indicará la severidad del daño GI producido por la administración del compuesto; 3) evaluando la severidad de la hiperemia de acuerdo al siguiente puntaje: 0, ausencia de lesiones; 0.25, petequia; 0.50, hiperemia ligera; 0.75, hiperemia severa; y 1, lesión vascular; 4) evaluando la presencia de hemorragia de acuerdo al siguiente puntaje: 0, ausente; 1, hemorragia ligera; y 2, hemorragia severa. Finalmente, también se puede realizar otras pruebas para evidenciar el daño como por ejemplo la prueba de sangrado de la mucosa gástrica mediante citometría de flujo con láser-Doppler o bien evaluando la permeabilidad microvascular de la mucosa gástrica con la tinción de azul de Evans y/o cuantificando la actividad de la mieloperoxidasa gástrica para determinar la acumulación de neutrófilos en la mucosa gástrica [95-100].

2. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

2.1. α -aminofosfonatos

Los α -aminofosfonatos son ésteres de los ácidos α -aminofosfónicos, moléculas de la familia de los organofosforados, que son considerados los análogos más relevantes de los α -aminoácidos naturales. Se obtienen mediante sustitución isostérica del ácido carboxílico (CO_2H), el cual es estructuralmente plano, por un ácido fosfónico (PO_3H_2) cuya conformación es tetraédrica. El andamiaje resultante consiste en un grupo amino unido a un carbono que a su vez está unido a un grupo fosfato (N-C-P). Este andamiaje versátil permite realizar diversas modificaciones estructurales y así obtener nuevos compuestos, Por otro lado, el grupo fosfonato confiere a la molécula mayor estabilidad, ya que es menos susceptible a la hidrólisis catalizada por enzimas fosfatasas [101].

Ya que su tamaño y propiedades fisicoquímicas les permite competir por el sitio activo de diversas clases de enzimas, los α -aminofosfonatos son capaces de, a) actuar como antimetabolitos, b) sustituir aminoácidos en estructuras peptídicas [102], o c) funcionar como sustratos alternos, lo que les confiere un gran potencial biológico ya que les permite participar en una gran variedad de actividades biológicas. Este potencial biológico ha despertado el interés en la búsqueda de nuevas moléculas con actividad biológica, por lo que se han diseñado y sintetizado diversas clases de análogos de los α -aminofosfonatos [103].

2.1.1. Potencial bioactivo de los α -aminofosfonatos

Las actividades biológicas de los α -aminofosfonatos se deben en parte a su capacidad de inhibir la actividad de diversas enzimas ya que pueden actuar como falsos sustratos o bien, bloquear el sitio activo de la enzima. [102]. Todo lo anterior se debe a su tamaño, y a las características estructurales y electrónicas del andamiaje N-C-P. En concordancia con lo anterior diversos estudios han evidenciado diferentes actividades de interés en medicina como por ejemplo actividad antiviral [104], antitumoral [105], antimicrobianas [106], antioxidantes [107], antibiótica [108], [109], [110], antifúngicas [111], anticonvulsivas [112], y neuroprotectora [113] de diversos tipos de α -aminofosfonatos (Tabla 3).

Tabla 3. α -aminofosfonatos reportados con actividad biológica

Clave	Estructura química	Actividad	Ensayo	Ref.
4h	<p>4h</p>	Antiviral Contra virus Coxsackie B4	<i>In vitro</i> : Células Vero	[104]
4b, 4c	<p>b c</p>	Antiviral contra virus sincitial respiratorio (RSV)	<i>In vitro</i> : Células HeLa	[104]
5i, 5l	<p>5</p> <p>i, R = 2-naphthyl l, R = 2-Cl-C₆H₄</p>	Antitumoral contra células de carcinoma colorrectal HCT116	<i>In vitro</i> : Células HCT116	[114]
L-IIIk, D-IIa, D-IIe	<p>Cmpd R₁ R₂ L-IIIk p-F i-Pr D-IIa H Et D-IIe o-F Et</p>	Antitumoral contra células PC3, Bcap37 y BGC823	<i>In vitro</i>	[115]
9m	<p>9m: R₁ = -OH; R₂ = -OCH₃; R₃ = H;</p>	Antitumoral HepG-2, A375, K562, NCI-H460, HL-7702	<i>In vitro</i>	[116]
4f-h	<p>4</p> <p>f g h</p>	Antimicrobiana contra <i>E. coli</i> , <i>S. aureus</i> , <i>A. niger</i> y <i>C. albicans</i> .	<i>In vitro</i>	[106]
4h	<p>4 h R R1 Me</p>	Antioxidante	<i>In vitro</i>	[107]

(Continuación tabla 3).

Clave	Estructura química	Actividad	Ensayo	Ref.
4ah, 4bh	<p> $R^1 = H$ (a) $R^1 = Cl$ (b) N-aryl </p>	Actividad anticolinesterasa Neuroprotectora	<i>In vitro</i>	[113]
4 ^a , 4g, 4j		Antibacteriana contra <i>Escherichia coli</i> NCIM2645 <i>Salmonella typhi</i> NCIM2501	<i>In vitro</i>	[108]

2.1.2. Efecto antiinflamatorio y analgésico de los α -aminofosfonatos de interés

De particular relevancia para nuestro grupo de investigación son las propiedades antiinflamatorias y analgésicas de una nueva serie de 10 α -aminofosfonatos, específicamente un conjunto de fosfoserinas alfa-metiladas que han mostrado actividad antiinflamatoria [5] y analgésica [6] en diversos modelos de dolor, en relación con este punto, algunos grupos de investigación han sintetizado previamente aminofosfonatos que poseen estas actividades (Tabla 4).

Tabla 4. α -aminofosfonatos con actividad antiinflamatoria y/o analgésica

Clave / control	Estructura química	%Efecto Encontrado	Modelo	Ref.
1a indometacina	<p>1a</p>	97.6 \pm 1.4	Edema de oído inducido por TPA (12-O-tetradecanoilforbol 13-acetato) en ratones	[5]
4h y 4i		78 \pm 2	Inflamación inducida por LPS en líneas celulares de macrófagos RAW 264.7	[117]
2b diclofenaco	<p>2b</p>	86.41	Técnica de inhibición de la desnaturalización de la albúmina	[118]
11a indometacina	<p>11a, R' = Me</p>	60.4	Edema agudo de la pata inducido por carragenina (CPE) en ratones 20–25 g	[110]
5d Diclofenaco	<p>5d</p>	91.01	Método de edema de la pata inducido por carragenina en ratas 150–200 g	[119]

Con base en estos antecedentes nuestro grupo de investigación diseñó y sintetizó una nueva serie de 10 α -aminofosfonatos (1a-f, 2a-c), específicamente un conjunto de fosfoferinas α -metiladas. La síntesis se realizó mediante una reacción tricomponente utilizando: 1) acetoxiacetona o hidroxiacetona, 2) diversas aminas alifáticas, y 3) dimetilfosfito en presencia de ácido fenilfosfónico en condiciones libres de disolventes (figura 2).

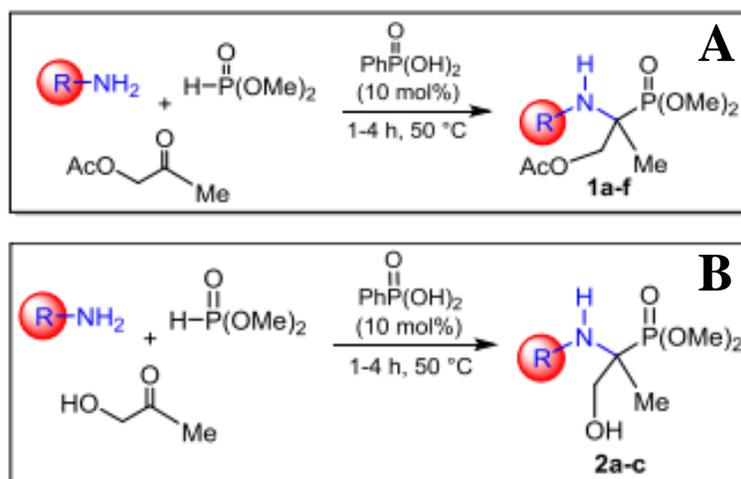


Figura 2. Síntesis de las fosfoferinas α -metiladas A= 1a-f, B= 2a-c). Modificada de Romero-Estudillo et al., 2018 [3]

Después de realizar la caracterización química, se llevó a cabo la evaluación de su potencial efecto antiinflamatorio. Para esto se utilizó el modelo de edema auricular inducida por activador tisular de plasminógeno (TPA) en ratón, en donde se utilizó indometacina (1mg/oreja) como control positivo. Los resultados mostraron que la aplicación tópica de los compuestos 1a, 1c-f y, 2a-c en un rango de dosis de 0.1 a 10 mg/oreja disminuyó significativamente el edema auricular inducido por TPA de manera dependiente de la dosis. En contraste, los compuestos 1b y 3 mostraron actividad antiinflamatoria moderada. Sin embargo, esta no fue dependiente de la dosis. Además, se observó que los compuestos 1a, 1c, 1f, 2c, 2b y 1d mostraron eficacias máximas cercanas al 100 % y estadísticamente iguales a la eficacia de indometacina (1 mg/oreja). La dosis a la cual se observó el efecto 50% del efecto antiinflamatorio en los animales en experimentación o Dosis Efectiva 50 (DE_{50}), se presentó un rango de 0.49 y 1.73 mg/oreja. El orden de la potencia de estos compuestos de mayor a menor fue el siguiente 1f, 1d, 2b = 2c, 1c, 1a, 1e, 1b, 2a, y 3. Para determinar al

menos en parte como estos α -aminofosfonatos producen su efecto antiinflamatorio, se evaluó también si estos eran capaces de modular la cantidad de neutrófilos y monocitos presentes en sangre obtenida del seno retro orbital. Este lecho vascular es el más cercano a la zona de inflamación por lo que se considera representativo de los cambios que estén sucediendo en el sitio de la inflamación. Se observó que el tratamiento con la dosis más efectiva en disminuir el edema auricular de los compuestos 1a, 1c, 1d, y 1f disminuyó de forma estadísticamente significativa el número de monocitos y neutrófilos en comparación del grupo que fue tratado con TPA [5]. En conjunto estos resultados sugieren que los α -aminofosfonatos suprimen en gran medida la inflamación aguda inducida por TPA, al modular la afluencia de monocitos y neutrófilos al sitio de la lesión.

En un estudio subsecuente se evaluó si los α -aminofosfonatos producen efecto antinociceptivo, es decir si son capaces de disminuir el dolor. Para esto se utilizó el modelo de estiramiento abdominal inducido con ácido acético en ratón el cual es considerado un modelo de dolor visceral; y el modelo de formalina el cual es considerado un modelo de dolor inflamatorio. En el modelo de dolor visceral se encontró que todas las fosfoserinas α -metiladas evaluadas tienen efecto antinociceptivo moderado con un rango de eficacia entre $35.7 \pm 7.5\%$ y $67.8 \pm 3.5\%$, siendo los compuestos 1e y 2b los más efectivos. En el modelo de la formalina se encontró que las fosfoserinas 1a, 1d, 1d y 1f produjeron un efecto antinociceptivo dependiente de la dosis con un rango de eficacia entre $33.7 \pm 9.1\%$ y $59.7 \pm 7.9\%$, siendo los compuestos 1f y 1d más eficaces y potentes que el control positivo Diclofenaco. Por otro lado, en el modelo de dolor neuropático, se encontró que las fosfoserinas 1d, 1e y 1e, pero no 1a, mostraron un efecto antialodínico con un rango de eficacia entre $15.4 \pm 2.2\%$ a $60.1 \pm 5.2\%$, siendo 1e y 1f más potentes que el control positivo Gabapentina [6]. Todos estos resultados en conjunto muestran que los α -aminofosfonatos evaluados poseen efecto analgésico, además del efecto antiinflamatorio. Estas características los convierten en candidatos interesantes para seguirse estudiando como potenciales fármacos con propiedades analgésicas y antiinflamatorias. Con base en lo anterior es necesario caracterizar su perfil farmacológico con la finalidad de determinar si son seguros.

2.1.3. Toxicidad de los α -aminofosfonatos

Los α -aminofosfonatos son compuestos químicos que producen un gran número de actividades biológicas de interés en medicina y por lo tanto tienen el potencial de convertirse en nuevos fármacos. Debido a su potencial terapéutico algunos grupos de investigación se han dado a la tarea de estudiar la toxicidad de los α -aminofosfonatos con base en la hipótesis de que si tienen la capacidad de inhibir la función de enzimas involucradas en el metabolismo celular entonces también es posible que generen efectos tóxicos. Por otro lado, cabe mencionar que estos compuestos se encuentran bien establecidos como potentes pesticidas [120]. Debido a esto los primeros estudios relacionados con su toxicidad son aquellos destinados a determinar su toxicidad hemolítica. En este aspecto un grupo de investigación polaco, diseñó y sintetizó dos series de alfa aminofosfonatos (compuestos 1-5 y compuestos 1-10) y evaluó su efecto hemolítico en eritrocitos de cerdo (Tabla 5). Encontraron que la mayoría de los compuestos produjo hemólisis en concentraciones milimolares (C_{50} =0.17-1.5 μ M y C_{100} =0.25-2.8 μ M, respectivamente). Mientras que los compuestos 1,2, 4, 7-9 de la serie 2 no produjo hemólisis importante (C_{100} =10 μ M). Los autores sugieren que la toxicidad hemolítica correlaciona con la lipofilidad de los compuestos estudiados [120, 121]. Otro estudio en donde se realizó una aproximación preliminar de la toxicidad de estos compuestos fue el de Abdel-Megeed y colaboradores en el 2012 (Tabla 5). Estos autores buscaban desarrollar compuestos con actividad antimicrobiana. Para ello sintetizaron una serie de α -aminofosfonatos que contienen en su estructura el andamiaje de quinazolin-4(3H)-ona (3-5) y pirimidina (6-8) y evaluaron su posible actividad antibacteriana y antifúngica. Encontraron que los compuestos producen actividad antibacteriana moderada contra *E. coli*, *B. subtilis* y *S. aureus* con una concentración mínima inhibitoria (MIC, *por sus siglas en inglés*) entre 10 y 1000 μ g/mL. De forma similar se encontró que producen actividad antifúngica moderada contra *C. albicans* y *S. cerevisiae* (MIC=10-1000 μ g/mL). El compuesto más activo fue el 6 con una MIC de 10 μ g/mL para bacterias y hongos. Además, se realizó una primera aproximación para determinar su toxicidad utilizando el ensayo de artemia salina. Se encontró que la concentración letal media (CL_{50}) estuvo en un rango entre 100 y 7841 μ g/mL. Los compuestos más tóxicos fueron el compuesto 4 y 5 que no son los más activos. Es importante destacar que la CL_{50} del compuesto 6 fue 843 μ g/mL [122].

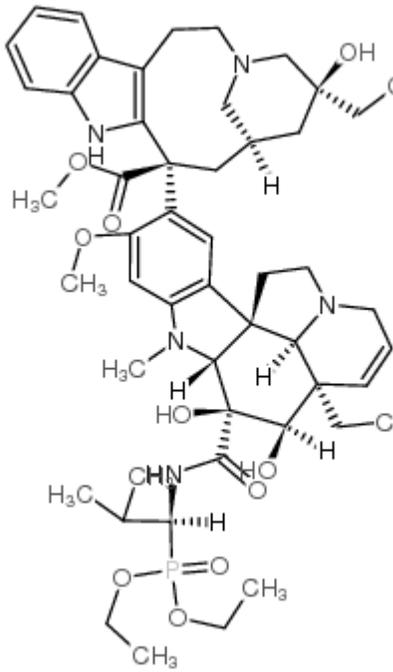
Tabla 5. Toxicidad hemolítica y artemia salina de α -aminofosfonatos

Clave	Estructura química	Tipo de ensayo (Concentraciones); tiempo de exposición (T_{exp})	Resultado-conclusión	Ref.																																																						
1-5	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Comp.</th> <th>R¹</th> <th>R²</th> <th>R³</th> <th>R⁴</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>CH₃</td> <td>n-C₃H₇</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>n-C₄H₉</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>CH₃</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>n-C₄H₁₁</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>-C₃H₁₀</td> <td>C₂H₅</td> <td>n-C₃H₁₇</td> <td>n-C₃H₁₇</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>-C₃H₁₀</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>n-C₃H₁₇</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>-C₃H₁₀</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>C₂H₅OH</td> <td>C₂H₅OH</td> </tr> </tbody> </table>	Comp.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	1	CH ₃	n-C ₃ H ₇	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	2	CH ₃	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₁₁	3	-C ₃ H ₁₀	C ₂ H ₅	n-C ₃ H ₁₇	n-C ₃ H ₁₇	4	-C ₃ H ₁₀	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	n-C ₃ H ₁₇	5	-C ₃ H ₁₀	n-C ₄ H ₉	C ₂ H ₅ OH	C ₂ H ₅ OH	<p>Hemolisis en eritrocitos de cerdo</p> <p>(0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mM)</p> <p>T_{exp}: 4 h</p>	<p>Todos los compuestos presentaron el efecto hemolítico</p> <p>C_{50}=0.17-1.5 mM</p> <p>2>3>1>5>4</p> <p>C_{100}=0.25-2.5 mM</p> <p>2,3>1>5>4</p>	[120]																								
Comp.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴																																																						
1	CH ₃	n-C ₃ H ₇	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉																																																						
2	CH ₃	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₁₁																																																						
3	-C ₃ H ₁₀	C ₂ H ₅	n-C ₃ H ₁₇	n-C ₃ H ₁₇																																																						
4	-C ₃ H ₁₀	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	n-C ₃ H ₁₇																																																						
5	-C ₃ H ₁₀	n-C ₄ H ₉	C ₂ H ₅ OH	C ₂ H ₅ OH																																																						
1-10	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Comp.</th> <th>R¹</th> <th>R²</th> <th>R³</th> <th>R⁴</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>C₂H₅</td> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>i-C₃H₇</td> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>C₂H₅</td> <td>C₂H₅</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>Sec-t-C₄H₉</td> <td></td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>-C₆H₁₂-</td> <td></td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>-C₆H₁₂</td> <td>C₂H₅</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>n-C₄H₉</td> <td>-C₆H₅-</td> <td>CH₃</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>n-C₁₀H₂₁</td> <td>i-C₃H₇</td> <td>-C₆H₁₀-</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Comp.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴	1	n-C ₄ H ₉	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃	2	n-C ₄ H ₉	CH ₃	CH ₃	CH ₃	3	n-C ₄ H ₉	i-C ₃ H ₇	CH ₃	CH ₃	4	n-C ₄ H ₉	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃	5	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	CH ₃	CH ₃	6	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	Sec-t-C ₄ H ₉		7	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	-C ₆ H ₁₂ -		8	-C ₆ H ₁₂	C ₂ H ₅	n-C ₄ H ₉	CH ₃	9	n-C ₄ H ₉	-C ₆ H ₅ -	CH ₃	CH ₃	10	n-C ₁₀ H ₂₁	i-C ₃ H ₇	-C ₆ H ₁₀ -		<p>Cuatro de los compuestos presentaron el efecto hemolítico significativo.</p> <p>C_{100}= 0.5-2.8</p> <p>Potencia del efecto hemolítico: 3>10>6>5</p> <p>Los compuestos 1, 2, 4, 7-9 no presentaron toxicidad hemolítica significativa (C_{100}> 10 mM),</p>	[121]
Comp.	R ¹	R ²	R ³	R ⁴																																																						
1	n-C ₄ H ₉	C ₂ H ₅	CH ₃	CH ₃																																																						
2	n-C ₄ H ₉	CH ₃	CH ₃	CH ₃																																																						
3	n-C ₄ H ₉	i-C ₃ H ₇	CH ₃	CH ₃																																																						
4	n-C ₄ H ₉	C ₂ H ₅	C ₂ H ₅	CH ₃																																																						
5	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	CH ₃	CH ₃																																																						
6	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	Sec-t-C ₄ H ₉																																																							
7	n-C ₄ H ₉	n-C ₄ H ₉	-C ₆ H ₁₂ -																																																							
8	-C ₆ H ₁₂	C ₂ H ₅	n-C ₄ H ₉	CH ₃																																																						
9	n-C ₄ H ₉	-C ₆ H ₅ -	CH ₃	CH ₃																																																						
10	n-C ₁₀ H ₂₁	i-C ₃ H ₇	-C ₆ H ₁₀ -																																																							
3-8	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Comp.</th> <th>Ar</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>5</td> <td>2,4-di-HOC₆H₃</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>4-ClC₆H₄</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>3-NO₂ C₆H₄</td> </tr> </tbody> </table> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Comp.</th> <th>Ar</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>6</td> <td>2,4-di-HOC₆H₃</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>4-ClC₆H₄</td> </tr> <tr> <td>8</td> <td>3-NO₂ C₆H₄</td> </tr> </tbody> </table>	Comp.	Ar	5	2,4-di-HOC ₆ H ₃	4	4-ClC ₆ H ₄	5	3-NO ₂ C ₆ H ₄	Comp.	Ar	6	2,4-di-HOC ₆ H ₃	7	4-ClC ₆ H ₄	8	3-NO ₂ C ₆ H ₄	<p>Actividad antibacteriana de los compuestos contra: <i>E. coli</i>, <i>B. subtilis</i>, y <i>S. aureus</i> (10–1000 μg/mL)</p> <p>Actividad antifúngica contra: <i>C. albicans</i> y <i>S. cerevisiae</i> (10–1000 μg/mL)</p> <p>Toxicidad aguda en artemia salina</p>	<p>Todos los compuestos mostraron actividad antibacteriana contra: <i>E. coli</i> MIC=10 y 1000 μg/mL 3>6> 4, 5, 7, 8</p> <p><i>B. subtilis</i> MIC= 10-1000 μg/mL 6>8 >3, 4, 5, 7</p> <p><i>S. aureus</i> MIC=10-1000 μg/mL 6>8>3, 4, 5, 7</p> <p>Ciprofloxacino (MIC₅₀ 5 mg/mL).</p> <p><i>C. albicans</i> MIC=10, 100 y1000 μg/mL 3, 6 ,8 >4, 5, 7</p> <p><i>S. cerevisiae</i> MIC=10-1000 μg/mL 4, 6 ,8 >3, 7, 5</p> <p>Amphotericin B (MIC₅₀ 15 mg/mL).</p> <p>CL₅₀=100-7841 μg/mL 5>4 >6 >3 >8>7</p>	[123]																																						
Comp.	Ar																																																									
5	2,4-di-HOC ₆ H ₃																																																									
4	4-ClC ₆ H ₄																																																									
5	3-NO ₂ C ₆ H ₄																																																									
Comp.	Ar																																																									
6	2,4-di-HOC ₆ H ₃																																																									
7	4-ClC ₆ H ₄																																																									
8	3-NO ₂ C ₆ H ₄																																																									

Por otro lado, es importante mencionar que una de las actividades de mayor interés en medicina de los α -aminofosfonatos es la antitumoral y se ha buscado desde la década de los 90s. Para dar origen a potenciales agentes antitumoral el grupo α -aminofosfonato ha sido introducido en diferentes entidades o grupos funcionales tales como el ácido dehidroabiético [124], condensados con alizarina [125], fusionados con tiazolpiridina [126] o en complejos con platino [127], por mencionar algunos. En concordancia, estudios *in vitro* han mostrado que este tipo de compuestos produce citotoxicidad importante, en una gran variedad de líneas celulares cancerosas humanas que incluyen: cáncer de mama (MCF-7, MDA-MB-231), de hígado (Hep-G2), de próstata (DU-145), neuroblastoma (IMR-32), melanoma (SKMEL-2), leucemia (K-562, U-973, HL-60), osteosarcoma (U2OS, MG-63), carcinoma de colon (HT-29, HCT116), carcinoma de vejiga (647-V, T-24, MB-49), cáncer de ovario (SK-OV-3), cervicouterino (HeLa). Asimismo, se han evaluado en líneas cancerosas resistentes a fármacos como es el caso de la línea SK-OV-3/CDDP derivada de cáncer de ovario y que es resistente a cisplatino (Tabla 6). Sin embargo, inicialmente pocos estudios evaluaron los posibles efectos tóxicos de los compuestos sintetizados, ya sea en células no cancerosas o utilizando otras aproximaciones. A continuación, se describen algunos estudios en donde además de estudiar el efecto citotóxico de los aminofosfonatos, se realizó una aproximación preliminar para conocer la toxicidad de los compuestos ya sea *in vitro* o *in vivo*. En 1991 Pierre y colaboradores publicaron un estudio en donde reportan el efecto citotóxico de un compuesto derivado de la vinca fusionado con el grupo α -aminofosfonato al que se le denominó S12363 (Tabla 6). Dicho compuesto resultó ser altamente citotóxico en 37 líneas cancerosas humanas y 2 de ratón. Entre estas, la mejor efectividad se observó contra líneas cancerosas de leucemia, pulmón, mama, ovario y melanoma. Además, el compuesto fue de 35 a 72 veces más potente en el efecto citotóxico que los controles positivos vincristina y vinblastina. Debido a estos prometedores resultados, se evaluó en roedores el efecto antitumoral. Se encontró que S12363 mostró efecto antitumoral en modelos de Leucemia, melanoma, adenocarcinoma de colon y sarcoma cuando se administran en un esquema de uno dos o tres dosis por vía intravenosa (i.v.) o intraperitoneal (i.p.) a las dosis de 0.075-0.3 mg/Kg/día. El mejor efecto se observó cuando el compuesto se administró por vía i.p. y no se observaron diferencias en la eficacia del efecto antitumoral entre los esquemas de una, dos o tres dosis. Cabe destacar que la dosis óptima fue de 20 a 40 veces menor que la utilizada

con vinblastina. Adicionalmente, se realizó un estudio de toxicidad aguda en ratón en donde se obtuvo una dosis letal 10 (DL_{10}) de 0.20 mg/kg (i.p.) lo que indica que S12363 es 22 veces más tóxico que vincristina y vinblastina [128]. Este compuesto tan prometedor se siguió estudiando y pasó a la fase clínica, es decir estudios en humanos, en donde se le asignó el nombre de Vinfosiltina. En un estudio de fase I, se determinó el perfil farmacocinético de Vinfosiltina en pacientes con cáncer a las dosis de 0.04 a 0.84 mg/m² administradas por bolo intravenoso. Se encontró que posee un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) largo de 50 horas. Sin embargo, produjo como efectos adversos neutropenia y leucopenia, evidenciado su toxicidad en humanos [129]. Además, este efecto adverso es congruente con el efecto hemolítico presente en otros compuestos que contienen el andamiaje α -aminofosfonato. Posteriormente, en un estudio de Fase II realizado en pacientes con cáncer de mama avanzado, que no obtuvieron respuesta al tratamiento de primera línea, se observó que la monoterapia con este fármaco no produjo mejoría en los pacientes, pero sí se observaron diversos efectos adversos. Los más frecuentes fueron nuevamente neutropenia y leucopenia. Además, se observó anemia, diarrea, constipación y fatiga [130]. Estos resultados en conjunto evidencian que los aminofosfonatos no son inocuos por lo que es importante caracterizar su toxicidad desde etapas tempranas.

Tabla 6. Estudios de antitumorales y toxicológicos de S12363

Clave del compuesto	Estructura química	Tipo de ensayo (Conc./ Dosis)	Resultado-conclusión	Ref.
S12363		<p>Citotoxicidad en 37 líneas cancerosas humanas y 2 de ratón que incluyen líneas cancerosas de: Leucemia, Colon, Pulmón Riñón, Ovario Seno, Melanoma T_{exp}:1 h</p>	<p>S12363 fue citotóxico en todas las líneas cancerosas, con mayor actividad en las líneas de leucemia, pulmón, mama, ovario y melanoma. La CI₅₀ media fue 35 nM, lo que indica que S12363 fue 35 a 72 veces más citotóxico que vincristina y vinblastina.</p>	[128]
		<p>Efecto antitumoral in vivo en ratón: modelos de Leucemia (L1210, P388) Melanoma b16, Carcinoma de pulmón de Lewis, Adenocarcinoma de colon y Sarcoma (M5076) Tratamiento 0.075 - 0.3 mg/Kg/día; i.p. o i.v. Esquemas de una dosis, dos o tres dosis.</p>	<p>La dosis óptima fue de 20 a 40 veces menor que la de vinblastina. Se encontró efecto antitumoral en todos los modelos excepto en el Carcinoma de pulmón de Lewis.</p> <p>La vía de administración óptima fue la i.p. Los esquemas de 2 o tres dosis no mejoran la actividad antitumoral en comparación con el tratamiento con una dosis única.</p>	
		<p>Toxicidad aguda en ratón (i.p.)</p>	<p>DL₁₀= 0.20 mg/kg por vía i.p. fue 22 veces más tóxico que vincristina y vinblastina</p>	
		<p>Estudios de fase I: Pacientes con cáncer Bolo i.v 0.04 to 0.84 mg/m² (0.12 and 1.35 mg/dosis)</p>	<p>Se observó el desarrollo de leucopenia y neutropenia</p>	[129]
		<p>Estudio de Fase II Bolo i.v 0.3 mg/m² una vez/semana (2-8 ciclos) 0.6 mg/m² una vez/c 2 meses (3-8 ciclos) En 16 pacientes con cáncer de mama avanzado que no obtuvieron respuesta con el tratamiento de primera línea.</p>	<p>Vinfosiltina no produjo ningún efecto terapéutico como monoterapia. Los efectos adversos observados fueron: neutropenia grado 3 y 4 (15/22), leucopenia grado 3 (n=9), anemia (n=1), diarrea (n=1), constipación (n=1) y fatiga n=1.</p>	[130]

Posteriormente Kraicheva y colaboradores fusionaron el grupo aminofosfonato con antraceno y obtuvieron tres compuestos de los cuales se evaluó su efecto citotóxico en siete líneas cancerosas. Se encontró que los tres fueron citotóxicos en las 7 líneas cancerosas después de 24 h de exposición con una CI₅₀ entre 0.02 y 0.88 mg/mL. El compuesto 5 fue el más activo en la mayoría de los casos, mientras que el 4 fue el menos activo. Estos autores

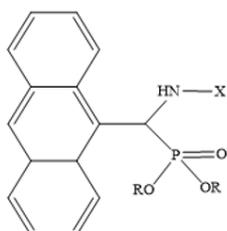
también evaluaron la citotoxicidad de los compuestos en linfocitos de humanos y se encontró una CI_{50} entre 0.29->2 mg/mL, siendo el compuesto 5 el más citotóxico en células no cancerosas. Es decir, el compuesto 5 fue de 2.6 a 4 veces más citotóxico en células cancerosas que en linfocitos. Adicionalmente se evaluó la toxicidad en cromosomas. Para esto se realizó un estudio de clastogénesis en células de médula ósea de ratón. Se encontró que después de 24 horas de la administración de una dosis de 10 o 100 mg/kg por vía i.p. un 4 a 8% de aberraciones cromosómicas. Las alteraciones que se observaron más frecuentemente fueron roturas, fragmentos y fusiones centrómero/centroméricas en un porcentaje mucho menor que el observado con el control positivo mitomicina C. Es decir se observó un efecto clastogénico moderado[131]. De forma similar, en el 2016, Lewkowski y colaboradores evaluaron el efecto citotóxico de una serie de seis α -aminofosfonatos derivados del pireno (3Aa-3Ad, 3Ai) en dos líneas celulares derivadas de carcinoma de colon, así como en linfocitos humanos. Se encontró que todos los compuestos evaluados produjeron citotoxicidad tanto en células cancerosas como en células no cancerosas. Sin embargo, mientras los compuestos mostraron una CI_{50} entre 12.8 y 105 μ M en células cancerosas, la CI_{50} en linfocitos estuvo entre 17.5-334.2 μ M. Esto indica que algunos compuestos presentan efecto citotóxico en células cancerosas en el mismo rango de concentraciones en donde producen citotoxicidad en linfocitos. Ejemplo de esto fue el compuesto 3Ac que el más activo en células cancerosas (CI_{50} = 15.8 \pm 3.44 y 15.9 \pm 4.85 μ M, respectivamente), sin embargo, este mostró citotoxicidad en la misma concentración que en linfocitos (CI_{50} = 17.5 \pm 4.15 μ M). Este resultado indica que 3Ac no es adecuado para su uso en humanos. Otro ejemplo fue el compuesto el 3Ad quien fue el segundo compuesto más activo con una CI_{50} = 105.8 \pm 3.37 y 70.8 \pm 2.99 μ M, respectivamente, mientras que en linfocitos la CI_{50} fue de 334.2 \pm 2.59 μ M. Esto indica que 3Ab tiene un índice de selectividad de 9.5 y 11 respectivamente. Es decir, la CI_{50} en linfocitos es 9 y 11 veces mayor que la de las células cancerosas. Esto lo convierte en una opción interesante para seguirse estudiando [132]. De forma similar, el grupo de Tiwari sintetizó una serie de catorce 2-Oxoindolin aminofosfonatos que fueron evaluados en 5 líneas cancerosas y en fibroblastos murinos (NIH3T3). Se encontró que todos los compuestos fueron citotóxicos en las líneas de SK-MEL-2, MG-63, HT-29 y Hep-G2. La CI_{50} reportada para estas líneas estuvo entre <0.1 y 93.9 μ M. Mientras que en las líneas de MCF-7 e IMR-32 solo 5 compuestos fueron activos, con una GI_{50} entre <0.1 y 89.8 μ M. Cabe destacar que estos

compuestos no se consideraron citotóxicos en fibroblastos ya que se obtuvo una $GI_{50} \Rightarrow 250 \mu M$. Los compuestos más activos están muy alejados de este valor por lo que al menos in vitro parecen ser seguros. Entre los compuestos más activos se encuentran 4b y 4h. A estos compuestos se les determinó su toxicidad aguda en ratón. Se encontró que ambos compuestos se consideran seguros cuando se administran por vía oral hasta la dosis de 2000 mg/kg (DL_{50} oral >2000 mg/kg) [133]. Por otro lado, Huang y colaboradores (2019) sintetizaron doce α -aminofosfonatos que contienen en su estructura complejos con platino (Pt-1, 1-11) y evaluaron su efecto en líneas cancerosas de carcinoma de vejiga urinaria, osteosarcoma, carcinoma hepatocelular y cáncer de ovario, así como en células hepáticas humanas. Después de 48 horas de exposición encontraron que todos los compuestos mostraron citotoxicidad en las cuatro líneas cancerosas con una CI_{50} entre 0.46 y 88.7 μM . Mientras que en hepatocitos se obtuvo una CI_{50} de 24.8- $>100 \mu M$. De igual forma estos resultados muestran que los compuestos evaluados ejercen su efecto citotóxico en líneas cancerosas al mismo tiempo que causan toxicidad en células no cancerosas. En este estudio el compuesto más activo fue el Pt-1, que mostró una CI_{50} entre 0.16 y 1.2 μM , mientras que su CI_{50} en hepatocitos fue de 24.8. Esto quiere decir que Pt-1 es entre 50 y 20 veces más tóxico para células cancerosas que para células no cancerosas. En este aspecto cabe resaltar que Pt-1 fue más activo en células derivadas de osteosarcoma [127]. Estos resultados muestran que este compuesto es prometedor para seguirse estudiando para su uso en humanos. Con base en lo anterior, los autores evaluaron su efecto antitumoral in vivo. Para ello emplearon un modelo de xenotrasplante inducido con células MB-49 derivadas de cáncer urotelial o cáncer de células transicionales, la forma más común de cáncer de vejiga en humanos. Se encontró que la administración de Pt-1 en un esquema múltiple por vía intravenosa durante 18 días disminuyó el volumen del tumor en un 56%, lo cual confirmó su potencial efecto antitumoral. Es importante mencionar que durante este tiempo no se observó muerte ni pérdida de peso, lo que indica que, al menos en este esquema de tratamiento, el compuesto es seguro. Adicionalmente, se realizó un estudio de toxicidad aguda, en donde Pt-1 se administró por vía intravenosa a grupos de tres ratones a las dosis de 10, 20 y 30 mg/kg. No se observaron muertes en ninguna de las dosis evaluadas. Esto sugiere que la administración de una sola dosis de Pt-1 no es letal y no afecta de forma macroscópica la salud del animal de experimentación. Por otro lado, en el 2019 Ewies y colaboradores sintetizaron una serie de

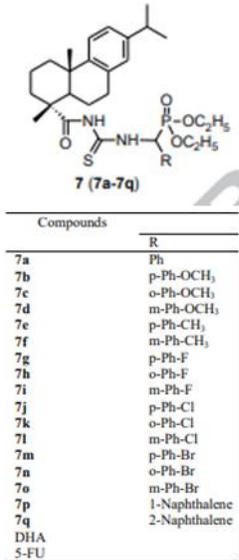
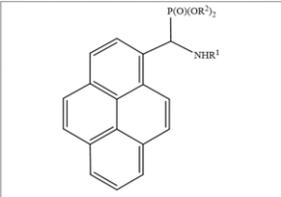
oxidiazoles α -aminofosfonatos (5a-m) y evaluaron su citotoxicidad en tres líneas cancerosas. Encontraron que todos los compuestos mostraron efectos citotóxicos de forma dependiente de la concentración siendo más efectivos en las células derivadas de cáncer de colon (CI_{50} = 9.6-24.2 μ M). En esta línea los compuestos más citotóxicos fueron 5i y 5l. Por lo que posteriormente se verificó la citotoxicidad de estos compuestos en células fetales de colon. En donde mostraron una CI_{50} de 23.4 y 35.9 μ M, respectivamente. Es decir, muestran un índice de selectividad de 2.49 y 3.9, respectivamente indicando que se requiere incrementar la CI_{50} de 5i y 5l 2.5 y 3.9 veces para producir citotoxicidad en células no cancerosas [134]. En el 2020 nuevamente el grupo de Huang reportó dos series de α -aminofosfonatos conjugados con irinotecan (8a-8j y 9a-9j), un agente antitumoral que actúa como inhibidor de la Topoisomerasa I y que se utiliza como monoterapia para el tratamiento de cáncer colorrectal [103]. Se evaluó el efecto citotóxico de ambas series de compuestos en 5 líneas tumorales, así como en una línea cancerosa resistente a cisplatino. Todos los compuestos mostraron actividad citotóxica en las seis líneas cancerosas con una CI_{50} entre 0.75 y 16.8 μ M. Los compuestos fueron más activos en la línea SK-OV-3. De todos los compuestos el compuesto más activo fue el compuesto 9b. Debido a lo anterior se evaluó el efecto antitumoral de 9B en un modelo de xenotransplante en ratón inducido por células SK-OV-3 resistentes a cisplatino. Se encontró que el tratamiento a las dosis de 10 o 20 mg/kg (i.v.) una vez a la semana por tres semanas redujo en 47.7% y 56.8%, respectivamente, el volumen del tumor. Un análisis histopatológico de órganos como hígado, riñón y corazón al finalizar el tratamiento no mostró cambios histopatológicos relevantes, además de que no se observó pérdida de peso en los animales tratados con 9b. Indicando que este esquema de tratamiento parece ser seguro para los roedores[103]. En el 2021 un grupo de la India sintetizó un grupo de compuestos conjugados con imatinib un compuesto antitumoral que actúa como inhibidor de la tirosina cinasa que fue aprobado en el 2001 por la FDA para el tratamiento de diferentes tipos de cáncer en especial la leucemia mieloide crónica. Los conjugados de imatinib con aminofosfonatos fueron evaluados en 5 líneas celulares y se encontró que todos los compuestos mostraron citotoxicidad significativa con una CI_{50} entre 1.08 y 53.9 μ M. Los compuestos fueron más efectivos en la línea celular de Du145 que derivada de cáncer. Los compuestos que mostraron mayor citotoxicidad en todas las líneas celulares fueron el 4f y el 4h con una CI_{50} promedio de 1.34 y 1.62 μ M. El efecto citotóxico de estos compuestos

también se evaluó en células mononucleares de sangre periférica (leucocitos). Los compuestos produjeron citotoxicidad en leucocitos con una CI_{50} = 32.3-42.37 μ M. Al igual que en otros casos, esto significa que algunos compuestos presentan su efecto citotóxico en células cancerosas en el mismo rango de concentración en que lo hacen en leucocitos. En el caso del compuesto 4f la CI_{50} 3n PBMC fue de 34.23 mientras que en células cancerosas fue de 1.34 μ M. Lo que indica que es 25 veces más citotóxico en células cancerosas que en leucocitos[135]. Más recientemente, se sintetizó una serie de 29 α -aminofosfonatos conjugados con camptotecina. Estos compuestos mostraron citotoxicidad en contra de 6 líneas tumorales. La CI_{50} se encontró entre 0.026 y 3.33 μ M. Posteriormente se evaluó la toxicidad aguda del compuesto B07 en ratón a las dosis de 10, 50 y 100 mg/kg por vía intravenosa y no se reportaron muertes en todas las dosis evaluadas, sugiriendo que a estas dosis y después de una sola administración el compuesto es seguro. Después del periodo de observación de 14 días se sacrificaron a los animales para obtener diversos tejidos y realizar un análisis histopatológico y de parámetros bioquímicos en sangre. No se encontraron alteraciones significativas en ambos casos [136]. Sin embargo, cabe destacar que las muestras se tomaron 14 días después de la administración por lo que no se pueden descartar efectos agudos.

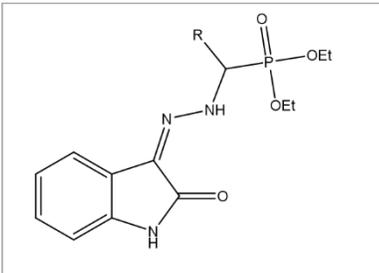
Tabla 7. Estudios de citotoxicidad y toxicidad de diferentes tipos de α -aminofosfonatos

Clave del compuesto	Estructura química	Tipo de ensayo (Conc. / Dosis)	Resultado-conclusión	Ref.												
3-5	 <table border="1" data-bbox="337 945 706 1102"> <thead> <tr> <th>Comp.</th> <th>X</th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>3</td> <td>C₈H₁₀</td> <td>CH₃</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>C₈H₁₀</td> <td>C₂H₅</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>C₅H₆O</td> <td>C₂H₅</td> </tr> </tbody> </table>	Comp.	X	R	3	C ₈ H ₁₀	CH ₃	4	C ₈ H ₁₀	C ₂ H ₅	5	C ₅ H ₆ O	C ₂ H ₅	<p>Citotoxicidad en 7 líneas cancerosas MCF-7 MDA-MB-231 HBL-100 Hepg2 HT29 647-V Hela</p> <p>0.0681-2 mg/mL T_{exp}: 24 h</p>	<p>Todos los compuestos mostraron efecto citotóxico en las 7 líneas cancerosas. MCF-7 CI₅₀=0.1, 0.45, >2 mg/mL MDA-MB-231 CI₅₀= 0.07, 0.88, >2 mg/mL Hepg2 CI₅₀= 0.11, 0.83 >2 mg/mL 647-V CI₅₀= 0.07, 0.6, >2 mg/mL; 5>3>4</p> <p>HT29 CI₅₀= 0.11, >2 mg/mL; 5>3, 4 HBL-100 CI₅₀= 0.02, 0.07, 0.73 mg/mL; 3>5>4 Hela CI₅₀= 0.12, 1.94, >2 mg/mL; 5 >4 >3.</p>	[131]
		Comp.	X	R												
		3	C ₈ H ₁₀	CH ₃												
4	C ₈ H ₁₀	C ₂ H ₅														
5	C ₅ H ₆ O	C ₂ H ₅														
<p>Citotoxicidad en fibroblastos de embrión de ratón</p>	<p>CI₅₀≈ 0.29->2 mg/mL; 5>3>4</p>															
<p>Clastogénesis en células de medula ósea de ratón (10 y 100 mg/kg, i.p)</p> <p>T_{exp}: 24 h</p>	<p>4-8% de aberraciones cromosómicas. Efecto clastogénico moderado no dependiente de la dosis. 3>4. Sin resultados de C5. Los principales tipos de alteraciones cromosómicas fueron: roturas y fragmentos: 35.6% y fusiones centrómero/centromérica: 62.17%.</p>															

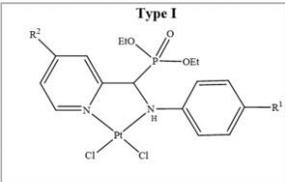
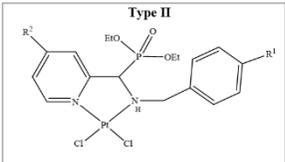
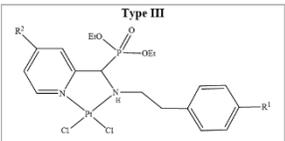
(Continuación tabla 7).

Clave del compuesto	Estructura química	Tipo de ensayo (Conc. / Dosis)	Resultado-conclusión	Ref.																																								
7a-7q	 <table border="1" data-bbox="402 636 641 982"> <thead> <tr> <th>Compounds</th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>7a</td><td>Ph</td></tr> <tr><td>7b</td><td>p-Ph-OCH₃</td></tr> <tr><td>7c</td><td>o-Ph-OCH₃</td></tr> <tr><td>7d</td><td>m-Ph-OCH₃</td></tr> <tr><td>7e</td><td>p-Ph-CH₃</td></tr> <tr><td>7f</td><td>m-Ph-CH₃</td></tr> <tr><td>7g</td><td>p-Ph-F</td></tr> <tr><td>7h</td><td>o-Ph-F</td></tr> <tr><td>7i</td><td>m-Ph-F</td></tr> <tr><td>7j</td><td>p-Ph-Cl</td></tr> <tr><td>7k</td><td>o-Ph-Cl</td></tr> <tr><td>7l</td><td>m-Ph-Cl</td></tr> <tr><td>7m</td><td>p-Ph-Br</td></tr> <tr><td>7n</td><td>o-Ph-Br</td></tr> <tr><td>7o</td><td>m-Ph-Br</td></tr> <tr><td>7p</td><td>1-Naphthalene</td></tr> <tr><td>7q</td><td>2-Naphthalene</td></tr> <tr><td>DHA</td><td></td></tr> <tr><td>5-FU</td><td></td></tr> </tbody> </table>	Compounds	R	7a	Ph	7b	p-Ph-OCH ₃	7c	o-Ph-OCH ₃	7d	m-Ph-OCH ₃	7e	p-Ph-CH ₃	7f	m-Ph-CH ₃	7g	p-Ph-F	7h	o-Ph-F	7i	m-Ph-F	7j	p-Ph-Cl	7k	o-Ph-Cl	7l	m-Ph-Cl	7m	p-Ph-Br	7n	o-Ph-Br	7o	m-Ph-Br	7p	1-Naphthalene	7q	2-Naphthalene	DHA		5-FU		Citotoxicidad en cuatro líneas tumorales: NCI-H460, HepG2, A549, SKOV3	<p>Todos los compuestos fueron citotóxicos.</p> <p>NCI-H460 CI₅₀=3.33-6.37 μM 7c>7g>7o>7d>7f,7h</p> <p>HepG2 CI₅₀= 7.7- >50 μM 7c>7g>7h>7o>7d</p> <p>A549 CI₅₀= 12.66-45.77 μM 7j>7h>7b>7c>7f</p> <p>SKOV3 CI₅₀=9.96-21.35 μM 7d>7h>7a>7g>7i</p>	[124]
Compounds	R																																											
7a	Ph																																											
7b	p-Ph-OCH ₃																																											
7c	o-Ph-OCH ₃																																											
7d	m-Ph-OCH ₃																																											
7e	p-Ph-CH ₃																																											
7f	m-Ph-CH ₃																																											
7g	p-Ph-F																																											
7h	o-Ph-F																																											
7i	m-Ph-F																																											
7j	p-Ph-Cl																																											
7k	o-Ph-Cl																																											
7l	m-Ph-Cl																																											
7m	p-Ph-Br																																											
7n	o-Ph-Br																																											
7o	m-Ph-Br																																											
7p	1-Naphthalene																																											
7q	2-Naphthalene																																											
DHA																																												
5-FU																																												
3Aa-3Ad, 3Ai	 <table border="1" data-bbox="381 1203 662 1373"> <thead> <tr> <th>Comp.</th> <th>R¹</th> <th>R²</th> </tr> </thead> <tbody> <tr><td>A</td><td></td><td>CH₃</td></tr> <tr><td>Aa</td><td>CH₂-Ph-</td><td></td></tr> <tr><td>Ab</td><td>Ph-</td><td></td></tr> <tr><td>Ac</td><td>p-CH₃-C₆H₄</td><td></td></tr> <tr><td>Ad</td><td>p-OCH₃-C₆H₄</td><td></td></tr> <tr><td>Ai</td><td>m-CH₃-C₆H₄</td><td></td></tr> </tbody> </table>	Comp.	R ¹	R ²	A		CH ₃	Aa	CH ₂ -Ph-		Ab	Ph-		Ac	p-CH ₃ -C ₆ H ₄		Ad	p-OCH ₃ -C ₆ H ₄		Ai	m-CH ₃ -C ₆ H ₄		Citotoxicidad en dos líneas celulares: HT29, HCT116	<p>Todos muestran actividad citotóxica en líneas cancerosas</p> <p>HT29 CI₅₀= 12.8-105.8 μM 3Ac>3Ad>3Aa>3Ai>3Ab</p> <p>HCT CI₅₀: 15.9-70.8 μM 3Ac>3Ad=3Ai>3Aa>3Ab</p>	[132]																			
Comp.	R ¹	R ²																																										
A		CH ₃																																										
Aa	CH ₂ -Ph-																																											
Ab	Ph-																																											
Ac	p-CH ₃ -C ₆ H ₄																																											
Ad	p-OCH ₃ -C ₆ H ₄																																											
Ai	m-CH ₃ -C ₆ H ₄																																											
		Citotoxicidad en linfocitos	<p>Citotoxicidad en linfocitos: CI₅₀=17.5-334.2 μM 3Ac>3Ai>3Aa>3Ad>3Ab</p>																																									

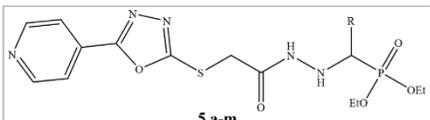
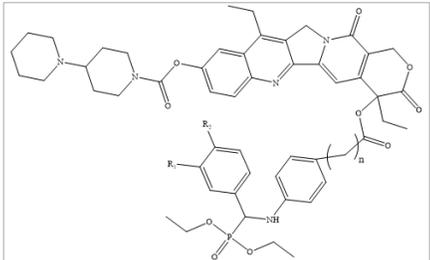
(Continuación tabla 7).

Clave del compuesto	Estructura química	Tipo de ensayo (Conc. / Dosis)	Resultado-conclusión	Ref.																																
4a-n	 <table border="1" data-bbox="332 951 711 1157"> <thead> <tr> <th>Comp.</th> <th>R</th> <th>Comp.</th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>4a</td> <td>C₆H₆</td> <td>4h</td> <td>C₈H₁₀O₂</td> </tr> <tr> <td>4b</td> <td>C₆H₅Cl</td> <td>4i</td> <td>C₄H₃S</td> </tr> <tr> <td>4c</td> <td>C₆H₅F</td> <td>4j</td> <td>C₄H₄O</td> </tr> <tr> <td>4d</td> <td>C₇H₈O</td> <td>4k</td> <td>C₆H₅O</td> </tr> <tr> <td>4e</td> <td>C₈H₉O₂</td> <td>4l</td> <td>C₇H₇O</td> </tr> <tr> <td>4f</td> <td>C₆H₅O</td> <td>4m</td> <td>C₆H₄NO₂</td> </tr> <tr> <td>4g</td> <td>C₇H₈O₂</td> <td>4n</td> <td>C₄H₄NS</td> </tr> </tbody> </table>	Comp.	R	Comp.	R	4a	C ₆ H ₆	4h	C ₈ H ₁₀ O ₂	4b	C ₆ H ₅ Cl	4i	C ₄ H ₃ S	4c	C ₆ H ₅ F	4j	C ₄ H ₄ O	4d	C ₇ H ₈ O	4k	C ₆ H ₅ O	4e	C ₈ H ₉ O ₂	4l	C ₇ H ₇ O	4f	C ₆ H ₅ O	4m	C ₆ H ₄ NO ₂	4g	C ₇ H ₈ O ₂	4n	C ₄ H ₄ NS	<p>Citotoxicidad en seis líneas cancerosas humanas MCF-7, IMR-32, SK-MEL-2, MG-63, HT-29 y Hep-G2</p> <p>10 µL</p> <p>T_{exp}:48 h</p>	<p>SK-MEL-2 GI₅₀=24-93.9 µM (todos los compuestos fueron activos) 4g>4n>4b>4m>4f=4h</p> <p>MG-63 GI₅₀=<0.1µM (todos los compuestos fueron activos)</p> <p>HT-29 GI₅₀= <0.1-56.9 µM (Todos los compuestos fueron activos) 4d-f=4i-j=4l-m</p> <p>Hep-G2 GI₅₀= <0.1-56.9 µM (Todos los compuestos fueron activos) 4i=4l>4k>4e=4f>4m</p> <p>MCF-7 GI₅₀=58.2-78.4 µM (5 compuestos activos) 4n>4b>4h>4m>4l</p> <p>IMR-32 GI₅₀=<0.1-89.8 µM (5 compuestos activos) 4f>4k>4m>4n>4l</p>	[133]
	Comp.	R	Comp.	R																																
	4a	C ₆ H ₆	4h	C ₈ H ₁₀ O ₂																																
4b	C ₆ H ₅ Cl	4i	C ₄ H ₃ S																																	
4c	C ₆ H ₅ F	4j	C ₄ H ₄ O																																	
4d	C ₇ H ₈ O	4k	C ₆ H ₅ O																																	
4e	C ₈ H ₉ O ₂	4l	C ₇ H ₇ O																																	
4f	C ₆ H ₅ O	4m	C ₆ H ₄ NO ₂																																	
4g	C ₇ H ₈ O ₂	4n	C ₄ H ₄ NS																																	
<p>Citotoxicidad en fibroblastos murinos (NIH3T3)</p>	<p>Los compuestos no fueron citotóxicos GI₅₀=>250 µM</p>																																			
<p>Toxicidad aguda en ratón método 425 de la OECD Compuestos 4b y 4h En realidad, no usaron ese método.</p>	<p>DL₅₀ oral >2000 mg/kg</p>																																			

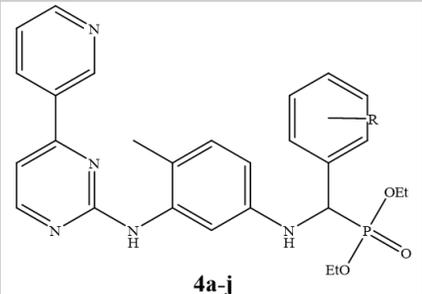
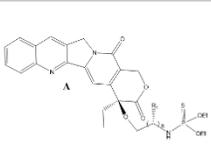
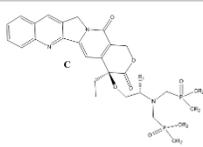
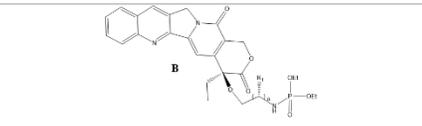
(Continuación tabla 7).

Clave del compuesto	Estructura química	Tipo de ensayo (Conc. / Dosis)	Resultado-conclusión	Ref.																	
Pt-1, 1-11	<p style="text-align: center;">Type I</p>  <table border="1" data-bbox="380 646 665 779"> <thead> <tr> <th>Tipo</th> <th>Pt</th> <th>R¹</th> <th>R²</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">I</td> <td>Pt-1</td> <td>Cl</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>Cl</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>OMe</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>OMe</td> <td>Cl</td> </tr> </tbody> </table>	Tipo	Pt	R ¹	R ²	I	Pt-1	Cl	Cl	1	Cl	H	2	OMe	H	3	OMe	Cl	<p>Citotoxicidad en 4 líneas celulares cancerosas</p> <p>T-24 MG-63 HepG-2 SK-OV-3 T_{exp}:48 h</p>	<p>Todos muestran actividad citotóxica en líneas cancerosas: T-24 CI₅₀ = 0.46-35.2 Mm Pt-1>1>4>8>11</p> <p>MG-63 CI₅₀=0.25-68.5 Mm Pt-1>1>4>5>7=8</p> <p>HepG-2 CI₅₀= 0.73-78.5 Mm Pt-1>1>8>4>3</p> <p>SK-OV-3 CI₅₀= 1.2-88.7 Mm Pt-1>1>8>11>4</p>	[127]
	Tipo	Pt	R ¹	R ²																	
	I	Pt-1	Cl	Cl																	
		1	Cl	H																	
2		OMe	H																		
3		OMe	Cl																		
<p style="text-align: center;">Type II</p>  <table border="1" data-bbox="380 972 665 1098"> <thead> <tr> <th>Tipo</th> <th>Pt</th> <th>R¹</th> <th>R²</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">II</td> <td>4</td> <td>Cl</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>Cl</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>6</td> <td>OMe</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>7</td> <td>OMe</td> <td>Cl</td> </tr> </tbody> </table>	Tipo	Pt	R ¹	R ²	II	4	Cl	Cl	5	Cl	H	6	OMe	H	7	OMe	Cl	<p>Citotoxicidad en células hepáticas humanas (HL-7702)</p>	<p>HL-7702 CI₅₀= 24.8- >100 Mm Pt-1 >4>8>5>1 Pt-1 fue el más potente y el más seguro.</p>		
Tipo	Pt	R ¹	R ²																		
II	4	Cl	Cl																		
	5	Cl	H																		
	6	OMe	H																		
	7	OMe	Cl																		
<p style="text-align: center;">Type III</p>  <table border="1" data-bbox="380 1270 665 1396"> <thead> <tr> <th>Tipo</th> <th>Pt</th> <th>R¹</th> <th>R²</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">III</td> <td>8</td> <td>Cl</td> <td>Cl</td> </tr> <tr> <td>9</td> <td>Cl</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>10</td> <td>OMe</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>11</td> <td>OMe</td> <td>Cl</td> </tr> </tbody> </table>	Tipo	Pt	R ¹	R ²	III	8	Cl	Cl	9	Cl	H	10	OMe	H	11	OMe	Cl	<p>Efecto antitumoral in vivo (ratón). Modelo de xenotrasplante inducido por inyección de células MB-49 derivadas de carcinoma urotelial. 9.8 mg/kg, i.v./c2 días por 18 días</p>	<p>Inhibición del 59.6% del crecimiento del tumor.</p> <p>No se observaron muertes ni pérdida de peso durante el experimento.</p>		
Tipo	Pt	R ¹	R ²																		
III	8	Cl	Cl																		
	9	Cl	H																		
	10	OMe	H																		
	11	OMe	Cl																		
	<p>Toxicidad aguda en ratón de Pt-1 10, 20 y 30 μmol/kg (20 mg/kg, i.v., 1 día por 12 días). Periodo de observación.</p>	<p>No se observó mortalidad o pérdida de peso en ninguna de las dosis evaluadas.</p>																			

(Continuación tabla 7).

Clave del compuesto	Estructura química	Tipo de ensayo (Conc. / Dosis)	Resultado-conclusión	Ref.																																	
5 ^a -m	 <p style="text-align: center;">5 a-m</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Comp.</th> <th>R</th> <th>Comp.</th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>a</td> <td>Fenil</td> <td>g</td> <td>4-OH-C₆H₄</td> </tr> <tr> <td>b</td> <td>4-Me-C₆H₄</td> <td>h</td> <td>3,4-OH-C₆H₄</td> </tr> <tr> <td>c</td> <td>2-thienyl</td> <td>i</td> <td>2-naftil</td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>4-CN-C₆H₄</td> <td>j</td> <td>4-NO₂-C₆H₄</td> </tr> <tr> <td>e</td> <td>4-Br- C₆H₄</td> <td>k</td> <td>4-F-C₆H₄</td> </tr> <tr> <td>f</td> <td>3-OMe-C₆H₄</td> <td>l</td> <td>2-Cl-C₆H₄</td> </tr> <tr> <td></td> <td></td> <td>m</td> <td>2,5-OMe-C₆H₃</td> </tr> </tbody> </table>	Comp.	R	Comp.	R	a	Fenil	g	4-OH-C ₆ H ₄	b	4-Me-C ₆ H ₄	h	3,4-OH-C ₆ H ₄	c	2-thienyl	i	2-naftil	d	4-CN-C ₆ H ₄	j	4-NO ₂ -C ₆ H ₄	e	4-Br- C ₆ H ₄	k	4-F-C ₆ H ₄	f	3-OMe-C ₆ H ₄	l	2-Cl-C ₆ H ₄			m	2,5-OMe-C ₆ H ₃	<p>Citotoxicidad en tres líneas celulares cancerosas: HCT116, HepG2 y MCF7</p> <p>Doxorrubicina (CI₅₀= 9.4, 26.9, 10.4 μM)</p>	<p>Todos los compuestos mostraron efectos citotóxicos de forma dependiente de la concentración</p> <p>HCT116 CI₅₀= 9.6-24.2 μM 5l, 5i>5d>5g>5j</p> <p>MCF7 CI₅₀= 13.6-53.9 μM 5d, 5c>5g>5j> 5l>5b</p> <p>HepG2 CI₅₀= 41.7-99.1 μM 5d>5c>5g, 5f>5i, 5j</p>	[134]	
	Comp.	R	Comp.	R																																	
a	Fenil	g	4-OH-C ₆ H ₄																																		
b	4-Me-C ₆ H ₄	h	3,4-OH-C ₆ H ₄																																		
c	2-thienyl	i	2-naftil																																		
d	4-CN-C ₆ H ₄	j	4-NO ₂ -C ₆ H ₄																																		
e	4-Br- C ₆ H ₄	k	4-F-C ₆ H ₄																																		
f	3-OMe-C ₆ H ₄	l	2-Cl-C ₆ H ₄																																		
		m	2,5-OMe-C ₆ H ₃																																		
	<p>Citotoxicidad de los compuestos 5i y 5l en células fetales de colon humano.</p>	<p>FHC 5i CI₅₀=23.4 μM 5l CI₅₀=35.9 μM Índice de selectividad 2.49 y 3.9, respectivamente.</p>																																			
8 ^a -8j, 9a-9 ^a	 <p style="text-align: center;">8a-j n=1 9a-j n=3</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Comp.</th> <th>R1</th> <th>R2</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>a</td> <td>H</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>b</td> <td>H</td> <td>-F</td> </tr> <tr> <td>c</td> <td>H</td> <td>-Cl</td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>H</td> <td>-Br</td> </tr> <tr> <td>e</td> <td>H</td> <td>-OCH₃</td> </tr> <tr> <td>f</td> <td>H</td> <td>-CH₃</td> </tr> <tr> <td>g</td> <td>-F</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>h</td> <td>-Cl</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>i</td> <td>-Br</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>j</td> <td>-OCH₃</td> <td>H</td> </tr> </tbody> </table>	Comp.	R1	R2	a	H	H	b	H	-F	c	H	-Cl	d	H	-Br	e	H	-OCH ₃	f	H	-CH ₃	g	-F	H	h	-Cl	H	i	-Br	H	j	-OCH ₃	H	<p>Citotoxicidad en 6 líneas celulares cancerosas: A549, MCF-7, MG-63, U2S2, SK-OV-3, SK-OV-3/CDDP</p> <p>T_{exp}: no especificado</p> <p>Stock: 2 mM Ir=16.53 μM CDDP8.35 μM</p>	<p>Todos los compuestos mostraron actividad citotóxica en las seis líneas celulares. 9b fue el más activo.</p> <p>A549 CI₅₀= 3.05-15.2 μM 9b>9g>9e>8e, 8b,8g>9c MCF-7 CI₅₀= 2.2-16.8 μM 9b>9e>9g>8g>9c, 8b, 8f MG-63 CI₅₀= 3.23-10.36 μM 9b>9e>8f>8b>8gc U2S2 CI₅₀= 1.75-9.74 μM 9b>9e>8b>9f>9h SK-OV-3 CI₅₀= 0.92-13.82 μM 9b>9e>9f>9g>9c SK-OV-3/CDDP CI₅₀= 1.39-15.82 μM 9b>9e>8b>9f>9g</p>	[103]
	Comp.	R1	R2																																		
	a	H	H																																		
	b	H	-F																																		
	c	H	-Cl																																		
	d	H	-Br																																		
	e	H	-OCH ₃																																		
	f	H	-CH ₃																																		
	g	-F	H																																		
	h	-Cl	H																																		
i	-Br	H																																			
j	-OCH ₃	H																																			
	<p>Efecto antitumoral <i>in vivo</i> de 9b en modelo de xenotrasplante de SK-OV-3/CDDP 10 o 20 mg/kg, i.v.; 1 vez c/semana x 3 semanas.</p>	<p>9b redujo en un 47.7% y 56.8% el volumen del tumor a las dosis de 10 y 20 mg/kg, respectivamente.</p>																																			
	<p>Análisis histopatológico de riñones, hígado, corazón, pulmón etc. De los animales con tumor</p>	<p>Menor pérdida de peso en los ratones tratados con 9b en comparación con irinotecan. No se observaron cambios histopatológicos.</p>																																			

(Continuación Tabla 7).

Clave del compuesto	Estructura química	Tipo de ensayo (Conc. / Dosis)	Resultado-conclusión	Ref.																																																					
4 ^a -4j 4 ^a -4i	 <p style="text-align: center;">4a-j</p> <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Comp.</th> <th>R</th> <th>Comp.</th> <th>R</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>a</td> <td>4-N,N-dimetil</td> <td>f</td> <td>4-Br</td> </tr> <tr> <td>b</td> <td>4-N,N-dietil</td> <td>g</td> <td>4-NO₂</td> </tr> <tr> <td>c</td> <td>3,4,5-trimetoxi</td> <td>h</td> <td>3-NO₂</td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>4-OH</td> <td>i</td> <td>4-Cl,3-NO₂</td> </tr> <tr> <td>e</td> <td>4-Cl</td> <td>j</td> <td>1-Naftil</td> </tr> </tbody> </table>	Comp.	R	Comp.	R	a	4-N,N-dimetil	f	4-Br	b	4-N,N-dietil	g	4-NO ₂	c	3,4,5-trimetoxi	h	3-NO ₂	d	4-OH	i	4-Cl,3-NO ₂	e	4-Cl	j	1-Naftil	<p>Citotoxicidad en 5 líneas tumorales: K-562, U-973, HL-60, MCF-7 DU145</p> <p>0.1–100 mg/mL</p> <p>T_{exp}:24 h</p>	<p>Todos los compuestos mostraron actividad citotóxica en las cinco líneas. Los compuestos con mayor actividad fueron aquellos con sustituyentes nitro y alógenos.</p> <p>K-562 CI₅₀= 1.2-28.9 μM 4f>4h>4g>4i>4j U-973 CI₅₀= 1.3-16.4 μM 4f>4h>4g>4i>4j HL-60 CI₅₀= 1.08-20.5 μM 4f>4h>4g>4i>4j MCF7 CI₅₀= 13.6-53.9 μM 4f>4h>4g>4i>4j DU145 CI₅₀= 1.08-14.15 μM 4f>4h>4g>4i>4j</p>	[135]																													
	Comp.	R	Comp.	R																																																					
a	4-N,N-dimetil	f	4-Br																																																						
b	4-N,N-dietil	g	4-NO ₂																																																						
c	3,4,5-trimetoxi	h	3-NO ₂																																																						
d	4-OH	i	4-Cl,3-NO ₂																																																						
e	4-Cl	j	1-Naftil																																																						
	<p>Citotoxicidad en PBMC 4f-4j</p>	<p>PBMC CI₅₀= 32.3-42.37 μM</p>																																																							
A01-08, B01-16, y C01-05	  <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Comp.</th> <th>R₁</th> <th>Comp.</th> <th>R₁</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A01</td> <td>H</td> <td>C01</td> <td>(CH₃)₂CH</td> </tr> <tr> <td>A02</td> <td>Me</td> <td>C02</td> <td>(CH₃)₂CHCH₂</td> </tr> <tr> <td>A03</td> <td>(CH₃)₂CH</td> <td>C03</td> <td>CH₃CH₂(CH₃)CH</td> </tr> <tr> <td>A04</td> <td>(CH₃)₂CHCH₂</td> <td>C04</td> <td>PhCH₂</td> </tr> <tr> <td>A05</td> <td>CH₃CH₂(CH₃)CH</td> <td>C05</td> <td>H</td> </tr> <tr> <td>A06</td> <td>PhCH₂</td> <td>A01-A06 n=1</td> <td>C01-C04 n=1</td> </tr> <tr> <td>A07</td> <td>H</td> <td>A07 n=2</td> <td>C05 n=3</td> </tr> <tr> <td>A08</td> <td>H</td> <td>A08 n=2</td> <td></td> </tr> </tbody> </table>	Comp.	R ₁	Comp.	R ₁	A01	H	C01	(CH ₃) ₂ CH	A02	Me	C02	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	A03	(CH ₃) ₂ CH	C03	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	A04	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	C04	PhCH ₂	A05	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	C05	H	A06	PhCH ₂	A01-A06 n=1	C01-C04 n=1	A07	H	A07 n=2	C05 n=3	A08	H	A08 n=2		<p>Citotoxicidad en 6 líneas celulares cancerosas</p> <p>0.001 a 10 μM</p>	<p>Hep3B CI₅₀ 0.026-6.65 μM C03>C02>C01>B05>A03 MCF-7 CI₅₀0.121-1.68 μM C03>C01>C02>B10=B11>B05</p>	[136]																	
	Comp.	R ₁	Comp.	R ₁																																																					
	A01	H	C01	(CH ₃) ₂ CH																																																					
A02	Me	C02	(CH ₃) ₂ CHCH ₂																																																						
A03	(CH ₃) ₂ CH	C03	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH																																																						
A04	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	C04	PhCH ₂																																																						
A05	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	C05	H																																																						
A06	PhCH ₂	A01-A06 n=1	C01-C04 n=1																																																						
A07	H	A07 n=2	C05 n=3																																																						
A08	H	A08 n=2																																																							
	 <table border="1" style="width: 100%; border-collapse: collapse;"> <thead> <tr> <th>Comp.</th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> <th>Comp.</th> <th>R₁</th> <th>R₂</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>B01</td> <td>H</td> <td>Me</td> <td>B09</td> <td>(CH₃)₂CH</td> <td>Et</td> </tr> <tr> <td>B02</td> <td>Me</td> <td>Me</td> <td>B10</td> <td>(CH₃)₂CHCH₂</td> <td>Et</td> </tr> <tr> <td>B03</td> <td>(CH₃)₂CH</td> <td>Me</td> <td>B11</td> <td>CH₃CH₂(CH₃)CH</td> <td>Et</td> </tr> <tr> <td>B04</td> <td>(CH₃)₂CHCH₂</td> <td>Me</td> <td>B12</td> <td>PhCH₂</td> <td>Et</td> </tr> <tr> <td>B05</td> <td>CH₃CH₂(CH₃)CH</td> <td>Me</td> <td>B13</td> <td>H</td> <td>Ph</td> </tr> <tr> <td>B06</td> <td>PhCH₂</td> <td>Me</td> <td>B14</td> <td>Me</td> <td>Ph</td> </tr> <tr> <td>B07</td> <td>H</td> <td>Me</td> <td>B15</td> <td>CH₃CH₂(CH₃)CH</td> <td>Ph</td> </tr> <tr> <td>B08</td> <td>Me</td> <td>Me</td> <td>B16</td> <td>PhCH₂</td> <td>Ph</td> </tr> </tbody> </table>	Comp.	R ₁	R ₂	Comp.	R ₁	R ₂	B01	H	Me	B09	(CH ₃) ₂ CH	Et	B02	Me	Me	B10	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	Et	B03	(CH ₃) ₂ CH	Me	B11	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	Et	B04	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	Me	B12	PhCH ₂	Et	B05	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	Me	B13	H	Ph	B06	PhCH ₂	Me	B14	Me	Ph	B07	H	Me	B15	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	Ph	B08	Me	Me	B16	PhCH ₂	Ph	<p>Toxicidad aguda en ratón FVB/N del compuesto B07</p> <p>10, 50, o 100 mg/kg. i.v</p>	<p>No se registraron muertes</p>
Comp.	R ₁	R ₂	Comp.	R ₁	R ₂																																																				
B01	H	Me	B09	(CH ₃) ₂ CH	Et																																																				
B02	Me	Me	B10	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	Et																																																				
B03	(CH ₃) ₂ CH	Me	B11	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	Et																																																				
B04	(CH ₃) ₂ CHCH ₂	Me	B12	PhCH ₂	Et																																																				
B05	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	Me	B13	H	Ph																																																				
B06	PhCH ₂	Me	B14	Me	Ph																																																				
B07	H	Me	B15	CH ₃ CH ₂ (CH ₃)CH	Ph																																																				
B08	Me	Me	B16	PhCH ₂	Ph																																																				
	<p>Análisis histológico y de parámetros bioquímicos en sangre 14 días después de la administración i.v.</p>	<p>No se observaron alteraciones en los parámetros bioquímicos medidos o en el análisis histológico del hígado 15 días después de la administración.</p>																																																							

(Continuación tabla 7).

Clave del compuesto	Estructura química	Tipo de ensayo (Conc. / Dosis)	Resultado-conclusión	Ref.																								
4aa-4ah, 4ab-4ab	<p>N-aryl-α-aminofosfonatos</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>Comp.</th> <th>R¹</th> <th colspan="2">R²</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td rowspan="4">4a</td> <td rowspan="4">H</td> <td>a</td> <td>C₈H₇F₃O</td> </tr> <tr> <td>b</td> <td>C₈H₇N</td> </tr> <tr> <td>c</td> <td>C₈H₉FO</td> </tr> <tr> <td>d</td> <td>C₈H₆ClF₃</td> </tr> <tr> <td rowspan="4">4b</td> <td rowspan="4">Cl</td> <td>e</td> <td>C₇H₆ClF</td> </tr> <tr> <td>f</td> <td>C₉H₁₀O₂</td> </tr> <tr> <td>g</td> <td>C₆H₈O</td> </tr> <tr> <td>h</td> <td>C₆H₈S</td> </tr> </tbody> </table>	Comp.	R ¹	R ²		4a	H	a	C ₈ H ₇ F ₃ O	b	C ₈ H ₇ N	c	C ₈ H ₉ FO	d	C ₈ H ₆ ClF ₃	4b	Cl	e	C ₇ H ₆ ClF	f	C ₉ H ₁₀ O ₂	g	C ₆ H ₈ O	h	C ₆ H ₈ S	Inhibición de la Acetilcolinesterasa	Todos los compuestos inhiben a la AChE CI ₅₀ = 0.17-3.018 μ M	[137]
		Comp.	R ¹	R ²																								
		4a	H	a	C ₈ H ₇ F ₃ O																							
				b	C ₈ H ₇ N																							
c	C ₈ H ₉ FO																											
d	C ₈ H ₆ ClF ₃																											
4b	Cl	e	C ₇ H ₆ ClF																									
		f	C ₉ H ₁₀ O ₂																									
		g	C ₆ H ₈ O																									
		h	C ₆ H ₈ S																									
Citotoxicidad en células HEK 293 (neuronas inmaduras No dice	Los compuestos no son citotóxicos CI ₅₀ = 59.6-78.4 μ M y >80 μ M																											
Efecto de los Compuestos 4aa, 4ae, 4ah, 4bd, 4be y 4bh en la degradación de ADN (20 μ M/4 μ L)	Solo el compuesto 4aa indujo fragmentación de ADN.																											
Efecto de los compuestos 4ah y 4bh en la viabilidad de células de N2a (20 y 40 μ M)	Los compuestos no tuvieron efectos negativos en la viabilidad celular.																											

2.1.4. Toxicidad de los α -aminofosfonatos de interés

En un estudio previo los α -aminofosfonatos 1 a-e, 2a-c produjeron un efecto antiinflamatorio y analgésico importante, lo que los hace buenos candidatos para seguirse estudiando como potenciales nuevos fármacos para el tratamiento de enfermedades que cursan con dolor e inflamación. Sin embargo, para ello es necesario caracterizar también su perfil toxicológico. Esta información en conjunto permitirá realizar un análisis riesgo beneficio para seleccionar aquellos con mayor potencial terapéutico o bien para hacer modificaciones a aquellos que resulten eficaces pero tóxicos.

Debido a esto en un estudio previo realizado en nuestro laboratorio se determinó la toxicidad oral aguda de los compuestos 1a-e con la finalidad de determinar la DL₅₀, así como los adversos que ocurren inmediatamente después de una administración única. Para este fin se utilizó el método 425 de la OECD denominado método “up and down”. Se encontró que todos los compuestos evaluados mostraron tener una DL₅₀ oral mayor a 2000 mg/kg. De

acuerdo con los criterios de clasificación de la OECD para sustancias tóxicas, este resultado permite categorizar a estos compuestos como inofensivo [5]. Sin embargo, es importante mencionar que durante las primeras 4 después de la administración se observaron varios efectos adversos no letales. Por ejemplo, en todos los ratones tratados con cualquiera de los α -aminofosfonatos a la dosis de 200 mg/kg se observó estrés, caracterizado por piloerección (levantamiento del pelo sobre la piel), aislamiento (separación del grupo social) y una respuesta de alarma exagerada. Además, los compuestos 1a y 1f ocasionaron parálisis flácida. Esta consiste en una pérdida completa de la coordinación motora, sin perder la respuesta a estímulos y sin caer en la inconciencia; este efecto tuvo una duración de aproximadamente una hora post administración. Después de este tiempo los animales recuperaron completamente la movilidad sin otros síntomas aparentes de toxicidad [6]. Además, es importante mencionar, que durante los estudios para evaluar el efecto antinociceptivo de los compuestos, en donde estos fueron administrados por vía intraperitoneal y a dosis menores que las utilizadas en el estudio de toxicidad, se observaron cambios conductuales indicativos de efectos tóxicos. Los cambios conductuales más frecuentemente observados fueron sedación, pérdida de la coordinación motora, erguimiento de la cola y convulsiones tónico-clónicas. Estos cambios se observaron principalmente con las dosis de 300 y 600 mg/kg de los compuestos 1f y 1e [6]. Con base en lo antes expuesto resalta la importancia de determinar la toxicidad aguda de estos compuestos por otra vía de administración, así como identificar los cambios conductuales más frecuentes que pudieran ser indicativos de toxicidad. Todo esto con la finalidad de seleccionar aquellos compuestos más seguros para seguirse estudiando o bien identificar otros efectos farmacológicos de interés.

3. JUSTIFICACIÓN

El diseño y desarrollo de nuevos medicamentos es un proceso que garantiza la eficacia, tolerabilidad y seguridad de una NEQ antes de ser aprobada para el tratamiento de una patología determinada. La ley exige que los nuevos medicamentos se evalúen para garantizar que su administración es segura en humanos, y es en la etapa preclínica de este proceso en donde se realizan las primeras aproximaciones experimentales encaminadas a identificar su letalidad y efectos adversos. Las pruebas de toxicidad aguda son la primera aproximación para caracterizar el perfil toxicológico de una sustancia y su objetivo principal es determinar la DL_{50} debido a que este parámetro permite categorizar que tan tóxicos son los compuestos.

Los α -aminofosfonatos son compuestos bioactivos con potencial de convertirse en nuevos fármacos y por lo tanto son de interés en medicina. Sin embargo, se conoce poco acerca de su toxicidad. Esto se debe a que inicialmente se asumió que eran inocuos por su analogía estructural con los aminoácidos naturales. Sin embargo, existen estudios *in vitro* que muestran que diferentes tipos de α -aminofosfonatos producen hemólisis, así como citotoxicidad tanto en líneas tumorales, como en células no cancerosas. Adicionalmente, en algunos estudios se evaluó la toxicidad aguda *in vivo* de α -aminofosfonatos con potencial antitumoral por lo que su toxicidad aguda fue evaluado a dosis bajas (1-10 mg/kg, i.v.) En estas condiciones, se encontraron diversos valores de DL_{50} que categorizan a los diferentes compuestos como muy tóxicos o inocuos. Esto sugiere que no se puede generalizar y es necesario estudiar la toxicidad de los diferentes tipos de α -aminofosfonatos.

En nuestro grupo de investigación estamos trabajando en el diseño, síntesis y evaluación de α -aminofosfonatos con potencial anti-artrítico. Derivado de esto inicialmente se sintetizaron 10 α -aminoserinatos (1a-f, 2a-c) que mostraron actividad antiinflamatoria *in vivo*, mostrando que tienen potencial para convertirse en nuevos fármacos antiinflamatorios. Sin embargo, es necesario estudiar su perfil toxicológico. En este sentido, se realizó un estudio preliminar de toxicidad aguda en donde se encontró que los compuestos 1a-f tienen una DL_{50} por vía oral mayor a 2000 mg/kg clasificándolos como inofensivos. También se observó que en las primeras 4 h post-administración producen efectos adversos como piloerección, aislamiento, pérdida de la coordinación motora, respuesta exagerada de alarma y sedación. Adicionalmente, en un estudio en donde se evaluó su actividad analgésica, se observaron los

mismos efectos adversos, además de erguimiento de la cola, convulsiones y sedación tras la administración intraperitoneal de una dosis de 600 mg/kg. Estos resultados en conjunto muestran que es necesario estudiar con detalle el perfil toxicológico de estos compuestos. Con base en lo anterior en el presente proyecto se estudió la toxicidad aguda por vía intraperitoneal de los compuestos 1a, 1e y 1f. Los resultados obtenidos permitirán comparar la toxicidad de los compuestos por distintas vías de administración para seleccionar aquellos que se continuarán estudiando en etapas posteriores.

Pregunta de investigación.

¿Existirá diferencia entre la DL_{50} de los α -aminofosfonatos 1A, 1E Y 1F al ser administrados por vía oral, y su DL_{50} al ser administrados por vía intraperitoneal en ratones hembra CD1?

4. HIPÓTESIS

La DL_{50} de los α -aminofosfonato (1A, 1E Y 1F) al ser administrados por vía intraperitoneal será menor que su DL_{50} al ser administrados por vía oral, en ratones hembra CD1.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo general

Comparar la DL_{50} de los α -aminofosfonatos 1A, 1E Y 1F tras su administración aguda por vía intraperitoneal, con su DL_{50} tras su administración aguda por vía oral, en ratones hembra CD1.

5.2. Objetivos específicos

1. Determinar a través del método de “up and down” 425 de la OECD, la dosis letal 50 de los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F tras su administración aguda por vía intraperitoneal, en ratones hembra CD1.
2. Identificar los principales signos de toxicidad aguda tras la administración vía intraperitoneal de los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F, en ratones hembra CD1.
3. Contrastar la ganancia del peso corporal tras la administración aguda por vía intraperitoneal de los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F, con la ganancia del peso corporal tras la administración aguda por vía intraperitoneal del vehículo en ratones hembra CD1.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

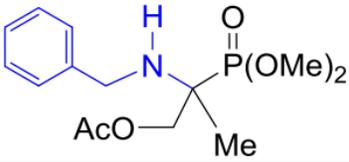
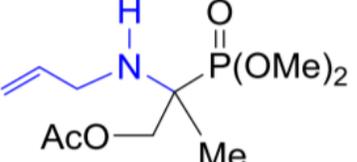
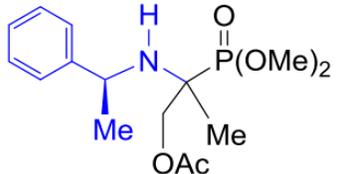
6.1. Animales

Los experimentos se realizaron en ratones hembra de la cepa CD1 de 8 semanas de edad (25-30 g al inicio del experimento), no embarazadas y núlparas, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UAEM. Los animales se mantuvieron en un ciclo de 12/12 horas de luz/oscuridad a una temperatura de 24°C, con agua y alimento *ad libitum* durante el estudio. Todos los protocolos experimentales se realizaron de acuerdo con los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 para el cuidado y manejo de animales de laboratorio [138]. El protocolo fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la UAEM.

6.2. Compuestos

En el presente trabajo se determinó la toxicidad aguda de los α -aminofosfonatos 1A, 1E, y 1F, tres nuevos compuestos derivados del dimetil 2,4-dimetil-5H-1,3-oxazol-4-ilfosfonato. Estos compuestos fueron, sintetizados caracterizados químicamente (Tabla 3) y proporcionados para este estudio por el grupo del Dr. José Mario Ordoñez Palacios del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM. Para realizar la administración intraperitoneal, los compuestos se disolvieron en una solución de carboximetilcelulosa al 0.5% (CMC 0.5%) en solución salina a un volumen constante de 0.1 MI por cada 10 g de peso corporal. La CMC 0.5% se utilizó como control negativo. Todas las soluciones de los compuestos se prepararon el día del experimento.

Tabla 8. Estructura y nombre químico de los α -aminofosfonatos estudiados.

Compuesto	Estructura química	Nombre químico
1A		<i>2-(Benzilamino)-2-(dimetoxifosforil)propil acetato</i>
1E		<i>2-(Alilamino)-2-(dimetoxifosforil)propil acetato</i>
1F		<i>2-(Dimetoxifosforil)-2-(((S)-1-feniletil)amino)propil acetato</i>

6.3. Prueba de toxicidad aguda 425 de la OECD para determinar la DL₅₀

Para determinar la toxicidad aguda de los α -aminofosfonatos 1A, 1E, y 1F se realizó la prueba 425 de la OECD. Esta es la prueba más recomendada por las agencias regulatorias debido a que para determinar la DL₅₀ emplea un número de animales experimentales muy reducido en comparación con otras pruebas. La prueba se divide en dos etapas: la prueba límite y la prueba principal, las cuales se explican más adelante.

Para realizar cualquiera de las dos etapas los animales de experimentación se colocaron individualmente en cajas de acrílico con agua y alimento *ad libitum*, para permitir un periodo de aclimatación de al menos 5 días al nuevo ambiente. El día del experimento, los ratones se mantuvieron en ayuno diurno de 4 horas previo a la administración del compuesto. Transcurrido el periodo de ayuno los ratones fueron pesados para determinar el volumen a administrar de la dosis del compuesto correspondiente e inmediatamente se realizó la administración por vía intraperitoneal. Después de la administración los animales fueron observados individualmente por un periodo de 2 horas, y periódicamente durante las primeras 48 horas, con la finalidad de identificar cambios conductuales indicativos de efectos adversos agudos o bien la muerte del animal. Además, el peso corporal del ratón se registró en los mismos puntos de tiempo. Los animales que sobrevivieron más de 48 horas fueron

monitoreados durante 12 días más. Los animales que permanecieron vivos 14 días después de la administración fueron sacrificados y se realizó una autopsia con la finalidad de identificar cambios macroscópicos gruesos en los órganos de los animales.

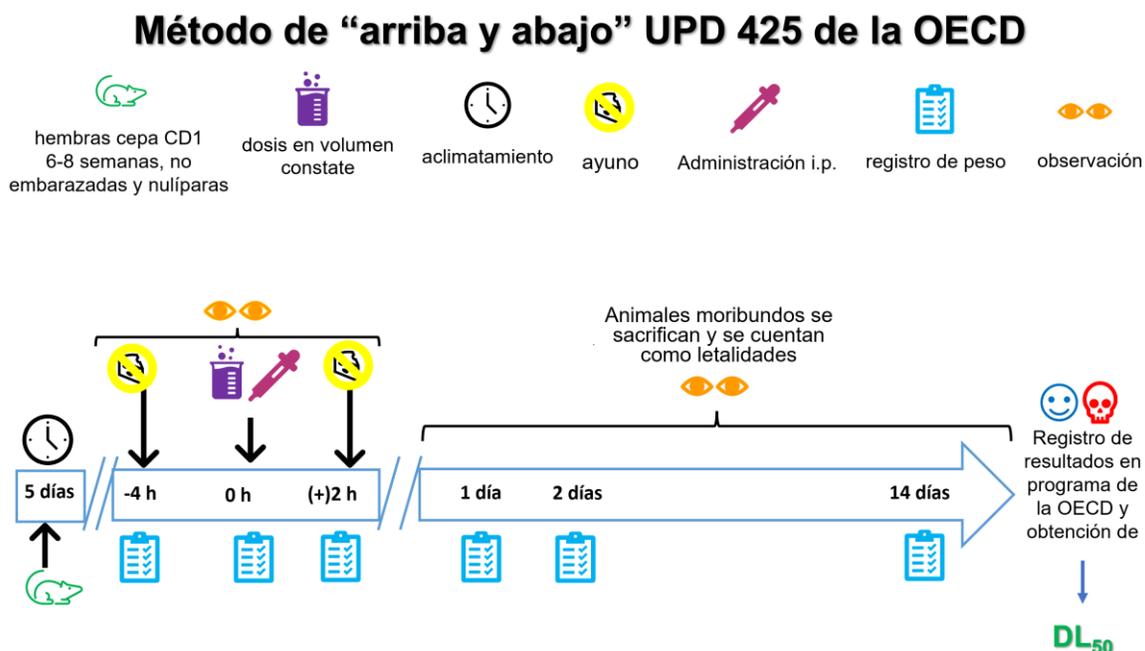


Figura 3. Método de "Arriba y Abajo" 425 de la OECD En primer lugar, el ratón se aclimató durante 5 días al nuevo ambiente. 4 horas antes de comenzar el experimento comenzó el ayuno del ratón, justo antes de la administración se pesó al ratón para obtener el volumen en el que se administró la dosis correspondiente del compuesto, momento a partir del cual, se observó al ratón sin interrupciones durante las primeras dos horas, transcurrido este tiempo terminó el ayuno del animal. El ratón fue pesado nuevamente el primer, segundo y catorceavo día, para finalmente ser sacrificado. Los desenlaces principales (supervivencia o muerte) se registraron en el programa proporcionado por la OECD para calcular la DL₅₀.

6.3.1. Prueba límite: 2000 mg/kg de peso corporal

Para determinar la DL₅₀ de cada α -aminofosfonato se inició el experimento con la prueba límite (2000 mg/kg). Si el ratón No. 1 murió en menos de 48 horas se dio por terminada esta prueba y se continuó el experimento mediante la prueba principal. Si el ratón No. 1 sobrevivió 48 horas, se administró a 4 ratones más de manera consecutiva, los cuales se mantuvieron en observación durante 14 días en total. Si terminado el plazo de 14 días, 3 animales murieron, la DL₅₀ fue menor a 2000 mg/kg y fue necesario llevar a cabo la prueba principal, si 3

animales o más sobrevivieron la DL₅₀ fue mayor a 2000 mg/kg y el estudio concluyó sin necesidad de realizar la prueba principal (Figura 4).

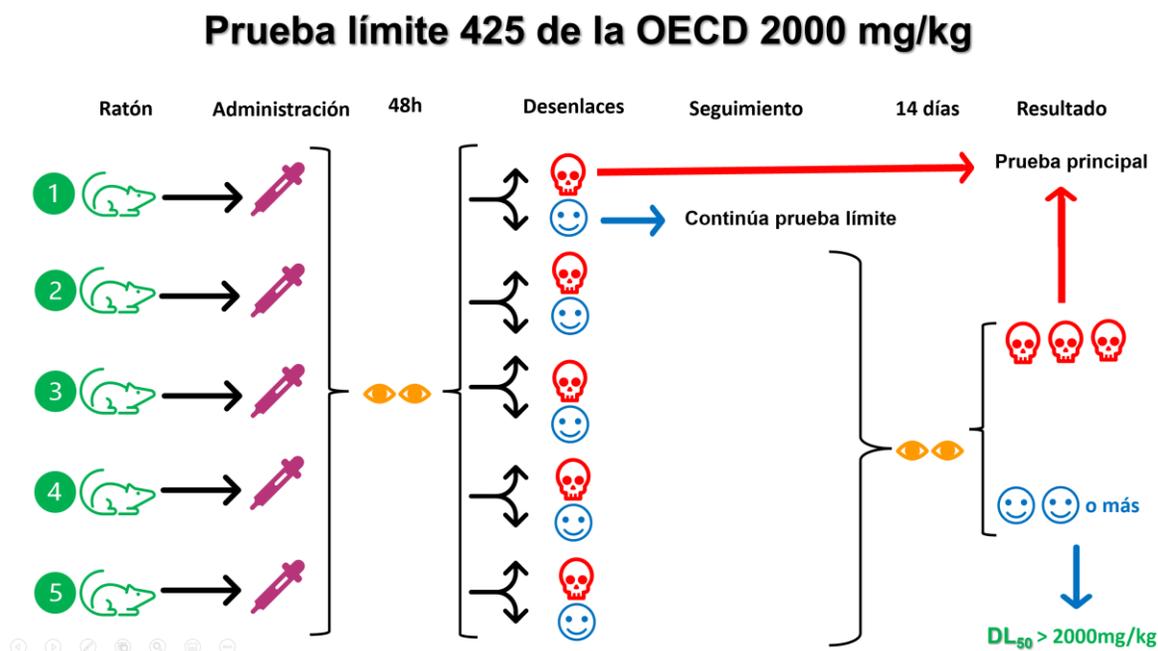


Figura 4. Prueba límite (2000 mg/kg). Lo fundamental en esta prueba es el primer ratón, ya que si este muere durante las primeras 48 horas automáticamente se debe continuar el experimento con la prueba principal, de lo contrario se continúa con la prueba límite, la cual esencialmente se convierte en un 3 de 5, es decir, si 3 ratones sobreviven la DL₅₀ es mayor a 2000 mg/kg, en cambio si 3 ratones mueren se debe calcular la DL₅₀ mediante la prueba principal.

6.3.2. Prueba principal

Cuando los criterios de terminación de la prueba límite así lo indicaron se realizó la prueba principal para determinar las DL₅₀. En esta prueba después del periodo de ayuno se administró a los animales secuencial y seriadamente en intervalos de 48 horas. El primer ratón fue inyectado intraperitonealmente recibiendo una dosis de 175 mg/kg, si el animal sobrevivió 48 horas, al segundo ratón se administró una dosis mayor (550 mg/kg), en caso contrario, se administró una dosis menor (550 mg/kg); este procedimiento se realizó a lo largo de todo el estudio. El factor de progresión de dosis empleado fue el antilogaritmo de 1 (3.2) y se mantuvo constante durante todo el estudio. La prueba principal se detuvo si, de manera consecutiva en 4 animales se continuó con el aumento o disminución progresivo de la dosis de la primera reversa (supervivencia de un ratón tras la muerte del ratón anterior o

muerte de un ratón tras la supervivencia del ratón anterior) (Figura 5a), si tres animales consecutivos sobrevivieron al aumento progresivo de la dosis (Figura 5b) o si se presentaron cinco reversas en 6 animales consecutivos (Figura 5c).

Los animales moribundos se sacrificaron para evitar su sufrimiento y se consideraron como animales que murieron durante la prueba. Si un animal murió 48 horas después de la administración, las administraciones de ratones subsecuentes se detuvieron, y los animales que ya habían sido administrados fueron observados con mayor detalle, si posteriormente otro animal murió, esa prueba se dio por terminada y se comenzó una nueva prueba al menos dos niveles por debajo de la dosis más baja que ocasionó muerte [71].

6.3.3. Cálculo de la DL_{50}

Con los resultados obtenidos de la prueba principal del método de UDP 425 de la OECD se calculó la DL_{50} utilizando el software estadístico (AOT425StatPgm).

6.6. Presentación y análisis de resultados

Los datos se presentan como la $DL_{50} \pm IC$ (Intervalo de confianza). Los principales signos de toxicidad se presentan de forma descriptiva utilizando frecuencia.

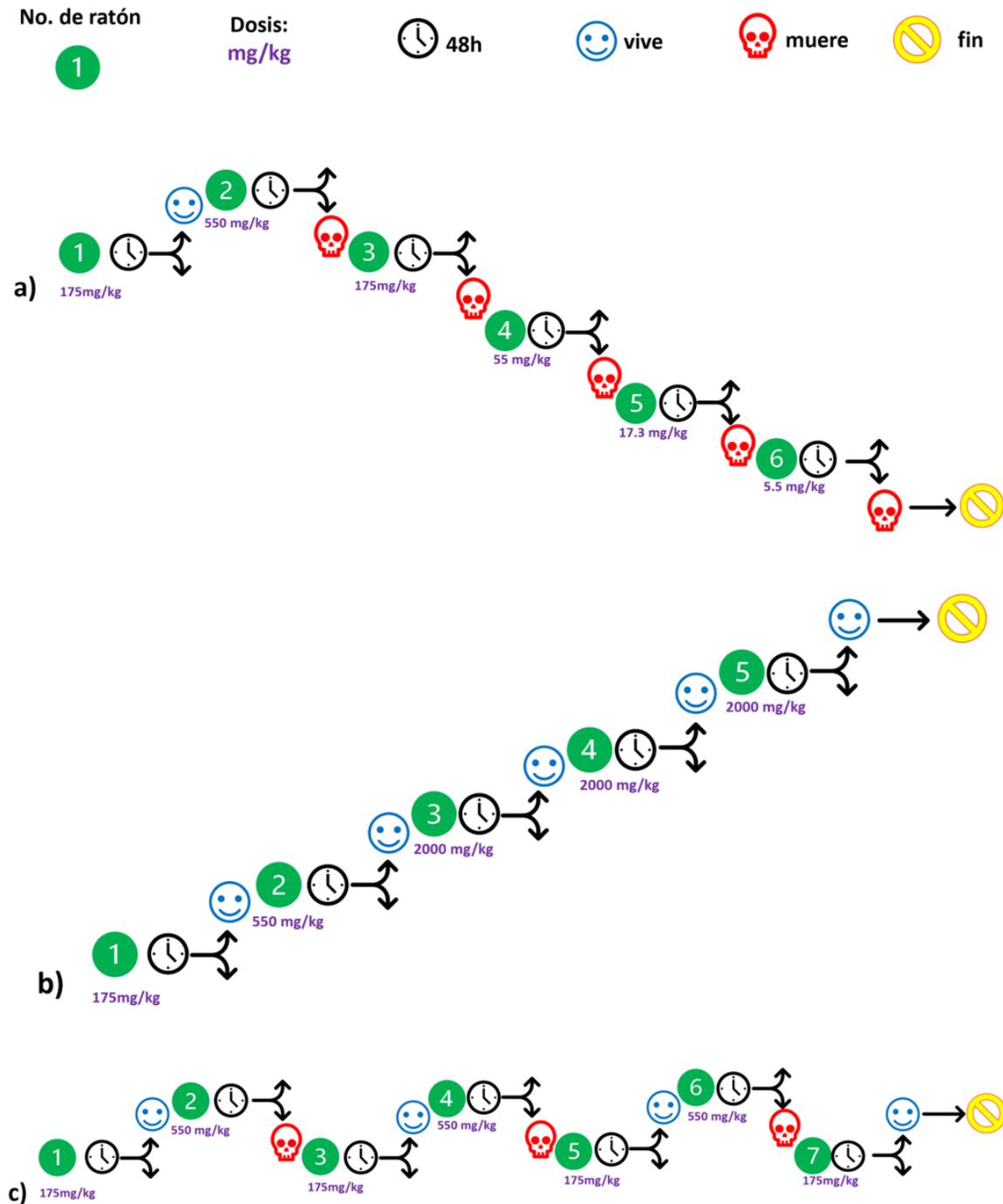


Figura 5. Prueba principal UPD 425 OECD. El primer ratón recibió una dosis de 175 mg/kg, si el animal sobrevivió 48 horas, se administró una dosis mayor al segundo animal, si murió, se administró una dosis menor; esta lógica se adoptó a lo largo de todo el estudio. La prueba se detuvo si 4 animales consecutivos siguieron la primera reversa (Figura 5a), si tres animales sobrevivieron de manera consecutiva al aumento progresivo de la dosis (Figura 5b) o si se presentaron cinco reversas consecutivas en 6 animales (Figura 5c). Una vez que se logró uno de estos criterios se calculó la DL₅₀ ingresando los datos en el programa proporcionado por la OECD.

7. RESULTADOS

El objetivo del presente trabajo fue determinar la toxicidad aguda que producen los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F tras su administración aguda por vía intraperitoneal en ratones hembra CD1. Para cumplir con este objetivo se utilizó el método 425 de la OECD cuyos resultados permiten calcular la DL_{50} , de cada compuesto evaluado, utilizando el menor número de animales posible. Dicho método consiste en dos fases de experimentación: la prueba límite y la prueba principal. Se inicia con la prueba límite, en donde se administra un primer ratón a una dosis de 2000 mg/kg, si este ratón muere, entonces la prueba se detiene y se realiza la prueba principal. En esta segunda prueba, se administra al ratón número 1 a una dosis de 175 mg/kg, si el ratón vive después de 48 horas, se administra un segundo ratón a una dosis más alta y así sucesivamente. Siguiendo este protocolo en el presente proyecto se utilizaron sólo 25 animales para determinar la DL_{50} de tres nuevos compuestos con potencial terapéutico (Tabla 9).

Tabla 9. Número de ratones utilizados para determinar la toxicidad aguda por vía i.p. de los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F

Compuesto	No. total de ratones utilizados por compuesto	Prueba límite		Prueba principal	
		No. de ratones evaluados	No. de ratones muertos	No. de ratones evaluados	No. de ratones muertos
CMC 0.5%	3	3	0	NA	NA
1A	8	1	1	7	3
1E	5	5	1	NA	NA
1F	9	1	1	8	3

7.1 Determinación de la DL_{50} i.p. de los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F por el método 425 de la OECD

En el presente proyecto se utilizó como vehículo para administrar a los diferentes compuestos una solución de carboximetilcelulosa (CMC) al 0.5% en solución salina fisiológica debido a esto se utilizó también como control negativo. La CMC al 0.5% se administró a una razón de 0.1 mL/10g de peso corporal del ratón y se siguió el protocolo de la prueba limite, es decir, se administró al ratón no. 1 por vía i.p., se observó durante 48 horas y una vez transcurrido

este tiempo si el ratón sobrevivía se administró el segundo ratón, y así sucesivamente hasta completar el mínimo de ratones, es decir 3. Siguiendo este protocolo, se observó que la administración de CMC al 0.5% por vía i.p, no produjo la muerte de ninguno de los animales administrados durante las primeras 48 horas, o en los 12 días restantes (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de la evaluación de la toxicidad aguda de CMC al 0.5% por vía i.p.

No. de ratón	Volumen administrado (mL)	Desenlace a		Observaciones
		48 horas	14 días	
1	0.31	Vive	Vive	Sin datos relevantes
2	0.28	Vive	Vive	Sin datos relevantes
3	0.30	Vive	Vive	Sin datos relevantes

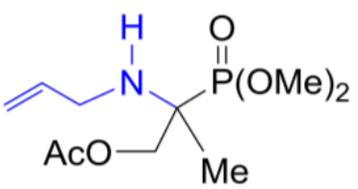
En cuanto a los compuestos, durante la prueba limite el compuesto 1A produjo la muerte del ratón número uno cuando se administró por vía intraperitoneal con la dosis de 2000 mg/kg. Por lo tanto, se realizó la prueba principal. En esta prueba los ratones administrados con 175 y 550 mg/kg sobrevivieron las primeras 48 horas después de la administración. Sin embargo, el ratón no. 3 que fue administrado con 2000 mg/kg murió. En consecuencia, el ratón no. 4 se administró con la dosis de 550 mg/kg. Éste sobrevivió los 14 días del experimento, por lo tanto, el ratón 5 se administró nuevamente con 2000 mg/kg y murió antes de 2 horas. Los resultados observados con los ratones 4 y 5 fueron iguales en los ratones 6 y 7, respectivamente. Con este patrón de muerte se calculó que la DL₅₀ del compuesto 1A por vía intraperitoneal fue 1098 mg/kg (Tabla 11).

Tabla 11. Desenlace de los ratones administrados por vía i.p. con el compuesto 1A durante la prueba principal

Estructura	No. ratón	Dosis mg/kg	Desenlace a		DL ₅₀ i.p (95% IC)
			48 horas	14 días	
	1	175	Vive	Vive	1098 mg/kg (550 a 2000)
	2	550	Vive	Vive	
	3	2000	Muere	--	
	4	550	Vive	Vive	
	5	2000	Muere	--	
	6	550	Vive	Vive	
	7	2000	Muere	--	

Por otro lado, con el compuesto 1E en la prueba límite se observó que de los 5 ratones que fueron administrados con la dosis de 2000 mg/kg, i.p., cuatro sobrevivieron las primeras 48 horas post-administración y posteriormente los 12 días restantes. Estos resultados permitieron determinar que la DL₅₀ del compuesto 1E por vía i.p. es mayor a 2000 mg/kg (Tabla 12).

Tabla 12. Desenlace de los ratones administrados por vía i.p. con el compuesto 1E durante la prueba límite

Estructura	No. ratón	Dosis mg/kg	Desenlace a		DL ₅₀ i.p.
			48 horas	14 días	
	1	2000	Vive	Vive	>2000 mg/kg
	2	2000	Muere	--	
	3	2000	Vive	Vive	
	4	2000	Vive	Vive	
	5	2000	Vive	Vive	

Finalmente, al realizar la prueba límite como parte de la prueba 425 de la OECD con el compuesto 1F, el primer ratón administrado i.p con la dosis de 2000 mg/kg murió, por lo que a continuación se realizó la prueba principal. En esta última se observó que los ratones 1, 2 y 3 administrados con las dosis de 175, 550 y 2000 mg/kg, respectivamente, sobrevivieron las primeras 48 horas post-administración. Con base en estos resultados, el ratón 4 fue administrado con la dosis de 2000 mg/kg, pero en esta ocasión murió. En consecuencia, al ratón 5 se le administro la dosis de 550 mg/kg y esta ocasión sobrevivió las primeras 48 horas post-administración, en consecuencia, al ratón 6 se le administro la dosis de 2000 mg/kg y sobrevivió. Los resultados de los ratones 7 y 8 fueron los mismos que los de los ratones 5 y 6, respectivamente. Estos resultados determinaron que la DL₅₀ por vía intraperitoneal del compuesto 1F fue igual a 2000 mg/kg (Tabla 13).

Tabla 13. Desenlace de los ratones administrados por vía i.p. con el compuesto 1F durante la prueba principal

Estructura del compuesto 1F	No. ratón	Dosis mg/kg	Desenlace a		DL ₅₀ i.p (95% IC)
			48 horas	14 días	
	1	175	Vive	Vive	2000 mg/kg (665.7 a 4540)
	2	550	Vive	Vive	
	3	2000	Vive	Vive	
	4	2000	Muere	Muere	
	5	550	Vive	Vive	
	6	2000	Muere	Muere	
	7	550	Vive	Vive	
	8	2000	Muere	Muere	

Es importante mencionar que la muerte de los animales que se produjo como resultado de la administración intraperitoneal de los diferentes compuestos en todos los casos ocurrió entre 5 y 10 min después de la administración. En la mayoría de estos se observó convulsiones y depresión respiratoria previa a la muerte del sujeto experimental. En conclusión y con base en la DL₅₀ se puede decir que el compuesto más seguro es el 1E seguido del 1F, mientras que el compuesto 1A fue el menos seguro de los tres compuestos.

7.2 Efectos conductuales observados después de la administración i.p. de los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F

El protocolo 425 de toxicidad aguda de la OECD establece que después de la administración del ratón con cada dosis de los diferentes compuestos, estos se observen de cerca por un periodo inicial de 2h y hasta completar 48h. Lo anterior con la finalidad de identificar si se producen cambios conductuales agudos que pudieran indicar signos de toxicidad en los animales. Además, si el animal sobrevivió las primeras 48 horas post-administración, se observó regularmente por 12 días más. Durante este periodo se realizó también el monitoreo de peso corporal. Los resultados mostraron que la inyección i.p. de CMC al 0.5 % no produjo cambios conductuales significativos en ninguno de los animales administrados. En contraste la administración i.p. de los compuestos produjo una serie de cambios conductuales en los animales que sobrevivieron. Cabe destacar que estos cambios se observaron en los primeros 30 minutos después de la administración de los compuestos y se revirtieron dentro de las dos horas post-administración. Los cambios conductuales más frecuentemente observados fueron

disminución de la coordinación motora, parálisis flácida, arqueo de la cola y convulsiones y se produjeron con las dosis más altas evaluadas es decir 550 y 2000 mg/kg, respectivamente (Tabla 14). Todos estos signos sugieren toxicidad de los compuestos a nivel del sistema nervioso. Además, cabe destacar que el perfil de cambios conductuales del compuesto 1E y 1F es muy similar en términos de frecuencia y dosis.

Tabla 14. Cambios conductuales observados después de la administración i.p. de los α -aminofosfonatos en los ratones sobrevivientes.

Conducta observada	COMPUESTOS			
	CMC 0.5%	1A	1E	1F
	Frecuencia (dosis en mg/kg)			
Estiramiento abdominal	0/3	0/4	0/4	0/5
Piloerección	0/3	3/4 (550)	3/4 (2000)	2/5 (550)
Lagrimeo	0/3	1/4 (175)	0/4	0/5
Salivación	0/3	1/4 (175)	0/4	0/5
Diarrea	0/3	1/4 (175)	0/4	3/5 (550)
Incoordinación motora	0/3	3/4 (550)	4/4 (2000)	3 (550) 1 (2000)
Sedación	0/3	1/4 (550)	4/4 (2000)	3 (550) 1 (2000)
Parálisis flácida	0/3	2/4 (550)	3/4 (2000)	1 (550) 1 (2000)
Arqueo de la cola	0/3	1/4 (550)	2/4 (2000)	1/5 (550)
Convulsiones	0/3	0/4	2/4 (2000)	1/5 (550)

En relación con el peso corporal se observó que la CMC al 0.5% no produjo cambios en este parámetro 24 horas después de la administración, mientras que 14 días después de la administración se observó una ganancia de peso del 10.8% (Figura 6A). Por su parte el compuesto 1A no disminuyó el peso de los animales 24 h post-administración. Sin embargo, 14 días después de la administración se observó un aumento de peso de tan solo el $4.2 \pm 0.9\%$ con respecto al peso inicial el cual no es estadísticamente significativo (Figura 6B). En este mismo sentido, se observó que el compuesto 1E y 1F produjeron una tendencia a disminuir el peso corporal de los roedores 24 horas después de la administración aproximadamente en un $8.1 \pm 1\%$. En contraste, 14 días después de la administración se observó tan solo un incremento de peso del 1% con respecto al peso inicial (Figura 6C, D). Lo anterior muestra que los ratones solo recuperaron el peso corporal perdido, sin embargo, ya no crecieron, como fue el caso de los ratones administrados con CMC al 0.5%.

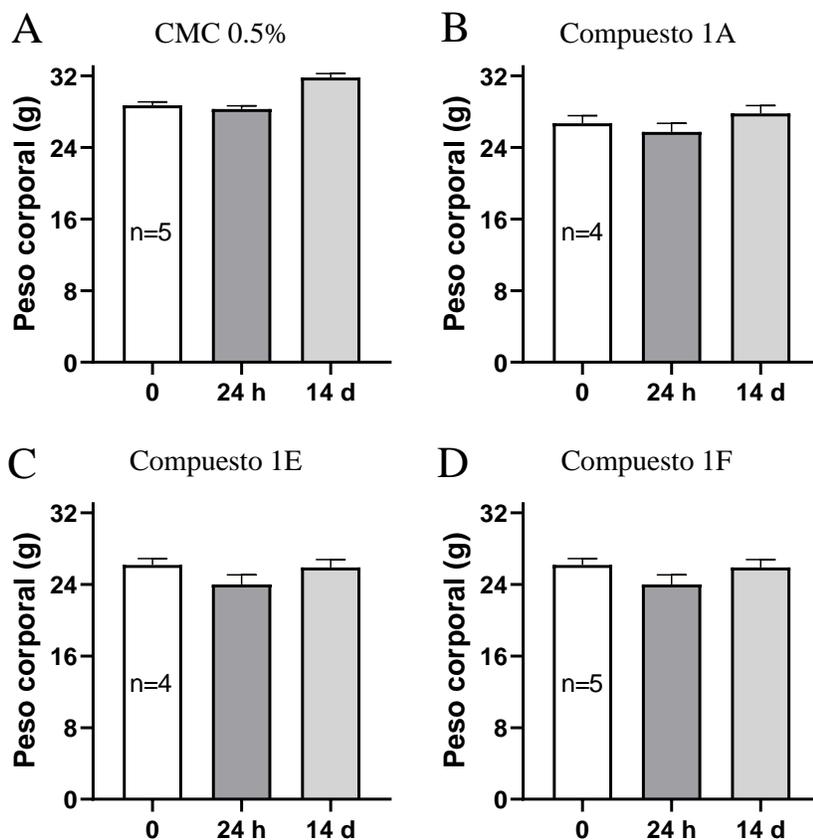


Figura 6. Peso corporal de los ratones hembra CD1 antes y después de ser administrados con los α -aminofosfonatos 1a, 1E y 1F. Cada barra representa el promedio \pm SEM.

7.3 Toxicidad oral aguda de los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F

Por otro lado, se determinó la toxicidad oral aguda de los compuestos siguiendo la misma metodología. En contraste con la administración i.p., se observó que para determinar la DL_{50} a través de la administración oral, dos de los compuestos (1A y 1F) se evaluaron únicamente en la prueba límite, es decir todos los ratones fueron administrados con la dosis de 2000 mg/kg, de forma consecutiva, si cada ratón sobrevivía las primeras 48 horas. En todos los casos los ratones sobrevivieron el periodo de observación de 14 días (Tablas 15 y 16).

Tabla 15. Desenlace de los ratones administrados por vía oral con el compuesto 1A durante la prueba límite

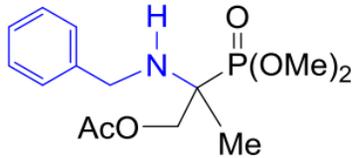
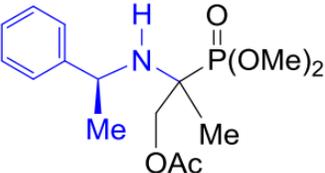
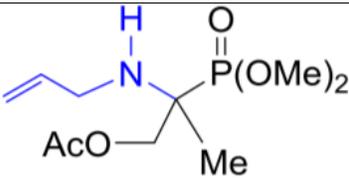
Estructura del compuesto 1A	No. ratón	Dosis mg/kg	Desenlace a		DL ₅₀ i.p.
			48 horas	14 días	
	1	2000	Vive	Vive	>2000 mg/kg
	2	2000	Vive	Vive	
	3	2000	Vive	Vive	
	4	2000	Vive	Vive	
	5	2000	Vive	Vive	

Tabla 16. Desenlace de los ratones administrados por vía oral con el compuesto 1F durante la prueba límite.

Estructura del compuesto 1F	No. ratón	Dosis mg/kg	Desenlace a		DL ₅₀ i.p.
			48 horas	14 días	
	1	2000	Vive	Vive	>2000 mg/kg
	2	2000	Vive	Vive	
	3	2000	Vive	Vive	
	4	2000	Vive	Vive	
	5	2000	Vive	Vive	

El compuesto 1E mato al primer ratón en la prueba límite por lo que se realizó la prueba principal en donde solo un ratón de siete murió. De esta manera se calculó que los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F tienen una DL₅₀ por vía oral mayor a 2000 mg/kg (Tablas 15, 16 y 17). Con base en este resultado se puede clasificar a los compuestos como inocuos de acuerdo con los criterios de la OECD. Es importante hacer notar que solo un ratón murió cuando los compuestos se administraron por esta vía, en comparación de los 9 ratones muertos cuando se administraron por vía i.p.

Tabla 17. Desenlace de los ratones administrados por vía oral con el compuesto 1E durante la prueba principal.

Estructura	No. ratón	Dosis mg/kg	Desenlace a		DL ₅₀ i.p.
			48 horas	14 días	
	1	175	Vive	Vive	>2000 mg/kg
	2	550	Vive	Muere	
	3	175	Vive	Vive	
	4	550	Vive	Vive	
	5	2000	Vive	Vive	
	6	2000	Vive	Vive	
	7	2000	Vive	Vive	

En cuanto a las observaciones conductuales, por esta vía se observó casi el mismo patrón conductual que por vía intraperitoneal, es decir, incoordinación motora, sedación, parálisis flácida, arqueo de la cola y convulsiones. Sin embargo, estos efectos se observaron con menor frecuencia y una dosis mucho mayor es decir 2000 mg/kg. De igual forma estos cambios se observaron durante los primeros 30 minutos y se revirtieron antes de las 2 horas post-administración (Tabla 18).

Tabla 18. Cambios conductuales observados después de la administración oral con los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F.

Conducta observada	COMPUESTOS			
	CMC	1A	1F	1E
	Frecuencia (dosis en mg/kg)			
Estiramiento abdominal	0/3	0/5	0/5	0/7
Piloerección	3/3	5/5 (2000)	4/5 (2000)	2/7 (550) 2/7 (2000)
Lagrimo	0/3	0/5	0/5	0/7
Salivación	0/3	0/5	0/5	0/7
Diarrea	0/3	0/5	0/5	0/7
Incoordinación motora	0/3	5/5 (2000)	5/5 (2000)	0/7
Marcha en círculos	0/3	4/5 (2000)	3/5 (2000)	0/7
Sedación	0/3	5/5 (2000)	5/5 (2000)	2/7 (2000)
Parálisis flácida	0/3	4/5 (2000)	2/5 (2000)	2/7 (2000)
Arqueo de la cola	0/3	1/5 (2000)	4/5 (2000)	0/7
Convulsiones	0/3	0/5	3/5 (2000)	0/7

8. DISCUSIÓN

Los α -aminofosfonatos son compuestos que producen un gran número de actividades biológicas de interés en medicina y por lo tanto tienen el potencial de convertirse en nuevos fármacos [102]. Por lo tanto, además de realizar estudios de sus efectos farmacológicos, también es necesario realizar estudios toxicológicos que nos permitan determinar su seguridad para ser administrados en un futuro en humanos, de acuerdo con los lineamientos de las agencias regulatorias. Los primeros estudios toxicológicos de este tipo de compuestos surgen debido al hecho de algunas clases de estos compuestos inicialmente fueron diseñadas como potentes pesticidas [120]. Por lo anterior se determinó su toxicidad en sangre, en donde se encontró que producen efecto hemolítico en eritrocitos de cerdo [120, 121]. Otro efecto tóxico frecuentemente estudiado es su actividad citotóxica tanto en células cancerígenas [128] como en no cancerígenas [131]. En cuanto a toxicidad *in vivo*, la mayoría de los estudios están relacionados en evaluar el efecto toxicológico de diferentes tipos de α -aminofosfonatos con actividad antitumoral [127, 133]. Este es el primer estudio en donde se evaluó la toxicidad aguda *in vivo* de α -aminofosfonatos con actividad antiinflamatoria y analgésica para lo cual se calculó la DL_{50} por dos diferentes vías de administración utilizando el método 425 de la OECD [71]. Adicionalmente, se identificaron de forma cualitativa los cambios conductuales más relevantes que se observaron en los ratones sobrevivientes.

La DL_{50} se define como la cantidad en miligramos por kilogramo de peso de un compuesto, requerida para matar al 50% de los animales de experimentación, de acuerdo con la OECD [42] este parámetro permite clasificar a un compuesto por su toxicidad intrínseca dependiendo de su vía de administración. En el presente proyecto se determinó la DL_{50} de los. Se encontró que por vía oral los tres compuestos tienen una DL_{50} mayor a 2000 mg/kg por lo que se consideran inocuos. En contraste por vía intraperitoneal, el compuesto 1A tiene una DL_{50} de 1098 mg/kg, el compuesto 1E tiene una DL_{50} mayor a 2000 mg/kg como por vía oral, y el compuesto 1F tiene una DL_{50} igual a 2000 mg/kg. Estos resultados muestran que en el caso de los compuestos 1A y 1F la DL_{50} obtenida por vía intraperitoneal fue menor que por vía oral. Estos resultados muestran que la vía de administración es un factor que determina la toxicidad de un compuesto químico. Conociendo la toxicocinética sabemos que al administrar un compuesto por vía oral, depositándolo directamente en el estómago del

animal mediante una cánula, no existe proceso de liberación [14], ya en el estómago, el compuesto es alterado por el pH (ácido), disminuyendo la fracción total de este que llega al lumen intestinal, donde gracias a los enterocitos comienza el proceso de absorción y el de biotransformación[13]. El proceso de absorción depende de la liposolubilidad del compuesto que en este caso es favorable y de la saturación de la superficie de las membranas involucradas, las cuales a dosis elevadas (2000 mg/kg) suelen saturarse retardando dicho proceso[13]. Una vez absorbido por el intestino, el compuesto pasa a la circulación enterohepática mediante la cual es depositado en el hígado, órgano en el cual la mayoría de los xenobióticos son biotransformados, disminuyendo la fracción del compuesto nuevamente, dando lugar a metabolitos. La fracción del compuesto que es metabolizada en el hígado posteriormente, facilitando de esta manera su excreción vía renal o en su defecto, si los metabolitos resultantes son apolares o de elevado peso molecular se excretan por vía biliar[42]; así la fracción del compuesto que no es metabolizada ni en el intestino, ni en el hígado y que alcanzó la circulación sistémica (biodisponibilidad)[22] se distribuye a los órganos y tejidos donde ejerce efectos que se manifiestan como las reacciones observadas, las características fisicoquímicas del compuesto determinan si este se acumula o no en ciertos tejidos. En resumen, la fracción del compuesto que representa la biodisponibilidad al ser administrado por vía oral no fue suficiente para generar el efecto adverso estudiado, en este caso la muerte. En cambio al administrar un compuesto por vía intraperitoneal se evita el paso del compuesto por el tracto gastrointestinal y por el hígado, y así su potencial degradación antes de ser absorbido, lo que aumenta la biodisponibilidad sistémica del compuesto y con esto su potencial tóxico [21], lo anterior explicaría por que para los compuestos 1A y 1F la DL_{50} obtenida por vía intraperitoneal es menor que por vía oral.

El protocolo 425 de toxicidad aguda de la OECD establece que después de la administración del ratón con cada dosis de los diferentes compuestos, estos se observen de cerca por un periodo inicial de 2h y hasta completar 48h. Lo anterior con la finalidad de identificar si se producen cambios conductuales agudos que pudieran indicar signos de toxicidad en los animales. Tras realizar los estudios de toxicidad aguda por ambas vías de administración el 79.31% de los animales que sobrevivieron presentó cambios conductuales reversibles en menos de 2 horas que podrían ser indicativos de toxicidad aguda. Los cambios conductuales más frecuentemente observados fueron incoordinación motora, sedación, parálisis flácida,

arqueo de la cola y convulsiones. El mecanismo de acción neurotoxicológico de los compuestos aún no se puede explicar, pero existen antecedentes de estudios enfocados en la toxicodinamia de esta familia de compuestos. El primer estudio demostró que debido a su hidrofobicidad estos compuestos se integran a las membranas de las neuronas, alterando su conformación y aumentando su conductividad, [120]; en segundo lugar existe evidencia de que ciertos análogos fosfónicos y sus derivados son moduladores del receptor de glutamato [139], el glutamato es un aminoácido que actúa como el principal neurotransmisor excitatorio del SNC [140], por último un estudio demostró que los organofosforados tienen la capacidad de bloquear la transmisión del sistema colinérgico ocasionando efectos neurotóxicos [141]. Será indispensable realizar estudios toxicodinámicos a los α -aminofosfonatos 1A, 1E y 1F por vía oral y por vía intraperitoneal para entender la causa de los cambios conductuales que fueron observados en los animales.

9. CONCLUSIONES

Los α -aminofosfonato 1A, 1E y 1F tiene una $DL_{50} > 2000$ mg/kg de peso al ser administrado por vía oral lo anterior permite clasificarlos como inofensivos de acuerdo con la categorización de la OECD. En contraste los α -aminofosfonato 1A, 1F y 1E tiene una DL_{50} de 1098, 2000 y, > 2000 mg/kg de peso respectivamente, al ser administrado por vía oral. Lo anterior sugiere que la vía de administración es un factor determinante de la toxicidad de estos compuestos.

El 79.31% de los animales que sobrevivieron presentó cambios conductuales reversibles en menos de 2 horas tras la administración intraperitoneal u oral que podrían ser indicativos de toxicidad aguda. Los cambios conductuales más frecuentemente observados fueron incoordinación motora, sedación, parálisis flácida, arqueo de la cola y convulsiones. Estos efectos sugieren que los compuestos podrían estar actuando en el SNC.

De manera general, nuestros resultados indican que los α -aminofosfonatos estudiados son inofensivos por vía oral, pero su toxicidad aguda incrementa por vía intraperitoneal. Estos compuestos ejercen efectos adversos agudos que podrían indicar otras su acción a nivel del SNC. Estudiar con mayor detalle los cambios conductuales observados podría ayudarnos a identificar otras actividades biológicas de interés médico de estos compuestos.

10. PERSPECTIVAS

- Determinar si los α -aminofosfonatos de interés tienen efecto antiinflamatorio y/o analgésico al ser administrados por vía oral y obtener su DE50
- Obtener el índice terapéutico de los α -aminofosfonatos de interés para la vía de administración oral.
- Evaluar si los α -aminofosfonatos de interés producen toxicidad gastrointestinal cuando se administran de forma aguda y crónica por vía oral o intraperitoneal en ratones hembra CD1.
- Caracterizar a través de pruebas conductuales, los efectos adversos que se producen en el SNC tras la administración aguda oral o intraperitoneal de los α -aminofosfonatos de interés en ratones hembra CD1.
- Realizar estudios de toxicidad crónicos de los α -aminofosfonatos de interés en ratones hembra CD1.

11. BIBLIOGRAFÍA

1. Marino, M., Z. Jamal, and M.A. Siccardi, *Pharmaceutics*, in *StatPearls*. 2021, StatPearls Publishing Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.: Treasure Island (FL).
2. Brodniewicz, T. and G. Gryniewicz, *Preclinical drug development*. *Acta Pol Pharm*, 2010. **67**(6): p. 578-85.
3. Setzer, R.W. and C.A. Kimmel, *Use of NOAEL, benchmark dose, and other models for human risk assessment of hormonally active substances*. *Pure and Applied Chemistry*, 2003. **75**(11-12): p. 2151-2158.
4. Oliveira, C.D., et al., *Maternal and developmental toxicity of ayahuasca in Wistar rats*. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol*, 2010. **89**(3): p. 207-12.
5. Romero-Estudillo, I., et al., *000Synthesis of new α -aminophosphonates: Evaluation as anti-inflammatory agents and QSAR studies*. *Bioorg Med Chem*, 2019. **27**(12): p. 2376-2386.
6. Gil, J.R.R., *Evaluación del efecto antinociceptivo de fosfoserinas α -metiladas en roedores*, in *Facultad de Medicina*. 2021, Universidad Autónoma del Estado de Morelos: Cuernavaca, Morelos. p. 108.
7. Root, D.E., B.P. Kelley, and B.R. Stockwell, *Global analysis of large-scale chemical and biological experiments*. *Curr Opin Drug Discov Devel*, 2002. **5**(3): p. 355-60.
8. Inglese, J. and D.S. Auld, *High Throughput Screening (HTS) Techniques: Applications in Chemical Biology*, in *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*. p. 1-15.
9. Zhang, D., et al., *Preclinical experimental models of drug metabolism and disposition in drug discovery and development*. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 2012. **2**(6): p. 549-561.
10. Vargesson, N., *Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms*. *Birth Defects Res C Embryo Today*, 2015. **105**(2): p. 140-56.
11. Stevens, J.L. and T.K. Baker, *The future of drug safety testing: expanding the view and narrowing the focus*. *Drug Discov Today*, 2009. **14**(3-4): p. 162-7.
12. Gilbert, S.G., *A small dose of Toxicology*, ed. H.W. Press. Vol. 2 nd edition. 2012.
13. Kuhn, M.R.J.y.G.R., *Toxicología Fundamental*. 4ta ed. 2009, Sevilla, España: Diez Santos.
14. Goodman, L.S.B.L.L.C.B.K.B.C., *Goodman & Gilman's pharmacological basis of therapeutics*. 2011, New York: McGraw-Hill.
15. Lown, K.S., et al., *Role of intestinal P-glycoprotein (mdr1) in interpatient variation in the oral bioavailability of cyclosporine*. *Clin Pharmacol Ther*, 1997. **62**(3): p. 248-60.
16. Fricker, G., et al., *Relevance of p-glycoprotein for the enteral absorption of cyclosporin A: in vitro-in vivo correlation*. *Br J Pharmacol*, 1996. **118**(7): p. 1841-7.
17. Wegner, G.J.m.b.b.d.o.A.F.C., *Chirurgische bemerkungen uber die peritonealhohle*. 1877. **20**: p. 51-55.

18. Blackburn, S.C. and M.P. Stanton. *Anatomy and physiology of the peritoneum*. in *Seminars in pediatric surgery*. 2014. Elsevier.
19. Aguirre, A.R. and H.J.B.J.o.N. Abensur, *Physiology of fluid and solute transport across the peritoneal membrane*. 2014. **36**: p. 74-79.
20. Granger, D.N., et al., *Peritoneal dialysis solutions and feline splanchnic blood flow*. 1984. **11**(5): p. 473-481.
21. Al Shoyaib, A., S.R. Archie, and V.T. Karamyan, *Intraperitoneal Route of Drug Administration: Should it Be Used in Experimental Animal Studies?* *Pharmaceutical Research*, 2019. **37**(1): p. 12.
22. Peters, S.A., et al., *Predicting Drug Extraction in the Human Gut Wall: Assessing Contributions from Drug Metabolizing Enzymes and Transporter Proteins using Preclinical Models*. *Clinical Pharmacokinetics*, 2016. **55**(6): p. 673-696.
23. Olsen, L., C. Oostenbrink, and F.S. Jørgensen, *Prediction of cytochrome P450 mediated metabolism*. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2015. **86**: p. 61-71.
24. Ionescu, C. and M.R. Caira, *Drug metabolism: current concepts*. 2006.
25. Mittal, B., et al., *Chapter Four - Cytochrome P450 in Cancer Susceptibility and Treatment*, in *Advances in Clinical Chemistry*, G.S. Makowski, Editor. 2015, Elsevier. p. 77-139.
26. Dvorak, Z. and P. Pavek, *Regulation of drug-metabolizing cytochrome P450 enzymes by glucocorticoids*. *Drug Metabolism Reviews*, 2010. **42**(4): p. 621-635.
27. Parikh, N.D. and J. Levitsky, *Hepatotoxicity and Drug Interactions in Liver Transplant Candidates and Recipients*. *Clinics in Liver Disease*, 2013. **17**(4): p. 737-747.
28. Tischer, S. and R.J. Fontana, *Drug-drug interactions with oral anti-HCV agents and idiosyncratic hepatotoxicity in the liver transplant setting*. *Journal of Hepatology*, 2014. **60**(4): p. 872-884.
29. Wang, Q., et al., *Glucuronidation and sulfation of 7-hydroxycoumarin in liver matrices from human, dog, monkey, rat, and mouse*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal*, 2005. **41**(3): p. 97-103.
30. Wang, L.Q. and M.O. James, *Inhibition of sulfotransferases by xenobiotics*. *Curr Drug Metab*, 2006. **7**(1): p. 83-104.
31. Harris, R.M. and R.H. Waring, *Sulfotransferase inhibition: potential impact of diet and environmental chemicals on steroid metabolism and drug detoxification*. *Curr Drug Metab*, 2008. **9**(4): p. 269-75.
32. Maiti, S., X. Chen, and G. Chen, *All-trans retinoic acid induction of sulfotransferases*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*, 2005. **96**(1): p. 44-53.
33. Kukongviriyapan, V., et al., *Inhibitory effects of polyphenolic compounds on human arylamine N-acetyltransferase 1 and 2*. *Xenobiotica*, 2006. **36**(1): p. 15-28.
34. Jakobsson, P.J., et al., *Common structural features of MAPEG -- a widespread superfamily of membrane associated proteins with highly divergent functions in eicosanoid and glutathione metabolism*. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 1999. **8**(3): p. 689-692.

35. Perez, J.L., et al., *Limonin methoxylation influences the induction of glutathione S-transferase and quinone reductase*. J Agric Food Chem, 2009. **57**(12): p. 5279-86.
36. Oselin, K. and K. Anier, *Inhibition of human thiopurine S-methyltransferase by various nonsteroidal anti-inflammatory drugs in vitro: a mechanism for possible drug interactions*. Drug Metab Dispos, 2007. **35**(9): p. 1452-4.
37. Zhang, J., et al., *Mediation of donor–acceptor distance in an enzymatic methyl transfer reaction*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2015. **112**.
38. Giacomini, K.M., et al., *Membrane transporters in drug development*. Nat Rev Drug Discov, 2010. **9**(3): p. 215-36.
39. Ding, X. and L.S. Kaminsky, *Human Extrahepatic Cytochromes P450: Function in Xenobiotic Metabolism and Tissue-Selective Chemical Toxicity in the Respiratory and Gastrointestinal Tracts*. 2003. **43**(1): p. 149-173.
40. Pavek, P. and Z. Dvorak, *Xenobiotic-induced transcriptional regulation of xenobiotic metabolizing enzymes of the cytochrome P450 superfamily in human extrahepatic tissues*. Curr Drug Metab, 2008. **9**(2): p. 129-43.
41. Mizuma, T., *Intestinal glucuronidation metabolism may have a greater impact on oral bioavailability than hepatic glucuronidation metabolism in humans: A study with raloxifene, substrate for UGT1A1, 1A8, 1A9, and 1A10*. International Journal of Pharmaceutics, 2009. **378**(1): p. 140-141.
42. Benedetti, M.S., et al., *Drug metabolism and pharmacokinetics*. Drug Metabolism Reviews, 2009. **41**(3): p. 344-390.
43. C.D., K., *Casarett and Doull's Toxicology: The Basic Science of Poisons*, ed. McGraw-Hill. Vol. 7th ed. 2008, New York.
44. Marra, M., et al., *Cutting the limits of aminobisphosphonates: new strategies for the potentiation of their anti-tumour effects*. Curr Cancer Drug Targets, 2009. **9**(7): p. 791-800.
45. Wynne, H.A., et al., *The effect of age upon liver volume and apparent liver blood flow in healthy man*. Hepatology, 1989. **9**(2): p. 297-301.
46. *Drug metabolism and ageing*. British Menopause Society Journal, 2005. **11**(2): p. 51-56.
47. Kando, J.C., K.A. Yonkers, and J.O. Cole, *Gender as a Risk Factor for Adverse Events to Medications*. Drugs, 1995. **50**(1): p. 1-6.
48. Zhou, S., et al., *Mechanism-Based Inhibition of Cytochrome P450 3A4 by Therapeutic Drugs*. Clinical Pharmacokinetics, 2005. **44**(3): p. 279-304.
49. Zhao, Y., M.F. Hebert, and R. Venkataramanan, *Basic obstetric pharmacology*. Seminars in Perinatology, 2014. **38**(8): p. 475-486.
50. Feghali, M., R. Venkataramanan, and S. Caritis, *Pharmacokinetics of drugs in pregnancy*. Seminars in Perinatology, 2015. **39**(7): p. 512-519.
51. Almazroo, O.A., M.K. Miah, and R. Venkataramanan, *Drug Metabolism in the Liver*. Clin Liver Dis, 2017. **21**(1): p. 1-20.
52. Food, U., D.A.J.C.f.D. Evaluation, and Research, *Guidance for industry: drug interaction studies—study design, data analysis, implications for dosing, and labeling recommendations*. 2012: p. 1-75.

53. Lin, J.H. and A.Y.H. Lu, *Inhibition and Induction of Cytochrome P450 and the Clinical Implications*. Clinical Pharmacokinetics, 1998. **35**(5): p. 361-390.
54. Hermersdörfer, H., *Methods in Toxicology, Vol. 1. Part A: In Vitro Biological Systems*. Herausgegeben von C. A. Tyson and J. M. Frazier. 568 Seiten, zahlr. Abb. und Tab. Academic Press, San Diego, New York, Boston, Sydney, Tokyo, Toronto 1993. Preis: 69,95 US \$. 1994. **38**(2): p. 222-222.
55. Singh, S., V. Khanna, and A. Pant, *Development of In Vitro Toxicology*. 2018. p. 1-19.
56. Inselman, A., et al., *Dr. Daniel Acosta and In Vitro toxicology at the U.S. Food and Drug Administration's National Center for Toxicological Research*. Toxicol In Vitro, 2020. **64**: p. 104471.
57. Humpel, C., *Organotypic brain slice cultures: A review*. Neuroscience, 2015. **305**: p. 86-98.
58. Onakpoya, I.J., C.J. Heneghan, and J.K. Aronson, *Post-marketing withdrawal of 462 medicinal products because of adverse drug reactions: a systematic review of the world literature*. BMC Med, 2016. **14**: p. 10.
59. Zhang, J., et al., *Effects of 31 FDA approved small-molecule kinase inhibitors on isolated rat liver mitochondria*. Arch Toxicol, 2017. **91**(8): p. 2921-2938.
60. Kleiner, D.E., *Drug-induced Liver Injury: The Hepatic Pathologist's Approach*. Gastroenterol Clin North Am, 2017. **46**(2): p. 273-296.
61. Zhang, J., et al., *Cytotoxicity of 34 FDA approved small-molecule kinase inhibitors in primary rat and human hepatocytes*. Toxicol Lett, 2018. **291**: p. 138-148.
62. Lavery, H., et al., *How can we improve our understanding of cardiovascular safety liabilities to develop safer medicines?* Br J Pharmacol, 2011. **163**(4): p. 675-93.
63. Sławiński, G., et al., *Immune Checkpoint Inhibitors and Cardiac Toxicity in Patients Treated for Non-Small Lung Cancer: A Review*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(19).
64. Sayed, N., C. Liu, and J.C. Wu, *Translation of Human-Induced Pluripotent Stem Cells: From Clinical Trial in a Dish to Precision Medicine*. J Am Coll Cardiol, 2016. **67**(18): p. 2161-2176.
65. Herati, A.S., et al., *Age-related alterations in the genetics and genomics of the male germ line*. Fertil Steril, 2017. **107**(2): p. 319-323.
66. Sato, T., et al., *In vitro production of functional sperm in cultured neonatal mouse testes*. Nature, 2011. **471**(7339): p. 504-7.
67. Fatehullah, A., S.H. Tan, and N. Barker, *Organoids as an in vitro model of human development and disease*. Nat Cell Biol, 2016. **18**(3): p. 246-54.
68. Johnson, M.D., et al., *Evaluation of in vitro assays for assessing the toxicity of cigarette smoke and smokeless tobacco*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2009. **18**(12): p. 3263-304.
69. Parasuraman, S., *Toxicological screening*. J Pharmacol Pharmacother, 2011. **2**(2): p. 74-9.
70. Stallard, N. and A. Whitehead, *Reducing animal numbers in the fixed-dose procedure*. Hum Exp Toxicol, 1995. **14**(4): p. 315-23.
71. OECD, *Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-Down Procedure*. 2008.

72. Lorke, D., *A new approach to practical acute toxicity testing*. Arch Toxicol, 1983. **54**(4): p. 275-87.
73. OECD, *Test No. 436: Acute Inhalation Toxicity – Acute Toxic Class Method*. 2009.
74. Curren, R.D. and J.W. Harbell, *In vitro alternatives for ocular irritation*. Environ Health Perspect, 1998. **106 Suppl 2**(Suppl 2): p. 485-92.
75. York, M. and W. Steiling, *A critical review of the assessment of eye irritation potential using the Draize rabbit eye test*. J Appl Toxicol, 1998. **18**(4): p. 233-40.
76. OECD, *Test No. 422: Combined Repeated Dose Toxicity Study with the Reproduction/Developmental Toxicity Screening Test*. 2016.
77. Muralidhara, S., et al., *Acute, subacute, and subchronic oral toxicity studies of 1,1-dichloroethane in rats: application to risk evaluation*. Toxicol Sci, 2001. **64**(1): p. 135-45.
78. OECD, *Test No. 452: Chronic Toxicity Studies*. 2018.
79. Jaijoy, K., et al., *Acute and chronic oral toxicity of standardized water extract from the fruit of Phyllanthus emblica Linn*. International Journal of Applied Research in Natural Products, 2010. **3**.
80. OECD, *Test No. 426: Developmental Neurotoxicity Study*. 2007.
81. Matsuura, I., et al., *Evaluation of a two-generation reproduction toxicity study adding endpoints to detect endocrine disrupting activity using lindane*. J Toxicol Sci, 2005. **30 Spec No.**: p. 135-161.
82. Ganiger, S., et al., *A two generation reproductive toxicity study with curcumin, turmeric yellow, in Wistar rats*. Food Chem Toxicol, 2007. **45**(1): p. 64-9.
83. Kimm-Brinson, K.L. and J.S. Ramsdell, *The red tide toxin, brevetoxin, induces embryo toxicity and developmental abnormalities*. Environ Health Perspect, 2001. **109**(4): p. 377-81.
84. Karl, T., R. Pabst, and S. von Hörsten, *Behavioral phenotyping of mice in pharmacological and toxicological research*. Exp Toxicol Pathol, 2003. **55**(1): p. 69-83.
85. Crawley, J.N., *Behavioral phenotyping of transgenic and knockout mice: experimental design and evaluation of general health, sensory functions, motor abilities, and specific behavioral tests*. Brain Res, 1999. **835**(1): p. 18-26.
86. Crawley, J.N. and R. Paylor, *A proposed test battery and constellations of specific behavioral paradigms to investigate the behavioral phenotypes of transgenic and knockout mice*. Horm Behav, 1997. **31**(3): p. 197-211.
87. Hodges, H., *Maze procedures: the radial-arm and water maze compared*. Brain Res Cogn Brain Res, 1996. **3**(3-4): p. 167-81.
88. Dewey, W.L., et al., *The effect of narcotics and narcotic antagonists on the tail-flick response in spinal mice*. J Pharm Pharmacol, 1969. **21**(8): p. 548-50.
89. Dourish, C.T., et al., *The selective CCK-B receptor antagonist L-365,260 enhances morphine analgesia and prevents morphine tolerance in the rat*. Eur J Pharmacol, 1990. **176**(1): p. 35-44.
90. Naveilhan, P., et al., *Distinct roles of the Y1 and Y2 receptors on neuropeptide Y-induced sensitization to sedation*. J Neurochem, 2001. **78**(6): p. 1201-7.

91. Maier, S.F., R.C. Drugan, and J.W. Grau, *Controllability, coping behavior, and stress-induced analgesia in the rat*. Pain, 1982. **12**(1): p. 47-56.
92. Pick, C.G., et al., *Genetic influences in opioid analgesic sensitivity in mice*. Brain Res, 1991. **566**(1-2): p. 295-8.
93. van Gaalen, M.M. and T. Steckler, *Behavioural analysis of four mouse strains in an anxiety test battery*. Behav Brain Res, 2000. **115**(1): p. 95-106.
94. Wiesenfeld-Hallin, Z., et al., *PD134308, a selective antagonist of cholecystinin type B receptor, enhances the analgesic effect of morphine and synergistically interacts with intrathecal galanin to depress spinal nociceptive reflexes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 7105-9.
95. Singh, G., *Recent considerations in nonsteroidal anti-inflammatory drug gastropathy*. Am J Med, 1998. **105**(1b): p. 31s-38s.
96. Liu, W., et al., *Role of neutrophil elastase in stress-induced gastric mucosal injury in rats*. J Lab Clin Med, 1998. **132**(5): p. 432-9.
97. Jain, N.K., S.K. Kulkarni, and A. Singh, *Modulation of NSAID-induced antinociceptive and anti-inflammatory effects by alpha2-adrenoceptor agonists with gastroprotective effects*. Life Sci, 2002. **70**(24): p. 2857-69.
98. Sánchez, S., et al., *Gastrointestinal tolerability of metamizol, acetaminophen, and diclofenac in subchronic treatment in rats*. Dig Dis Sci, 2002. **47**(12): p. 2791-8.
99. Naidu, P.S., et al., *Synergy between enzyme inhibitors of fatty acid amide hydrolase and cyclooxygenase in visceral nociception*. J Pharmacol Exp Ther, 2009. **329**(1): p. 48-56.
100. Kinsey, S.G., et al., *Inhibition of monoacylglycerol lipase attenuates nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastric hemorrhages in mice*. J Pharmacol Exp Ther, 2011. **338**(3): p. 795-802.
101. Mucha, A., P. Kafarski, and Ł. Berlicki, *Remarkable potential of the α -aminophosphonate/phosphinate structural motif in medicinal chemistry*. J Med Chem, 2011. **54**(17): p. 5955-80.
102. Naydenova, E.D., P.T. Todorov, and K.D. Troev, *Recent synthesis of aminophosphonic acids as potential biological importance*. Amino Acids, 2010. **38**(1): p. 23-30.
103. Huang, X., et al., *Synthesis, mechanisms of action, and toxicity of novel aminophosphonates derivatives conjugated irinotecan in vitro and in vivo as potent antitumor agents*. Eur J Med Chem, 2020. **189**: p. 112067.
104. Ouahrouch, A., et al., *Design, Synthesis, and Antiviral Activity of Novel Ribonucleosides of 1,2,3-Triazolylbenzyl-aminophosphonates*. Arch Pharm (Weinheim), 2016. **349**(1): p. 30-41.
105. Wang, Q., et al., *Synthesis, X-ray crystal structure, DNA/protein binding and cytotoxicity studies of five α -aminophosphonate N-derivatives*. Bioorganic chemistry, 2016. **69**: p. 132-139.
106. Elsherbiny, D.A., et al., *Synthesis, antimicrobial activity, and sustainable release of novel α -aminophosphonate derivatives loaded carrageenan cryogel*. Int J Biol Macromol, 2020. **163**: p. 96-107.
107. Kunda, U.M.R., et al., *Efficient Synthesis of α -Aminophosphonates and Evaluation of Significance of P=O Group Towards Antioxidant Activity*. Phosphorus Sulfur and Silicon and the Related Elements, 2014. **190**.

108. Dake, S.A., et al., *Ionic liquid promoted synthesis, antibacterial and in vitro antiproliferative activity of novel α -aminophosphonate derivatives*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2011. **21**(8): p. 2527-32.
109. Alotaibi, S.H. and H.H. Amer, *Synthesis, spectroscopic and molecular docking studies on new schiff bases, nucleosides and α -aminophosphonate derivatives as antibacterial agents*. *Saudi J Biol Sci*, 2020. **27**(12): p. 3481-3488.
110. Abdou, W.M., R.F. Barghash, and M.S. Bekheit, *Carbodiimides in the synthesis of enamino- and α -aminophosphonates as peptidomimetics of analgesic/antiinflammatory and anticancer agents*. *Arch Pharm (Weinheim)*, 2012. **345**(11): p. 884-95.
111. Devarayan, K., et al., *Effect of Microgravity on Fungistatic Activity of an α -Aminophosphonate Chitosan Derivative against *Aspergillus niger**. *PLoS One*, 2015. **10**(10): p. e0139303.
112. Schmutz, M., et al., *The competitive NMDA receptor antagonists CGP 37849 and CGP 39551 are potent, orally-active anticonvulsants in rodents*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1990. **342**(1): p. 61-6.
113. Shaikh, S., et al., *Synthesis of carbazole based α -aminophosphonate derivatives: design, molecular docking and in vitro cholinesterase activity*. *J Biomol Struct Dyn*, 2020: p. 1-23.
114. Ewies, E.F., et al., *Design, synthesis and biological evaluation of novel α -aminophosphonate oxadiazoles via optimized iron triflate catalyzed reaction as apoptotic inducers*. *Eur J Med Chem*, 2019. **180**: p. 310-320.
115. Liu, J.Z., et al., *Synthesis and in vitro study of pseudo-peptide thioureas containing α -aminophosphonate moiety as potential antitumor agents*. *Eur J Med Chem*, 2010. **45**(11): p. 5108-12.
116. Huang, K.B., et al., *An aminophosphonate ester ligand-containing platinum(ii) complex induces potent immunogenic cell death in vitro and elicits effective anti-tumour immune responses in vivo*. *Chem Commun (Camb)*, 2019. **55**(87): p. 13066-13069.
117. Sudileti, M., et al., *Green synthesis, molecular docking, anti-oxidant and anti-inflammatory activities of α -aminophosphonates*. *Medicinal Chemistry Research*, 2019. **28**.
118. Damiche, R. and S. Chafaa, *Synthesis of new bioactive aminophosphonates and study of their antioxidant, anti-inflammatory and antibacterial activities as well the assessment of their toxicological activity*. *Journal of Molecular Structure*, 2017. **1130**: p. 1009-1017.
119. Sujatha, B., et al., *Microwave-assisted synthesis and anti-inflammatory activity evaluation of some novel α -aminophosphonates*. *Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements*, 2017. **192**(10): p. 1110-1113.
120. Trela, Z., H. Kleszczyńska, and J. Sarapuk, *Physiological and hemolytic toxicity of some aminophosphonates*. *Z Naturforsch C J Biosci*, 2001. **56**(9-10): p. 838-42.
121. Kleszczyńska, H., J. Sarapuk, and D. Bonarska, *The hemolytic toxicity of some new aminophosphonates*. *Cell Mol Biol Lett*, 2001. **6**(2a): p. 271-5.

122. Abdel-Megeed, M.F., et al., *Synthesis and antimicrobial activities of a novel series of heterocyclic alpha-aminophosphonates*. Arch Pharm (Weinheim), 2012. **345**(10): p. 784-9.
123. Abdel-Megeed, M.F., et al., *Synthesis and antimicrobial activities of a novel series of heterocyclic α -aminophosphonates*. Arch Pharm (Weinheim), 2012. **345**(10): p. 784-9.
124. Huang, X.C., et al., *Synthesis and antitumor activities of novel α -aminophosphonates dehydroabiatic acid derivatives*. Bioorg Med Chem Lett, 2013. **23**(19): p. 5283-9.
125. Ye, M.Y., et al., *Synthesis and antitumor activities of novel α -aminophosphonate derivatives containing an alizarin moiety*. Eur J Med Chem, 2014. **83**: p. 116-28.
126. Gu, L. and C. Jin, *Synthesis and antitumor activity of α -aminophosphonates containing thiazole[5,4-b]pyridine moiety*. Org Biomol Chem, 2012. **10**(35): p. 7098-102.
127. Huang, K.-B., et al., *An aminophosphonate ester ligand-containing platinum (II) complex induces potent immunogenic cell death in vitro and elicits effective anti-tumour immune responses in vivo*. 2019. **55**(87): p. 13066-13069.
128. Pierré, A., et al., *Preclinical Antitumor Activity of a New Vinca Alkaloid Derivative, S 12363*. Cancer Research, 1991. **51**(9): p. 2312-2318.
129. Ings, R.M., et al., *Value of early pharmacodynamic and pharmacokinetic investigations with anticancer drugs: data from phase I tolerance studies on a new vinca alkaloid derivative*. Xenobiotica, 1992. **22**(7): p. 871-80.
130. Adenis, A., et al., *Phase II study of a new vinca alkaloid derivative, S12363, in advanced breast cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 1995. **35**(6): p. 527-8.
131. Kraicheva, I., et al., *Synthesis, antiproliferative activity and genotoxicity of novel anthracene-containing aminophosphonates and a new anthracene-derived Schiff base*. Bioorg Med Chem, 2012. **20**(1): p. 117-24.
132. Lewkowski, J., et al., *Synthesis, fluorescence properties and the promising cytotoxicity of pyrene-derived aminophosphonates*. Beilstein J Org Chem, 2016. **12**: p. 1229-35.
133. Tiwari, S.V., et al., *New 2-Oxoindolin Phosphonates as Novel Agents to Treat Cancer: A Green Synthesis and Molecular Modeling*. Molecules, 2018. **23**(8).
134. Ewies, E.F., et al., *Design, synthesis and biological evaluation of novel alpha-aminophosphonate oxadiazoles via optimized iron triflate catalyzed reaction as apoptotic inducers*. Eur J Med Chem, 2019. **180**: p. 310-320.
135. Aita, S., et al., *Novel alpha-Aminophosphonates of imatinib Intermediate: Synthesis, anticancer Activity, human Abl tyrosine kinase Inhibition, ADME and toxicity prediction*. Bioorg Chem, 2021. **109**: p. 104718.
136. Chen, Y.Y., et al., *Design and synthesis of novel 20(S)-alpha-aminophosphonate derivatives of camptothecin as potent antitumor agents*. Bioorg Chem, 2021. **114**: p. 105065.
137. Shaikh, S., et al., *Design, synthesis and evaluation of pyrazole bearing alpha-aminophosphonate derivatives as potential acetylcholinesterase inhibitors against Alzheimer's disease*. Bioorg Chem, 2020. **96**: p. 103589.

138. NOM, *Especificaciones técnicas para la producción , cuidado y uso de los animales de laboratorio*. in *DOF*, 1999.
139. Kukhar', V.P., *Aminophosphonic and aminophosphinic acids : chemistry and biological activity*. 2000.
140. Meldrum, B.S., *Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology*. *J Nutr*, 2000. **130**(4S Suppl): p. 1007s-15s.
141. Jacquet, P., et al., [*Organophosphorus poisoning: Towards enzymatic treatments*]. *Ann Pharm Fr*, 2019. **77**(5): p. 349-362.



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 12 de diciembre de 2022.

Dra. Graciela Jiménez Santana
Encargada de Despacho de la
Dirección de la Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Evaluación *in vivo* de la dosis letal 50 de nuevos α -aminofosfonatos**”, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Eduardo Marco Antonio Reynoso Ríos. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dra. Gabriela Castañeda Corral

Calle Leñeros esquina Iztacchuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos, México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL | Fecha:2022-12-13 16:01:37 | Firmante
JTdTYEi7KbvNPPmrkZLjIkfBJnzh4Q3jOpQ2hLLEi81z71aACly7lx7SI2oaqKI6TmYQW42vF8QWWwYfiS49RIHSJgoZozZvrlbvijQn0ZShTkt03XeHcplmut7135RkyUYDOapqf
dyV19ELXWhHG1/b7BE39ejdWotKB/gglANLI2WLV5P/TQ3vM5eVM3b3+0HSfRXPZGWT59b6/6LinnzReKRisB2IFAVq/bYuTnFZBQV/Weft0bmABITFVQ6lykdqU4aOdVgPNC4
buK2eW9WBDO5mHj1BFPW1hNDpPKHj1jBIC1L1IM2xK611ZcPeyZvOUVWAJz9S6xw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



b0t0e5IEh

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/j5pGUcid9krLF4Ww7BS2p3uCRRcF3JS>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA

Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 12 de diciembre de 2022.

Dra. Graciela Jiménez Santana
Encargada de Despacho de la
Dirección de la Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Evaluación *in vivo* de la dosis letal 50 de nuevos α -aminofosfonatos**”, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Eduardo Marco Antonio Reynoso Ríos. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Juan José Acevedo Fernández

Calle Leñeros esquina Iztaccihuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx

**UA
EM**

Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2022-12-15 10:25:20 | Firmante
P83JYkctTn6MYpk2KMwsX8XIDLfhKSO1vdY0Z5fBkNcZRSs/mUjvB9wAjjZeKrE4tQRkES4t6Og38Lj3ZuTMveUK4iOj6Zpk1jhiquMAHhV3JB+JOssHI3VmYayu6vJEKstBam2pot
GFLnZRvUxggO8sGcyWb3OeX5GwLkz8iRD9n2dRkxTDaZZxvJ9Dm5uTecB1kuYeYWKeb8tKBatApNjvBu+hqF2+C0jF09gGhTQyqawsUvZRWRDka/LhKr2tZPhNPTyYQJkLZ
Y6LHzyb0AYvVLZ3JO2XoBoPv2Qz32ipG4Ay8bnFZQfD4nBnwK5/noo4oYJqLVXQYh5DC6Q==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



[QZjDrqliF](#)

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/yBoH33gDbrFdLXWdgsazoH9gGcMq3Zhn>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



FACULTAD DE MEDICINA
Secretaría de Investigación

Coordinación General de Posgrado

Cuernavaca, Mor., 12 de diciembre de 2022.

Dra. Graciela Jiménez Santana
Encargada de Despacho de la
Dirección de la Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “Evaluación *in vivo* de la dosis letal 50 de nuevos α -aminofosfonatos”, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Eduardo Marco Antonio Reynoso Ríos. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Ivan Omar Romero Estudillo

Calle Leñeros esquina Iztacchuatl s/n Col. Volcanes. C.P. 62350. Cuernavaca, Morelos. México.
Tel. (777)3 29-3473 • jefatura_posgrado.medicina@uaem.mx



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

IVAN OMAR ROMERO ESTUDILLO | Fecha:2022-12-13 15:26:08 | Firmante
BhBbejeCtnEyyC9PXtEIlk8fb0SquOY2iu6Uxwzm8N57NnsQ7K+IH+07HVyhC5F2zKQ7WSZTcCDmzXijxouQ/Mp8Bw1cF+3Sepo3utG196HsH6Ju0WZQHUEUmYUh3XQ4k70Jef
oMHDFTLTmMHx3VKrFDV/mpukhsJWMMohFTTfSnlaQFFI4DkSlxe7/Ssu2k+71HGItSOg5dVtEAlsXUXgbbTIFQxBp4mhLgKplf3uSWOtxN7uQcgbZgchqDLCE4+dw8v/q2r
Zpxluuv9ZEV2arzYQp0YFBpKa3lxx0TnLl8FcJk/mljiwe8oM87f6nOk0YRxorAATSpEQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



dGUnktewK

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/QF0qdPdsMYLlBjYSIRBTaaa5aALRy7N>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023



Cuernavaca, Mor., 12 de diciembre de 2022.

Dra. Graciela Jiménez Santana
Encargada de Despacho de la
Dirección de la Facultad de Medicina
P r e s e n t e:

Estimada Dra. Jiménez, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis “**Evaluación *in vivo* de la dosis letal 50 de nuevos α -aminofosfonatos**”, que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno Eduardo Marco Antonio Reynoso Ríos. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 75 del Reglamento General de Estudios de Posgrado de la UAEM le otorgo el siguiente dictamen:

I. Se aprueba el trabajo de tesis otorgando el voto correspondiente.

Así mismo, le agradezco la invitación a participar en este programa educativo, reiterando además mi disposición para seguir colaborando en este tipo de actividades. Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

A t e n t a m e n t e

Dr. Pablo Noé Nuñez Aragón



Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

Sello electrónico

JUAN JOSE ACEVEDO FERNANDEZ | Fecha:2022-12-13 16:19:19 | Firmante
UPUavxOo557nOG28bCRE9AfUo9n34vI04P7G3I3mwVfS21u4sP5eO1HYNrXlbgqCf5uJyyOM+yuLYVtb8oZQ8tqQPmAx+28M9HLI2o9tMo7IM5pv7IY5LaUpokqSUheJDFfcWkt
yZLta01CqH6gqB5O6BmX3DhzVgL1hWY0IP0VdP9OW8AUhZrzKwQMC1vH91AT2+JX6C7bu0K7bRUmW1zYe1nbZeWZ4lFECyydxoY9M4uZgbehVFE9V/tzObhqL17p21cr70
ZiHFpnNk/1HJV34jI2Fh1MhI0sUizIVQXqP771xND9oTJ4JdE+XUJF2Vziz6WQbxiAFgw==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



oR3SwAIK

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/poqomiHL6qaWl18ctuCCC1CFA8q4hA3pH>



Una universidad de excelencia

RECTORÍA
2017-2023