



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

---

---

**FACULTAD DE MEDICINA**

SECRETARIA DE DOCENCIA

JEFATURA DE POSGRADO

Evaluación del efecto anti-inflamatorio y  
toxicidad aguda de nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos

**TESIS**

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN:

**MEDICINA MOLECULAR**

PRESENTA:

**LIC. FARMACIA MISAEL LOPEZ CASTILLO**

DIRECTORA DE TESIS

**DRA. GABRIELA CASTAÑEDA CORRAL**

CUERNAVACA, MORELOS MEXICO

MAYO DE 2019

El presente proyecto se realizó en el Laboratorio de Farmacología de la Facultad de Medicina perteneciente a la Universidad Autónoma del Estado de Morelos de enero de 2017 a mayo de 2019.

### **Miembros del comité tutorial**

Tutor principal: Dra. Gabriela Castañeda Corral

Tutor personal: Dr. Juan José Acevedo Fernández

1° Vocal: Dr. Mario Ordoñez Palacios

2° Vocal: Dr. José Luis Viveros Ceballos

3° Vocal: Jesús Santa Olalla Tapia

### **Miembros del jurado de examen**

Presidente: Dr. Jesús Santa Olalla Tapia

Secretario: Dr. Juan José Acevedo Fernández

1° Vocal: Dr. Alejandro Zamilpa Álvarez

2° Vocal: Dr. Iván Omar Romero Estudillo

3° Vocal: Dra. Gabriela Castañeda Corral

## AGRADECIMIENTOS

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACyT) POR LA BECA DE MAESTRÍA OTORGADA A MISAEL LÓPEZ CASTILLO CON NÚMERO DE REGISTRO: **622403**

A LA BECA DE MOVILIDAD DEL **PROGRAMA DE FORTALECIMIENTO DE LA CALIDAD EDUCATIVA 2017**; OTORGADA PARA LA ESTANCIA DE INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO DE NEUROBIOLOGÍA DEL DOLOR A CARGO DEL DR. VINICIO GRANADOS SOTO, DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOBIOLOGÍA DEL CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL. (CINVESTAV, SEDE SUR) LLEVADA A CABO EN LA CIUDAD DE MÉXICO DEL 22 DE OCTUBRE AL 8 DE NOVIEMBRE DE 2017.

Y POR LOS APOYOS ECONÓMICOS A LOS PROYECTOS CON NUMERO **248868 Y 807**, QUE FINANCIARON PARTE DE ESTE TRABAJO.

## ÍNDICE

Agradecimientos .....	II
i índice de figuras .....	V
ii. Índice de tablas .....	IX
iii. Abreviaturas .....	X
iv. Resumen .....	XII
1. Introducción.....	1
1.1. Inflamación.....	1
1.2. Mediadores inflamatorios .....	3
1.2.1. Citocinas .....	3
1.2.2. Aminas vasoactivas .....	4
1.2.3. Proteasas plasmáticas.....	5
1.2.5. Óxido nítrico.....	8
1.2.6. Sustancia p .....	8
1.3. Células de la respuesta inmune.....	9
1.3.1. Macrófagos .....	9
1.3.2. Neutrófilos .....	11
1.3.3. Células cebadas.....	13
1.3.4. Resolución de la inflamación .....	13
1.4. Enfermedades inflamatorias .....	14
1.4.1. Enfermedades inflamatorias cutáneas.....	14
1.4.1.1. Dermatitis atópica.....	14
1.4.1.2. Dermatitis por contacto .....	15
1.4.1.3. Psoriasis .....	15
1.5. Tratamiento farmacológico de la inflamación.....	16
1.5.1. Analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos.....	16
1.5.2. Glucocorticoides.....	19
1.6. Efectos adversos de los tratamientos actuales .....	19
1.7. Desarrollo de nuevos fármacos.....	20
1.7.1. Etapas de desarrollo e investigación de un medicamento .....	21
1.8. Toxicidad .....	26
1.8.1. Toxicidad aguda .....	28
1.8.2. Métodos para determinar la dl <sub>50</sub> .....	29
1.9. A-aminofosfonatos .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.9.1. La importancia de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos en el desarrollo de nuevos fármacos.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.9.2. Potencial biológico de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.9.3. Efecto de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos en la inflamación.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.9.4. Toxicidad de los $\alpha$ -aminofosfonatos .....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.9.5. Propiedades farmacocinéticas de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
1.9.6. Nuevos $\alpha$ -aminofosfonatos.....	<b>¡Error! Marcador no definido.</b>
2. Justificación .....	<b>¡ERROR! MARCADOR NO DEFINIDO.</b>
3. Hipótesis .....	46
4. Objetivo general .....	46

4.1. Objetivos particulares .....	46
5. Materiales y métodos.....	47
5.1. Animales.....	47
5.2. Fármacos.....	47
5.3. Modelo de inflamación auricular aguda inducida por tpa .....	49
5.3.1. Curva dosis-respuesta .....	50
5.4. Cuantificación de células inmunes en muestras de sangre periférica.....	52
5.4.1. Tinción de wright .....	52
5.4.2. Cuantificación de células inmunes .....	53
5.5. Prueba de toxicidad aguda: determinación de la dosis letal 50 .....	53
5.6. Análisis estadístico .....	56
6. Resultados.....	57
6.1. Caracterización del curso temporal de la inflamación auricular inducida por tpa .....	57
6.2. Evaluación del efecto anti-inflamatorio de los nuevos $\alpha$ -aminofosfonatos.....	59
6.3. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de los aminofosfonatos más activos...	65
6.4. Evaluación de la toxicidad aguda .....	68
7. Discusión .....	71
7.1. Caracterización del curso temporal de la inflamación auricular inducida por tpa .....	71
7.2. Evaluación del efecto anti-inflamatorio de los nuevos $\alpha$ -aminofosfonatos.....	71
7.3. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de los aminofosfonatos más activos...	73
7.4. Evaluación de la toxicidad aguda .....	74
8. Conclusiones.....	75
9. Perspectivas .....	76
10. Bibliografía.....	77

## I Índice de figuras

Figura 1. Eventos centrales de la inflamación aguda. Se observa que la lesión producida por un estímulo nocivo favorece la liberación de agentes vasoactivos y quimiotácticos que activan terminaciones nerviosas, lo que lleva al incremento de la permeabilidad de los capilares (vasodilatación) facilitando el reclutamiento de células del sistema inmune que fagocitan y liberan más mediadores inflamatorios que sostienen la respuesta. Estas iniciarán el proceso de reparación del tejido y combatirán a los patógenos presentes. (Modificado Julius et al, 2001).....	2
Figura 2. Síntesis de eicosanoides formados a partir del AA por la acción de las enzimas PLA2, COX, y LOX. Los recuadros amarillos presentan las diferentes enzimas involucradas en la síntesis de los diferentes eicosanoides de importancia clínica y los recuadros violetas los productos de estas. (Modificado de Dongjuan et al, 2014). .....	6
Figura 3. Proceso de diapédesis. Este proceso llamado diapédesis describe el paso de células (leucocitos, monocitos y neutrófilos) desde la sangre hacia tejidos dañados, a través de las paredes íntegras de los vasos sanguíneos (Modificado de Harper, Bioquímica ilustrada 3ra Ed). .....	10
Figura 4. Esquema general del neutrófilo segmentado. Se puede observar la forma multilobulada de su núcleo que sirve para su identificación, además de los gránulos que sirven para su función, estos contienen diferentes moléculas como proteasas, histamina y algunas aminas vasoactivas. ....	11
Figura 5. Etapas del desarrollo del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos. La investigación y el desarrollo de nuevos fármacos requieren esfuerzos coordinados de diversas ramas de la ciencia por lo que se requiere de un equipo multidisciplinario.....	23
Ilustración 6 Análogos isostéricos .....	31
Figura 7. Grupos químicos que contienen el andamiaje N-C-P en su estructura. ....	33
Figura 8. Estructuras representativas resultado de los trabajos de Abdou y colaboradores. Estas moléculas son derivados de fosfo-sustituidos heterocíclicos en el 2011 (panel A) y derivados de fósforo pirazol sustituidos en el 2012 (panel B) que demostraron tener actividad anti-inflamatoria en los modelos de edema intra-plantar inducido por carragenina .....	40
Figura 9. Estructura representativa de los compuestos derivados del $\alpha$ -etil- N- (fosfometil) glicina. Esta molécula es resultado del trabajo del grupo de Naydenova y cols. (2006) de efecto clastogénico y citotóxico moderados. ....	42
Figura 10. Estructura química del dimetil 2,4-dimetil-5H-1,3-oxazol-4-ylfosfonato. Los $\alpha$ -aminofosfonatos de este proyecto son análogos de esta molécula. ....	43
Figura 11. Reacción tri-componente para la obtención de los diferentes $\alpha$ -aminofosfonatos. A partir de acetoxiacetona y con diversas aminas alifáticas y dimetilfosfito en presencia de 10% de ácido fenilfosfónico, se obtuvieron los de la serie 1a-f (A) y de la serie 2a-c (B).....	44
Figura 12. Diseño experimental para determinar el efecto anti-inflamatorio de los nuevos análogos de $\alpha$ -aminofosfonatos. ....	50

Figura 13. Esquema representativo de la curva dosis-respuesta de dos compuestos hipotéticos A y B. Está marcada con líneas punteadas la posición de la dosis efectiva 50 (DE <sub>50</sub> ), con base en esto se puede decir que el compuesto A es más eficaz que el compuesto B dado que si alcanza el 100% de efecto; y que el compuesto A también es más potente que el B al 50% del efecto.....	51
Figura 14. Diseño experimental para la cuantificación de linfocitos monocitos y neutrófilos. Esta evaluación se llevó a cabo en sangre periférica de ratones con inflamación auricular inducida por TPA con o sin tratamiento con los $\alpha$ -aminofosfonatos. ....	53
Figura 15. Esquema de administración y seguimiento para determinar la DL <sub>50</sub> de los $\alpha$ -aminofosfonatos a través de la prueba límite de la OECD 425. Si cualquiera de los 5 ratones muere durante este proceso, inmediatamente se procede a realizar la prueba principal. ....	54
Figura 16. Método 425 ‘Up and Down’ de la OECD, para determinar la DL <sub>50</sub> de sustancias químicas. ....	56
Figura 17. Curso temporal de la inflamación auricular inducida por TPA. Se observa un incremento gradual de la inflamación que alcanza un máximo grado entre las 4 y 6 horas. Cada punto representa el promedio de 8 animales $\pm$ SEM. *P<0.05, ANOVA de dos vías, post test de Bonferroni con respecto al vehículo.....	57
Figura 18. Curva dosis-respuesta del efecto anti-inflamatorio de indometacina (A-B) y de metilprednisolona (C-D) en el modelo de edema auricular inducido por TPA. En el panel A y C los datos se presentan en porcentaje de inflamación, mientras que en B y D se expresan como porcentaje de inhibición del edema. Cada punto representa el promedio de 8 animales $\pm$ SEM. *P<0.05, ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos.....	58
Figura 19. Efecto anti-inflamatorio del compuesto 1a en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A: efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis respuesta del compuesto 1a. Notar que el efecto anti-inflamatorio del compuesto 1a es dependiente de la dosis. Cada punto representa el promedio de 8 animales $\pm$ SEM. *P<0.05, ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos.....	59
Figura 20. Efecto anti-inflamatorio del compuesto 1b en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A: efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto 1b. Notar que el efecto anti-inflamatorio del compuesto 1b no es dependiente de la dosis. Cada punto representa el promedio de 8 animales $\pm$ SEM. *P<0.05, ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto a TPA de los tratamientos.....	60
Figura 21. Efecto anti-inflamatorio del compuesto 1c en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A: efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto 1c. Cada punto representa el promedio de 6-8 animales $\pm$ SEM. *P<0.05, ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos. ....	61
Figura 22. Efecto anti-inflamatorio del compuesto 1d en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A. efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto 1d. Cada	

punto representa el promedio de 6-8 animales $\pm$ SEM. *P<0.05, ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos. ....	61
<b>Figura 23. Efecto anti-inflamatorio del compuesto 1e en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A. efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto 1e. Cada punto representa el promedio de 8 animales <math>\pm</math> SEM. *P&lt;0.05, ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos. ....</b>	<b>62</b>
<b>Figura 24. Efecto anti-inflamatorio del compuesto 1f en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A. efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto 1f. Cada punto representa el promedio de 6-8 animales <math>\pm</math> SEM. *P&lt;0.05, ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos. ....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 25. Efecto anti-inflamatorio del compuesto 2a en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A. efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto 2a. Cada punto representa el promedio de 6-8 animales <math>\pm</math> SEM. *P&lt;0.05, ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos. ....</b>	<b>63</b>
<b>Figura 26. Efecto anti-inflamatorio del compuesto 2b en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A. efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto 2b. Notar que el efecto anti-inflamatorio del compuesto 2b es dependiente de la dosis y que es equiefectivo en comparación con indometacina. Cada punto representa el promedio de 6-8 animales <math>\pm</math> SEM. *P&lt;0.05, ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos. ..</b>	<b>64</b>
<b>Figura 27. Efecto anti-inflamatorio del compuesto 2c en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A. efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto 2c. Cada punto representa el promedio de 6-8 animales <math>\pm</math> SEM. *P&lt;0.05, ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos. ....</b>	<b>64</b>
<b>Figura 28. Efecto anti-inflamatorio del Compuesto 3 en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto 3. El efecto anti-inflamatorio del compuesto 3 no es dependiente de la dosis en comparación con indometacina. Cada punto representa el promedio de 6-8 animales <math>\pm</math> SEM. *P&lt;0.05, ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos. ....</b>	<b>65</b>
<b>Figura 29. Cambio en la aparición de monocitos, neutrófilos y linfocitos en sangre periférica obtenida del seno retro orbital, post-tratamiento con TPA y los nuevos <math>\alpha</math>-aminofosfonatos. Curso temporal del promedio de células encontradas a lo largo del experimento(A, C y E); área bajo la curva de la aparición de las diferentes células durante 4 horas post tratamiento con TPA más los compuestos 1a, 1c, 1d y 1f; (B, D y F). *P&lt;0.05, ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos y con respecto al TPA.....</b>	<b>67</b>
<b>Figura 30. Curso temporal del aumento del edema inducido por TPA y el efecto anti-inflamatorio del tratamiento con los diferentes compuestos expresados en porcentaje. Los nuevos <math>\alpha</math>-aminofosfonatos evitan la aparición del edema durante al menos las 4 horas de la duración del experimento.....</b>	<b>68</b>



## II. Índice de tablas

<b>Tabla 1. Mecanismos mediante los cuales los neutrófilos detienen y eliminan bacterias y otros estímulos nocivos (modificado de Kolaczowska et al, 2013).</b> .....	<b>12</b>
<b>Tabla 2. Propiedades generales de los AINEs.</b> .....	<b>18</b>
<b>Tabla 3. Fases clínicas del desarrollo de un medicamento.</b> .....	<b>24</b>
<b>Tabla 4. Factores que condicionan la toxicidad de una sustancia.</b> .....	<b>27</b>
<b>Tabla 5. Criterios de clasificación del grado de toxicidad de una sustancia con base en su DL50 según al OECD.</b> .....	<b>29</b>
<b>Tabla 6. Características estructurales y electrónicas del andamiaje C-N-P.</b> .....	<b>32</b>
<b>Tabla 7. Actividades biológicas reportadas para los aminofosfonatos.</b> .....	<b>34</b>
<b>Tabla 8. Actividades biológicas reportadas para los aminofosfonatos (continuación).</b> .....	<b>35</b>
<b>Tabla 9. Actividades biológicas reportadas para los aminofosfonatos (continuación).</b> .....	<b>36</b>
<b>Tabla 10. Actividades biológicas reportadas para los aminofosfonatos (continuación).</b> .....	<b>37</b>
<b>Tabla 11. Enzimas que pueden ser inhibidas por <math>\alpha</math>-aminofosfonatos y tipo de inhibición. Modificado de Mucha y cols. 2011.</b> .....	<b>38</b>
<b>Tabla 12 Enzimas que pueden ser inhibidas por <math>\alpha</math>-aminofosfonatos y tipo de inhibición. Modificado de Mucha y cols. 2011. (continuación)</b> .....	<b>39</b>
<b>Tabla 13. Inhibición de proteasas de serina de neutrófilos por sondas basadas en <math>\alpha</math>-aminofosfonatos. Modificado de Grzywa y cols. 2014.</b> .....	<b>41</b>
<b>Tabla 14. Estructura de los <math>\alpha</math>-aminofosfonatos donados por el Dr. Mario Ordoñez del CIQ de la UAEM. Se presenta su estructura, nombre químico y clave.</b> .....	<b>48</b>
<b>Tabla 11. Resumen de la eficacia y potencia de los nuevos <math>\alpha</math>-aminofosfonatos evaluados en el modelo de inflamación auricular aguda inducida por TPA. *P&lt;0.05, ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al control con indometacina.</b> .....	<b>65</b>
<b>Tabla 12. Valores obtenidos de la DL<sub>50</sub> expresados en mg/kg de peso de la serie 1 de los <math>\alpha</math>-aminofosfonatos, calculado través de la prueba principal o de la prueba limite.</b> .....	<b>69</b>
<b>Tabla 13. Resultados de las pruebas de toxicidad aguda; cambio en el peso y síntomas de toxicidad observados de administraciones de dosis de 2000 mg/kg de los compuestos 1a, 1c, 1d y 1f. Se muestra la incidencia (de un total de 5 animales) de los diferentes síntomas de toxicidad aguda medidos durante el ensayo; agrupadas en general, coordinación motora, sistema nervioso central (CNC) y comportamiento social (marcado en gris: 1 o más animales lo padecieron, blanco: ningún animal lo padeció).</b> .....	<b>70</b>

### III. Abreviaturas

μM	micro Molar
5-HT	Serotonina
AA	Ácido Araquidónico
ABC	Área bajo la curva
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AINEs	Anti-inflamatorios no esteroideos
AR	Artritis reumatoide
BF	Bifosfonatos
BLT	Receptor 1 de Leucotrieno B
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (MEX)
COX	Ciclooxigenasa
CPMP	Comité de especialidades farmacéuticas de la comunidad europea
Cys LTs	Receptor 1 de cisteínil Leucotrieno
DA	Dermatitis atópica
DAMP'S	Moléculas asociadas a daño
DC	Células dendríticas
DE <sub>50</sub>	Dosis efectiva 50
EMEA	Europa, medio oriente y Asia
EtOH	Etanol
EEUU	Estados Unidos de América
FDA	Administración de alimentos y fármacos (Estados Unidos)
FPP	Farnesil pirofosfato
GC	Glucocorticoides
GCP	Buenas Prácticas clínicas
GCR	Receptor de glucocorticoides
HETE	Ácido hidroxieicosatetraenoico
HPETE	Ácido hidroperoxieicosatetraenoico
ICH	Congreso Internacional de Armonización
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-17	Interleucina 17
IL-23	Interleucina 23
IFN	Interferón
LOX	Lipooxigenasa
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B 4
LT's	Leucotrienos
G-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos
GM-CSF	Factor estimulador de colonias de macrófagos
mL	Mililitro
MMP	Metaloproteasa de matriz

NET's	Trampas extracelulares de neutrófilos
NFκB	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
NK	Natural killers
NK1	Neurocinina 1
NO	Óxido nítrico
SNOe	Sintasa de Óxido nítrico endotelial
SNOi	Sintasa de Óxido nítrico inducible
SONn	Sintasa de Óxido nítrico neuronal
SNO	Óxido nítrico sintasa
OECD	Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico
PAMP's	Patrones asociados a daño
PKC	Proteína cinasa C
PGE2	Prostaglandina E2
PGHs	Prostaglandina H sintasa
PG's	Prostaglandinas
PLA2	Fosfolipasa A2
PMN	Polimorfonucleares
PPAR γ	Receptor gamma activado por el proliferador de peroxisoma
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SP	Sustancia P
TNF-α	Factor de necrosis tumoral alfa
TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate
TGF	Factor de crecimiento transformante
TX's	Tromboxanos

## IV. Resumen

La inflamación es la respuesta del organismo frente a estímulos nocivos de diversa naturaleza, cuyo objetivo es eliminar cualquier posible agente dañino y la reparación del tejido, siendo crucial en la defensa del huésped ante el medio externo. Actualmente existe una gran diversidad de enfermedades inflamatorias que afectan a un porcentaje importante de la población. La terapéutica actual de la inflamación incluye fármacos como los AINEs y los glucocorticoides. Ambos inhiben directa o indirectamente la producción de mediadores pro-inflamatorios disminuyendo significativamente los síntomas del proceso inflamatorio. Sin embargo, estos fármacos poseen diversos efectos adversos que empeoran al ser administrados por largos periodos de tiempo. Además, no curan ni detienen el progreso de la enfermedad inflamatoria que se esté tratando. Sin embargo, está bien documentado que si se controlan los síntomas cardinales de la inflamación, se logra un mejor control de la enfermedad lo que conlleva a una mejora en la calidad de vida del paciente. Lo anterior pone de manifiesto la necesidad de buscar nuevos fármacos anti-inflamatorios más eficaces y con un perfil de seguridad alto. Los  $\alpha$ -aminofosfonatos son una familia de compuestos químicos diversos, con un alto potencial biológico y a los que se les ha demostrado diversas actividades biológicas que incluyen la antibacteriana, antiviral, neuroprotectora y antitumoral. Además, el análisis estructural con programas computacionales sugiere un buen potencial como agentes anti-inflamatorios e inmunomoduladores. Lo anterior los convierte en una alternativa potencial para el tratamiento de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios. En este sentido el grupo de investigación del Dr. Mario Ordoñez del Centro de la UAEM se sintetizaron 10 nuevos análogos de  $\alpha$ -aminofosfonatos a través de una reacción de un solo paso. En el presente proyecto se evaluó el potencial antiinflamatorio de estos compuestos utilizando el modelo de inflamación auricular aguda inducida por TPA, así como su capacidad para modificar el número de células inmunes presentes en sangre periférica. Adicionalmente, se evaluó su toxicidad aguda, con el método 425 ‘‘Up and Down’’ de la OECD, en un esfuerzo de identificar a los más prometedores en cuanto a su eficacia y seguridad. Los resultados mostraron que todos los compuestos preparados tienen actividad anti-inflamatoria significativa, siendo los compuestos 1a, 1c, 1d, 1f, 2b y 2c los más prometedores, en términos de eficacia máxima (más del 95% de efecto anti-inflamatorio), potencia (rango DE<sub>50</sub> entre 0.7 y 10.1 mg / oreja) y potencia relativa (rango de 0.04 a 0.67). Los compuestos 1a, 1c, 1d y 1f disminuyen significativamente el número de neutrófilos (rango de 46.7 a 63.0%) y monocitos (18.9–34.1%) y aumentan el número de linfocitos (rango de 20 a 98%) en muestras de sangre del seno retro-orbital. Además, los compuestos 1a-f mostraron ser inofensivos cuando se administran a dosis menores de 2000 mg/Kg (DL<sub>50</sub> de >2000 mg / kg), a su vez que no mostraron efectos adversos graves. En conjunto, estos resultados en conjunto sugieren que los  $\alpha$ -aminofosfonatos son candidatos potenciales para el tratamiento de la inflamación aguda.

# 1. Introducción

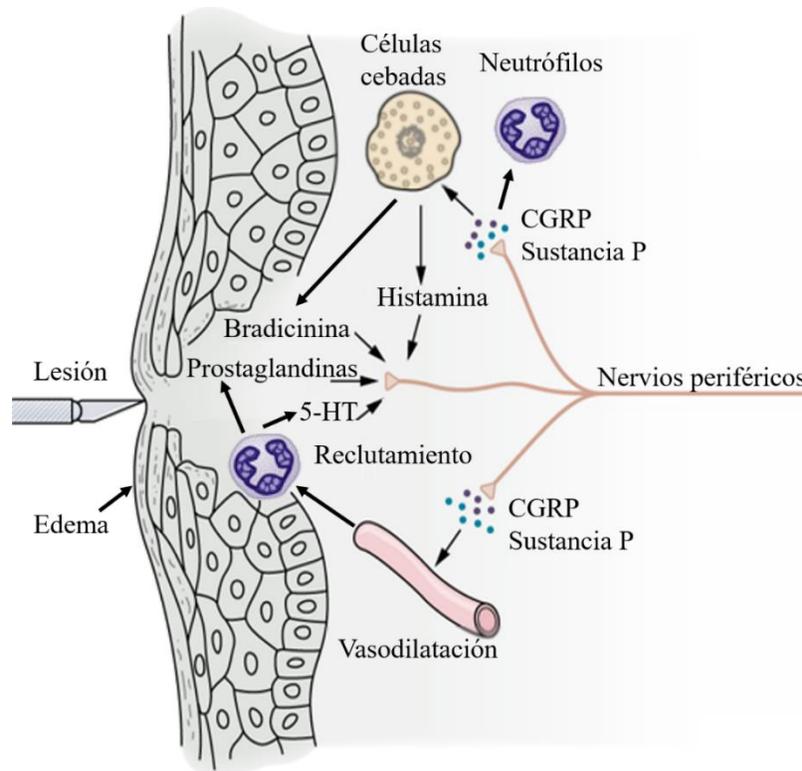
## 1.1. Inflamación

La inflamación es la respuesta del organismo frente a un estímulo nocivo de diversa naturaleza, su objetivo es la eliminación del agente causal y la reparación del tejido, siendo crucial en la defensa del huésped ante el medio externo [1]. Como cualquier respuesta inmune, se desencadena ante la detección de estímulos nocivos, a través de la detección de patrones moleculares asociados a daños (DAMP's) o de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP's) [2]. Estos estímulos, que pueden ser exógenos o endógenos, son detectados por “sensores celulares” que incluyen a las células que conforman el tejido, células inmunitarias y terminaciones nerviosas cercanas a la zona del daño. Posteriormente, mediante una correcta coordinación de todas éstas células se logrará 1) la eliminación de los estímulos o señales que los activaron, 2) la reparación de las zonas que sufrieron daños y 3) la resolución del proceso inflamatorio [3]. Los estímulos nocivos exógenos incluyen microorganismos y estímulos nocivos de naturaleza química, eléctrica o mecánica que pueden generar una infección o un daño tisular, respectivamente. Mientras que los estímulos endógenos más comunes son sintetizados y/o liberados por las células como resultado de un daño tisular, muerte celular, necrosis y/o alteración del metabolismo. [4].

Las características generales de una reacción inflamatoria localizada y aguda se conocen desde inicios de la humanidad, pero fueron descritas formalmente por primera vez hace casi 2000 años, en el siglo II d. C, por los romanos. Estas fueron denominadas como signos cardinales de la inflamación e incluyen: tumefacción (del latín “tumor”), enrojecimiento (rubor), calor, dolor y pérdida de la función. Estos signos tienen origen en los mecanismos moleculares propios del proceso inflamatorio: cuando aparece un estímulo nocivo, inmediatamente aumenta el diámetro de los vasos sanguíneos (vasodilatación) que conduce a un incremento del volumen sanguíneo en la zona (tumefacción), un mayor volumen de sangre favorece el incremento de la temperatura del tejido y lo hace enrojecer (rubor y calor). Durante la vasodilatación se escapa líquido desde los vasos sanguíneos, en particular en las vénulas, esto da como resultado la acumulación de líquido que expande el tejido [5]. Posteriormente, células del sistema inmune como neutrófilos, linfocitos y monocitos se unen al tejido endotelial y atraviesan las paredes de los capilares para ingresar en los espacios

tisulares, en un proceso llamado extravasación. Estas células cumplirán sus funciones de defensa como son fagocitosis, producción de anticuerpos, citotoxicidad y memoria inmunitaria (figura 1) [6].

La inflamación puede clasificarse de acuerdo a su duración en inflamación aguda que se caracteriza por ser auto-limitada y que llega a una resolución, y en inflamación crónica que se caracteriza por la formación de tejido fibroso y por la desregulación en los mecanismos de resolución de la lesión [7]. La inflamación aguda es útil para destruir, atenuar o mantener localizado al agente nocivo, y simultáneamente iniciar una serie de procesos que pueden determinar la cura o reconstrucción del tejido lesionado. Por esta razón a la inflamación aguda se le atribuye fundamentalmente una respuesta de carácter protector, y de no existir este proceso, las infecciones se propagarían de manera incontrolada, las heridas no se curarían y los órganos lesionados presentarían lesiones supurativas de forma permanente [5].



**Figura 1.** Eventos centrales de la inflamación aguda. Se observa que la lesión producida por un estímulo nocivo favorece la liberación de agentes vasoactivos y quimiotácticos que activan terminaciones nerviosas, lo que lleva al incremento de la permeabilidad de los capilares (vasodilatación) facilitando el reclutamiento de células del sistema inmune que fagocitan y liberan más mediadores inflamatorios que sostienen la respuesta. Estas iniciarán el proceso de reparación del tejido y combatirán a los patógenos presentes. (Modificado Julius et al, 2001).

## 1.2. Mediadores inflamatorios

Como ya se mencionó, muchas sustancias químicas son producidas y liberadas localmente ante la acción de estímulos nocivos que desencadenan un proceso inflamatorio y que se denominan mediadores de la inflamación. Estos mediadores llevan información sobre el daño a otras células e inician las respuestas vasculares, celulares y humorales de la inflamación [8]. Desde el punto de vista cronológico, los diversos mediadores de la inflamación van a producir básicamente dos efectos. En una primera fase inicial, alteraciones vasculares que facilitan la extravasación de moléculas desde la sangre al foco inflamatorio, así como la producción de edema. En una segunda fase más tardía, las alteraciones vasculares, así como la liberación de factores quimiotácticos en el foco inflamatorio, determinarán la llegada de células inmunes procedentes de la sangre y de los tejidos circundantes [8]. Dada su diversidad estructural y naturaleza química se pueden clasificarse de diversas maneras.

### 1.2.1. Citocinas

Las citocinas son pequeñas proteínas sintetizadas y liberadas por las células que han recibido un estímulo nocivo. Estas moléculas tienen un efecto específico en las interacciones y comunicaciones entre las células. Las citocinas se pueden sub-clasificar como quimiocinas (citocinas con actividades quimiotácticas) e interleucinas (citocinas producidas por un leucocito y que actúan sobre otros leucocitos)[9]. Es común que diferentes tipos de células secreten la misma citocina o que una sola citocina actúe sobre varios tipos de células diferentes (pleiotropía). Estas moléculas pueden inducir funciones similares entre sí, a menudo se producen en cascada, es decir, una citocina estimula a sus células diana para que produzcan citocinas adicionales. Las citocinas, como mensajeros centrales en la respuesta inmune, son producidas por muchas poblaciones celulares pero los productores predominantes son los linfocitos T y los macrófagos. Además, las citocinas pueden producirse en el tejido nervioso periférico durante los procesos fisiológicos y patológicos resultado de una lesión o estímulo nocivo. Después de una lesión, los macrófagos residentes y los reclutados, células cebadas, en conjunto con las células endoteliales y las terminaciones nerviosas que se encuentran alrededor del sitio lesionado secretan citocinas y factores de crecimiento específicos requeridos para iniciar una respuesta inflamatoria[10].

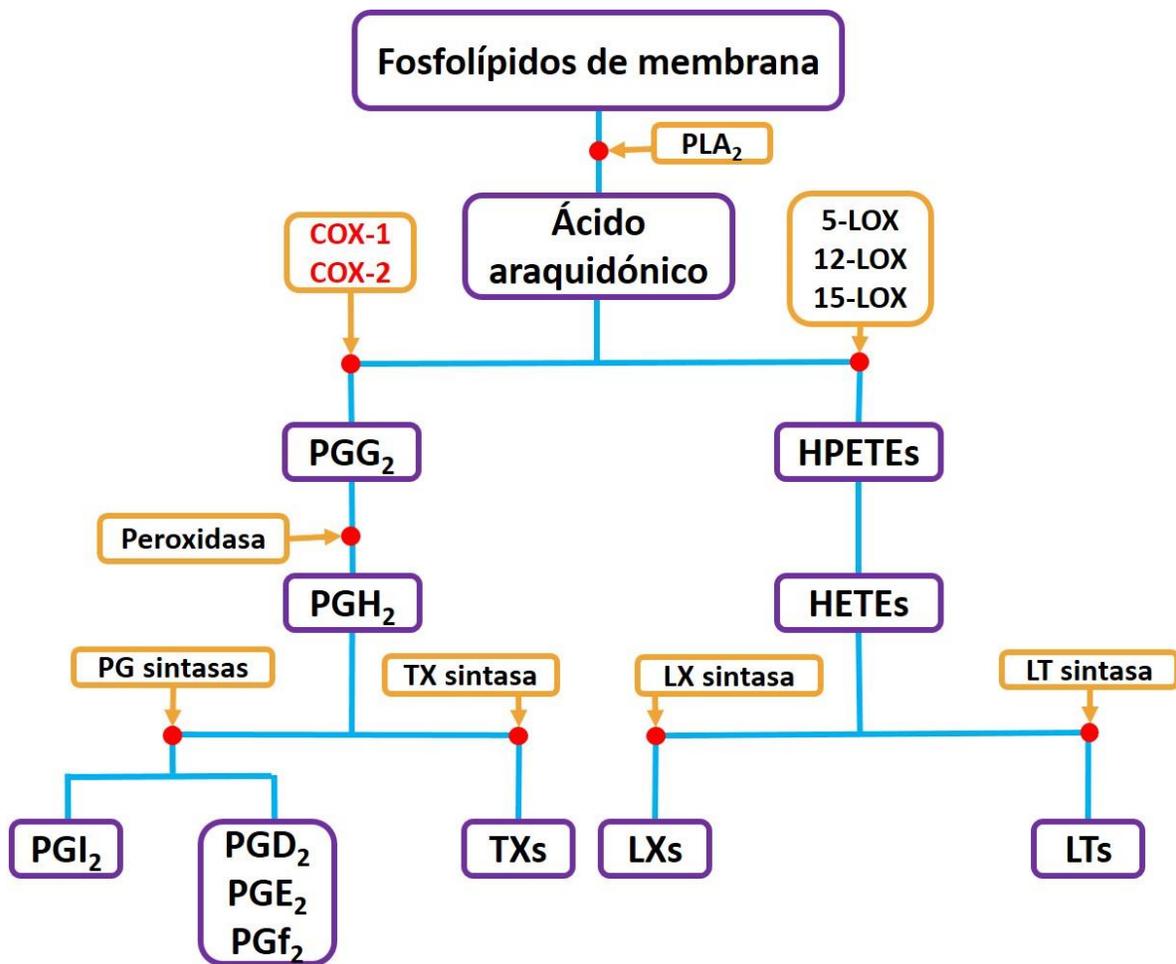
### 1.2.2. Aminas vasoactivas

Las aminas vasoactivas son compuestos orgánicos derivados del amoníaco con uno o más grupos alquilo o arilo enlazados al átomo de nitrógeno. Estas aminas tienen la capacidad de ejercer efectos vasoactivos sobre el músculo liso y los tejidos que conforman los vasos. En este contexto pueden aumentar (vasodilatación) o reducir (vasoconstricción) el diámetro de dichos vasos. Aquí podemos encontrar sustancias como la histamina, la bradicinina, y la serotonina.

- a. Histamina: Esta molécula deriva de la histidina, tiene funciones como regulador del tono vasomotor, produce vasodilatación, edema e incremento de la permeabilidad vascular. Desencadena broncoconstricción, rinitis, urticaria y anafilaxis, y favorece la producción de prostaciclina y de óxido nítrico [11]. Por lo tanto, también está involucrada en la regulación de las funciones normales del estómago y actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central.
- b. Bradicinina: Tienen una importante acción vasodilatadora que facilita la salida de plasma a los tejidos, causando edema, enrojecimiento y aumento de la temperatura[12].
- c. Serotonina (5-Hidroxitriptamina, 5-HT): Es un conocido neurotransmisor proveniente del triptófano, que también se encuentra en el sistema nervioso digestivo, en las plaquetas y otras células del sistema inmune. La serotonina también actúa como agente vasoactivo al tiempo que regula la hemostasia y la coagulación de la sangre. A concentraciones altas actúa como un vasoconstrictor directo del músculo liso endotelial o potenciando los efectos de otros vasoconstrictores. En estados fisiológicos, la vasodilatación ocurre a través de la liberación, mediada por serotonina, de óxido nítrico de las células endoteliales. Además, inhibe la liberación de norepinefrina de los nervios adrenérgicos.

### 1.2.3. Proteasas plasmáticas

Distintos precursores de naturaleza proteica ya se encuentran libres en el espacio intersticial o son secretados por otras células que participan activamente en el proceso inflamatorio. Por ejemplo, las proteasas plasmáticas son enzimas activas que viajan en el plasma y se encargan de activar, a través modificaciones enzimáticas (proteólisis) o pos-traduccionales, a estos precursores, transformándolos en moléculas activas que llevan a cabo su función. En los mamíferos se encuentran los cininógenos, que son precursores de la bradicinina y la lisil-bradicinina (calidina), llamadas colectivamente como cininas. Las cininas tienen una amplia gama de efectos proinflamatorios que incluyen hipotensión, vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular, edema e inducción del reclutamiento celular y producción de citocinas y eicosanoides [13]. Otros mediadores importantes que participan en la regulación de la inflamación son los derivados del ácido araquidónico (AA) o eicosanoides. Estos compuestos incluyen a las prostaglandinas (PGs), los leucotrienos (LTs) y los tromboxanos (TXs). Los eicosanoides juegan importantes papeles fisiológicos, ejemplo de ello es su papel en la inflamación, en la fisiopatología de la diabetes, el cáncer, la arteriosclerosis y la hipertensión [14]. Los eicosanoides son moléculas de señalización derivadas de ácidos grasos esenciales de veinte carbonos (figura 2). Los prostanooides son la subclase natural de los eicosanoides que consta de las PGs y los TXs. Estructuralmente, las PGs contienen un anillo de ciclopentano, mientras que los TXs tienen un anillo de ciclohexano en su estructura [15]. Estos compuestos se producen *in situ* a través de la acción de enzimas tales como la fosfolipasa A2 (PLA2), la ciclooxigenasa (COX) y la lipooxigenasa (LOX).



**Figura 2.** Síntesis de eicosanoides formados a partir del AA por la acción de las enzimas PLA<sub>2</sub>, COX, y LOX. Los recuadros amarillos presentan las diferentes enzimas involucradas en la síntesis de los diferentes eicosanoides de importancia clínica y los recuadros violetas los productos de estas. (Modificado de Dongjuan et al, 2014).

En ausencia de estímulos, la concentración celular de AA libre es muy baja. Sin embargo, lipasas específicas como la PLA<sub>2</sub> pueden liberar AA que posteriormente será oxidado por los enzimas de la cascada del AA (figura 2). Esta molécula es metabolizada rápidamente por las COX y LOX. Diversos estímulos tales como citocinas, factores de crecimiento o estímulos nocivos de naturaleza mecánica, térmica o química son capaces de activar la liberación del AA, y posteriormente la COX catalizará la síntesis la PGH<sub>2</sub>, un endoperóxido cíclico inestable [16]. Existen dos isoformas de COX, la COX-1 y la COX-2. La COX-1 es la isoforma encargada de la síntesis basal de las PGs, mientras que la COX-2 se expresa principalmente en respuesta a diversos estímulos nocivos [17]. De forma específica en

función del tipo celular, la PGH<sub>2</sub> puede ser metabolizada dando lugar a PGE<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, PGF<sub>2</sub> $\alpha$ , PGI<sub>2</sub> (prostaciclina) o TXA<sub>2</sub> (figura 2). Mientras que a través de la acción de las ciclooxigenasas se generan endoperóxidos, PGs y TXs; a través de las LOX se sintetizan los LTs, el ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (HPETE) y el ácido 5-hidroxi-eicosatetraenoico (HETE). Las enzimas involucradas en la síntesis de eicosanoides se han encontrado en una gran variedad de tipos celulares, por ejemplo, la TX-sintasa que está involucrada en la activación de plaquetas y macrófagos, la prostaciclina sintasa en células endoteliales, estimulando la liberación de compuestos vasoactivos, la PGF sintasa en útero, promoviendo la contracción de músculo liso y la PGD sintasa en cerebro y células cebadas [16]. Para que las PGs lleven a cabo su función, deben ser liberadas desde las células al espacio intersticial, donde pueden ejercer efectos autócrinos o parácrinos al unirse a receptores específicos. Se han descrito cuatro receptores para la PGE<sub>2</sub> (EP1-EP4), dos para la PGD<sub>2</sub> (DP1 y DP2), y un receptor al que se une la PGF<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, y tromboxano A<sub>2</sub> (FP, IP, y TP, respectivamente) [18]. Las PGs también pueden unirse a receptores nucleares como los receptores proliferativos activados por peroxisoma (PPAR- $\gamma$ ) y regular los procesos inflamatorios[19].

Por otro lado, a partir del LTA<sub>4</sub> se puede formar el LTB<sub>4</sub>, un potente agente quimioatrayente de neutrófilos [20] y estimulador de la adhesión de los leucocitos sobre las células endoteliales [21]. El LTA<sub>4</sub> también puede ser transformado a LTC<sub>4</sub> mediante la LTA<sub>4</sub> sintasa, y éste puede dar lugar a la formación de LTD<sub>4</sub> y LTE<sub>4</sub>. En conjunto a estos leucotrienos se le conoce con el nombre genérico de cisteínil leucotrienos (CysLTs). Los LTs son sintetizados básicamente en células inflamatorias como leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y células cebadas. Sus efectos biológicos dependen de su interacción con receptores específicos. Se han caracterizado cuatro receptores que también tienen siete dominios transmembranales y están acoplados a proteínas G. Así, hay dos receptores para el LTB<sub>4</sub>, el receptor BLT<sub>1</sub> es de alta afinidad mientras que el BLT<sub>2</sub> es de baja afinidad [22]. Existen dos receptores para los CysLTs, el CysLT<sub>1</sub> y el CysLT<sub>2</sub> [23]. Además, se ha descrito que el LTB<sub>4</sub> puede interactuar con el receptor nuclear PPAR- $\gamma$  e inducir la expresión de genes implicados en la  $\beta$ -oxidación [24].

### 1.2.5. Óxido nítrico

Otro mediador segregado por las células involucradas en la respuesta inflamatoria es el óxido nítrico (NO), un gas de naturaleza química simple, de bajo peso molecular y altamente lipofílico. El NO se ha encontrado en diferentes tipos celulares de diversas especies de animales y plantas. Actualmente se sabe que el NO es una molécula ubicua en el organismo humano y que participa en el funcionamiento de diferentes órganos y de casi todos los sistemas [25]. En la síntesis de NO participan tres isoformas del óxido nítrico sintetasa (SNO), la neuronal (SNO<sub>n</sub>), la endotelial (SNO<sub>e</sub>) y la inducible (SNO<sub>i</sub>); como su nombre lo indica, estas enzimas se encuentran en su mayoría en células del sistema nervioso y cardiovascular y la inducible es característica de las células del sistema inmune, es decir, se expresa principalmente en macrófagos y otros monocitos. En el sistema nervioso central, la SNO<sub>n</sub> participa en la regulación del flujo sanguíneo cerebral, la neurotransmisión excitatoria y la plasticidad cerebral. La SNO<sub>e</sub> es responsable de la actividad relajante en los vasos sanguíneos a través de la regulación del tono vascular y la presión sanguínea, inhibe la agregación plaquetaria y bloquea la activación y adhesión de los leucocitos. Finalmente, la SNO<sub>i</sub> participa en la inmunidad celular y en los mecanismos de defensa contra células tumorales y organismos patógenos [26].

### 1.2.6. Sustancia P

La Sustancia P (SP) es un péptido de cadena corta identificado hace casi 80 años como neurotransmisor. Este péptido ejerce sus acciones sobre sus células diana mediante su unión molecular a una proteína receptora presente en la membrana. Este complejo proteico-receptor de la SP se denomina receptor de neurocinina 1 (NK1) y su presencia determina si una célula puede o no responder a las acciones de la SP. En cuanto a su papel en la inflamación, la SP ha sido implicada en reacciones inflamatorias de tejidos tan diversos como el pulmón [27], el intestino [28], las articulaciones [29], la piel [30] y los ojos [31]. La SP es producida por células del sistema inmune como macrófagos, eosinófilos, linfocitos y células dendríticas [32], pero también se libera de las terminales periféricas de los nociceptores. A su vez, la SP potencia la proliferación de linfocitos y la producción de inmunoglobulinas, y mejora la secreción de citocinas de linfocitos, monocitos, macrófagos y células cebadas [33]. La

liberación inducida por la SP de mediadores inflamatorios tales como citocinas, especies reactivas de oxígeno (ROS), derivados del ácido araquidónico e histamina potencia la respuesta a una lesión tisular y estimula el reclutamiento de leucocitos, amplificando la respuesta inflamatoria [34]. La SP también produce vasodilatación local y aumenta la permeabilidad vascular, mejorando así el suministro y la acumulación de leucocitos en los tejidos dañados [35]. La SP puede estimular específicamente la quimiotaxis de linfocitos, monocitos, neutrófilos y fibroblastos [36] e induce un influjo rápido de neutrófilos y eosinófilos en la dermis humana. Este fenómeno se produce en paralelo con la translocación de selectina P y la regulación positiva de E-selectina [37]. Al promover la vasodilatación, la migración leucocitaria y la adhesión entre células leucocitarias / endoteliales, la SP asegura la extravasación, migración y posterior acumulación de leucocitos en el sitio de la lesión. La SP también ha sido implicada en la resolución de la inflamación. La evidencia de un papel para la SP en la reparación de tejidos se ha derivado principalmente de estudios que detallan su efecto proliferativo en una variedad de células. La SP actúa como un mitógeno para células del músculo liso, fibroblastos, células endoteliales y sinoviocitos [38].

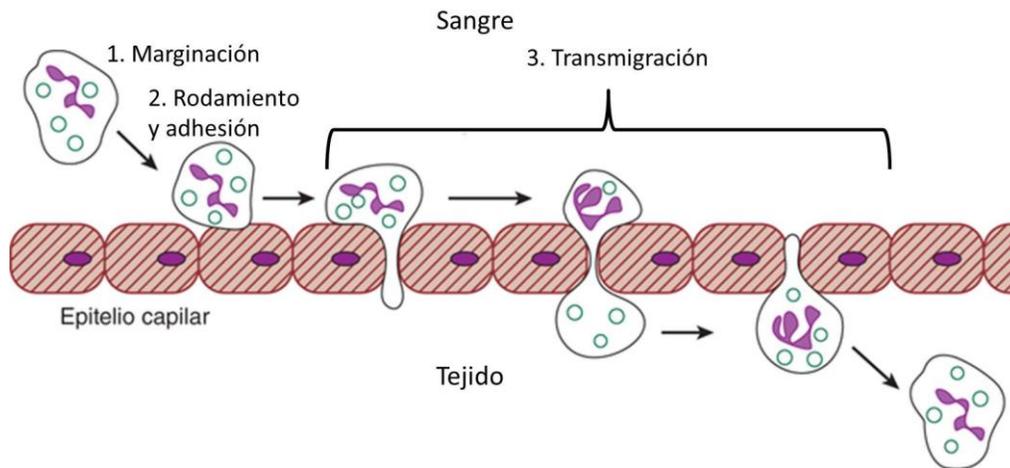
### 1.3. Células de la respuesta inmune

Como hemos visto, cuando ocurre un daño al organismo, el sistema inmune proporciona la primera línea de defensa del huésped contra los patógenos o estímulos que causaron el daño, a través de la liberación de mediadores y el reclutamiento de células inmunes de la circulación. Esta movilización de células y dispersión de mediadores a la circulación provoca una respuesta protectora de acción rápida e inespecífica [39]. Esta respuesta está mediada por células fagocíticas presentadoras de antígenos (células dendríticas y macrófagos), granulocitos, neutrófilos y células cebadas [40].

#### 1.3.1. Macrófagos

Los macrófagos son células que derivan de los monocitos. Los monocitos son células heterogéneas que circulan en la sangre y constituyen un componente crítico de la respuesta inflamatoria inmune innata. Estas células provienen de progenitores hematopoyéticos en la médula ósea, específicamente el progenitor de monocitos común. El desarrollo de monocitos sanguíneos a partir de estos progenitores depende del factor de crecimiento, el factor

estimulador de colonias de macrófagos (conocido como M-CSF o CD115)[41]. Los monocitos, al madurar a macrófagos obtienen la capacidad de fagocitar partículas de su entorno, procesar antígenos (capturan proteínas del entorno y las convierten en pequeños péptidos) y presentarlo al linfocito, con lo que establecen el vínculo entre la inmunidad natural o innata y la adquirida o facultativa. El reclutamiento de monocitos a sitios de inflamación es crítico para la defensa del huésped. Durante la inflamación, los monocitos circulan a través de la sangre y se extravasan a los tejidos inflamados a través de proceso de diapédesis, que involucra 1) la marginación, 2) el rodamiento y la adhesión y la 3) trans migración (figura 3).



**Figura 3.** Proceso de diapédesis. Este proceso llamado diapédesis describe el paso de células (leucocitos, monocitos y neutrófilos) desde la sangre hacia tejidos dañados, a través de las paredes íntegras de los vasos sanguíneos (Modificado de Harper, Bioquímica ilustrada 3ra Ed).

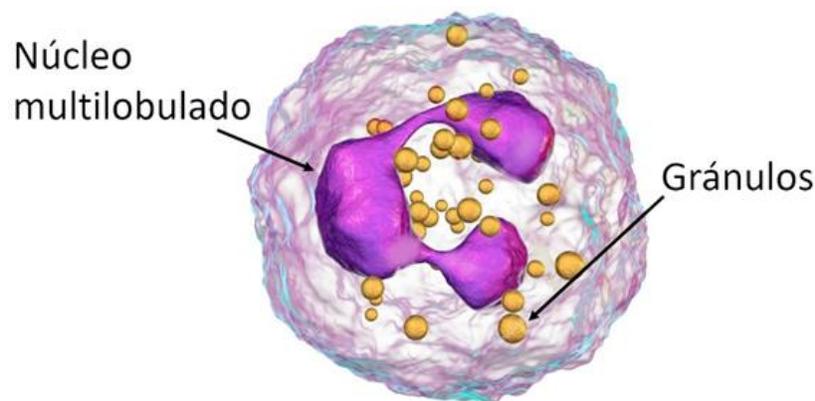
Durante una lesión estéril, los monocitos proinflamatorios pueden diferenciarse en un macrófago que patrulla y repara el tejido lesionado; en cambio, si aparece un agente infeccioso este inducirá la conversión de monocitos proinflamatorios a células dendríticas (DC's) a través de la activación con el factor de necrosis tumoral (TNF), estas células son superiores a los macrófagos en el proceso de aclaramiento bacteriano. Cuando la lesión ya ha sido resuelta, los monocitos proinflamatorios contribuyen a la repoblación de macrófagos residentes en diversos tejidos en estado estable [42].

Los monocitos secretan una gran cantidad de citocinas inflamatorias (IL-1, IL-6, IL-8 y IFN), estimulantes hematopoyéticos (IL-3, GM-CSF), inductoras de respuesta TH1 (IL-12, 18) o

TH2 (IL-4, 10), anti-inflamatorias y reguladoras de la angiogénesis y la cicatrización (TGF), entre otras [43].

### 1.3.2. Neutrófilos

Los neutrófilos son la población celular más abundante de leucocitos presente en sangre periférica y se caracterizan por la forma multilobulada de sus núcleos (figura 4). Son de origen linfoide y se generan continuamente en la médula ósea a partir de precursores mieloides, alcanzando una producción de hasta  $2 \times 10^{11}$  células al día [44].



**Figura 4.** Esquema general del neutrófilo segmentado. Se puede observar la forma multilobulada de su núcleo que sirve para su identificación, además de los gránulos que sirven para su función, estos contienen diferentes moléculas como proteasas, histamina y algunas aminas vasoactivas.

Son un tipo de leucocitos polimorfonucleares que forman parte de la primera línea de defensa durante la inflamación aguda [45]. El proceso de diferenciación y activación de los neutrófilos está controlado por el factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), que producen los linfocitos T en respuesta a factores quimiotácticos como la interleucina 17A (IL-17A) este factor es producido a su vez por linfocitos  $T\gamma\delta$  y células NK activadas. La liberación de IL-17A está a su vez bajo el control de la IL-23 que se libera de macrófagos residentes en el tejido y de células dendríticas [46]. Los neutrófilos, por lo general, son las primeras células reclutadas desde la sangre periférica. Migran a los tejidos desde los vasos sanguíneos y una vez en el sitio de la lesión eliminan bacterias, hongos y virus, así como células cancerosas. Los mecanismos a través de los cuáles realizan esta función son diversos y se mencionan en la tabla 1.

**Tabla 1.** Mecanismos mediante los cuales los neutrófilos detienen y eliminan bacterias y otros estímulos nocivos (modificado de Kolaczowska et al, 2013).

Mecanismos defensivos de los neutrófilos		
Sitio de acción	Mecanismos	Componentes
Intracelular	Fagocitosis	Unión a vesículas que contienen especies reactivas de oxígeno (ROS), catepsinas, defensinas, lactoferrina y lisozima (degradación)[47]
Extracelular	Trampas extracelulares de ADN de neutrófilos (NET's)	ADN e histonas (inmovilización) Contenido de diversos gránulos intracelulares (lactoferrina, catepsinas, mieloperoxidasa) MPO y elastasa de neutrófilos)[48]
	Liberación de factores antimicrobianos contenidos en gránulos especializados	

Uno de los principales mecanismos de los neutrófilos para eliminar microorganismos es la fagocitosis. Durante este proceso, los neutrófilos internalizan los patógenos en vacuolas denominadas fagosomas. Este último sufre un proceso de maduración muy rápido que conlleva a la fusión con vesículas que contienen enzimas o ROS y a la liberación de péptidos anti-microbianos y a la generación de ROS lo que favorece la desintegración de los patógenos.

Por otro lado, la degranulación en la superficie de los neutrófilos y la extrusión de ácidos nucleicos favorece la formación de NET's; estas son estructuras en forma de red hechas de DNA que el neutrófilo expulsa y sobre la que se encuentran diversos componentes citoplasmáticos entre ellos diversas enzimas como MPO y proteasas. Estas redes son capaces de atrapar e inmovilizar bacterias y virus evitando la diseminación de los microorganismos. Además facilita su muerte al favorecer una alta concentración local de agentes antimicrobianos [49].

Los neutrófilos también participan en la transducción de señales extracelulares que llevan a la producción de numerosas citocinas pleiotrópicas (es decir, que la misma citocina es capaz de actuar en múltiples tipos celulares) [50]. Durante su maduración, los neutrófilos desarrollan diversos gránulos que se llenan con proteínas proinflamatorias, enzimas y otras moléculas relevantes a su función y que modifican su contenido con el tiempo. Los gránulos primarios son azurófilos, que contienen metaloproteinasas de matriz (MMP), los gránulos secundarios, también llamados específicos los cuales contienen lactoferrina, y los gránulos terciarios, (también llamados gránulos de gelatinasa), que contienen MMP como gelatinasa

B). Los gránulos azurófilos humanos contienen otra proteasa única, la azurocidina. Ahora bien, la existencia de múltiples tipos de gránulos se puede explicar por el hecho de que algunas de las proteínas no pueden existir juntas en la forma innata: por ejemplo, la elastasa de neutrófilos digiere lipocalina asociada a gelatinasa de neutrófilos [51].

La vida media de los neutrófilos en circulación es de aproximadamente de 8 a 10 horas. Sin embargo, los neutrófilos activados pueden extender su vida hasta por más de 15 horas [52]. Cabe destacar que en algunos tejidos como son la médula ósea, el bazo, los pulmones y el hígado en el cuerpo actúan como reservorios de células inmunes desde donde los neutrófilos pueden moverse rápidamente para llegar al sitio de la inflamación [51]. Además, los neutrófilos tienen capacidad de activar a otros tipos de células que participan en la inflamación [53].

### 1.3.3. Células cebadas

Las células cebadas juegan un papel importante en la inflamación en respuesta a un alérgeno, al igual que los eosinófilos y la inmunoglobulina E [54]. Una de las funciones protectoras de estas células es la producción y secreción de citocinas y otras moléculas pro-inflamatorias como IL-1, IL-6, serotonina e histamina por mencionar algunas. Las interleucinas son las responsables del reclutamiento y activación celular, así como de las manifestaciones locales y generales de la inflamación que terminaran desencadenando síntomas como malestar, fiebre, hipotensión, aumento del volumen del área y de la temperatura [55].

### 1.3.4. Resolución de la inflamación

Como se ha mostrado, la respuesta inflamatoria aguda es auto-limitada y normalmente da como resultado la restauración del tejido y el retorno a la homeostasis, esto se logra al eliminar completamente el estímulo que originó la inflamación. Se acepta que este proceso es activo y está controlado por una gama de mecanismos bioquímicos y celulares estrechamente regulados, por ejemplo, a través del cese completo de la señalización pro-inflamatoria en la zona afectada, la eliminación de los granulocitos que hayan quedado en los tejidos y el retorno eventual de los números de células mononucleares tisulares (macrófagos y linfocitos) a los niveles basales [56]. A partir de aquí, la proliferación de las

células locales del tejido rellena los espacios vacíos formando la cicatriz, con lo que se da por terminada la lesión. En casos contrarios, cuando los estímulos inflamatorios son persistentes o aparece una desregulación de estos mecanismos de la fase de resolución da como resultado una inflamación crónica, que tiene como resultado patologías de naturaleza inflamatoria, donde el proceso de resolución no se logra y la lesión puede incluso empeorar.

#### 1.4. Enfermedades inflamatorias

Existe una amplia gama de trastornos y condiciones que se caracterizan por la presencia de un proceso inflamatorio. Algunos ejemplos son alergia, asma, enfermedades autoinmunes (artritis, lupus), enfermedad celíaca, glomerulonefritis, hepatitis, aterosclerosis, enfermedad inflamatoria intestinal, enfermedades cutáneas, rechazo de trasplante. Lo anterior demuestra el variado número de manifestaciones patológicas relacionadas con la inflamación. A continuación, se describen algunas de las enfermedades más representativas.

##### 1.4.1. Enfermedades inflamatorias cutáneas.

Existen diversas patologías cutáneas en donde la inflamación del tejido desempeña un papel crítico en el desarrollo y el progreso de la enfermedad. Las más comunes incluyen dermatitis atópica, dermatitis por contacto y psoriasis [57].

##### 1.4.1.1. Dermatitis atópica

La Dermatitis atópica (DA) es una enfermedad de la piel que afecta principalmente niños y adolescentes. Un estudio epidemiológico reciente llevado a cabo en EEUU mostró que la prevalencia pediátrica es de al menos 10%, y que el inicio de la enfermedad ocurre antes de los 5 años en el 85% de los niños afectados [58]. Esta enfermedad se caracteriza por presentar las manifestaciones características de la inflamación, así como prurito intenso, piel seca, eritema y exudado [59]. Esta enfermedad afecta predominantemente la superficie de los pliegues de codos, rodillas, cabeza, cara cuello y manos [60]. La patogénesis de la dermatitis atópica es compleja y multifactorial. Se ha planteado que la disfunción de barrera de la piel es parte de las causas más importantes de la aparición de la enfermedad, aunque también se considera que los factores ambientales, la predisposición genética y la disfunción inmune desempeñan un papel en su desarrollo y están estrechamente entrelazados [61]. A nivel

celular se piensa que la principal causa de los síntomas de esta enfermedad es la actividad excesiva de los linfocitos T, principalmente de los de linaje Th1, Th17 y Th22 que son los que generan respuestas de toxicidad celular y un aumento en la presencia de citocinas pro-inflamatorias en los tejidos afectados [62].

#### 1.4.1.2. Dermatitis por contacto

La dermatitis por contacto es una afección inflamatoria frecuente de la piel caracterizada por lesiones cutáneas eritematosas y pruriginosas después del contacto con una sustancia extraña. La condición se puede clasificar en irritante o alérgica [63]. La dermatitis por contacto es uno de los principales motivos de consulta en dermatología en EEUU, con una prevalencia del 15 al 20% [64]; su incidencia es de 7.9 casos por 1000 personas-año en países de Europa, estimando que la alérgica es de 3 casos por 1000 personas-año [65]. Por último, la prevalencia promedio de la dermatitis de contacto alérgica en el mundo es de 21.2% (rango 12.5-40.6%)[66].

La variedad irritante, como su nombre lo indica, genera una irritación de la piel no modulada por inmunidad y los agentes causales son lesiones en la piel, agentes citotóxicos y/o inflamatorios. La dermatitis alérgica por contacto es una reacción de hipersensibilidad retardada en la que una sustancia extraña entra en contacto con la piel, se une a una proteína de la piel, formando un complejo antigénico que conduce a la sensibilización. Este tipo de dermatitis la causa una respuesta de hipersensibilidad retardada de tipo IV que esta mediada por células T [63].

#### 1.4.1.3. Psoriasis

La psoriasis es una enfermedad de la piel cuya prevalencia mundial es de alrededor del 2%, pero los estudios en los países desarrollados han informado tasas de prevalencia más altas, en promedio, del 4,6% al 2013 [67]. En México representa 2% de la consulta dermatológica, con una incidencia aproximada de 2.5 millones de personas afectadas de las cuales entre el 25 y el 30% cursa con un cuadro clínico de moderado a severo [68]. Esta enfermedad se caracteriza por descamación e inflamación de las capas superiores de la piel, y presenta síntomas como dolor, picazón, aumento de la temperatura y enrojecimiento de zonas delimitadas en diferentes partes del cuerpo [69]. En condiciones normales, las células de la

piel crecen desde las capas más profundas y suben lentamente a la superficie reemplazando constantemente a las células muertas de la superficie. Este proceso se llama renovación celular, y tarda aproximadamente un mes. Cuando se padece psoriasis, la renovación celular ocurre en sólo unos pocos días, lo que provoca que las células nuevas suban demasiado rápido y se acumulen en la superficie [70]. La forma más común es la *psoriasis vulgaris* que se manifiesta en placa crónica, es decir; regiones rojas, escamosas y bien demarcadas de piel inflamada con una duración de más de 3 meses continuos, estas placas son el resultado del aumento de la proliferación aumentada de queratinocitos [71]. Aproximadamente el 15% de los pacientes que padecen psoriasis pueden desarrollar artritis psoriásica, esta enfermedad afecta generalmente a las grandes articulaciones, especialmente las de las extremidades inferiores, seguido por las articulaciones pequeñas de manos y pies, y en menor proporción a las articulaciones de la espalda y sacroilíacas de la pelvis.

### 1.5. Tratamiento farmacológico de la inflamación

El objetivo del tratamiento farmacológico de la inflamación es disminuir las molestias causadas por los síntomas de la inflamación y devolver al paciente un aproximado de la calidad de vida que solía tener. Desde principios de los años 90, la terapia tradicional para la inflamación ha sido el uso de analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) y glucocorticoides [72].

#### 1.5.1. Analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos

Los analgésicos anti-inflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen un grupo heterogéneo de fármacos que poseen propiedades analgésicas, antiinflamatorias y antipiréticas debido a su capacidad de inhibir a la familia de enzimas ciclooxigenasas (tabla 2). La ciclooxigenasa (COX) es una enzima que cataliza la transformación del ácido araquidónico, un fosfolípido de membrana, en prostaglandinas; estas tienen un doble papel al tener funciones fisiológicas y de respuesta a estímulos nocivos, estas últimas son el objetivo de este grupo de fármacos, que al inhibir su producción, evita y revierte la aparición de la mayoría de los signos cardinales de la inflamación, sobretodo el edema y el dolor asociado.

Debido a la gran diversidad de procesos fisiológicos en los que participan las prostaglandinas, los AINEs presentan también una gran diversidad de efectos adversos a nivel renal,

gastrointestinales y en el sistema cardiovascular. Sin embargo, los más frecuentes son los que relacionados con en el tracto gastrointestinal y que incluyen desde náuseas, dispepsia, pirosis retroesternal y dolor abdominal hasta úlceras pépticas, que pueden sangrar o perforar el estómago y poner en riesgo la vida del paciente. Estas complicaciones dependen de varios factores como la edad y el estado general de salud del paciente, así como de la dosis administrada y la duración del tratamiento [73]. En casos con alto riesgo de complicaciones del tracto gastrointestinal se recomiendan medidas preventivas, como el uso de dosis eficaces menores del AINE, la inclusión de fármacos gastroprotectores en la terapia o el uso de AINEs que inhiben de forma preferentemente selectiva a COX-2. [74].

**Tabla 2.** Propiedades generales de los AINEs.

Grupo farmacológico	Mecanismo de acción	Indicación terapéutica	Efectos adversos
Salicilatos <ul style="list-style-type: none"> <li>Ácido acetilsalicílico</li> <li>Diflunisal</li> </ul>	Inhibición irreversible de la COX-1, inhibición de COX-2.	Presentan acción analgésica, antipirética y antiinflamatoria, Inhibición permanente de la COX-1 plaquetaria por acetilación.	Produce trastornos gastrointestinales y nefritis.
Derivado de para-aminofenol <ul style="list-style-type: none"> <li>Paracetamol</li> </ul>	Se desconoce	Predominantemente antipirético, también posee acciones analgésicas.	Puede producir irritación gástrica leve, a dosis altas puede producir trastornos hepáticos severos.
Derivados del ácido acético <ul style="list-style-type: none"> <li>Indometacina</li> <li>Diclofenaco</li> <li>Ketorolaco</li> </ul>	Inhibidores no selectivos de COX-1 y 2; inhiben la movilidad de los leucocitos polimorfonucleares y puede tener un efecto vasoconstrictor directo independiente de la COX.	Propiedades analgésicas, anti-inflamatorias y antipiréticas sobresalientes similares a las de los salicilatos.	Efectos secundarios gastrointestinales frecuentes que pueden ser letales. Diarrea y a veces se lesiones ulcerosas del intestino. Cefalea frontal que ocurre en 25 a 50% de los pacientes
Fenamatos <ul style="list-style-type: none"> <li>Ácido mefenámico</li> <li>Meclofenamato</li> <li>Ácido flufenámico</li> </ul>	Inhibidores reversibles y competitivos de la COX.	Indicados en el tratamiento a corto plazo del dolor por lesiones de tejidos blandos, dismenorrea, así como en la artritis reumatoide y la artrosis.	Cerca del 25% de los usuarios sufre efectos secundarios gastrointestinales con las dosis terapéuticas.
Ácidos enólicos <ul style="list-style-type: none"> <li>Meloxicam</li> <li>Piroxicam</li> <li>Tenoxicam</li> </ul>	Inhibidores no selectivos de la COX-2. El meloxicam muestra mayor selectividad por la COX-2.	Poseen actividad antiinflamatoria, analgésica y antipirética. Indicados para el tratamiento a largo plazo de la artritis reumatoide o la artrosis por su $t_{1/2}$ prolongado.	Aprox. Del 15 al 18% de los pacientes reporta molestias epigástricas, irritación de la mucosa y en casos severos sangrados y perforación gástrica.
Derivados del ácido propiónico <ul style="list-style-type: none"> <li>Ibuprofeno</li> <li>Ketoprofeno</li> <li>Fenoprofeno</li> <li>Naproxeno</li> </ul>	Inhibidores no selectivos de la COX similares a los AINEs tradicionales	Tienen efectos anti-inflamatorios y analgésicos importantes. Los datos muestran que tienen una eficacia un poco mayor en la analgesia y el alivio de la rigidez matutina.	Cerca del 25% de los usuarios sufre efectos secundarios gastrointestinales. Alrededor del 5% de los pacientes presenta diarrea, esteatorrea e inflamación del intestino.
AINEs preferentemente selectivos de COX-2 <ul style="list-style-type: none"> <li>Celecoxib</li> <li>Parecoxib</li> <li>Etoricoxib</li> </ul>	Mayor inhibición de la COX-2 que el resto de los AINEs	Indicados para el tratamiento del dolor dental y para la inflamación dependiente de la dosis en la artrosis y la artritis reumatoide.	Daño gastrointestinal leve. También se ha demostrado el riesgo de infarto al miocardio y apoplejía.

### 1.5.2. Glucocorticoides

Los glucocorticoides son fármacos que poseen potentes acciones anti-inflamatorias e inmunosupresoras. Estos fármacos ejercen sus efectos a través de la activación del receptor glucocorticoide que se encuentra en el citoplasma (MC2R, NR5A1) Cuando el fármaco glucocorticoide se une a su receptor citoplasmático se forma un complejo fármaco receptor que se transloca al núcleo y se une al ADN. Ahí actúa como un factor de transcripción dando como resultado la regulación o inhibición de la transcripción de genes como por ejemplo los de las citocinas pro y anti-inflamatorias o de enzimas como la COX-1 y 2. Otro mecanismo de acción es por interacciones proteína-proteína entre el receptor y otros factores de transcripción como AP-1 o NFkB. [75]. Además, tienen la capacidad de inhibir a la enzima PLA2 la cual es determinante en la síntesis de eicosanoides como leucotrienos, tromboxanos y prostaglandinas.

Los glucocorticoides se prescriben comúnmente en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o en enfermedades en donde existen condiciones inflamatorias severas como por ejemplo la artritis reumatoide, asma, psoriasis, gota, y también como co-tratamiento en algunos cánceres como mieloma múltiple y leucemia [76]. Sin embargo, a pesar de su gran potencia como anti-inflamatorios, su utilidad a largo plazo se limita por los diversos efectos secundarios que poseen. Estos incluyen osteoporosis, inmunosupresión, hipertensión y resistencia a la insulina, tienen la capacidad de actuar sobre la función renal aumentando la retención de sodio y agua, a dosis elevadas tienen la capacidad de suprimir el eje hipotalámico-hipofisario-suprarrenal y por lo tanto la secreción de cortisol, sin embargo no se afecta la secreción de hormonas mineralocorticoides por las glándulas suprarrenales (aldosterona y andrógenos), también pueden favorecer la hipertrigliceridemia, la hipercolesterolemia y el aumento de la presión arterial que favorecen el aumento del riesgo de enfermedades cardiovasculares.

### 1.6. Efectos adversos de los tratamientos actuales

Es importante destacar que los tratamientos antes mencionados únicamente controlan los síntomas, pero no revierte el proceso patológico. Adicionalmente el tratamiento crónico incrementa la frecuencia y severidad de los efectos adversos lo que limitan su uso en muchos

de los casos, además de que existen pacientes que no responden al tratamiento. Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nuevos fármacos para enfermedades que cursan con inflamación y que tengan una efectividad igual o mayor que los fármacos de uso actual presentan menos efectos adversos y puedan ser utilizados por lapsos de tiempo mayores [77].

### 1.7. Desarrollo de nuevos fármacos

Cuando se presenta una enfermedad, por ejemplo un proceso inflamatorio, la práctica de la medicina clínica indica la prescripción de un medicamento que revierta el proceso o al menos disminuya los síntomas. No es común detenerse a pensar en los pasos que están involucrados en el desarrollo de este medicamento, que empezó sólo como una molécula, y damos por hecho la existencia de estos comprimidos, inyecciones, cremas, etc. Sin embargo, si se pretende describir el riguroso y arduo proceso que vive esta molécula antes de su uso clínico, se debe empezar hablando del proceso regulatorio que controla la comercialización de estos medicamentos, de la razón por lo cual son útiles, qué instituciones son las responsables, cuánto tiempo demora y cuáles son los costos involucrados [78]. En primera instancia, el proceso de investigación y desarrollo de nuevos fármacos es largo y complejo [79], involucra grandes costos y pocas posibilidades de éxito. De entre las numerosas moléculas identificadas y evaluadas muy pocas llegan a los estantes de las farmacias debido a que la mayoría no llega a cumplir los diferentes requisitos de las etapas de evaluación y son descartadas. El proceso de evaluación de estas nuevas moléculas es tan complejo que debe ser manejada por una diversidad de disciplinas científicas que incluyen la química orgánica, biología molecular, toxicología, medicina, farmacología, bioquímica y ciencias computacionales. Todas participan activamente en esta etapa del proceso, lo que en parte explica los enormes costos involucrados. En promedio, el proceso de estudiar y evaluar una nueva molécula con potencial actividad biológica dura de 12 a 15 años y se requiere de una inversión cercana a los \$600 millones de dólares, antes que ésta sea aprobada para su comercialización. Sólo uno de 5,000 posibles nuevos fármacos que entran a la etapa de ensayos pre-clínicos será aprobado para uso terapéutico [80]. De estas, la mayoría (90%) son desarrolladas por grandes empresas farmacéuticas internacionales y el resto es estudiado por universidades u otros organismos. En 1999, en los EEUU las compañías farmacéuticas invirtieron \$24 mil millones de dólares en investigaciones, 14% más que el año anterior [78].

### 1.7.1. Etapas de desarrollo e investigación de un medicamento

En el pasado, el descubrimiento de nuevas moléculas era al azar debido a que se generaba por accidente, esto llevaba al desarrollo de una nueva molécula activa, o bien, que a una molécula ya existente se le comprobaba otro efecto farmacológico no buscado. Hoy en día, el proceso ha cambiado dramáticamente, tanto en la técnica como en la organización. Primero se identifica la diana terapéutica y luego se realiza un tamizaje (screening) de miles de sustancias. Esto a través de una conjugación de técnicas como la robótica, microensayos y técnicas computacionales que permiten, hacer representaciones de la estructura química, hacer comparaciones de esta con otras estructuras almacenadas en grandes bases de datos y así identificar compuestos potencialmente útiles desde el punto de vista farmacológico [81]. Las moléculas que potencialmente pueden actuar como fármacos se pueden obtener a través de técnicas como la síntesis química combinatoria de alta velocidad, el diseño racional de moléculas y la extracción a partir de fuentes naturales [82]. Posteriormente, se determinará si alguna de estas moléculas puede estimular, bloquear o modificar la función de un receptor o enzima, lo que permitirá seleccionar la o las moléculas que tenga la acción óptima sobre la diana terapéutica.

En este mismo sentido, el avance en el conocimiento de la estructura y manipulación de genomas funcionales ha permitido un manejo aún más directo y específico favoreciendo el desarrollo de fármacos a través de la ingeniería genética. El primer ejemplo de un fármaco producido por ingeniería genética fue la insulina recombinante humana en los años 80. Esto fue seguido por la hormona de crecimiento, vacunas recombinantes y factores estimuladores de colonias de células humanas, entre otros. En el año de 1996 el gasto de la industria farmacéutica en estas áreas de investigación, ascendió a más de \$1.0000 millones de dólares y ha seguido creciendo[55]. Otro enfoque es la evaluación de extractos de fuentes naturales como plantas, o bien secreciones de animales o sustancias producidas por microorganismos, a partir de los cuáles se pueden obtener moléculas activas [83].

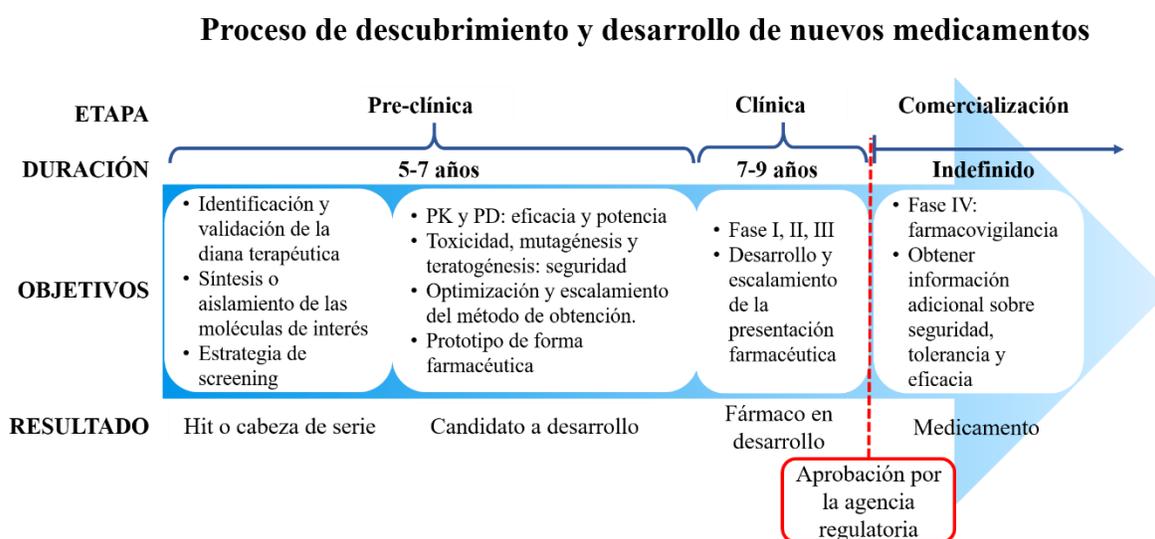
El primer paso en el proceso de descubrimiento de nuevos fármacos es identificar la diana terapéutica [84]. De manera idónea la diana terapéutica tendría que ser una entidad molecular única en una vía metabólica y ser reconocida como clave en la fisiopatología de la enfermedad. También podría ser un receptor celular con una función específica y bien

caracterizada. Vale la pena considerar que la identificación de una diana terapéutica puede hacerse a partir del análisis estructural y de las propiedades bioactivas de algunos de los fármacos ya están en pleno uso clínico[84]. La siguiente consideración es práctica y tiene relación con los ensayos de laboratorio ya que resulta esencial contar con un ensayo robusto, reproducible y validado. La validación de una diana terapéutica ocurre en la clínica. A mayor grado de novedad de una diana terapéutica, mayor grado de riesgo. Por ejemplo trabajar con una diana terapéutica bien validada significa que se diseñará un fármaco muy similar a los ya existentes para esa diana. Por otro lado, trabajar con una diana que sea una proteína con función desconocida puede significar un riesgo muy alto de fracaso. Una de las estrategias es identificar dianas validadas parcialmente.

Una vez que se identifica la diana comienza el proceso de diseño químico donde el objetivo será generar una molécula que sea compatible o, de manera ideal, varias series de moléculas potencialmente compatibles pero con propiedades químicas distintas. Los compuestos deben cumplir criterios específicos en cuanto a su potencia, eficacia (capacidad de la molécula de interaccionar con la diana y producir una respuesta), selectividad (grado al cual también afectan a otros blancos), farmacocinética y toxicidad. Una vez que se identifica la molécula, con base en los resultados experimentales, comienza el proceso de convertirla en un candidato farmacológico. Una vez que el equipo de descubrimiento de fármacos se siente satisfecho en cuanto a que la molécula tiene las propiedades deseadas, la selecciona como un “candidato”. A partir de aquí se comienza con el desarrollo de nuevos medicamentos en donde se distinguen dos grandes etapas: la clínica y la preclínica. El objetivo de la fase preclínica es generar la evidencia que sustente su eficacia y seguridad en células o animales, mientras que durante la etapa clínica se obtendrá evidencia que confirme la eficacia y seguridad del “candidato” en humanos.

Los estudios pre-clínicos se realizan *in vitro* e *in vivo*, es decir, en modelos con cultivos celulares, partes de tejidos y animales completos. El propósito primario de esta etapa es evaluar la eficacia del candidato (farmacodinamia) así como sus propiedades farmacocinéticas *in vitro* e *in vivo*. En esta etapa, en los estudios *in vivo*, las moléculas se deben evaluar en al menos dos especies de animales, esto debido a que una molécula puede afectarlas en forma diferente. Además durante los estudios preclínicos se evalúan un gran

rango de propiedades de la molécula que incluyen: estudios de estabilidad, se inicia el diseño de la forma farmacéutica y se realizan pruebas de toxicidad para determinar teratogenicidad, toxicidad a diferentes niveles (aguda, subcrónica, crónica). En la figura 5 se resume el proceso de cada una de las etapas de desarrollo e investigación de cada una de ellas así como las aplicaciones en cada una de ellas. Así, cabe destacar los pasos de identificación de un blanco terapéutico (diana terapéutica), estudios de toxicidad que se llevan a cabo en la fase preclínica siendo esta la primera y hasta llegar a la fase clínica la cual incluye el proceso de desarrollo, comercialización y registro posterior la aprobación para la venta y suministro.



**Figura 5.** Etapas del desarrollo del proceso de descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos. La investigación y el desarrollo de nuevos fármacos requieren esfuerzos coordinados de diversas ramas de la ciencia por lo que se requiere de un equipo multidisciplinario.

Cada una de estas etapas es de gran importancia ya que la suma de los resultados permite generar la evidencia que respalde la eficacia y seguridad de la molécula, así como los resultados negativos en alguno de estas etapas puede terminar con el camino de dicha molécula. Si estos complejos estudios preliminares son prometedores, normalmente el propietario solicita la patente del compuesto.

Cuando un compuesto satisface las pruebas farmacológicas, toxicológicas y bioquímicas realizadas durante la fase preclínica, se presenta a las agencias regulatorias como a la Secretaría de Salud en México, a través de la COFEPRIS (Comisión Federal para la

Protección Contra Riesgos Sanitarios), para obtener los permisos necesarios para realizar ensayos clínicos en personas [85].

Durante la etapa clínica se distinguen cuatro fases (Fase I-IV), durante las cuales se busca obtener información determinada relacionada a la eficacia y seguridad del fármaco en humanos. En la tabla 3 se resume el objetivo de cada una de estas, así como la población en la que se realiza.

**Tabla 3.** Fases clínicas del desarrollo de un medicamento.

Fases	Tipo de sujeto experimental y objetivo del estudio	Costo aproximado
Fase I	Voluntarios sanos. Se realizan estudios de farmacocinética y seguridad farmacológica, así como establecimiento del rango de dosis para lograr la exposición deseada.	\$500,000 dólares
Fase IIa	Estudio en pacientes con la patología que se desea tratar, para obtener una lectura preliminar de la eficacia y la seguridad potenciales, así como la relación dosis-respuesta.	\$500,000 dólares
Fase IIb	Estudios en pacientes con la patología que se desea tratar. Se requiere un número mayor que en la fase IIa. Estos estudios por lo general utilizan puntos de referencia final clínicos para definir la dosis que se utilizará en estudios definitivos de fase III.	\$500,000 dólares
Fase III	Pacientes con la patología que se desea tratar, grupo más heterogéneo que los de fase II. Estos son estudios grandes con puntos de referencia final con relevancia clínica y factores de comparación. Estos estudios deben aportar la evidencia sólida de la eficacia del nuevo fármaco que sustente su aprobación para la comercialización.	\$100,000 dólares
Fase IV	Durante la comercialización se continúa obteniendo información de los posibles efectos adversos del medicamento y de su eficacia. Al estar a la venta el grupo de pacientes que lo utiliza se vuelve más heterogéneo por lo que la información obtenida puede utilizarse para resolver cuestiones sobre seguridad, tolerancia y eficacia, al igual que para complementar de manera potencial la indicación médica autorizada al inicio y la formulación del fármaco.	

Cada una de estas etapas requiere de la realización de uno o varios estudios clínicos que deben realizarse bajo los estándares de las guías de Buenas Prácticas Clínicas (*Good Clinical Practices*, GCP en inglés). En general, los estudios clínicos son aleatorizados (pacientes asignados al azar al grupo de tratamientos o al control) con la finalidad de eliminar la posibilidad de sesgo. Otro estudio clínico común es el estudio doble ciego (donde ni el

investigador ni el paciente saben en qué grupo están) debido a que permite evitar la subjetividad en la evaluación de la respuesta. Durante el desarrollo de un estudio clínico, frecuentemente existe el análisis interno y periódico de datos, que permite decidir anticipadamente si hay un beneficio real o, más importante, efectos deletéreos del fármaco durante el estudio. Estos análisis se realizan a través de comités multidisciplinarios independientes constituidos por expertos en el tema y con el poder de detener el estudio si la evidencia demuestra diferencias sustanciales entre los tratamientos, en cuyo caso, resultaría una falta ética continuarlo. Actualmente, se exige la participación de minorías étnicas para asemejar la población real. Al finalizar cada ensayo clínico se realiza un informe detallado, que puede llegar a tener más de 12.000 páginas [86], y ha de contener toda la información recopilada a lo largo de todo el proceso de investigación y desarrollo del medicamento y debe demostrar que el nuevo fármaco tiene el efecto deseado.

Las GCP son el resultado del alineamiento de la FDA (*Food and Drug Administration*, por sus siglas en inglés), el comité de Especialidades Farmacéuticas de la Comunidad Europea (CPMP) y el Ministerio de Salud de Japón. Estas son esenciales para el estándar, diseño y conducción de los estudios clínicos las cuales se actualizan periódicamente con el objetivo básico de proteger a los pacientes de potenciales efectos adversos [87]. Estos principios son reconocidos y exigidos por el Congreso Internacional de Armonización (ICH), lo que permite que estudios realizados sean válidos para el registro de productos en EEUU, Europa o Japón.

Una vez concluidos satisfactoriamente los estudios clínicos de fase I-III se da paso a la fase de aprobación y registro. La responsabilidad del patrocinador y de las agencias regulatorias sobre el medicamento aprobado no termina con la comercialización y venta del producto, sino que continúa durante todo el periodo de su uso clínico (Fase IV o farmacovigilancia) [85]. La farmacovigilancia aporta datos de la efectividad y seguridad del medicamento [88], así como información que soporte usos terapéuticos distintos a los evaluados durante los estudios preclínicos y clínicos, o bien combinaciones con otros fármacos, entre otras. Por ello, aunque el producto se haya estudiado ya sobre grupos de pacientes relativamente grandes, cuando sale al mercado hay que seguir comprobando que el fármaco no presenta irregularidades. La farmacovigilancia es por lo tanto el seguimiento detallado de la incidencia de efectos adversos identificados durante la etapa clínica o efectos adversos no identificados

previamente. Lo anterior para modificar la información relativa a las recomendaciones de uso, o en su caso, para retirar el fármaco del mercado en el caso de que sea necesario[89]. Los eventos adversos a medicamentos se definen como “todo efecto no deseado que aparece al administrar un medicamento a la dosis adecuada, para la indicación adecuada, durante el tiempo adecuado, para la profilaxis, el diagnóstico o tratamiento de una enfermedad, o para la modificación de una función fisiológica”. Se excluye de esta manera, a las sobredosis absolutas o relativas, intentos de suicidios, etc. El evento adverso más serio es la toxicidad generalizada, tal como es el shock anafiláctico que afecta órganos como el hígado, la piel y hasta sistemas como el hematopoyético y el nervioso. Tal reacción ha sido descrita para toda clase de agentes terapéuticos, aunque los más comúnmente involucrados son antibióticos, anticonvulsivos, antipsicóticos, antidepresivos y AINEs. En este contexto, la biotransformación de los fármacos por el organismo juega un papel esencial en la aparición de toxicidad. Los procesos de biotransformación incluyen la modificación química de las sustancias así como la conjugación con sulfatos y ácido glucurónico, con el objetivo de facilitar la eliminación de la sustancia del organismo, sin embargo, dada la naturaleza inespecífica de estas, se pueden producir metabolitos reactivos en ciertas circunstancias que sean tóxicos, o intermediarios reactivos, que al reaccionar con moléculas propias del organismo causarían toxicidad a diferentes niveles. Debido a lo anterior es deseable que los estudios de toxicidad se inicien lo más temprano posible en la etapa preclínica, con la finalidad de descartar aquellos que sean potencialmente dañinos para el ser humano. De esto se hablará en el siguiente apartado.

## 1.8. Toxicidad

La toxicología se define como el estudio para identificar y cuantificar los efectos adversos asociados a la exposición de agentes físicos y sustancias químicas a un organismo [90]. Estos efectos adversos surgen a causa de la interacción entre la sustancia toxica y las células del hospedero. Esta interacción puede variar dependiendo de las propiedades químicas de las sustancias, de la membrana celular y de la vía de exposición del sujeto a la sustancia (tabla 4). Esto debido a que las interacciones pueden ocurrir en la superficie celular, dentro de la célula, en el interior de alguno de los organelos de la célula, así como en la matriz extracelular

[91]. Los efectos de una sustancia química sobre un determinado sistema u órgano también están relacionados con la magnitud y duración de la exposición.

**Tabla 4.** Factores que condicionan la toxicidad de una sustancia.

Relacionados a la administración	Relacionados al sujeto	Relacionados a la molécula
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Vía de administración</li> <li>• Naturaleza del vehículo</li> <li>• Concentración</li> <li>• Velocidad de administración</li> <li>• Sustancias asociadas</li> <li>• Sinergismo</li> <li>• Antagonismo</li> <li>• Tolerancia</li> <li>• Sensibilización</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Especie animal</li> <li>• Raza</li> <li>• Sexo</li> <li>• Peso</li> <li>• Edad</li> <li>• Susceptibilidades individuales</li> <li>• Estado patológico</li> <li>• Estado fisiológico</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estado físico (condiciona de la vía de entrada)</li> <li>• Solubilidad en agua o en lípidos</li> <li>• Tamaño de la molécula</li> <li>• Estructura química</li> <li>• Grado de oxidación</li> </ul>

Considerando la diversidad de efectos tóxicos que se producen incluso en un solo sistema u órgano, se ha propuesto una línea de pensamiento uniforme acerca del órgano crítico y el efecto crítico, con miras a evaluar los riesgos y desarrollar criterios para el análisis de sustancias tóxicas. El que un determinado órgano o sistema se considere crítico depende no sólo de la toxicodinamia del agente, sino también de la vía de administración y de la población expuesta. A continuación se mencionan algunos de estos criterios:

- Concentración celular crítica: concentración a la que una sustancia produce en la célula cambios funcionales adversos ya sean reversibles o irreversibles.
- Concentración crítica en un órgano: concentración media en el órgano en el momento en el que el tipo más sensible de células del órgano alcanza la concentración crítica.
- Órgano crítico: el órgano que primero alcanza la concentración crítica de la sustancia en determinadas circunstancias de exposición y en una población dada.
- Efecto crítico: punto definido en la relación entre la dosis y el efecto en el individuo, a saber, el punto en el que se produce un efecto adverso en la función celular del órgano crítico. A un nivel de exposición inferior al que provoca una concentración crítica de la sustancia en el órgano crítico, pueden producirse algunos efectos que no deterioran la función celular en sí, aunque son detectables por medio de pruebas bioquímicas y de otro tipo. Esos efectos se denominan efectos subcríticos [92].

De manera general, se identifican tres tipos de entidades tóxicas: 1) sustancias químicas, 2) agentes biológicos, y 3) agentes físicos. Las sustancias químicas incluyen tanto sustancias inorgánicas como orgánicas. Entre estas últimas se encuentra el metanol, la mayor parte de los medicamentos y venenos de origen animal. Entre las inorgánicas podemos considerar los metales pesados, ácido fluorhídrico y gas cloro. Las entidades físicamente tóxicas incluyen agentes que por lo general no son pensadas como tal, por ejemplo: sonidos y vibraciones, calor y frío extremos, excesos de radiación electromagnética no ionizante como la luz infrarroja y la luz visible, radiación ionizante como los rayos x y rayos gamma, y la radiación de partículas como rayos alfa, rayos beta, y los rayos cósmicos [93]. En la toxicidad biológica es más complicado identificar la “dosis umbral”, puesto que muchas toxinas las producen agentes biológicos que primero se reproducen para desarrollar la infección. Sin embargo, en un anfitrión con un sistema inmunológico intacto, la toxicidad inherente del organismo es contrarrestada por la capacidad del anfitrión de defenderse; entonces la toxicidad biológica depende de una combinación de los factores de ambas partes [91]. Por lo tanto, la evaluación de la toxicidad de una sustancia en un organismo vivo es crucial cuando se considera la protección de la salud pública, ya que la exposición a sustancias químicas desconocidas puede ser peligrosa y producir efectos adversos para el ser humano. En la práctica, la evaluación generalmente incluye efectos agudos, subcrónicos, crónicos, teratógenos, carcinogénicos y reproductivos [94].

### 1.8.1. Toxicidad aguda

La toxicidad aguda generalmente se define como la serie de efectos adversos que ocurren inmediatamente o poco tiempo después de una administración única o múltiple de una o más sustancias. Un efecto adverso es "cualquier efecto que dé como resultado un deterioro funcional y / o lesiones que pueden afectar el rendimiento de todo el organismo o que reducen la capacidad del órgano para responder a un desafío adicional" [95]. En consecuencia, una sustancia química que ingresa al organismo por vía oral durante un tiempo limitado y produce cualquier efecto adverso rápidamente, es tóxica por vía oral y aguda. Sin embargo, el término toxicidad oral aguda se usa con mayor frecuencia en relación con la letalidad y la determinación de la dosis letal 50 (DL<sub>50</sub>) [96]. Es decir, la dosis necesaria para provocar la muerte del 50% de los sujetos a los que se les administró la sustancia. Los objetivos de las pruebas de toxicidad aguda son obtener información sobre la actividad tóxica de un producto

químico y obtener información acerca de cómo lo hace. Además, la información sobre toxicidad sistémica aguda generada por la prueba se utiliza para identificar peligros y la gestión de riesgos en el contexto de la producción, manipulación y uso de productos químicos. Las pruebas de toxicidad en general tienen como objetivo obtener la DL<sub>50</sub> dado que es una forma de medir el envenenamiento potencial a corto plazo de una sustancia química [97]. El valor de DL<sub>50</sub> es actualmente la base para la clasificación del grado de toxicidad de los productos químicos (tabla 5) y, por lo tanto, es requerido por las autoridades gubernamentales en diferentes situaciones. Para realizar estas pruebas, los animales a los que se les administra una dosis de la sustancia de estudio se observan de cerca durante las primeras 24 horas y luego día a día durante un máximo de 2 semanas. Se toma nota de los cambios en la apariencia y el comportamiento de los animales de experimentación. Se puede usar una gran cantidad de signos clínicos para caracterizar la toxicidad sistémica aguda y describir su progresión [94].

**Tabla 5.** Criterios de clasificación del grado de toxicidad de una sustancia con base en su DL<sub>50</sub> según al OECD.

Efecto	Toxicidad oral (DL <sub>50</sub> )	Toxicidad cutánea (DL <sub>50</sub> )	Toxicidad por inhalación (DL <sub>50</sub> )
Muy toxicas	0-25 mg/kg	0-50 mg/kg	0-0.5 mg/kg
Toxicas	25-200 mg/kg	50-400 mg/kg	0.5-2 mg/kg
Nocivas	200-2000 mg/kg	400-2000 mg/kg	2-20 mg/kg
Inofensivas	>2000 mg/kg	>2000 mg/kg	>20 mg/kg

### 1.8.2. Métodos para determinar la DL<sub>50</sub>

El valor absoluto de DL<sub>50</sub> para un compuesto varía entre diferentes laboratorios, y estas variaciones se han atribuido a diferencias en, por ejemplo, detalles de protocolo, cepas de animales, cuidados y sobretodo la fuente de la sustancia química a la que se le está llevando a cabo prueba. Es por ello que existen diversos métodos para llevar a cabo dicho análisis con una alta precisión estadística pero con la mínima cantidad de animales [98]. A este respecto, la organización para la cooperación económica y el desarrollo (OCDE) ha publicado diferentes protocolos que intentan homogeneizar las pruebas de toxicidad entre sus países miembros. Una de estas es la denominada prueba límite, descrita en la directriz 245 de la OCDE [99], esta es una versión restringida de una prueba de toxicidad aguda, esta prueba consiste en administrar una dosis de 2000 o 5000 mg/kg a un animal de experimentación por

vía oral y posteriormente se evalúan sus cambios conductuales. Si el animal no muere en las primeras 48 horas se administra otro con la misma dosis hasta llegar a 5 animales administrados; si ninguno muere,  $DL_{50}$  está por encima de 2000 o 5000 mg/kg, si alguno muere, se llevará a cabo la denominada prueba principal. La prueba principal también denominada de arriba y abajo consiste en una única progresión de dosis ordenada en la que los animales se dosifican, uno a la vez. El primer animal recibe una dosis establecida. Si el animal sobrevive, la dosis para el próximo animal aumenta en un factor de 3.2 veces la dosis original; si muere, la dosis para el siguiente animal disminuye con una progresión de dosis similar. (Nota: 3.2 es el factor predeterminado que corresponde a una progresión de dosis de una unidad y media log). Cada animal debe observarse cuidadosamente durante 48 horas antes de tomar una decisión sobre que dosis administrar al próximo animal. Esa decisión se basa en el patrón de supervivencia de 48 horas de todos los animales hasta ese momento [99]. Se usa una combinación de criterios de detención para utilizar el menor número posible de animales mientras se ajusta el patrón de dosificación para reducir el efecto de un valor inicial bajo o pendiente baja.

Los criterios son:

- (a) Tres animales consecutivos sobreviven en el límite superior
- (b) Cinco reversiones ocurren en 6 animales consecutivos probados
- (c) Al menos 4 animales han seguido la primera reversión y las relaciones de verosimilitud especificadas exceden el valor crítico.

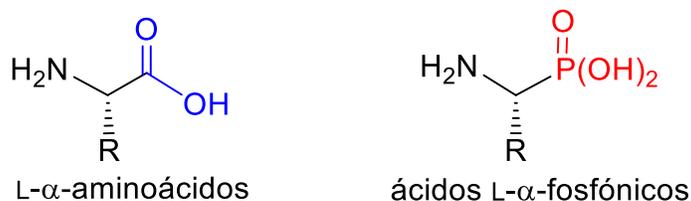
La dosificación se detiene cuando se cumple uno de estos criterios, momento en el que se calcula una estimación de la  $DL_{50}$  y un intervalo de confianza para la prueba en función del estado de todos los animales al final del experimento. En algunos casos para productos químicos con curvas de dosis-respuesta de poca pendiente, es posible que se necesiten animales adicionales [99].

En resumen, las nuevas moléculas que sean propuestas para volverse fármacos y posteriormente medicamentos, deben ser: 1) eficaces, es decir que logran el efecto farmacológico deseado, 2) estables, es decir, que su estructura química no cambia con el paso del tiempo y 3) que son seguras, es decir, no son tóxicas y no tienen efectos secundarios

peores que el padecimiento que tratan. En este proyecto presentamos a los  $\alpha$ -aminofosfonatos como potenciales agentes terapéuticos.

### 1.9. $\alpha$ -Aminofosfonatos

Los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos y sus ésteres los  $\alpha$ -aminofosfonatos, son compuestos orgánicos que fueron descubiertos en los seres vivos en la década de los 40's. Los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos son considerados los análogos isostéricos más importantes de las  $\alpha$ -aminoácidos, donde el grupo carboxílico plano [CO<sub>2</sub>H] es sustituido por el grupo fosfónico tetrahédrico [P(O) (OH)<sub>2</sub>] de mayor demanda estérica, y que en los últimos años se ha convertido en un compuesto de gran interés en química orgánica y para el desarrollo de nuevos fármacos.



**Ilustración 6** Análogos isostéricos

Los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos y sus ésteres los fosfonatos son conocidos por sus propiedades quelantes [100], la introducción de distintos grupo amino incrementa su capacidad para unirse a iones metálicos. La selectividad de los ligandos con grupo fosfónico está determinada por la estereoquímica de estos grupos y por una serie de propiedades específicas que los distinguen de sus análogos carboxílicos. El grupo fosfónico es altamente nucleofílico, más ácido, tetrahédrico y con un mayor volumen estérico en comparación con su análogo el ácido carboxilo. También, el grupo fosfónico tiene un eje de simetría C<sub>3</sub> y el enlace  $\pi$  entre fósforo (P) y oxígeno (O) es mucho más débil que el enlace  $\pi$  entre carbono (C) y oxígeno. Por lo tanto, la probabilidad de la formación del enlace P-O en el grupo fosfónico es mayor que la del enlace C-O en el grupo carboxílico [101]. Por otro lado, el grupo fosfonato a diferencia del grupo fosfato es resistente a la hidrólisis por enzimas fosfatasas involucradas en la escisión de grupos fosfato, característica que favorece su estabilidad en el organismo (tabla 6).

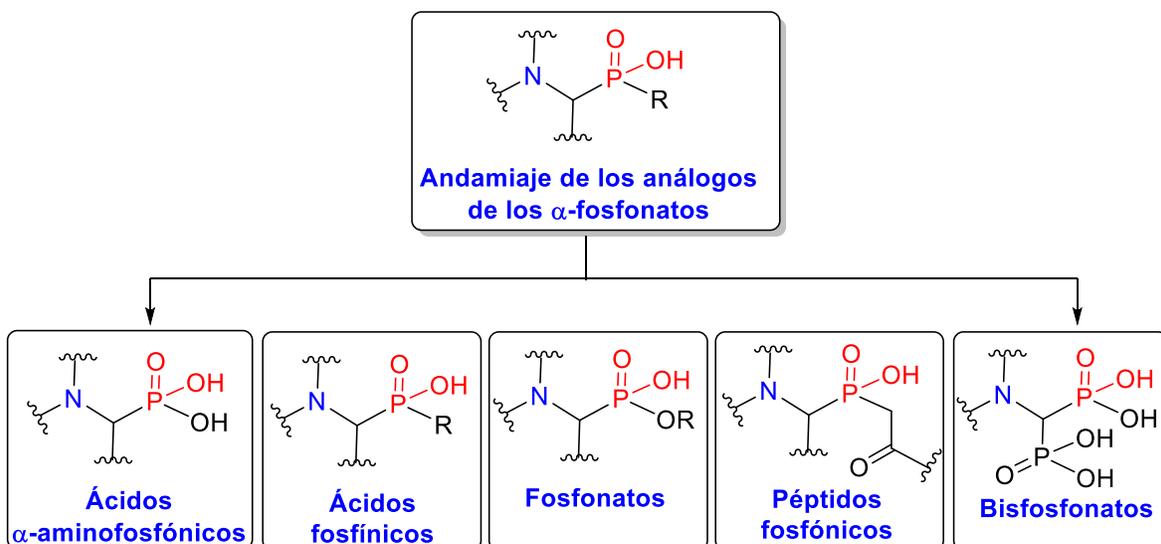
**Tabla 6.** Características estructurales y electrónicas del andamiaje C-N-P.

No.	Característica
1	Propiedades ácido-base dispuestas análogamente a las de los aminoácidos naturales manteniendo así su capacidad de formar una red específica de puentes de hidrógeno
2	Dos o tres átomos de oxígeno cargados negativamente y/o heteroátomos distribuidos tetraédricamente alrededor del átomo central de fósforo.
3	Buenas propiedades quelantes de cationes metálicos
4	Alta estabilidad en condiciones químicas severas

### 1.9.1. La importancia de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos en el desarrollo de nuevos fármacos

Hoy en día existen diversos ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos y ésteres fosfónicos que han mostrado poseer una gran variedad de actividades biológicas prometedoras, de importancia comercial, que abarcan áreas desde la agroquímica hasta la medicina [102].

El gran potencial biológico de los ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos y sus ésteres han despertado gran interés para el desarrollo de nuevos fármacos y en consecuencia en los últimos años se incrementó la investigación en el estudio de nuevas metodologías para la síntesis racémica y enantioselectiva de este tipo de compuestos[103]. Desde el punto de vista químico, este andamiaje ofrece diversas posibilidades de modificación estructural que han resultado en un gran número de  $\alpha$ -aminofosfonatos de relevancia química y que difieren entre sí en que contienen en su estructura química: 1) heterociclos o 2) anillos aromáticos como furano, antraceno, tiofeno, pirazol, imidazol y piridina [104-114]. Esto ha resultado en una gran diversidad de  $\alpha$ -aminofosfonatos, por lo que utilizando como criterio de clasificación su estructura química, estos compuestos se agrupan en los siguientes subgrupos: ácidos  $\alpha$ -aminofosfónicos, ácidos fosfínicos, péptidos fosfónicos, fosfonatos y los bifosfonatos (figura 7).



**Figura 7.** Grupos químicos que contienen el andamiaje N-C-P en su estructura.

### 1.9.2. Potencial biológico de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos

La actividad biológica más prometedora de los  $\alpha$ -aminofosfonatos en medicina es la disminución de la actividad de diversas enzimas. Sin embargo, también se ha reportado que tienen un gran potencial como agentes anticancerígenos [115, 116], antibacterianos [117-119], antivirales (anti-VIH) [120, 121], antifúngicos [122, 123], antiparasitarios [124], activadores del sistema inmune [125, 126] y compuestos neuroactivos [127-130]. En la tabla 7 se resumen algunos de los estudios más representativos que avalan estas actividades.

**Tabla 7.** Actividades biológicas reportadas para los aminofosfonatos.

Bioactividad	Tipo de compuesto	Ensayo ( <i>in vivo/in vitro</i> ) Concentraciones o dosis evaluadas	Resultados	Referencia
Inhibidores enzimáticos	18 amino péptidos Análogos del estado de transición derivados del ácido fosfórico. C12-28	Inhibición de renina en sangre (pH 7.2, <i>in vitro</i> ), De 0.010 a 30 x10 <sup>-6</sup> M	11 C/efecto:CI <sub>50</sub> : 0.03-10 x10 <sup>-6</sup> M 12>26>23>21>22>25>13>16>18>29>24 7 compuestos sin efecto CI <sub>50</sub> > 30 x 10 <sup>6</sup> M (14, 15, 17, 19, 20, 27, 28)	[131]
	17 N-análogos de α-aminofosfonatos o-cresol C1-17	Inhibición de 5 diferentes proteín tirosina fosfatasas humanas ( <i>in vitro</i> )	7 C presentan actividad inhibitoria CI <sub>50</sub> : 6.64-627 μM PTP1B CI <sub>50</sub> : 5>2>12=4>3>15>1 TCPTP CI <sub>50</sub> : 5>2>12>4=15>3>1 PTP-MEG2 CI <sub>50</sub> : 12>4=5>2>3>1 SHP1 CI <sub>50</sub> : 12=15 SHP1 CI <sub>50</sub> : 12>15 12 C sin actividad: CI <sub>50</sub> >10 mM	[132]
Anticancerígenos	26 Derivado de α-aminofosfonato C4a-4x	Ensayo de citotoxicidad <i>in vitro</i> : A549, Hela, MCF-7, O2US. CCR 0.5, 0.3, 0.1, 0.03 y 0.01 M.	Todos los compuestos fueron activos, se muestra el orden de potencia (CI <sub>50</sub> ) de los 5 más activos en cada línea celular  <b>A549</b> :16.6-163.3 μM; 4u > 4s > 4j > 4q > 4x <b>HeLa</b> : 2.5-137.0 μM; 4u > 4t > 4n > 4b > 4x <b>MCF-7</b> :0.3-11d.3 μM; 4x>4u > 4m= 4w = 4v <b>U2OS</b> : 2.5-157.6 μM 4x > 4u = 4p > 4t > 4n	[116]
	9 α-aminofosfonatos Solo C4J fue evaluado	Ensayo de citotoxicidad ( <i>in vitro</i> ): A549, SK-MEL2 CCR: 2-20 μM	Compuesto <b>4j</b> CI <sub>50</sub> aprox. 8 μM en A549 y SK-MEL2	[133]
	17 análogos de α-aminofosfonato C7a-7q	Ensayo citotóxico <i>in vitro</i> en cultivos celulares: NCI-H460, A5491, HepG2, SKOV3.  CCR: 0.1 a 100 μM. No especifican las concentraciones evaluadas.	<b>NCI-H460</b> (CI <sub>50</sub> ): 3.33 a 36.37 μM: 7c > 7g > 7o > 7d > 7h > 7f > 7n > 7m > 7j > 7q > 7b > 7e > 7i > 7a > 7k > 7p > 7l > 5-FU > DHA. <b>A5491</b> (CI <sub>50</sub> μM): 12.66-45.1d μM. 7j > 7h > 7b > 7c > 7f > 7o > 7k > 7m > 7e > 7n > 7g > 7a > 7i > 7l > 7p > 7d > 5-FU > 7q > DHA. <b>HepG2</b> (CI <sub>50</sub> ): 7.1e-37.30 μM. 7c, 7g, 7h, 7a, 7o, 7d, 7m, 7k, 7j, 7n, 7e, 5-FU, 7i, 7b, 7f, DHA. <b>SKOV3</b> (CI <sub>50</sub> ): 9.96-21.35 μM: 7d > 7h > 7a > 7g > 7i > 7m > 7e > 7j > 7k > 7f > 7n > 7c > 7p > 7l > 7o > 7b > 5-FU > DHA.	[134]

**Tabla 8.** Actividades biológicas reportadas para los aminofosfonatos (continuación).

Anticancerígenos (continuación)	S1c63, un derivado alcaloide de un aminofosfonato ópticamente activo de O-deacetilo Vinblastina.	<p>Citotoxicidad <i>in vitro</i> en 39 líneas celulares (37 humanas y 2 murinas):                      9 líneas de leucemia, 8 de cáncer de pulmón, 5 de cáncer de colon, 2 de cáncer de riñón, 2 de cáncer de ovario, 5 de cáncer de mama, 2 de melanoma y 4 líneas cancerígenas misceláneas                      CCR: 9 concentraciones de cada Compuesto por triplicado</p>	<p>S 1c63 muestra mejor actividad citotóxica en líneas celulares de leucemia, pulmón, mama, ovario, melanoma, y células de cáncer de colon o riñón.                      La media de todas las CI<sub>50</sub> es 35 nM, esto significa que es 36 y 72 veces más potente que vinblastina y vincristina, respectivamente.                      No se observó actividad citotóxica en el adenocarcinoma de pulmón de Lewis.</p>																																																																																																																																													
		<p><b>Xenotransplante:</b> 10<sup>6</sup> células P388 o 10<sup>5</sup> L1210 (leucemia), 0.5 mL de: 10 B16 melanoma i.p., o 5x10<sup>4</sup> cel. de melanoma B16 i.v., o injertos s.c. de 1 mg de colon, 38 carcinoma o 1 µL de fragmentos de Carcinoma de pulmón de Lewis. En BALB/c inyección s.c. de 10<sup>6</sup> P388 células leucémicas. C57BL/6 inoculados i.p. con 10<sup>6</sup> células de M5076 de sarcoma.  <b>Esquemas de admón.:</b> a) Admón. Única. B) 2 admón. (días 2 y 9). C) 3 admón (días 1, 5 y 9). D) 4 admón. (días 1, 5, 9 y 13). <b>Dosis:</b> 0.1, 0.15 y 0.2 mg/kg/día</p>	<p>S1c63: mostró buena actividad antitumoral en tumores inducidos por las células leucémicas P388 y L1210 (i.p.), melanoma B16 (i.p.) y adenocarcinoma de colon (s.c.), así como en los modelos diseminados. De Leucemia P388, melanoma B16 (iv) melanoma y sarcoma M5076 (i.p.).                      En todos los experimentos S1c63 fue de 10 a 40 veces más potente que Vinblastina. El compuesto no tuvo efecto en el carcinoma de pulmón de Lewis.</p>																																																																																																																																													
	18 análogos del ácido α-amino fosfónico y vinblastina C7-C24	<p>Citotoxicidad de células leucémicas L1210                      CCR: 5 concentraciones por triplicado (No mencionadas)</p>	<p>CI<sub>50</sub>: 0.4-64.67 nM                      12=15&gt;13&gt;21&gt;10&gt;23&gt;24&gt;19&gt;22&gt;18&gt;14&gt;17&gt;7&gt;20&gt;8&gt;11&gt;16&gt;9</p>																																																																																																																																													
		<p>Xenotransplante de cel. leucémicas P388 en ratones DBA2  <b>Tratamiento.</b> Dosis única, no especificada.</p>	<p>%T/C: 122-342                      12 &gt; 21 &gt; 17 = 24 &gt; 19 &gt; 18 &gt; 7 &gt; 22 &gt; 8 = 20 &gt; 9 &gt; 15 &gt; 13 &gt; 10 &gt; 16 &gt; 11 &gt; 14 &gt; 23</p>																																																																																																																																													
Antibacterianos	<p>Fosfonopéptidos que incorporan ácido (l-aminoetil) fosfónico y ácido (aminometil) fosfónico C-23-35                      L-X-L-Ala(P) [X = - Aminoácido]                      (6 con Aá naturales y 8 con Aá sintéticos)</p>	<p>Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento de diferentes cepas bacterianas:                      Gram (-):  <i>E.coli</i> (1), <i>K. aerogenes</i> (2), <i>Enterobacter</i> (3), <i>S. marcescens</i> (4), <i>S. typhimurium</i> (5), <i>H. influenza</i> (6).                      Gram (+): <i>S. aureus</i> (7), <i>S. faecalis</i> (8).                      CCR de 0.12 a 128 µg/mL</p>	<p>Los fosfonodipéptidos 23-35, análogos de alafosfalina no tienen o muestran poco efecto antibacteriano</p>	[136]																																																																																																																																												
<table border="1"> <thead> <tr> <th rowspan="2">X es Aá. terminal en L-X-L-Ala (P)</th> <th colspan="8">Cepa bacteriana</th> </tr> <tr> <th>1</th> <th>2</th> <th>3</th> <th>4</th> <th>5</th> <th>6</th> <th>7</th> <th>8</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>1. Ala</td> <td>1</td> <td>0.5</td> <td>1</td> <td>8</td> <td>64</td> <td>64</td> <td>2</td> <td>32</td> </tr> <tr> <td>2. Arg</td> <td>0.25</td> <td>&lt;0.12</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>32</td> <td>128</td> <td>16</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>3. Cys</td> <td>32</td> <td>16</td> <td></td> <td>i</td> <td>i</td> <td>i</td> <td>i</td> <td>i</td> </tr> <tr> <td>4. Met</td> <td>0.25</td> <td>0.12</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>8</td> <td>16</td> <td>1</td> <td>1</td> </tr> <tr> <td>5. Phe</td> <td>0.5</td> <td>1</td> <td>2</td> <td>4</td> <td>32</td> <td>32</td> <td>2</td> <td>4</td> </tr> <tr> <td>6. L-Nva</td> <td>0.003</td> <td>0.015</td> <td>0.25</td> <td>0.5</td> <td>0.25</td> <td>4</td> <td>1</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>7. Ala(F)</td> <td>0.25</td> <td>4</td> <td>32</td> <td>i</td> <td>32</td> <td>8</td> <td>32</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>8. Arg(NO<sub>2</sub>)</td> <td>0.5</td> <td>2</td> <td>8</td> <td>4</td> <td>64</td> <td>NE</td> <td>2</td> <td>33</td> </tr> <tr> <td>9. Arg(Homo)</td> <td>0.25</td> <td>0.12</td> <td>2</td> <td>2</td> <td>2</td> <td>64</td> <td>2</td> <td>128</td> </tr> <tr> <td>10. Cys(SMe)</td> <td>0.03</td> <td>0.03</td> <td>0.03</td> <td>0.5</td> <td>0.25</td> <td>4</td> <td>2</td> <td>16</td> </tr> <tr> <td>11. Cys(S-n-Pr)</td> <td>0.06</td> <td>0.03</td> <td>0.06</td> <td>0.5</td> <td>0.25</td> <td>64</td> <td>2</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>12. Met-(SO)</td> <td>4</td> <td>4</td> <td>32</td> <td>32</td> <td>i</td> <td>16</td> <td>4</td> <td>8</td> </tr> <tr> <td>13. Met-(SO<sub>2</sub>)</td> <td>16</td> <td>32</td> <td>i</td> <td>i</td> <td>i</td> <td>32</td> <td>4</td> <td>32</td> </tr> <tr> <td>14. 2-tienil metil</td> <td>0.5</td> <td>0.25</td> <td>1</td> <td>4</td> <td>4</td> <td>32</td> <td>2</td> <td>32</td> </tr> </tbody> </table> <p>i: inactivo; NE: no evaluado; 1-5 aminoácidos (Aá.) naturales, 7-14 Aá sintéticos.</p>		X es Aá. terminal en L-X-L-Ala (P)	Cepa bacteriana								1	2	3	4	5	6	7	8	1. Ala	1	0.5	1	8	64	64	2	32	2. Arg	0.25	<0.12	1	2	32	128	16	16	3. Cys	32	16		i	i	i	i	i	4. Met	0.25	0.12	1	2	8	16	1	1	5. Phe	0.5	1	2	4	32	32	2	4	6. L-Nva	0.003	0.015	0.25	0.5	0.25	4	1	8	7. Ala(F)	0.25	4	32	i	32	8	32	16	8. Arg(NO <sub>2</sub> )	0.5	2	8	4	64	NE	2	33	9. Arg(Homo)	0.25	0.12	2	2	2	64	2	128	10. Cys(SMe)	0.03	0.03	0.03	0.5	0.25	4	2	16	11. Cys(S-n-Pr)	0.06	0.03	0.06	0.5	0.25	64	2	8	12. Met-(SO)	4	4	32	32	i	16	4	8	13. Met-(SO <sub>2</sub> )	16	32	i	i	i	32	4	32	14. 2-tienil metil	0.5	0.25	1	4	4	32	2	32
X es Aá. terminal en L-X-L-Ala (P)	Cepa bacteriana																																																																																																																																															
	1	2	3	4	5	6	7	8																																																																																																																																								
1. Ala	1	0.5	1	8	64	64	2	32																																																																																																																																								
2. Arg	0.25	<0.12	1	2	32	128	16	16																																																																																																																																								
3. Cys	32	16		i	i	i	i	i																																																																																																																																								
4. Met	0.25	0.12	1	2	8	16	1	1																																																																																																																																								
5. Phe	0.5	1	2	4	32	32	2	4																																																																																																																																								
6. L-Nva	0.003	0.015	0.25	0.5	0.25	4	1	8																																																																																																																																								
7. Ala(F)	0.25	4	32	i	32	8	32	16																																																																																																																																								
8. Arg(NO <sub>2</sub> )	0.5	2	8	4	64	NE	2	33																																																																																																																																								
9. Arg(Homo)	0.25	0.12	2	2	2	64	2	128																																																																																																																																								
10. Cys(SMe)	0.03	0.03	0.03	0.5	0.25	4	2	16																																																																																																																																								
11. Cys(S-n-Pr)	0.06	0.03	0.06	0.5	0.25	64	2	8																																																																																																																																								
12. Met-(SO)	4	4	32	32	i	16	4	8																																																																																																																																								
13. Met-(SO <sub>2</sub> )	16	32	i	i	i	32	4	32																																																																																																																																								
14. 2-tienil metil	0.5	0.25	1	4	4	32	2	32																																																																																																																																								

**Tabla 9.** Actividades biológicas reportadas para los aminofosfonatos (continuación).

Antibacterianos (continuación)	18 $\alpha$ -aminofosfonatos Serie 1: C4A-J (con Cl) Serie 2: C4a-j (con I)	Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento bacteriano de las cepas: <b>Gram (-):</b> <i>P. vulgaris</i> , <i>E. coli</i> , <i>S. typhi</i> , <i>P. putida</i> <b>Gram (+):</b> <i>S. aureus</i> Concentración única: 10 mg/ml.	<b>Serie 1:</b> Todos los C mostraron actividad antibacteriana. Los más activos en comparación con ampicilina fueron 4B, 4C, 4D, 4F y 4J en todas las cepas de bacterias. <b>Serie 2:</b> Sólo los compuestos 4a-h mostraron actividad antibacteriana, 4b, 4e y 4h fueron más efectivos que ampicilina.	[133]
	4 $\alpha$ -aminofosfonatos que contienen el sustituyente indazol C2a-d	Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento bacteriano, por halo de inhibición, de: <i>K. pneumonia</i> , <i>S. typhi</i> , <i>P. auroginosa</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> . Concentración única: 40 $\mu$ g/disco	Los 4 compuestos muestran actividad antibacteriana moderada en comparación con gentamicina y kanamicina. El compuesto más activo fue el 2d.	[137]
Antivirales	14 Diaril aminofosfonato. Derivados de tiourea C8a-n	Ensayo del efecto protector y "curativo" contra TMV <i>in vivo</i> en hojas de <i>N. tabacum L.</i> (500 $\mu$ g/mL y para CCR 125, 250 y 500 $\mu$ g/uL)	Los 14 compuestos muestran efecto "protector" contra TMV (30.9-46.3%). Efecto "curativo" moderado en comparación con Nignamicina: CI <sub>50</sub> 239.8- 413.4 $\mu$ g/mL. 8g>8m>8e>8k	[121]
	14 Ribonucleósidos derivados de triazoilbencil-aminofosfonatos C4a-j y C5a-j	Ensayo <i>in vitro</i> efecto protector contra diversos tipos de virus 1 a 250 $\mu$ M	C4b y 4c fueron moderadamente activos contra RSV. CE <sub>50</sub> : 47.5 y 5i.5 5i CI <sub>50</sub> $\mu$ M C5c, 5f, 5g fueron activos contra VZV TK $\gamma$ y TK <sup>+</sup> El resto de los compuestos no mostró actividad.	[138]
	Glifosato	Ensayo <i>in vivo</i> en ratones CD1 infectados con HSV-2. Glifosato: 150 mg/kg, tratamiento crónico	El grupo tratado con N-(fosfonometil)-glicina isopropil-amino (150 mg/kg) mostró un 60% de supervivencia, igual al de Aciclovir (3 mg/kg)	[139]
Antifúngicos	Derivado de $\alpha$ -aminofosfonato y quitosano	Cultivo en placa <i>in vitro</i> , Inhibición de la germinación de esporas e inhibición del crecimiento radial (% FIE) de <i>Aspergillus Níger</i> 50 y 500 $\mu$ g/ml	73.5% de Inhibición de la germinación de esporas de <i>A. Níger</i> . 65% y 76.1% de inhibición del crecimiento radial a las concentraciones de 50 y 500 $\mu$ g/mL	[123]
	Dos Derivados de $\alpha$ -aminofosfonato y de quitosano $\alpha$ -ATPMCS $\alpha$ -ATPECS	Ensayo <i>in vitro</i> inhibición del crecimiento fúngico: <i>R. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> , <i>P. asparagi</i> , <i>S. solani</i>	% de inhibición: $\alpha$ -ATPMCS: <i>R. solani</i> : 47.1, 66.1 y 87.3%; <i>F. oxysporum</i> y <i>P. asparagi</i> : 100%; <i>S. solani</i> : 34.5, 42.9, 68.2% $\alpha$ -ATPECS: <i>R. solani</i> : 46.5, 67-2, 83.55, <i>F. oxysporum</i> y <i>P. asparagi</i> : 100%, <i>S. solani</i> : 30.6, 54.7, 100%.	[140]
Neuromoduladores	EAB-318	Ensayos <i>in vitro</i> : Ensayos de binding, medición de corrientes post-sinápticas excitatorias (CPE), neuroprotección por isquemia CCR 0.3 a 1000 $\mu$ M Ensayos <i>in vivo</i> , embriones de pollo, rebanadas de hipocampo de rata	<ul style="list-style-type: none"> <li>• CI<sub>50</sub> para el antagonismo del RNMDA: 7.9 nM</li> <li>• CI<sub>50</sub> para la inhibición de CPE inducidas por el RNMDA: 60 nM,</li> <li>• Efecto neuroprotector por hipoxia</li> </ul> Antagonismo del receptor AMPA/Kaínato	[141]

**Tabla 10.** Actividades biológicas reportadas para los aminofosfonatos (continuación).

Inmunomoduladores	8/13 Fosfono-derivados de ganciclovir C5a-c y5h-l	<p><i>In vivo</i>: modulación de células inmunes (↓ del estado activo) en Ratas obesas.                  Screening preliminar: 50, 100 y 200 mg/kg</p> <p>Dosis evaluada: 8 mg/kg, p.o., 1 vez al día/ 8 semanas</p>	<p>El C5i disminuye significativamente:</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• El no de linfocitos, monocitos y neutrófilos en sangre y</li> <li>• Los niveles séricos de TNF<math>\alpha</math>, IL-1, IL-6 y proteína C reactiva</li> </ul>	[142]
-------------------	---	--	---	-------

Por otro lado, es importante destacar que el gran potencial biológico de estos compuestos se debe en parte a que los  $\alpha$ -aminofosfonatos tienen la capacidad de actuar como potentes inhibidores enzimáticos. Esto a su vez se debe a las características estructurales y electrónicas del andamiaje N-C-P, así como su tamaño, que les permite actuar como: 1) sustitutos de sus análogos en varios péptidos, 2) falsos sustratos o 3) inhibidores de una gran variedad de enzimas. La combinación de estas características junto con la adición de sustituyentes que están dirigidos a mejorar la afinidad por el sitio activo provee la posibilidad de crear inhibidores enzimáticos de todas las clases; estructuralmente diversos, efectivos y selectivos (tabla 8). Esta aproximación ha sido particularmente exitosa en el caso de enzimas que catalizan reacciones de hidrólisis (proteasas, EC 3.4) o la formación de enlaces de amidas (ligasas, EC 6.3). Resalta de manera importante la capacidad del aminofosfonato antihipertensivo fosinopril para inhibir metaloproteasas como la Enzima Convertidora de Angiotensina I (ECA). La ECA desempeña un papel importante en la fisiopatología de la hipertensión arterial, razón por la cual el fosinopril actualmente se encuentra entre el arsenal de medicamentos disponibles para el tratamiento de la hipertensión [143].

**Tabla 11.** Enzimas que pueden ser inhibidas por  $\alpha$ -aminofosfonatos y tipo de inhibición. Modificado de Mucha y cols. 2011.

Clase de enzima	Nombre del Enzima (ECN)	Tipo de Inhibición
Oxidoreductasas	1-deoxi-xilulosa 5-fosfato reductoisomerasa [1.1.1.267]	S/P
	Tirosinasa [1.14.18.1]	
Transferasas	Aspartato transcarbamoilasa [2.1.3.2]	S/P
	Ornitina transcarbamoilasa [2.1.3.3]	ETS
	Betaína-homocisteína S-metiltransferasa [2.1.1.5]	ND
	Farnesil difosfato sintasa [2.5.1.10]	S/P
	Geranil-geranil difosfato sintasa [2.5.1.29]	S/P
	Hexoquinasa [2.7.1.1]	S/P
Hidrolasas	Esterasas Carboxiesterasa [3.1.1.1] Neuropatía esterasa [3.1.1.5] Acetilcolinesterasa [3.1.1.7] Butirilcolinesterasa [3.1.1.8]	ITS
	S-adenosil-L-homocisteína hidrolasa [3.3.1.1]	S/P
	Proteasas Metaloproteasas Leucina aminopeptidasa [3.4.11.1] Aminopeptidasa [3.4.11.2] Aminopeptidasa A [3.4.11.7] Dipeptidasa renal [3.4.13.11] Enzima convertidora de angiotensina I [3.4.15.1] Carboxipeptidasa A [3.4.17.21] Glutamato carboxipeptidasa II (NAALADasa) [3.4.17.21] Colagenasa bacteriana [3.4.24.3] Encefalinasa, neprilisina [3.4.24.11] Oligopeptidasa del timo [3.4.24.15] Endopeptidasa 24.16 [3.4.24.16] Astacina [3.4.24.21] Termolisina [3.4.24.27] Enzima convertidora de endotelina I [3.4.24.1f] Colagenasa intersticial (MMP-1) [3.4.24.7] Gelatinasa A (MMP-2) [3.4.24.24] Estromelisina 1 (MMP-3) [3.4.24.7] Matrilisina (MMP-7) [3.4.24.23] Neutrófilo colagenasa (MMP-8) [3.4.24.34] Gelatinasa B (MMP-9) [3.4.24.35] Estromelisina 3 (MMP-11) [3.4.24. B3] Elastasa macrófaga (MMP-12) [3.4.24.65] Colagenasa 3 (MMP-13) [3.4.24. B4] Membrana de tipo MMP-1 (MMP-14) [3.4.24.80]	S/P, TS
	Proteasas aspárticas Pepsina [3.4.23.1] Renina [3.4.23.15] Proteasa del VIH-1 [3.4.23.160] Penicilopepsina [3.4.23.20] $\beta$ -secretasa ( $\beta$ ACE1) [3.4.23.46]	TS

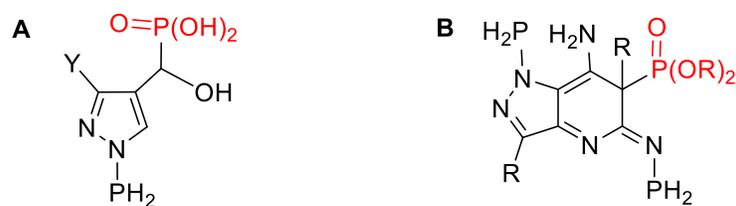
**Tabla 12** Enzimas que pueden ser inhibidas por  $\alpha$ -aminofosfonatos y tipo de inhibición. Modificado de Mucha y cols. 2011. (continuación)

Hidrolasas	Proteasas de serina DDP II [3.4.14.2] DPP IV [3.4.14.5] Quimotripsina [3.4.21.1] Tripsina [3.4.21.4] Trombina [3.4.21.5] Catepsina G [3.4.21.20] Elastasa de neutrófilo humano [3.4.21.37] Mastocitos triptasa [3.4.21.59] Activador del plasminógeno tipo uroquinasa [3.4.21.73] Granzima A y B [3.4.21.78 y 3.4.21.79] Seprasa [3.4.21. B28] Hepacivirina (proteasa NS3 del VHC) [3.4.21.98]	ITS
	Fosfatasa alcalina [3.1.3.1]	ND
	Ureasa [3.5.1.5]	ETS
	$\beta$ -lactamasa [3.5.2.6]	ITS
	Pirofosfatasa [3.6.1.1]	S/P
Liasas	Dialquilglicina descarboxilasa [4.1.1.64]	S/P
	KDOP sintasa [4.1.2.16]	TS
Isomerasas	Alanina racemasa	S/P
Ligasas	Alanina t-RNA ligasa	TS
	Glutamina sintetasa [6.3.1.2]	ETS
	Glutación sintetasa [6.3.2.3]	TS
	D-Alanil-D-alanina ligasa [6.3.2.4]	TS
	Glutiónespermidina sintetasa [6.3.1.8]	TS
	UDP-N-acetilmuramoil-alanina-D-glutamato ligasa, Murd [6.3.2.9]	TS
	Enzima que agrega D-Ala-D-Ala [6.3.2.15]	TS

De modo similar, también se han sintetizado  $\alpha$ -aminofosfonatos que pueden inhibir potentemente enzimas como la glutamina sintetasa, la ureasa, o la proteasa de VIH-1 por lo que estos compuestos representan una nueva terapéutica potencial para el tratamiento de la tuberculosis, infecciones por bacterias, protozoarios y VIH, respectivamente.

### 1.9.3. Efecto de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos en la inflamación

Los  $\alpha$ -aminofosfonatos exhiben una gran variedad de efectos biológicos. Sin embargo, hasta el momento existen pocos reportes en donde se haya evaluado si estos compuestos tienen la capacidad de interferir con el proceso inflamatorio.



**Figura 8.** Estructuras representativas resultado de los trabajos de Abdou y colaboradores. Estas moléculas son derivados de fosfo-sustituidos heterocíclicos en el 2011 (panel A) y derivados de fósforo pirazol sustituidos en el 2012 (panel B) que demostraron tener actividad anti-inflamatoria en los modelos de edema intra-plantar inducido por carragenina

En este contexto destaca el grupo de Abdou y colaboradores, quienes se han dedicado a la síntesis de  $\alpha$ -aminofosfonatos con propiedades analgésicas y anti-inflamatorias. El resultado de estos esfuerzos fue la síntesis de 8  $\alpha$ -aminofosfonatos en el 2011, con propiedades anti-inflamatorias (figura 8, panel A). El efecto anti-inflamatorio reportado fue del 7 al 51.2% y se observó 4 horas después de la administración intraperitoneal de 0.11 mMol/kg de peso de cada uno de estos compuestos en el modelo de edema plantar inducida por carragenina en rata [144]. Posteriormente en el 2012 [145], este mismo grupo sintetizó una serie de 9 enamino- y  $\alpha$ -aminofosfonatos con propiedades analgésica y anti-inflamatorias (figura 8, panel B). Estos compuestos inhibieron la inflamación inducida por carragenina en rata del 2.1 al 63% siendo dos derivados de piridina fosfonato los más activos (61 y 63.6% de inhibición del edema, respectivamente). Este efecto se observó cuatro horas después de la administración subcutánea de una dosis de 100 mg/kg de cada uno de los  $\alpha$ -aminofosfonatos. Es importante mencionar que estos compuestos también exhibieron efecto analgésico, siendo de nuevo los derivados de piridina fosfato los más activos [144]. En concordancia con estos resultados, Sienczyk y colaboradores en el 2014 repostaron la síntesis de una serie de 12 sondas basadas en actividad (ABP, por sus siglas en inglés *activity based probes*), cuya cabeza armada es un diaril-éster 1-aminoalquilfosfonato [146]. Estas sondas fueron diseñadas con el objetivo de inhibir proteasas de serina de neutrófilos. Lo anterior es relevante debido a que durante el proceso inflamatorio, los neutrófilos además de secretar agentes altamente reactivos, también secretan proteasas de serina como la captésina G, la neutrófilo elastasa, la proteinasa 3 y la proteasa de serina 4. La función principal de las proteasas de serina ésta asociada con la respuesta inmune innata. Sin embargo, la actividad de las proteasas no está limitada al sitio de la inflamación, por lo que su actividad debe ser controlada de manera muy precisa para limitar la degradación tisular. La actividad

descontrolada de las proteasas de neutrófilos puede llevar al desarrollo de enfermedades que comprometen la vida del paciente como la enfermedad pulmonar crónica obstructiva. En este contexto, las proteasas de neutrófilo son un blanco terapéutico para controlar la inflamación. Por esa razón, en el estudio ya mencionado se evaluó la capacidad de las 12 sondas para inhibir, en un rango de concentración de 10 nM a 2  $\mu$ M, a la neutrófilo elastasa de humanos, la captensina G y la proteasas de serina 3 (tabla 9). Encontrándose que 9 de las 12 sondas inhiben a la neutrófilo elastasas humana, siendo la sonda 1 la más activa. De estas, 7 sondas fueron capaces de inhibir a la proteasa de serina 3 siendo la 4 y la 8 las más activas ( $K_{obs}/L$ ). Mientras que sólo 6 de las sondas inhibieron a la captensina G, siendo las sondas 9, 10 y 11 las más activas.

**Tabla 13.** Inhibición de proteasas de serina de neutrófilos por sondas basadas en  $\alpha$ -aminofosfonatos. Modificado de Grzywa y cols. 2014.

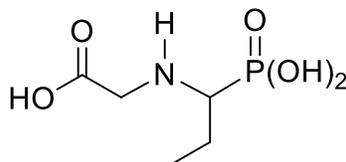
	ABP	$K_{obs}/[I]$ [ $M^{-1} S^{-1}$ ]		
		Elastasa de neutrófilo humana	Proteínasa 3	Catepsina G
1	Bt-Val-Pro-Ala <sup>P</sup> (O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-S-CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2.1x10 <sup>5</sup> ±8950	34%	n.i.
2	Bt-Val-Pro-Abu <sup>P</sup> (O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-S-CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	4.2x10 <sup>5</sup> ±300	5.1x10 <sup>3</sup> ±350	5%
3	Bt-Val-Pro-Val <sup>P</sup> (O-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	1.8x10 <sup>5</sup> ±7850	1.6x10 <sup>3</sup> ±100	n.i.
4	Bt-Val-Pro-Val <sup>P</sup> (O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-S-CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	5.5x10 <sup>5</sup> ±25000	1.6x10 <sup>4</sup> ±1200	n.i.
5	Bt-Val-Pro-Leu <sup>P</sup> (O-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	22% <sup>[a]</sup>	n.i.	n.i.
6	Bt-Val-Pro-Leu <sup>P</sup> (O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-O-CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	38%	n.i.	n.i.
7	Bt-Val-Pro-Leu <sup>P</sup> (O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-S-CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	1.7x10 <sup>4</sup> ±1550	21%	2.6x10 <sup>3</sup> ±125
8	Bt-Val-Pro-Leu <sup>P</sup> (O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-COOCH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	2.1x10 <sup>5</sup> ±30	1.9x10 <sup>4</sup> ±2300	1.6x10 <sup>3</sup> ±125
9	Bt-Val-Pro-Phe <sup>P</sup> (O-C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub>	n.i.	n.i.	4.5x10 <sup>3</sup> ±500
10	Bt-Val-Pro-Phe <sup>P</sup> (O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-S-CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	7.5x10 <sup>2</sup> ±25	n.i.	5.3x10 <sup>3</sup> ±900
11	Bt-LC-Suc-Val-Pro-Phe <sup>P</sup>	n.i.	n.i.	3.8x10 <sup>3</sup> ±10
12	Bt-LC-Suc-Phe-Val-Thr (4Gu)Phg <sup>P</sup> (O-C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> -4-S-CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	n.i.	2.1x10 <sup>3</sup> ±100	2.4x10 <sup>2</sup> ±25

[a] Porcentaje de inhibición a 5  $\mu$ M de inhibición probada. n.i.: <5% inhibición se observó en condiciones de ensayo (37 °C, 30 min).

#### 1.9.4. Toxicidad de los $\alpha$ -aminofosfonatos

Hasta el momento se ha descrito la importancia biológica de los  $\alpha$ -aminofosfonatos como potenciales nuevos fármacos para el tratamiento de diversas patologías. Sin embargo, existen pocos reportes en donde se evaluó su toxicidad más allá de su potencial citotóxico en líneas celulares cancerígenas. Lo anterior se debe probablemente a que inicialmente se asumió que

estos compuestos son inocuos por su analogía estructural con los aminoácidos naturales. Sin embargo, a partir del año 2000 se han publicado algunos estudios de toxicidad.



**Figura 9.** Estructura representativa de los compuestos derivados del  $\alpha$ -etil- N- (fosfonometil) glicina. Esta molécula es resultado del trabajo del grupo de Naydenova y cols. (2006) de efecto clastogénico y citotóxico moderados.

En este sentido, el grupo de Naydenova y colaboradores [147] evaluaron el potencial genotóxico, antiproliferativo y citotóxico de 11 nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos (figura 9). Encontraron que estos compuestos mostraron un efecto clastogénico moderado, en un rango de dosis entre 10 y 100 mg/kg, en comparación con mitomicina (<6.67% vs 46.67%). Además, se observó que el tipo de aberración cromosómica más frecuentemente inducida por  $\alpha$ -aminofosfonatos es la fusión de centrómeros. Por otro lado, se observó que 9 de estos compuestos tienen baja actividad antiproliferativa en células de la médula ósea a las dosis de 10 y 100 mg/kg, sin embargo 2 análogos hidantoin-fosfónicos muestran un efecto antiproliferativo importante. Finalmente estos compuestos poseen un buen efecto citotóxico contra células tumorales humanas [148] Adicional a estos hallazgos, también se ha reportado que algunos aminofosfonatos generan efectos hemolíticos en eritrocitos a concentraciones iguales o mayores a 100  $\mu$ M [148].

#### 1.9.5. Propiedades farmacocinéticas de los ácidos $\alpha$ -aminofosfónicos

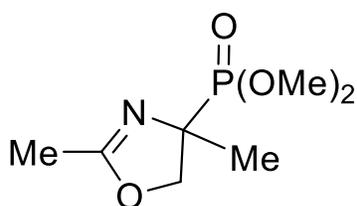
En lo que concierne a las propiedades farmacocinéticas de estos compuestos los estudios más completos son probablemente los realizados para la alafosfalina. La alafosfalina se absorbe rápidamente después de la administración parenteral. Alcanza su concentración plasmática máxima 20 minutos después de la administración subcutánea en ratas y el ABC de la curva de concentración plasmática vs tiempo es de 25  $\mu$ g.h / mL después de una dosis de 20 mg/kg. El tiempo de vida media plasmático se encuentra entre 20 min en ratas y una hora en humanos. El fármaco se absorbe rápidamente por vía oral, pero por esta ruta es 8 veces menos efectivo debido a que el dipéptido es ampliamente hidrolizado. La administración por vía

intramuscular de una dosis de 200 o 500 mg/kg produce una concentración inhibitoria plasmática adecuada para varios patógenos. El compuesto es rápidamente aclarado por vía renal, tanto en forma de dipéptido como del aminoácido L-AlaP. Alafosfalina es bien tolerada y posee baja toxicidad en mamíferos [149].

#### 1.9.6. Nuevos $\alpha$ -aminofosfonatos

Los antecedentes ya mencionados sugieren que los  $\alpha$ -aminofosfonatos son moléculas que potencialmente pueden ser usadas en el tratamiento de la inflamación. Debido a lo anterior, actualmente la investigación se ha enfocado en realizar modificaciones estructurales con la finalidad de que las nuevas estructuras posean múltiples efectos biológicos, mejores propiedades farmacocinéticas y presenten menos efectos adversos.

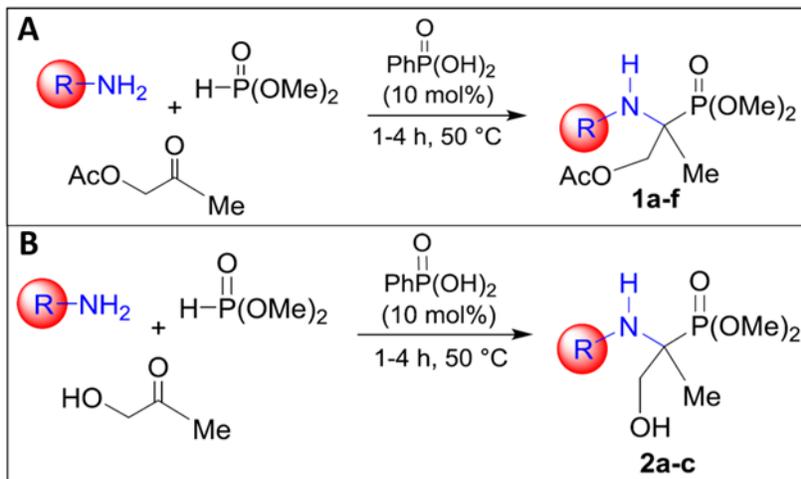
En este sentido el grupo de investigación del Dr. Mario Ordoñez del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM, sintetizó 10 nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos basados en una molécula ideal, el dimetil 2,4-dimetil-5H-1,3-oxazol-4-ylfosfonato (figura 10). Esta molécula se analizó con el programa de predicción de actividades biológicas PASS Online [150] que mostró que tenía un alto potencial como agente anti-inflamatorio, por lo que se decidió sintetizarla. Sin embargo, la síntesis ha sido compleja, por lo que se decidió evaluar el efecto anti-inflamatorio de algunos de los intermediarios buscando hacer variaciones estructurales que mejoraran sus propiedades fisicoquímicas.



**Figura 10.** Estructura química del dimetil 2,4-dimetil-5H-1,3-oxazol-4-ylfosfonato. Los  $\alpha$ -aminofosfonatos de este proyecto son análogos de esta molécula.

Estos intermediarios se sintetizaron a través de la reacción de tres componentes de acetoxiacetona o hidroxiacetona con diversas aminas alifáticas y dimetilfosfito en presencia de cantidades catalíticas de ácido fenilfosfónico en condiciones libre de disolventes. Los  $\alpha$ -aminofosfonatos 1a-f y 2a-c se obtuvieron con buenos rendimientos, como mezclas inseparables de enantiómeros. Cuando la reacción de tres componentes se realizó con *terc-*

butilamina como amina alifática, se aisló el correspondiente  $\alpha$ -hidroximetilfosfonato aisló con un rendimiento del 89-(figura 11).



**Figura 11.** Reacción tri-componente para la obtención de los diferentes  $\alpha$ -aminofosfonatos. A partir de acetoxiacetona y con diversas aminas alifáticas y dimetilfosfito en presencia de 10% de ácido fenilfosfónico, se obtuvieron los de la serie **1a-f** (A) y de la serie **2a-c** (B)

## 2. Justificación

Actualmente, existe una gran diversidad de enfermedades relacionadas directa o indirectamente con la inflamación que afectan a un porcentaje importante de la población. Éstas se tratan con grupos de fármacos como los AINE's y los glucocorticoides que poseen diversos efectos adversos y que no curan, ni detienen el progreso de las enfermedades inflamatorias. Sin embargo, está bien documentado que si se controlan los síntomas cardinales de la inflamación, se logra un mejor control de la enfermedad lo que conlleva a una mejora en la calidad de vida de los pacientes. Debido a lo anterior es una necesidad buscar nuevos fármacos anti-inflamatorios más eficaces y que demuestren un perfil de seguridad alto.

Los aminofosfonatos son una familia de compuestos químicos diversos, con un alto potencial biológico y a los que se les ha demostrado diversas actividades biológicas que incluyen la antibacteriana, antiviral, neuroprotectora y antitumoral. Además, el análisis estructural con programas computacionales sugiere un buen potencial como agentes anti-inflamatorios e inmunomoduladores. En concordancia algunos tipos de  $\alpha$ -aminofosfonatos han mostrado efecto antiinflamatorio en roedores. Lo anterior los convierte en una alternativa potencial para el tratamiento de enfermedades que cursan con procesos inflamatorios. En este sentido el grupo de investigación del Dr. Mario Ordoñez del Centro de Investigaciones Químicas de la UAEM sintetizó 10 nuevos análogos de  $\alpha$ -aminofosfonatos a través de una reacción en un solo paso. Estos compuestos fueron caracterizaron químicamente, pero es necesario demostrar si poseen efectos anti-inflamatorios. Así, el objetivo del presente proyecto es determinar si los nuevos aminofosfonatos poseen efecto anti-inflamatorio y realizar un estudio pre-eliminar de su toxicidad aguda *in vivo*.

### 3. Hipótesis

Los nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos disminuyen la inflamación auricular aguda inducida por TPA en ratón y presentarán baja toxicidad aguda.

### 4. Objetivo General

Determinar, *in vivo*, el efecto anti-inflamatorio de 10 nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos en un modelo de inflamación aguda en ratón, así como su toxicidad aguda.

#### 4.1. Objetivos particulares

1. Caracterizar el curso temporal de la inflamación auricular inducida por TPA en ratón.
2. Evaluar el efecto de nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos en la inflamación aguda en el modelo de edema auricular inducido por TPA en ratón.
3. Determinar si el efecto anti-inflamatorio de los  $\alpha$ -aminofosfonatos más activos se debe a la modulación del influjo de células blancas en sangre periférica.
4. Realizar un estudio preliminar de la toxicidad oral aguda de los  $\alpha$ -aminofosfonatos más activos en ratón.

## 5. Materiales y métodos

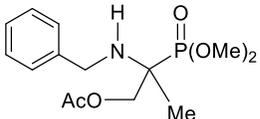
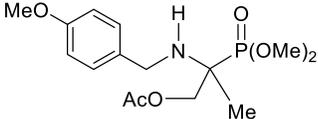
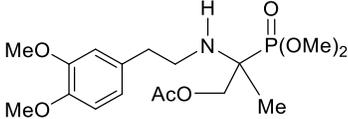
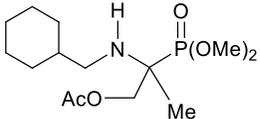
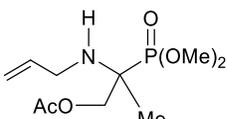
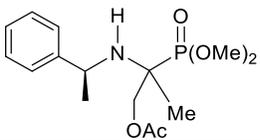
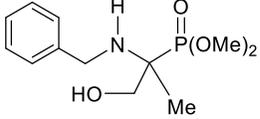
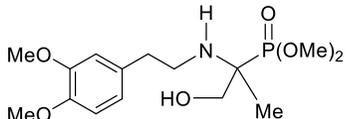
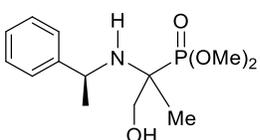
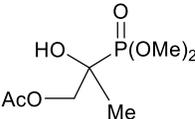
### 5.1. Animales

Los experimentos se realizaron en ratones hembra de la cepa CD1 con un peso corporal de 30-35 gramos y de entre 6-8 semanas de edad, provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UAEM. Los animales se mantuvieron con 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 a los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 [151] para el cuidado y manejo animales de laboratorio. El protocolo fue aprobado por el comité de ética de la Facultad de Medicina de la UAEM.

### 5.2. Fármacos

En el presente trabajo se evaluó el efecto anti-inflamatorio de 10  $\alpha$ -aminofosfonatos que fueron sintetizados y proporcionados en el grupo del Dr. José Mario Ordoñez Palacios del Centro de investigaciones de la UAEM (tabla 10). Para realizar la aplicación tópica, estos compuestos fueron disueltos en Etanol (EtOH) absoluto. (Etanol, Mesa S.A. de C.V., No. de lote: 20160121AE96). Como controles positivos se utilizaron indometacina (Sigma, No. de lote: 065M4173V) a la dosis de 0.125, 0.25, 0.5, 0.75, 1 mg/oreja, y metilprednisolona (SOLO-MEDROL<sup>®</sup> Pfizer, No. de lote: T03782) a la dosis de 25, 50, 100, 200 y 400  $\mu$ g/oreja disueltos en acetona (High Purity, No. de lote: 16A0064). Para la inducción de la inflamación se utilizó Forbol 12-miristato 13-acetato (TPA) a una concentración de 2.5  $\mu$ g/ $\mu$ L por oreja (Sigma, No. de lote: MKBX7269V). Todos los fármacos y compuestos fueron preparados el día del experimento.

**Tabla 14.** Estructura de los  $\alpha$ -aminofosfonatos donados por el Dr. Mario Ordoñez del CIQ de la UAEM. Se presenta su estructura, nombre químico y clave.

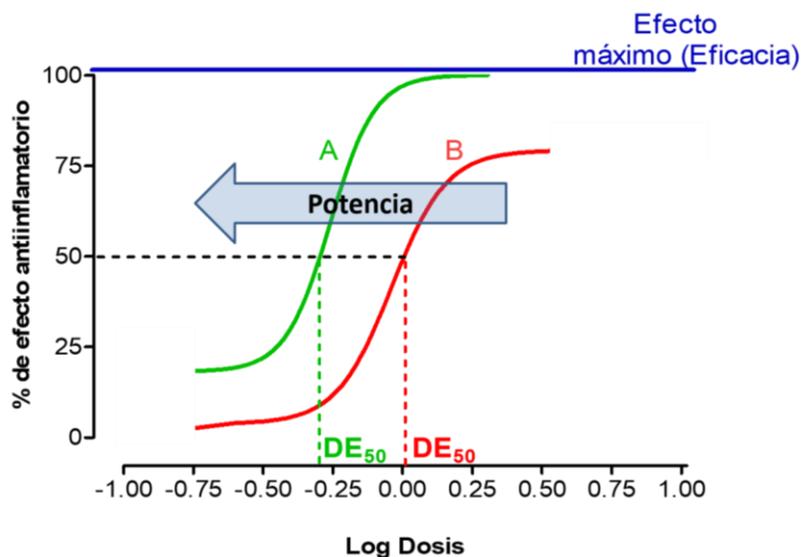
Estructura	Nombre químico	Clave
	Dimetil (2(bencilamino)-1-acetoxipropan-2-il)fosfonato	(1a) Occ-1a
	Dimetil (1-acetoxi-2-((4-metoxibencil)amino)propan-2-il)fosfonato	(1b) Occ-r1b
	Dimetil (2-((3,4-dimetoxifenetil)amino)-1-acetoxipropan-2-il)fosfonato	(1c) Occ-r1c
	Dimetil (2-((ciclohexilmetil)amino)-1-acetoxipropan-2-il)fosfonato	(1d) Occ-r1d
	Dimetil (2-(alilamino)-1-acetoxipropan-2-il)fosfonato	(1e) Occ-r1e
	Dimetil (1-acetoxi-2-(((s)-1-feniletil)amino)propan-2-il)fosfonato	(1f) Occ-r1f
	Dimetil (2-(bencilamino)-1-hidroxipropan-2-il)fosfonato	(2a) 2a
	Dimetil (2-((3,4-dimetoxifenetil)amino)-1-hidroxipropan-2-il)fosfonato	(2b) 2b
	Dimetil (1-hidroxi-2-(((s)-1-feniletil)amino)propan-2-il)fosfonato	(2c) 2c
	2-(dimetoxifosforilo)-2-acetato de hidroxipropilo	(3) Occ-r3

### 5.3. Modelo de inflamación auricular aguda inducida por TPA

Para evaluar el efecto anti-inflamatorio de los nuevos análogos de  $\alpha$ -aminofosfonatos se utilizó la prueba de edema auricular inducida por TPA. Para esto, a los ratones bajo condiciones de anestesia (pentobarbital sódico, 63 mg/Kg de peso, i.p.) se les recortó el pelo circundante del entorno de la oreja. Posteriormente, con una micropipeta se realizó la aplicación de TPA a una concentración de 2.5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  en el pabellón auricular interior (5  $\mu\text{L}$ ) y en la cara exterior de la oreja (5  $\mu\text{L}$ ). Una vez aplicado el TPA se inició el registro del tiempo (tiempo 0). Cinco minutos después de la aplicación del TPA se administraron por vía tópica el vehículo, dosis crecientes de los  $\alpha$ -aminofosfonatos (0.1-10 mg/oreja) o los controles positivos en un volumen de 20  $\mu\text{L}$  (10  $\mu\text{L}$  en cada lado de la oreja). Cuatro horas post-TPA, se sacrificó al ratón por sobredosis de anestesia e inmediatamente se obtuvo una biopsia de 6 mm de diámetro tanto de la oreja derecha (oreja tratada) como de la oreja izquierda (oreja control) con un sacabocado (figura 12). Las biopsias de ambas orejas se pesaron en una balanza analítica para calcular el porcentaje de inflamación con la siguiente fórmula:

$$\% \text{ de inflamación} = \left( \frac{\text{Peso de la biopsia tratada con el compuesto} * 100}{\text{Peso de la biopsia tratada con el vehículo}} \right) - 100$$





**Figura 13.** Esquema representativo de la curva dosis-respuesta de dos compuestos hipotéticos A y B. Está marcada con líneas punteadas la posición de la dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ), con base en esto se puede decir que el compuesto A es más eficaz que el compuesto B dado que si alcanza el 100% de efecto; y que el compuesto A también es más potente que el B al 50% del efecto.

La representación gráfica de la curva concentración respuesta con frecuencia mejora cuando se contrasta el efecto del fármaco en función al logaritmo de la dosis. El modelo sigmoideo de la curva dosis-respuesta se caracteriza por dos asíntotas en los extremos y en la porción media, una recta con una pendiente ( $m$ ) característica. La  $m$  es la razón de cambio del efecto en función de la concentración o la dosis empleada del fármaco; por ejemplo los fármacos que presenten una  $m$  con alta inclinación significa que pequeñas variaciones en la dosis inducen grandes variaciones en la magnitud del efecto. Por el contrario, una inclinación cercana a la horizontal sugiere que cambios significativos en la dosis generan poca variación en la magnitud del efecto. Adicionalmente, la gráfica permite discernir si una molécula sintética o de origen natural ejerce efectos como agonista total o parcial sobre su blanco molecular, es decir si su afinidad con su diana farmacológica (receptor, enzima o canal iónico) es igual o más grande que su ligando endógeno (total) o es menor (parcial). En este estudio utilizamos esta herramienta para determinar la  $DE_{50}$ , la eficacia máxima (efecto antiinflamatorio máximo) y la potencia relativa y además nos permitió clasificar a los  $\alpha$ -aminofosfonatos en agonistas parciales o totales.

#### 5.4. Cuantificación de células inmunes en muestras de sangre periférica

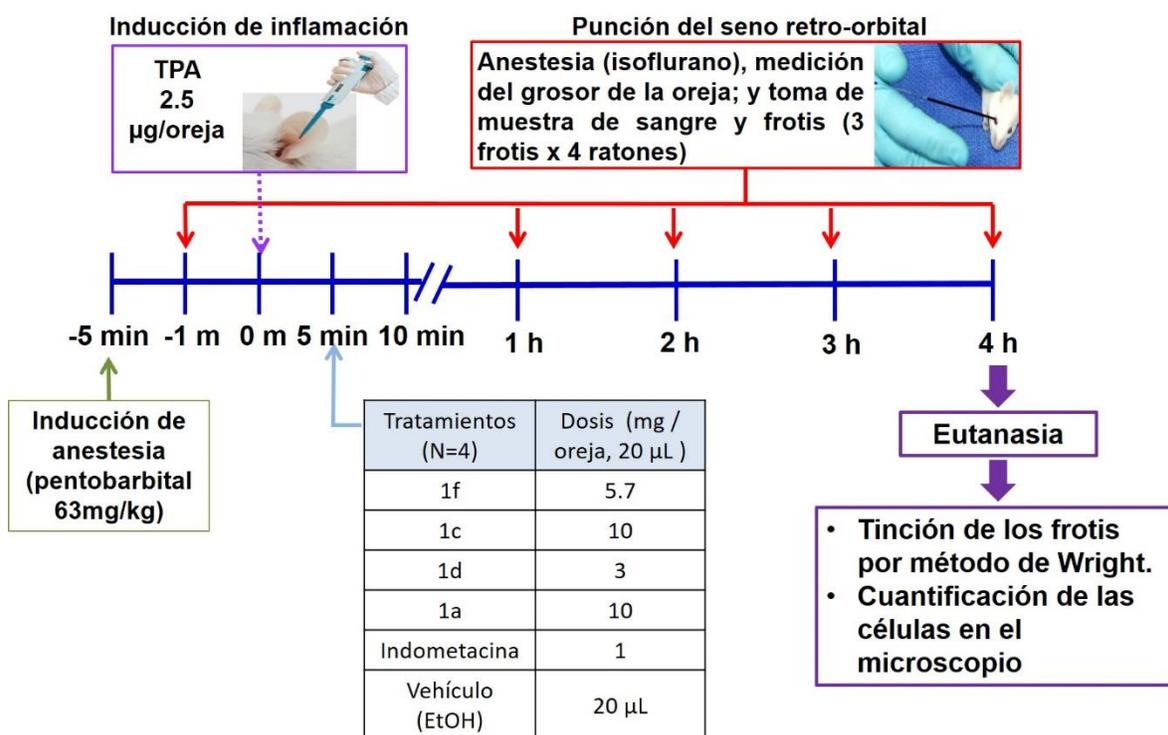
Para determinar si los  $\alpha$ -aminofosfonatos que mostraron el mayor efecto anti-inflamatorio eran capaces de inhibir la infiltración de células inmunes durante el proceso inflamatorio, se realizó la cuantificación de monocitos, neutrófilos y linfocitos, en frotis de muestras de sangre periférica del ratón, obtenidas a las 0, 1, 2, 3 y 4 horas después de la inducción de la inflamación con TPA (figura 14). Para obtener las muestras de sangre, al ratón se le indujo anestesia mediante la inhalación de isoflurano. Posteriormente, se realizó la extracción de sangre con un capilar de vidrio previamente heparinizado utilizando el método de punción del seno retro-orbital, el cual es el lecho vascular más cercano al sitio de la inflamación. Este método consiste en introducir de 1 a 2 milímetros del capilar en el pliegue semilunar del ojo del ratón en un ángulo recto para que la sangre suba por capilaridad y cuando este se llenó aproximadamente hasta la mitad del capilar se retiró con suavidad. Inmediatamente se tomaron 3  $\mu$ L de sangre del interior del capilar con una micropipeta y se depositaron en un portaobjetos de cristal limpio y desgrasado. La muestra de sangre se extendió con otro portaobjetos limpio para obtenerse una capa delgada y homogénea sobre la superficie (frotis) y se dejó secar al aire durante 5 min. Se realizaron tres frotis por cada tiempo, por ratón y 4 ratones por compuesto (12 laminillas por tiempo). Una vez secos los frotis se tiñeron como se describe a continuación.

##### 5.4.1. Tinción de Wright

Para realizar la tinción de los frotis, estos se colocaron en una bandeja de tinción y se cubrieron con aproximadamente 2 mL de colorante de Wright (el necesario para cubrir toda la muestra) por 2 minutos. Después, se les agregó la misma cantidad de buffer de fosfatos (1X, pH 7.4) y se incubaron durante 4 minutos más. Posteriormente se eliminó por decantación el exceso de colorante y buffer de los frotis y después se les realizó 2 lavados bajo el chorro de agua corriente, durante aproximadamente 10 segundos. Finalmente se permitió que los frotis se secaran al aire completamente durante al menos 1 hora antes de realizar el análisis microscópico.

#### 5.4.2. Cuantificación de células inmunes

Para realizar el conteo de linfocitos, monocitos y neutrófilos, el frotis se colocó en la platina del microscopio y se enfocó inicialmente con el objetivo 4X, y después con el de 40X. Con esta magnificación se realizó el conteo directo de monocitos, neutrófilos y linfocitos, haciendo barridos en forma de Z a todo lo largo y ancho del portaobjetos y procurando no leer el mismo espacio dos veces. Los resultados se expresan como el promedio de tres frotis por cada tiempo y 4 ratones por grupo experimental.

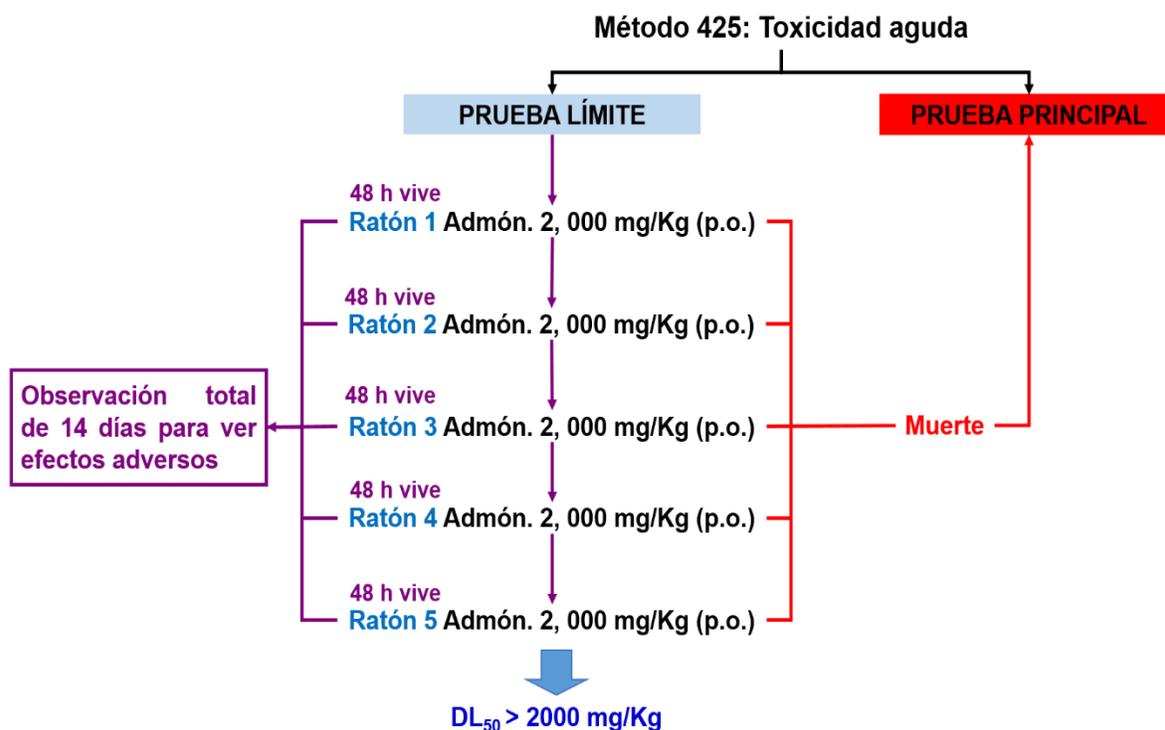


**Figura 14.** Diseño experimental para la cuantificación de linfocitos monocitos y neutrófilos. Esta evaluación se llevó a cabo en sangre periférica de ratones con inflamación auricular inducida por TPA con o sin tratamiento con los  $\alpha$ -aminofosfonatos.

#### 5.5. Prueba de toxicidad aguda: Determinación de la dosis letal 50

Para determinar la toxicidad aguda de los nuevos análogos de  $\alpha$ -aminofosfonatos, se utilizó la prueba de toxicidad aguda de Up-and-Down de la Organización Europea para la Cooperación y el Desarrollo Económico (OECD, *por sus siglas en inglés*) para la evaluación de toxicidad aguda de sustancias químicas. Esta prueba tiene como ventaja que utiliza un menor número de animales en comparación con otros métodos. La prueba se divide en dos

etapas: la prueba límite y la prueba principal (figura 15). Esta prueba se inicia administrando inicialmente y por vía oral (p.o.) una dosis de 2000 mg/Kg a un primer ratón (ratón 1), previo ayuno de 4 horas, de uno de los  $\alpha$ -aminofosfonatos. Posterior a la administración, dicho ratón se mantiene en observación por 48 horas para detectar cambios conductuales gruesos indicativos de otros efectos adversos. Si después de este periodo el ratón no muere, se administra un segundo ratón (ratón 2) con la misma dosis (2000 mg/Kg, p.o.) y se observa nuevamente durante 48 horas, si el ratón 2 no muere, se administra el ratón 3 con la misma dosis y el mismo tiempo de observación, así hasta completar los 5 ratones administrados con la dosis de 2000 mg/Kg, p.o. Si ninguno de los 5 ratones muere la prueba habrá terminado y se estima que la DL50 es mayor a 2000 mg/kg. Sin embargo, si cualquiera de los 5 ratones muere en esta etapa se realizará la prueba principal (figura 15).



**Figura 15.** Esquema de administración y seguimiento para determinar la DL50 de los  $\alpha$ -aminofosfonatos a través de la prueba límite de la OECD 425. Si cualquiera de los 5 ratones muere durante este proceso, inmediatamente se procede a realizar la prueba principal.

Esta prueba consiste en administrar a los diferentes ratones con diferentes dosis consecutivas sugeridas por la OECD, siguiendo el método de arriba y abajo (Up-and-Down). La OECD sugiere que al primer ratón de esta prueba se le administre la dosis de 175 mg/Kg, p.o., el

cual se observó por 48 horas. El resultado puede ser que el ratón muera o viva. Si el ratón vive, el segundo ratón se administra con la dosis de 550 mg/Kg, p.o. Pero si el ratón muere se administra la dosis de 55 mg/Kg, p.o. Se continúa con este procedimiento hasta haber administrado 5 ratones. Con los resultados obtenidos, se calculó la DL<sub>50</sub> utilizando la media geométrica con la siguiente formula:

$$GM_{\bar{y}} = \sqrt[n]{(y_1)(y_2)(y_3)}$$

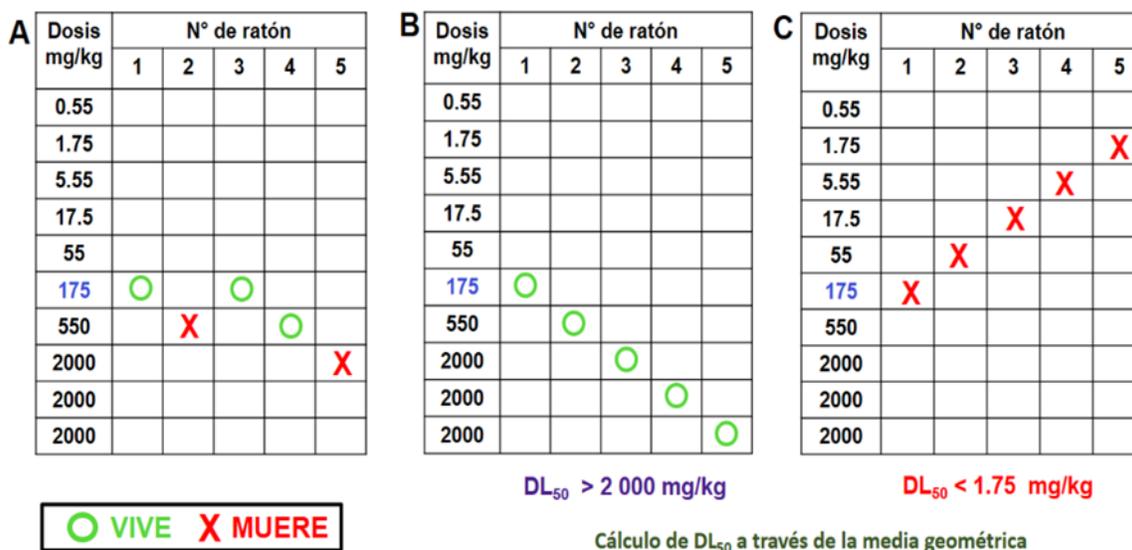
En donde:

$GM_{\bar{y}}$  = Media geométrica       $y_{1...n}$  = Dosis utilizadas      n=No. de dosis utilizadas

En la figura 16 (panel A) se muestra un ejemplo de cómo se realiza método Up-and-Down iniciando con la administración de la dosis de 175 mg/Kg al ratón 1. En este caso el ejemplo muestra que ratón vivió por lo que a el ratón 2 se le administró una dosis mayor, el método sugiere la dosis de 550 mg/Kg. Si el ratón muere entonces el siguiente ratón (ratón 3) se administra con una dosis menor en este caso sería otra vez 175 mg/kg, se continúa de esta manera hasta completar 5 ratones y con estos datos se calcula la DL<sub>50</sub>. En el panel B) se muestra un ejemplo en donde después de la administración inicial de la dosis de 175 mg/Kg al ratón 1 que sobrevive al tratamiento por lo que al ratón dos se le administra una dosis mayor. En este ejemplo dado que los ratones 2, 3, 4 y 5 también sobreviven, el método indica que la DL<sub>50</sub> de ese compuesto es mayor a 2000 mg/kg. Finalmente, en el panel C, se muestra un ejemplo en el que después de la administración inicial todos los ratones mueren. En este caso el método indica que la DL<sub>50</sub> del compuesto evaluado es <1.75 mg/Kg. Estos valores de DL<sub>50</sub> permitirán clasificar a los  $\alpha$ -aminofosfonatos de acuerdo a su grado de toxicidad.

## Prueba principal 425: Up-and-Down

5 dosis sugeridas por la OECD, una dosis por ratón



**Figura 16.** Método 425 “Up and Down” de la OECD, para determinar la  $DL_{50}$  de sustancias químicas.

Adicionalmente, todos los ratones que sobrevivieran el período de observación de 48 horas, deben ser observados por un total de 14 días con la finalidad de detectar otros efectos adversos de los compuestos, diferentes a la muerte. Esto se realizó a través del seguimiento del peso corporal y la detección de cambios en su conducta. Al final del período todos los animales sobrevivientes serán sacrificados y se les realizará una necropsia para identificar macroscópicamente cambios en la morfología de los órganos.

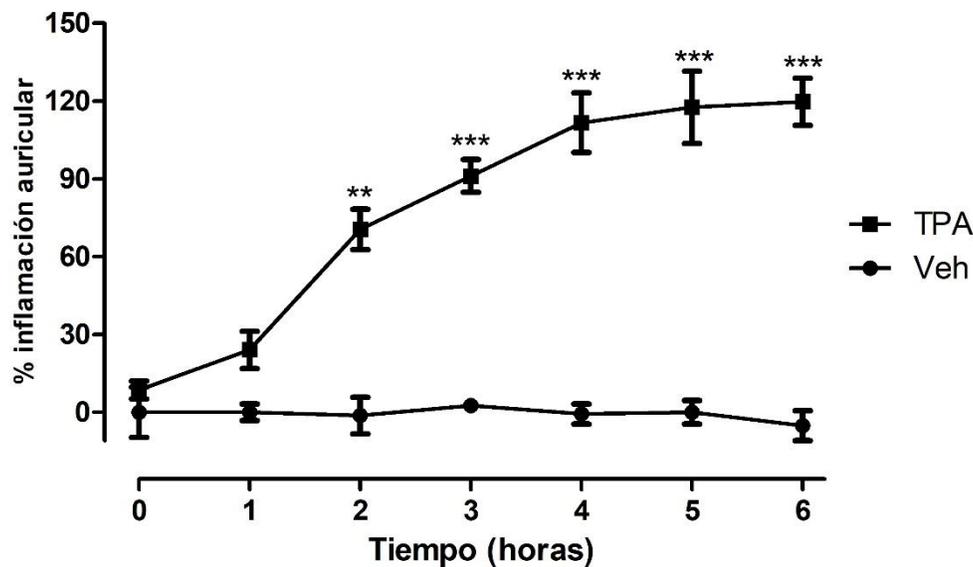
### 5.6. Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media de 8 animales  $\pm$  el error estándar de la media (SEM). Se realizó análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett para la comparación entre más de 3 grupos experimentales de un mismo tratamiento. Se consideró que existe una diferencia estadísticamente significativa cuando el valor de P fue menor a 0.05.

## 6. Resultados

### 6.1. Caracterización del curso temporal de la inflamación auricular inducida por TPA

Para caracterizar el curso temporal de la inflamación auricular inducida por la aplicación tópica de TPA, se realizó la medición del grosor de la oreja cada hora, durante 6 horas post-tratamiento. Se observó que el grosor de la oreja, en donde se aplicó el TPA, aumento gradualmente a partir de la hora 1, alcanzando su máximo entre la hora 4 y 6. Cabe destacar que la inflamación se mantuvo constante durante las 6 horas que duró el ensayo. Por otro lado, en la oreja en la que solo se administró el vehículo (EtOH) en el que fue disuelto el TPA, no se observó incremento del grosor de la oreja. Estos resultados indican que la inflamación auricular observada se debe a la aplicación del TPA y no al vehículo (figura 17).

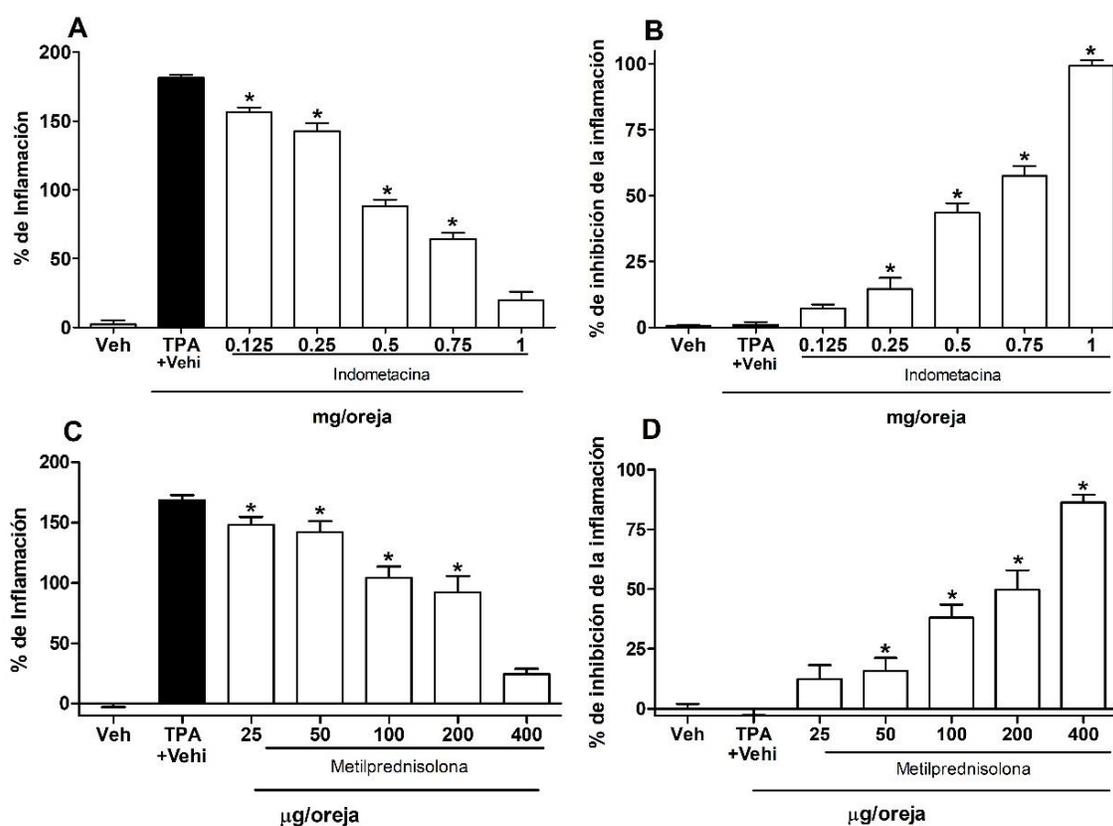


**Figura 17.** Curso temporal de la inflamación auricular inducida por TPA. Se observa un incremento gradual de la inflamación que alcanza un máximo grado entre las 4 y 6 horas. Cada punto representa el promedio de 8 animales  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , ANOVA de dos vías, post test de Bonferroni con respecto al vehículo.

Posteriormente para validar el modelo de inflamación auricular en nuestras condiciones experimentales, se realizó la evaluación de indometacina y metilprednisolona, ambos fármacos utilizados en la terapéutica actual de la inflamación y que pertenecen al grupo de los AINEs y de los glucocorticoides, respectivamente.

Los resultados mostraron que la aplicación tópica de dosis crecientes de indometacina (0.125-1 mg/oreja) y metilprednisolona (25-400  $\mu$ g/oreja) disminuyeron de manera dependiente de

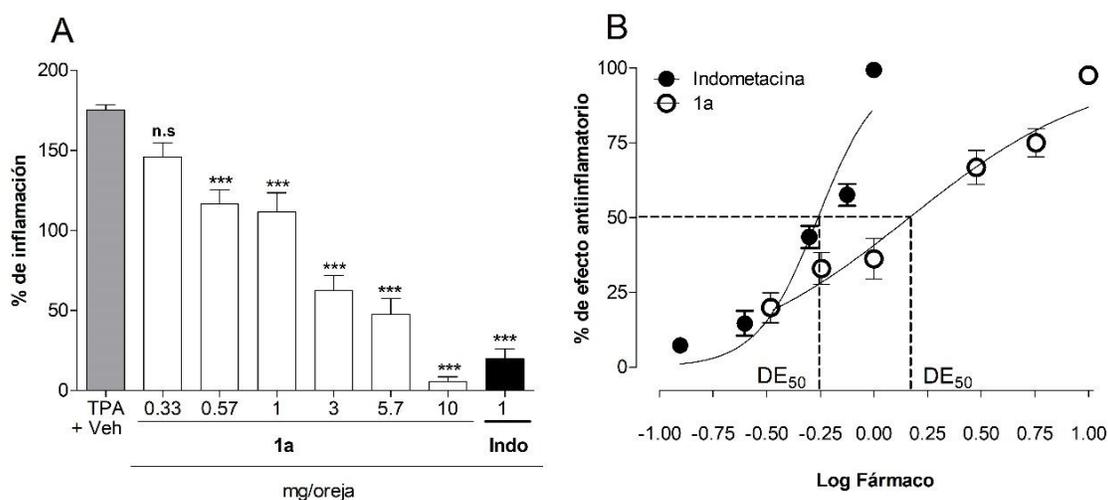
la dosis la inflamación auricular inducida por TPA. En el caso de la indometacina, la disminución de la inflamación fue estadísticamente significativa a partir de la dosis de 0.25 mg/oreja y hasta la dosis de 1 mg/oreja (figura 18A). Mientras que la metilprednisolona disminuyó significativamente la inflamación a partir de la dosis de 50  $\mu$ g/oreja. Cuando estos datos se expresaron como porcentaje de inhibición del edema auricular se observó que la eficacia máxima de la indometacina ( $99.34 \pm 1.9$ ) se alcanzó con la dosis de 1 mg/oreja (figura 18B) y la de la metilprednisolona ( $86.23 \pm 3.2$ ) se alcanzó con la dosis de 400  $\mu$ g/oreja (figura 18D). La dosis de 1,0 mg/oreja de indometacina se eligió para las comparaciones porque produjo el máximo efecto anti-inflamatorio en nuestras condiciones experimentales. Cabe destacar que la indometacina es el AINE más utilizado como control positivo en este modelo.



**Figura 18.** Curva dosis-respuesta del efecto anti-inflamatorio de indometacina (A-B) y de metilprednisolona (C-D) en el modelo de edema auricular inducido por TPA. En el panel A y C los datos se presentan en porcentaje de inflamación, mientras que en B y D se expresan como porcentaje de inhibición del edema. Cada punto representa el promedio de 8 animales  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos.

## 6.2. Evaluación del efecto anti-inflamatorio de los nuevos $\alpha$ -aminofosfonatos

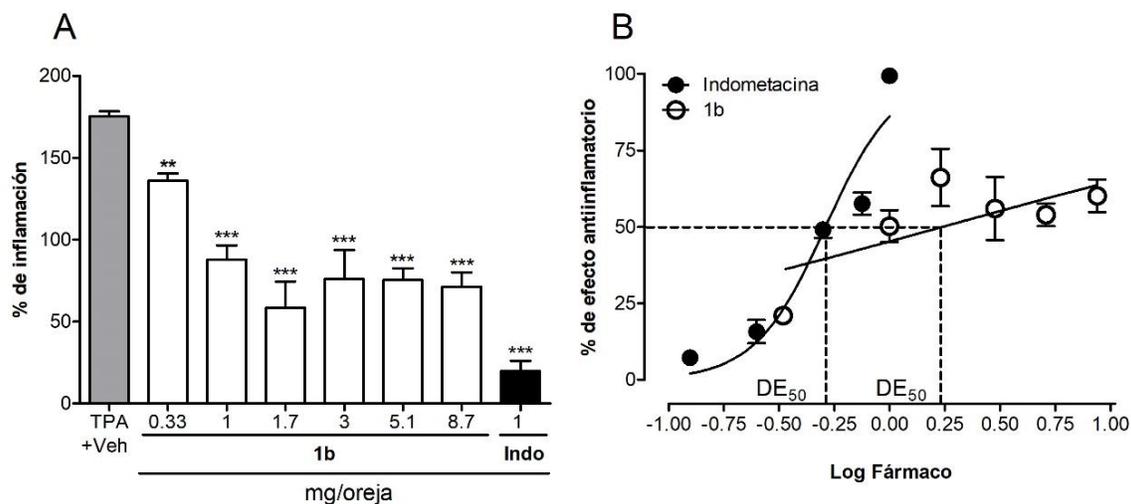
Para determinar si los diferentes  $\alpha$ -aminofosfonatos eran capaces de disminuir la inflamación inducida por TPA, dosis crecientes de cada aminofosfonato se aplicaron 5 minutos después de la aplicación auricular de TPA ( $t = 0$ ), posteriormente, 4 horas después de la administración se obtuvo una biopsia del tejido inflamado (oreja ipsilateral) y no inflamado (oreja contralateral) y con estos datos se calculó el % de inflamación y el % de efecto anti-inflamatorio. En este primer screening se evaluaron 10 nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos distintos. Los resultados mostraron que el tratamiento con el compuesto **1a** a las dosis de 0.33, 0.57, 1, 3 y 10 mg/oreja previnieron el edema de la oreja inducido por TPA de manera dependiente de la dosis. La curva dosis respuesta del porcentaje de efecto anti-inflamatorio del compuesto **1a** mostró que el efecto es estadísticamente significativo en comparación al vehículo del tratamiento a partir de la dosis de 0.57 mg/oreja y que la eficacia anti-inflamatoria máxima se alcanzó a la dosis de 10 mg/oreja (figura 19).



**Figura 19.** Efecto anti-inflamatorio del compuesto **1a** en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A: efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis respuesta del compuesto **1a**. Notar que el efecto anti-inflamatorio del compuesto **1a** es dependiente de la dosis. Cada punto representa el promedio de 8 animales  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos.

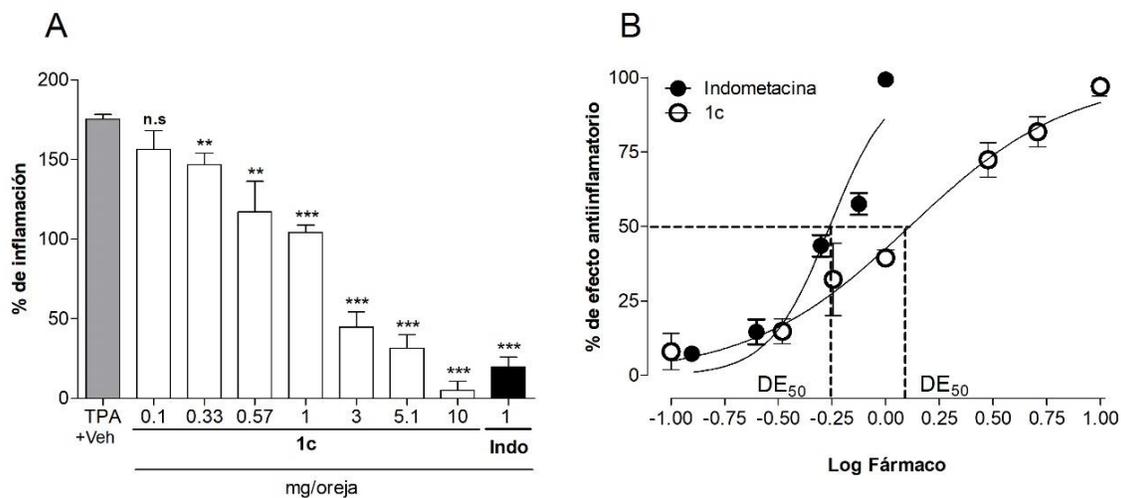
Por su parte, el compuesto **1b** presentó un efecto anti-inflamatorio menor a la de indometacina y mostró un comportamiento no-dependiente de la dosis (figura 20). La disminución de la inflamación fue estadísticamente significativa comparándola con el vehículo de los tratamientos a partir de la dosis de 0.33 y hasta la dosis de 8.7 mg/oreja. La

eficacia máxima observada fue del  $66.14 \pm 9.36\%$  lo que sugiere que este compuesto tiene un comportamiento tipo agonista parcial.



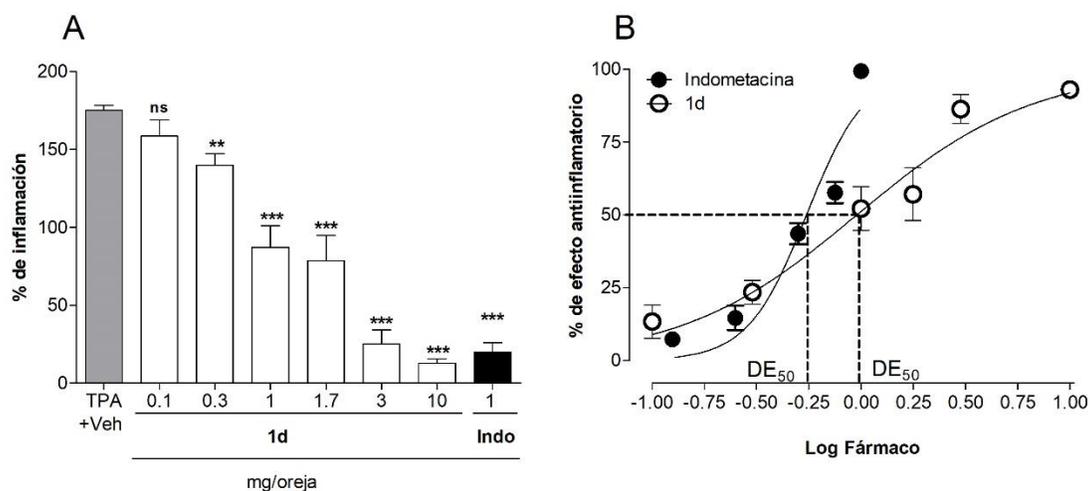
**Figura 20.** Efecto anti-inflamatorio del compuesto **1b** en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A: efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto **1b**. Notar que el efecto anti-inflamatorio del compuesto **1b** no es dependiente de la dosis. Cada punto representa el promedio de 8 animales  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto a TPA de los tratamientos.

La evaluación de compuesto **1c** exhibió que también posee actividad antiinflamatoria que es dependiente de la dosis. El efecto anti-inflamatorio observado fue estadísticamente significativo a partir de la dosis de 0.33 mg/oreja y hasta la dosis de 10 mg/oreja en comparación con el grupo tratado con el vehículo. La eficacia máxima fue de  $97.04 \pm 3.23\%$  y se observó a la dosis de 10 mg/oreja (figura 21) demostrando que el compuesto **1c** se comporta como un agonista total.



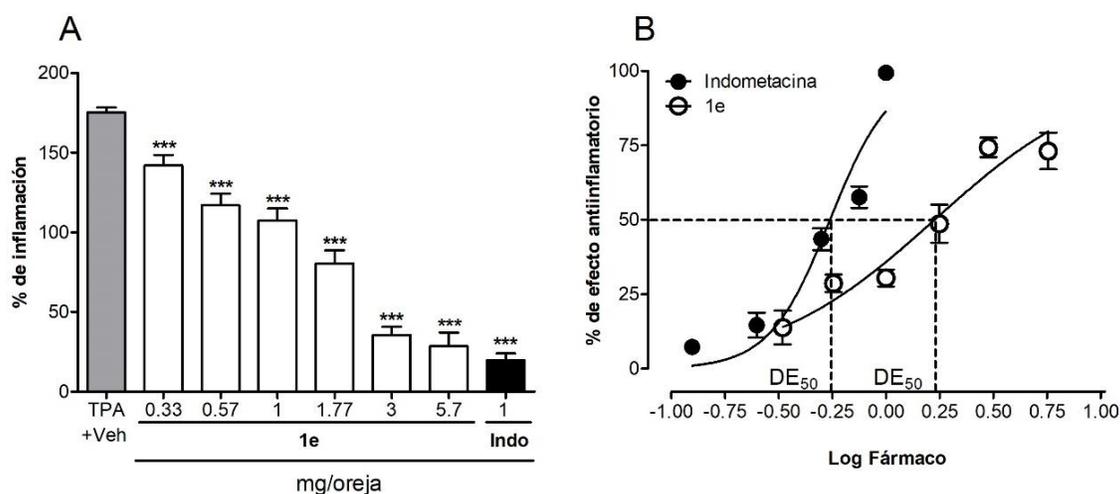
**Figura 21.** Efecto anti-inflamatorio del compuesto **1c** en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A: efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto **1c**. Cada punto representa el promedio de 6-8 animales  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos.

De forma similar, se encontró que el compuesto **1d** disminuyó la inflamación auricular inducida por TPA de manera dependiente de la dosis y que esta disminución fue estadísticamente significativa en todas las dosis evaluadas. La curva dosis-respuesta mostró que su eficacia máxima fue del  $86.27 \pm 4.99\%$  y  $92.98 \pm 1.55\%$ , a las dosis de 3 y 10 mg/oreja respectivamente (figura 22) a la vez que demostró que el compuesto tiene un comportamiento tipo agonista total.



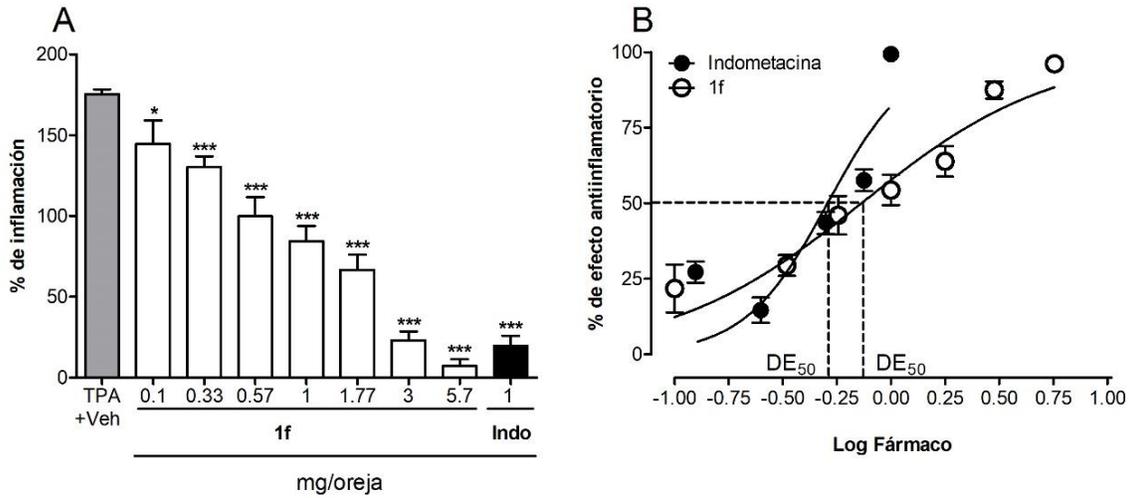
**Figura 22.** Efecto anti-inflamatorio del compuesto **1d** en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A. efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto **1d**. Cada punto representa el promedio de 6-8 animales  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos.

En relación al compuesto **1e**, se observó que la aplicación tópica de este compuesto redujo de manera estadísticamente significativa, a todas las dosis evaluadas, la inflamación auricular inducida por TPA. La curva dosis-respuesta mostró un efecto dependiente de la dosis y un comportamiento tipo agonista total. El efecto máximo ( $73.15 \pm 3.5\%$ ) se produjo a las dosis de 3 y 5.7 mg/oreja (figura 23)



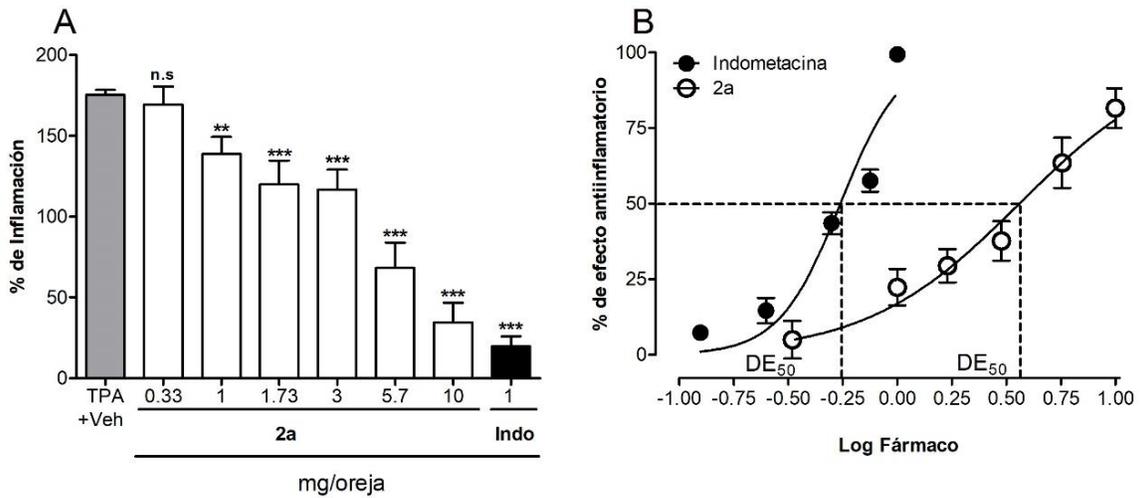
**Figura 23.** Efecto anti-inflamatorio del compuesto **1e** en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A. efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto **1e**. Cada punto representa el promedio de 8 animales  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos.

La evaluación del compuesto **1f** mostró que este  $\alpha$ -aminofosfonato genera un efecto anti-inflamatorio dependiente de la dosis, (figura 24) estadísticamente significativa a todas las dosis evaluadas. Los resultados también revelaron que su efecto máximo fue de  $96.9 \pm 2.3\%$  a la dosis de 5.7 mg/oreja demostrando un comportamiento tipo agonista total.

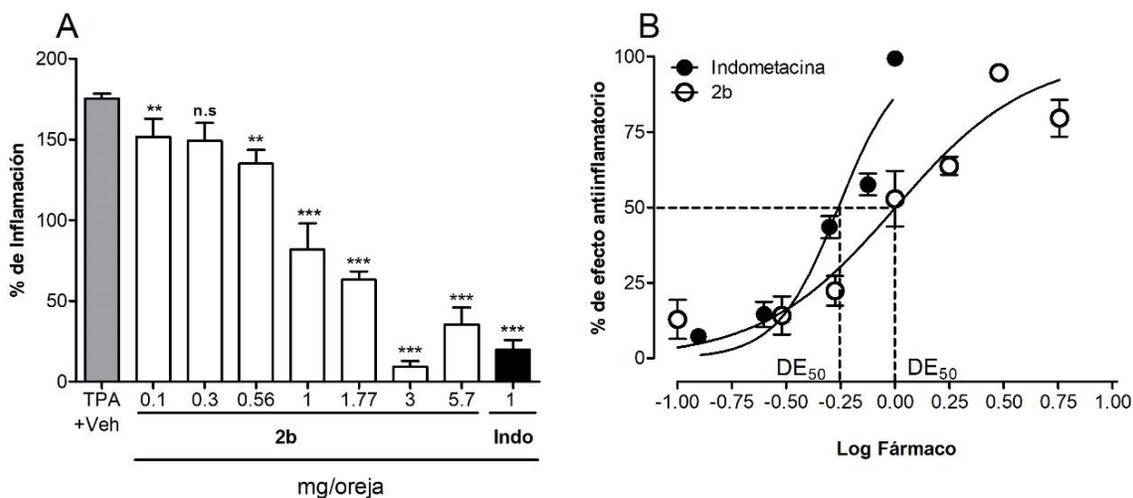


**Figura 24.** Efecto anti-inflamatorio del compuesto **1f** en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A. efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto **1f**. Cada punto representa el promedio de 6-8 animales  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos.

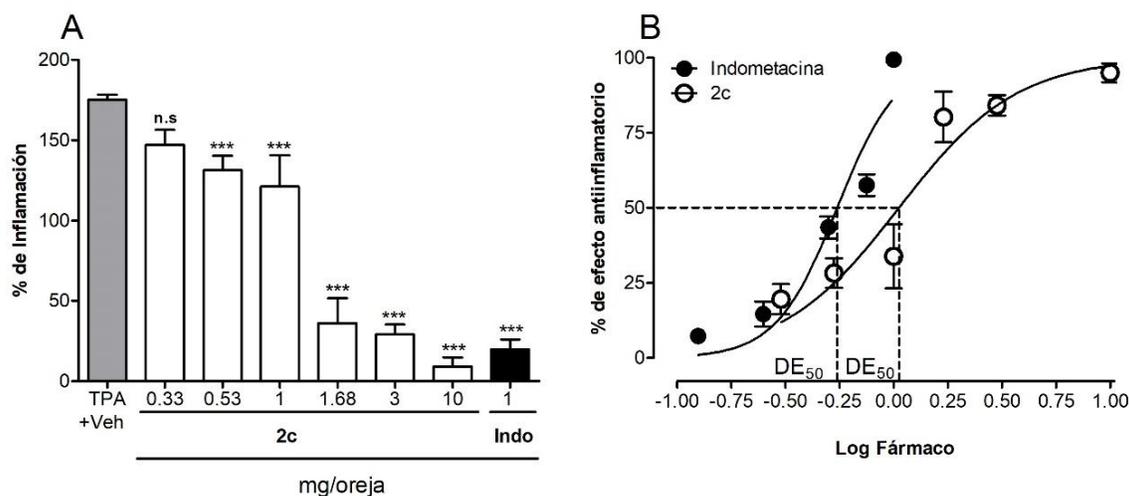
De igual manera, se evaluaron también los compuestos **2a** (figura 25), **2b** (figura 26) y **2c** (figura 27). Los resultados de la evaluación de estos compuestos mostraron que los tres tienen efecto anti-inflamatorio dependiente de la dosis y que alcanzan efectos máximos de  $81.6 \pm 6.5$ ,  $95.0 \pm 3.1$  y  $94.6 \pm 1.96$ , respectivamente.



**Figura 25.** Efecto anti-inflamatorio del compuesto **2a** en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A. efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto **2a**. Cada punto representa el promedio de 6-8 animales  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos.



**Figura 26.** Efecto anti-inflamatorio del compuesto **2b** en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A. efecto expresado como % de inflamación. B. curva dosis-respuesta del compuesto **2b**. Notar que el efecto anti-inflamatorio del compuesto **2b** es dependiente de la dosis y que es equiefectivo en comparación con indometacina. Cada punto representa el promedio de 6-8 animales  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos.



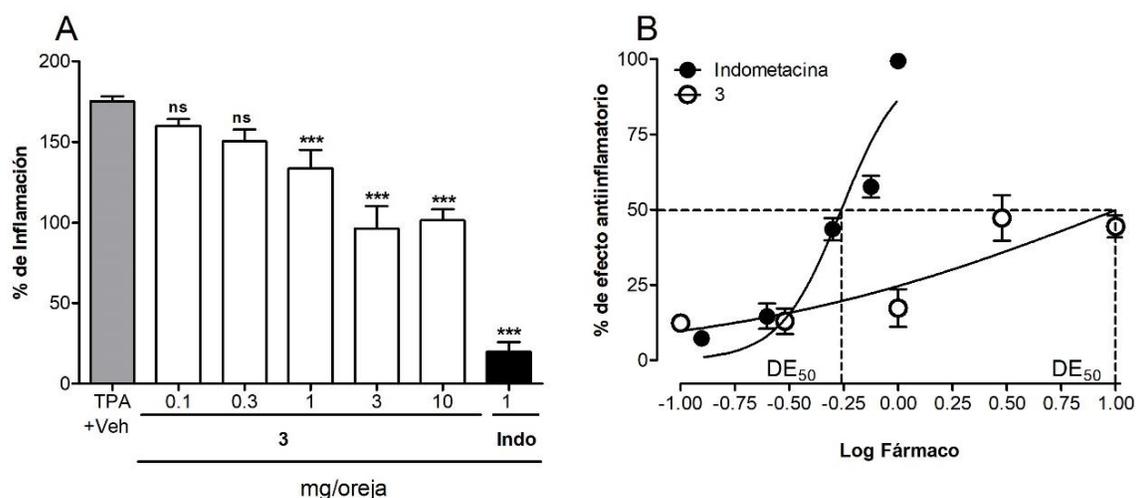
**Figura 27.** Efecto anti-inflamatorio del compuesto **2c** en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A. efecto expresado como % de inflamación. B. curva dosis-respuesta del compuesto **2c**. Cada punto representa el promedio de 6-8 animales  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos.

Finalmente, en la tabla 11 se muestra un resumen de los resultados en donde se puede ver que los compuestos que muestran eficacia máxima similar a la indometacina son (en orden decreciente): **1f**, **1d**, **1c**, **2c** y **2b**, **1c** y **1a**. Mientras que los compuestos **1b**, **2a** y **3** son los

menos eficaces en orden decreciente. Es importante destacar que la indometacina es más potente que todos los compuestos evaluados.

**Tabla 15.** Resumen de la eficacia y potencia de los nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos evaluados en el modelo de inflamación auricular aguda inducida por TPA. \* $P < 0.05$ , ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al control con indometacina.

$\alpha$ -aminofosfonato	Eficacia máxima	DE <sub>50</sub> (mg/oreja)	Potencia relativa
Indometacina	99.3±2.0	0.49	1.0
<b>1f</b>	96.1±2.3 <sup>ns</sup>	0.73	0.67
<b>1d</b>	93.0±1.6 <sup>ns</sup>	0.95	0.50
<b>2b</b>	94.6±2.0 <sup>ns</sup>	1.00	0.48
<b>2c</b>	95.6±3.1 <sup>ns</sup>	1.05	0.46
<b>1c</b>	97.0±3.2 <sup>ns</sup>	1.29	0.37
<b>1a</b>	97.6±1.4 <sup>ns</sup>	1.46	0.33
<b>1e</b>	74.3±3.5*	1.68	0.28
<b>1b</b>	66.1±9.4*	1.73	0.29
<b>2a</b>	81.6±6.5*	3.63	0.13
<b>3</b>	47.2±7.5*	10.14	0.04



**Figura 28.** Efecto anti-inflamatorio del Compuesto **3** en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA. A efecto expresado como % de inflamación. B curva dosis-respuesta del compuesto **3**. El efecto anti-inflamatorio del compuesto **3** no es dependiente de la dosis en comparación con indometacina. Cada punto representa el promedio de 6-8 animales  $\pm$  SEM. \* $P < 0.05$ , ANOVA de una vía; post hoc de Dunnet con respecto al vehículo de los tratamientos.

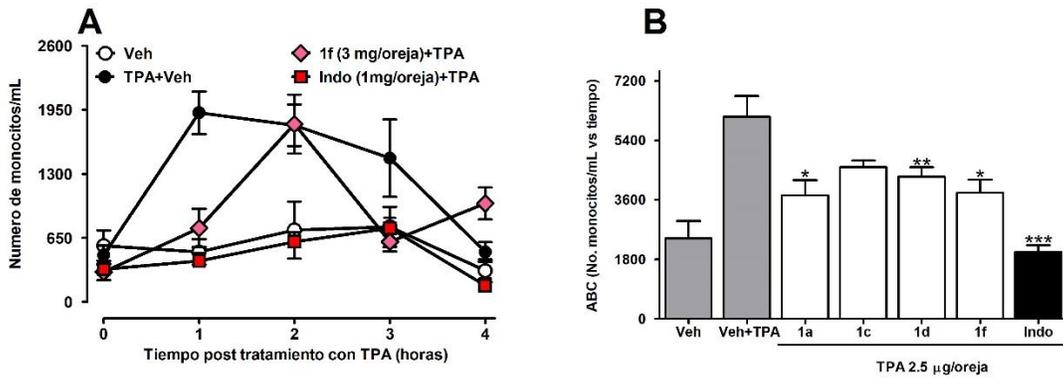
### 6.3. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de los aminofosfonatos más activos

Para determinar si los diferentes aminofosfonatos eran capaces de modificar la respuesta inflamatoria celular en el modelo de inflamación auricular inducida por TPA se evaluaron

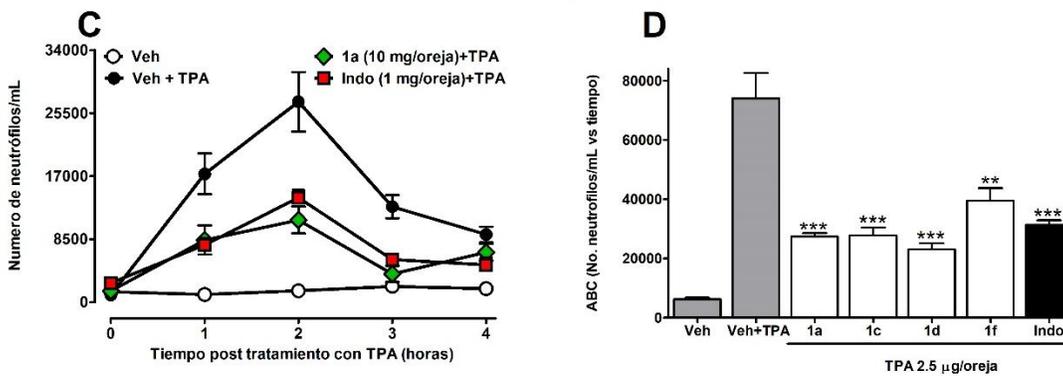
los cuatro  $\alpha$ -aminofosfonatos más eficaces a las dosis que tuvieron mayor efecto midiendo los cambios en el número de monocitos, neutrófilos y linfocitos post tratamiento con TPA. Esta evaluación se llevó a cabo en la sangre periférica obtenida del seno retro-orbital, que es parte de la circulación craneal del ratón y la zona de obtención de sangre más cercana al lugar de administración de TPA.

El conteo de monocitos, neutrófilos y linfocitos en los frotis mostró que la aplicación de TPA en la oreja incrementó, de manera estadísticamente significativa el número de los tres tipos celulares en comparación con el grupo tratado con el vehículo, alcanzando un cambio máximo a las dos horas. El área bajo la curva (ABC) calculada a partir de los cursos temporales mostro que el edema inducido por TPA incremento  $231.8 \pm 28.5\%$ ,  $927.8 \pm 79.3\%$  y  $99.97 \pm 11.4\%$  el no. de monocitos, neutrófilos y linfocitos, respectivamente. Estos datos muestran que la inflamación inducida por TPA estimula el aumento de los tres tipos celulares en la circulación alrededor de la zona tratada; al mismo tiempo, el tratamiento con indometacina disminuyó en un  $64.22 \pm 3.6\%$ , el número de monocitos, un  $47.65 \pm 8.9\%$  el de linfocitos y un  $57.66 \pm 2.0\%$  el de neutrófilos post tratamiento con TPA. En relación al tratamiento con los compuestos **1f** ( $5.7 \mu\text{g}/\text{oreja}$ ), **1c** ( $10 \mu\text{g}/\text{oreja}$ ), **1a** ( $10 \mu\text{g}/\text{oreja}$ ), y **1d** ( $3 \mu\text{g}/\text{oreja}$ ) se observó que estos disminuyeron el número de monocitos presentes en sangre en un  $32.6 \pm 6.9\%$ ,  $18.8 \pm 3.5\%$ ,  $34.0 \pm 8.1\%$ , y  $24.0 \pm 5.2\%$ , respectivamente (figura 29 A-B), de estos tratamientos, solamente la disminución causada por el compuesto **1c** resulto ser estadísticamente no significativa comparándola con el tratamiento con TPA, todos los demás si lo fueron. En cuanto al número de neutrófilos, se observó que los compuestos disminuyeron el número de neutrófilos presentes en sangre en un  $46.74 \pm 5.8\%$ ,  $62.56 \pm 3.6\%$ ,  $63.03 \pm 1.5\%$ , y  $68.84 \pm 2.8\%$ , respectivamente (figura 29 C-D), en este caso, la disminución causada por todos los tratamientos fue estadísticamente significativa en comparación con el tratamiento con TPA. Sin embargo, al evaluar el número de linfocitos se encontró que los tratamientos con los compuestos aumentaron de manera estadísticamente significativa el número de estas células presentes en el sitio de obtención de sangre en un  $46.00 \pm 7.6\%$ ,  $98.53 \pm 21.7\%$ ,  $75.13 \pm 9.9\%$ , y  $20.83 \pm 14.2\%$ , respectivamente (figura 29 E-F).

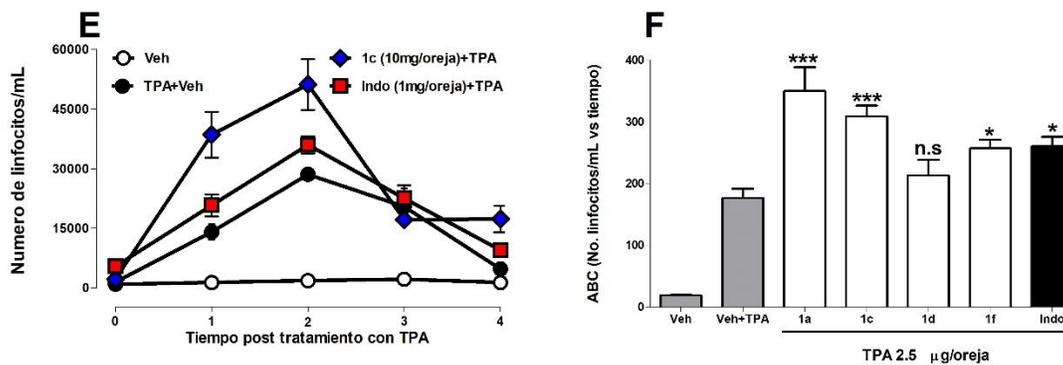
## Monocitos



## Neutrófilos



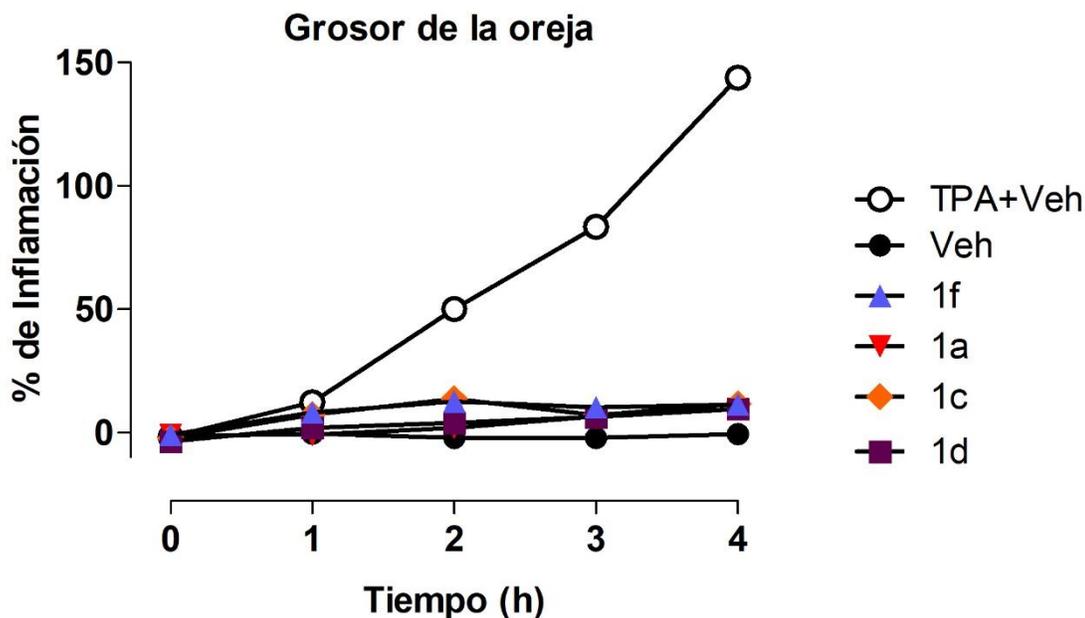
## Linfocitos



**Figura 29.** Cambio en la aparición de monocitos, neutrófilos y linfocitos en sangre periférica obtenida del seno retro orbital, post-tratamiento con TPA y los nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos. Curso temporal del promedio de células encontradas a lo largo del experimento (A, C y E); área bajo la curva de la aparición de las diferentes células durante 4 horas post tratamiento con TPA más los compuestos **1a**, **1c**, **1d** y **1f**; (B, D y F). \* $P < 0.05$ , ANOVA de una vía; post hoc de Dunnett con respecto al vehículo de los tratamientos y con respecto al TPA.

Para asegurarse que el efecto de los compuestos sobre el número de las células es debido al efecto anti-inflamatorio de los compuestos, al mismo tiempo que se obtenía la muestra de sangre se midió el grosor de la oreja (figura 30) con un vernier digital, con esta información se confirmó como el tratamiento tópico con el TPA aumentaba el volumen de la oreja

(edema) durante toda la duración del experimento, mientras que la aplicación de los compuestos evitaron la aparición del edema de manera muy similar al tratamiento con el vehículo del TPA.



**Figura 30.** Curso temporal del aumento del edema inducido por TPA y el efecto anti-inflamatorio del tratamiento con los diferentes compuestos expresados en porcentaje. Los nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos evitan la aparición del edema durante al menos las 4 horas de la duración del experimento.

#### 6.4. Evaluación de la toxicidad aguda

En el presente trabajo se realizó el estudio de toxicidad aguda a través del método de arriba y abajo establecido por la OECD. Todos los  $\alpha$ -aminofosfonatos fueron sometidos a esta evaluación, excepto el compuesto **3**, dado su bajo rendimiento en la evaluación como anti-inflamatorio. En el caso de los compuestos de la serie **2** (**2a-c**), su evaluación se inició (prueba limite) pero no se pudo completar (prueba principal) a causa de su inestabilidad física por lo que no se realizó el cálculo de su  $DL_{50}$ , sin embargo, si se obtuvieron datos de sus efectos adversos a la dosis más alta (prueba limite).

En la tabla 12 se muestran los valores calculados de  $DL_{50}$  para los compuestos **1a**, **1b**, **1e**, **1f**, **1d** y **1c**, que si completaron todo el esquema de evaluación. Se observa que todos tienen una  $DL_{50}$  mayor a 2000 mg/Kg. Con base a los criterios de la OECD, esto permite categorizarlos como inofensivos cuando se administra una dosis única por vía oral.

**Tabla 16.** Valores obtenidos de la DL<sub>50</sub> expresados en mg/kg de peso de la serie 1 de los  $\alpha$ -aminofosfonatos, calculado través de la prueba principal o de la prueba limite.

Compuesto	Prueba limite DL <sub>50</sub>	Prueba principal DL <sub>50</sub>
CMC 0.5%	> 2000 mg/kg	
1a	> 2000 mg/kg	
1b	> 2000 mg/kg	
1e		> 2000 mg/kg
1f	> 2000 mg/kg	
1d		> 2000 mg/kg
1c	> 2000 mg/kg	

Por otro lado el registro de peso y la observación conductual mostró que la administración de los compuestos no afectó la ganancia de peso en comparación con el grupo tratado con el vehículo. Lo que sobresale fue que durante las primeras 4 horas de vigilancia los animales presentaron estrés, caracterizado por piloerección (levantamiento del pelo sobre la piel), aislamiento (separación del grupo social) y una respuesta a alarma exagerada; cabe destacar que esto sucedió a la dosis más grande administrada, la de la prueba limite (2000 mg/kg de peso) (tabla 13).

Singularmente, los compuestos **1a** y **1f** ocasionaron en los animales una parálisis flácida; esta consiste en una pérdida completa de la coordinación motriz, conservando la respuesta a estímulos y sin caer en la inconciencia; este efecto tuvo una duración de entre 1 y 2 horas post administración, después del cual se recuperaron completamente sin aparentar otros síntomas de toxicidad.

**Tabla 17.** Resultados de las pruebas de toxicidad aguda; cambio en el peso y síntomas de toxicidad observados de administraciones de dosis de 2000 mg/kg de los compuestos **1a**, **1c**, **1d** y **1f**. Se muestra la incidencia (de un total de 5 animales) de los diferentes síntomas de toxicidad aguda medidos durante el ensayo; agrupadas en general, coordinación motora, sistema nervioso central (CNC) y comportamiento social (marcado en gris: 1 o más animales lo padecieron, blanco: ningún animal lo padeció).

Resultados toxicidad aguda: evaluación conductual										
Especie y género: Ratón CD1, hembras	Compuesto									
	CMC	1a	1f	1b	1d	1e	1c	2a	2b	2c
Pilo erección	4	5	4	1	5	4	2	2	4	3
Disminución de la temperatura	0	1	3	0	2	0	0	1	3	0
Diarrea	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Flacidez	0	4	0	0	0	0	0	5	5	4
Marcha tambaleante	0	5	5	4	0	0	0	4	4	4
Marcha en círculos	0	4	3	0	0	0	0	3	0	0
Falta de tono	0	1	2	2	2	0	0	5	5	4
Arqueo de la cola	0	1	4	0	0	0	0	0	0	0
Convulsiones	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0
Sacudidas	0	0	0	1	0	1	0	2	0	0
Temblores	0	1	0	0	1	3	1	4	4	4
Aislamiento	0	5	4	3	2	4	2	1	1	0
Agresividad	0	1	0	0	0	3	0	1	2	1
Respuesta exagerada a alarma	1	1	4	2	1	4	1	1	2	0
Temor	0	1	0	0	1	2	3	0	0	1

## 7. Discusión

### 7.1. Caracterización del curso temporal de la inflamación auricular inducida por TPA

La reacción inflamatoria de la piel inducida por una dosis única de TPA se caracteriza por la rápida aparición de eritema, edema e infiltración de neutrófilos y linfocitos. Además intervienen varios mediadores proinflamatorios como la histamina, PGE<sub>2</sub>, la bradicinina, la serotonina, los péptidos vasoactivos y citocinas como IL-1, IL-6 y TNF $\alpha$ , siendo PGE<sub>2</sub> uno de los principales mediadores involucrados en la inflamación de la piel inducida por TPA[152].

En este sentido, se ha demostrado que el TPA es capaz de producir un aumento de los niveles de PGE<sub>2</sub>, comenzando 30 minutos después de la inducción y alcanzando su concentración máxima entre 4 y 6 h después de la aplicación de TPA, cuando el edema del oído alcanza su máxima extensión [153]. En concordancia, nuestro nos muestra claramente la rápida aparición del edema inmediatamente después de la aplicación tópica del TPA.

Para validar nuestro modelo se seleccionaron como controles positivos a la indometacina y a la metilprednisolona, debido a que son fármacos que ya se usan en el tratamiento de la inflamación por su alta potencia y eficacia anti-inflamatoria. Como ya se ha descrito, estos fármacos actúan a través de la inhibición de las enzimas COX y PLA<sub>2</sub>, claves en la producción de eicosanoides pro-inflamatorios como PGs, LTs y TXs. A este respecto existen varios reportes que muestran que la indometacina disminuye la inflamación auricular en porcentajes de entre 91 y 100 % [154, 155], lo cual está en concordancia con lo observado. Por otro lado, reportes previos muestran que la metilprednisolona, reduce la inflamación auricular en un 70a 75% [156, 157]. Es importante notar que si bien ambos fármacos disminuyen importantemente la inflamación en porcentajes similares, las dosis a las que lo hace la metilprednisolona son menores en comparación con la dosis indometacina. Estos resultados concuerdan con el hecho de que los glucocorticoides son fármacos anti-inflamatorios más potentes que los AINEs [158].

### 7.2. Evaluación del efecto anti-inflamatorio de los nuevos $\alpha$ -aminofosfonatos

Como ya ha sido reportado, los agentes anti-inflamatorios como los AINEs y los glucocorticoides muestran actividad en este modelo mediante la inhibición de las enzimas

COX/LOX [154, 159]; en este orden de ideas, la capacidad anti-inflamatoria de los nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos nos hacen pensar que son capaces de inhibir, si no directamente a las enzimas COX/LOX, a alguna de las enzimas de la cascada de la activación de la PKC, lo que inhibiría la producción de mediadores inflamatorios y detendría el proceso inflamatorio[160]. Estos resultados concuerdan con los estudios de Abdou y colaboradores que sintetizaron y evaluaron, en dos estudios diferentes, 8 y 10  $\alpha$ -aminofosfonatos respectivamente; encontrando que sus compuestos disminuyen el edema intraplantar inducido por carragenina con un rango de actividad anti-inflamatoria entre un 30 y 72% el primero y entre 7 y 114% el segundo [145, 161]. Ellos comparan la actividad de sus  $\alpha$ -aminofosfonatos con su control de indometacina y sugieren que al tener un comportamiento similar deberían tener un mecanismo de acción muy similar: la inhibición de la producción de metabolitos del AA. Por otro lado, la comparación de las curvas dosis-respuesta de los distintos  $\alpha$ -aminofosfonatos sugieren que el comportamiento de los compuestos **1f**, **1d**, **2b**, **2c** **1c** y **1a** puede ser el de un agonista total, es decir, que genera la máxima actividad intrínseca obtenible al unirse a su diana terapéutica, sin embargo, hasta ahora desconocemos la diana ni el mecanismo involucrado mediante el cual los  $\alpha$ -aminofosfonatos generan su actividad.

Es importante mencionar que algunos de los compuestos evaluados sufrieron un cambio de aspecto en el laboratorio; los compuestos **2c** y **1f** sufrieron el cambio de apariencia física antes de ser expuestos a las condiciones ambientales, mientras que los compuestos **2b** y **2a** sufrieron este cambio de aspecto 48 y 72 horas, respectivamente, después de ser expuestos las condiciones ambientales del laboratorio. El cambio que observamos consistió en la transformación desde un líquido aceitoso translucido a un semi-sólido opaco. Este cambio afectó la eficacia de los compuestos, ya que cuando se evaluó una dosis del compuesto con este aspecto su eficacia disminuyó notablemente (figuras 23A y 24A).

En cuanto al compuesto **3**, se observó que, aunque inhibe de manera estadísticamente significativa el edema auricular inducido por TPA comparándolo con el vehículo de los tratamientos, este efecto fue menor al observado en el tratamiento con otros aminofosfonatos y con la indometacina. La eficacia máxima observada fue del  $44.41 \pm 3.7\%$  a la dosis de 10 mg/oreja siendo hasta el momento, el aminofosfonato menos eficaz encontrado (figura 28). De igual manera también mostro un cambio de apariencia al ser expuesto al ambiente; esto

aunado a su baja efectividad dio pie a no utilizarlo en las siguientes evaluaciones. También es importante señalar que estructuralmente, el compuesto **3** no es un  $\alpha$ -aminofosfonato, sino un  $\alpha$ -hidroximetilfosfonato, su principal diferencia es que carece del grupo amino y que, en comparación, tiene un peso molecular menor a los otros compuestos sintetizados. Esta diferencia estructural podría ser la causa de su menor efecto anti-inflamatorio en comparación con los  $\alpha$ -aminofosfonatos, sin embargo, tampoco se conoce el mecanismo involucrado.

### 7.3. Evaluación de la actividad inmunomoduladora de los aminofosfonatos más activos

Nuestros resultados mostraron evidencia de que los  $\alpha$ -aminofosfonatos **1a**, **1c**, **1d** y **1f** disminuyeron de manera temporal la afluencia de neutrófilos y monocitos pero aumentaron la afluencia de linfocitos en muestras de sangre del seno retro-orbital. Dado que el sitio de recolección de la muestra es el lugar anatómico más cercano a la oreja, se puede inferir que en el edema se infiltran células del sistema inmune (monocitos, neutrófilos y linfocitos) por el tratamiento con TPA, y que los compuestos aplicados tópicamente modulan fuertemente este proceso, llevando a una disminución en la respuesta inflamatoria. Paralelamente, se sabe que los  $\alpha$ -aminofosfonatos son inhibidores enzimáticos eficientes [162], el grupo de Gryzwa en el 2014 sintetizó sondas basadas en la actividad de tipo  $\alpha$ -aminofosfonato que fueron capaces de inhibir las enzimas de la familia de las neutrófilo serín proteasas, como la catepsina G, la elastasa de neutrófilo y proteinasa 3 [163]; se sabe que estas enzimas tienen un papel importante en la actividad de las células inmunes como neutrófilos y monocitos que están involucradas en la respuesta inflamatoria. Por lo tanto, no podemos excluir la posibilidad de que estos nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos actúen como inhibidores de enzimas como las neutrófilo serín proteasas, y de esta manera modifiquen la producción de mediadores proinflamatorios o la actividad pro-inflamatoria de estas células, modulando de esta manera la respuesta inflamatoria y el edema. Sin embargo, se necesitan más experimentos para corroborar esta hipótesis.

#### 7.4. Evaluación de la toxicidad aguda

La toxicidad se mide a través de la dosis y el tipo de daño que genera en el individuo[95]; nuestra evaluación mostro que los nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos tienen una  $DL_{50}$  superior a 2000mg/kg, lo que permite clasificarlos como inofensivos según la OECD, esto los vuelve moléculas prometedoras para convertirse en fármacos que, siendo bastante efectivos en la prevención de la inflamación, no causarían efectos adversos a dosis terapéuticas, que si se comparan con las dosis a las que los fármacos anti-inflamatorios actuales presentan sus efectos terapéutico; por ejemplo, la indometacina, el AINE que se usó como control se recomienda administrar en dosis de 75 mg/kg sin superar los 150 mg/kg al día para el tratamiento del dolor inflamatorio[164];[164];mientras que la metilprednisolona, que fue el glucocorticoide que también se usó como control se indica en dosis no mayores a 40 mg/kg en padecimientos graves que pongan en riesgo la vida[165]. Los efectos adversos que observamos [165]. En nuestro estudio, los efectos adversos se presentaron hasta la dosis de 2000 mg/kg de peso, que en comparación, es mucho mayor que las dosis terapéuticas de los fármacos control. Esto nos da indicios de que los nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos

Dentro de los efectos adversos que más comúnmente se presentaron en nuestro modelo fueron los relacionados con el SNC; síntomas leves como estrés, pilo-erección, respuesta exagerada a alarma y síntomas moderados como perdida de la coordinación motora y parálisis flácida; estos síntomas nos indican una acción de los  $\alpha$ -aminofosfonatos **1a**, **1f** y **2a-c** sobre el cerebelo, la médula espinal o los nervios periféricos eferentes, sin embargo, nuestro modelo no es capaz de darnos más información sobre estos síntomas, por lo tanto deben hacerse más estudios para determinar el mecanismo de acción de estos efectos secundarios.

## 8. Conclusiones

En conclusión, 10 derivados de  $\alpha$ -aminofosfonatos (**1a-f**, **2a-c** y el  $\alpha$ -hidroxifosfonato **3**) que fueron desarrollados a través de un método simple de tres componentes catalizado por ácido fenilfosfónico, demostraron en nuestro estudio ser capaces de disminuir significativamente la inflamación inducida tópicamente por TPA, disminuyendo el edema de forma importante. También, la aplicación de los derivados de los  $\alpha$ -aminofosfonatos más efectivos (**1a**, **1c**, **1d** y **1f**) fueron capaces de, por un lado, disminuir significativamente el número de monocitos y neutrófilos y por otro, aumentar el número de linfocitos; esto al analizar sangre periférica en el área cercana al sitio de administración (seno retro-orbital). Estos resultados nos hacen pensar que esto puede deberse principalmente a la capacidad de los compuestos para inhibir un amplio número de enzimas, entre ellas posiblemente las involucradas en el proceso inflamatorio (COX/LOX) y las involucradas en la actividad de células inmunes (elastasas de neutrófilo, proteasas) incidiendo así en el proceso inflamatorio.

De igual manera, nuestro estudio encontró que los derivados de  $\alpha$ -aminofosfonatos evaluados presentan una  $DL_{50}$  superior a 2000 mg/kg, siendo clasificados como inofensivos según la OECD. Estos resultados no sugieren que los  $\alpha$ -aminofosfonatos tienen características farmacológicas prometedoras para convertirse en fármacos seguros, con efectos adversos que solo se observan a la dosis máxima evaluada.

En conjunto, estos resultados sugieren que los derivados de  $\alpha$ -aminofosfonatos son agentes con potencial para su uso como tratamiento de enfermedades inflamatorias, especialmente las que afectan la piel; y que resultan inofensivos en administraciones orales únicas, lo que les confiere la capacidad de volverse fármacos en un futuro.

## 9. Perspectivas

- Evaluar a los  $\alpha$ -aminofosfonatos en otros modelos; sistémicos, crónicos y en otras especies, para asegurar su eficacia y seguridad y para detectar otros efectos.
- Evaluar la capacidad inhibitoria de estos nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos en enzimas de importancia clínica.
- Evaluar mediante experimentos más complejos los efectos adversos de los  $\alpha$ -aminofosfonatos, como toxicidad subcrónica, crónica, carcinogénesis y sus efectos en la reproducción y en los extremos de la vida.

## 10. Bibliografia

1. Scott, A., et al., *What is "inflammation"? Are we ready to move beyond Celsus?* British Journal of Sports Medicine, 2004. **38**(3): p. 248-249.
2. Venereau, E., C. Ceriotti, and M.E. Bianchi, *DAMPs from Cell Death to New Life*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 422.
3. Iba, Y., et al., *Involvement of mast cells in the regulation of matrix metalloproteinase-9 and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in 12-O-tetradecanoylphorbolacetate-induced inflammation in mice*. Int Immunopharmacol, 2007. **7**(5): p. 597-603.
4. Nasef, N.A., S. Mehta, and L.R. Ferguson, *Susceptibility to chronic inflammation: an update*. Archives of Toxicology, 2017: p. 1-11.
5. Kumar V, et al., *Acute and chronic inflammation.*, in *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease*, M.-H. Interamericana, Editor. 2007: New York.
6. Kindt, T.J., R.A. Goldsby, and B.A. Osborne, *Immunologia de Kuby*. 2007. **1**.
7. Dinarello, C.A., *Blocking IL-1 in systemic inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(9): p. 1355-9.
8. Larsen, G.L. and P.M. Henson, *Mediators of inflammation*. Annu Rev Immunol, 1983. **1**: p. 335-59.
9. Kishimoto, T., T. Taga, and S. Akira, *Cytokine signal transduction*. Cell, 1994. **76**(2): p. 253-62.
10. Dinarello, C.A., *Proinflammatory cytokines*. Chest, 2000. **118**(2): p. 503-508.
11. Schleimer, R., *Inflammation: Basic principles and clinical correlates*. Vol. 9. 1988.
12. Golias, C., et al., *The kinin system--bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system--bradykinin*. Hippokratia, 2007. **11**(3): p. 124-128.
13. Marceau, F. and D. Regoli, *Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives*. Nat Rev Drug Discov, 2004. **3**(10): p. 845-52.
14. Capdevila, J.H., R.C. Harris, and J.R. Falck, *Microsomal cytochrome P450 and eicosanoid metabolism*. Cell Mol Life Sci, 2002. **59**(5): p. 780-9.
15. Bos, C.L., et al., *Prostanoids and prostanoid receptors in signal transduction*. Int J Biochem Cell Biol, 2004. **36**(7): p. 1187-205.
16. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, 2001. **294**(5548): p. 1871-5.
17. Smith, W.L., D.L. DeWitt, and R.M. Garavito, *Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology*. Annu Rev Biochem, 2000. **69**: p. 145-82.
18. Narumiya, S. and G.A. FitzGerald, *Genetic and pharmacological analysis of prostanoid receptor function*. J Clin Invest, 2001. **108**(1): p. 25-30.
19. Zingarelli, B. and J.A. Cook, *Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma is a new therapeutic target in sepsis and inflammation*. Shock, 2005. **23**(5): p. 393-9.
20. Harvath, L., *Neutrophil chemotactic factors*. Exs, 1991. **59**: p. 35-52.
21. Dahlen, S.E., et al., *Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1981. **78**(6): p. 3887-91.
22. Tager, A.M. and A.D. Luster, *BLT1 and BLT2: the leukotriene B(4) receptors*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2003. **69**(2-3): p. 123-34.

23. Kanaoka, Y. and J.A. Boyce, *Cysteinyl leukotrienes and their receptors: cellular distribution and function in immune and inflammatory responses*. J Immunol, 2004. **173**(3): p. 1503-10.
24. Chinetti, G., J.C. Fruchart, and B. Staels, *Peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs): nuclear receptors at the crossroads between lipid metabolism and inflammation*. Inflamm Res, 2000. **49**(10): p. 497-505.
25. Talavera-Cuevas, E., M. Condes-Lara, and G. Martínez-Lorenzana, *Aspectos sobre las funciones del óxido nítrico como mensajero celular en el sistema nervioso central*. Salud Mental, 2003. **26**(2): p. 42-50.
26. Menshikova, E.B., N.K. Zenkov, and V.P. Reutov, *Nitric oxide and NO-synthases in mammals in different functional states*. Biochemistry (Mosc), 2000. **65**(4): p. 409-26.
27. Colten, H.R. and J.E. Krause, *Pulmonary inflammation--a balancing act*. N Engl J Med, 1997. **336**(15): p. 1094-6.
28. Mantyh, C.R., et al., *Substance P activation of enteric neurons in response to intraluminal Clostridium difficile toxin A in the rat ileum*. Gastroenterology, 1996. **111**(5): p. 1272-80.
29. Krause, J.E., D.A. Dimaggio, and K.E. McCaaron, *Alterations in neurokinin 1 receptor gene expression in models of pain and inflammation*. Canadian Journal of Physiology and Pharmacology, 1995. **73**(7): p. 854-859.
30. Foreman, J.C., *Substance P and calcitonin gene-related peptide: effects on mast cells and in human skin*. Int Arch Allergy Appl Immunol, 1987. **82**(3-4): p. 366-71.
31. Bill, A., et al., *Substance P: release on trigeminal nerve stimulation, effects in the eye*. Acta Physiol Scand, 1979. **106**(3): p. 371-3.
32. Joos, G.F., P.R. Germonpre, and R.A. Pauwels, *Role of tachykinins in asthma*. Allergy, 2000. **55**(4): p. 321-37.
33. Maggi, C.A., *The effects of tachykinins on inflammatory and immune cells*. Regul Pept, 1997. **70**(2-3): p. 75-90.
34. Holzer, P. and U. Holzer-Petsche, *Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion and inflammation*. Pharmacol Ther, 1997. **73**(3): p. 219-63.
35. Pernow, B., *Substance P*. Pharmacol Rev, 1983. **35**(2): p. 85-141.
36. Schratzberger, P., et al., *Differential chemotactic activities of sensory neuropeptides for human peripheral blood mononuclear cells*. J Immunol, 1997. **158**(8): p. 3895-901.
37. Smith, C.H., et al., *Neuropeptides induce rapid expression of endothelial cell adhesion molecules and elicit granulocytic infiltration in human skin*. J Immunol, 1993. **151**(6): p. 3274-82.
38. Rameshwar, P., et al., *Receptor induction regulates the synergistic effects of substance P with IL-1 and platelet-derived growth factor on the proliferation of bone marrow fibroblasts*. J Immunol, 1997. **158**(7): p. 3417-24.
39. Legein, B., *Inflammation and immune system interactions in atherosclerosis*. Cellular and Molecular Life Sciences, 2013. **70**(20): p. 3847-3869.
40. Iwasaki, A. and R. Medzhitov, *Toll-like receptor control of the adaptive immune responses*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 987-95.
41. Hettinger, J., et al., *Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor*. Nat Immunol, 2013. **14**(8): p. 821-30.
42. Lavin, Y., et al., *Tissue-resident macrophage enhancer landscapes are shaped by the local microenvironment*. Cell, 2014. **159**(6): p. 1312-26.

43. Li, M.O. and R.A. Flavell, *Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10*. *Immunity*, 2008. **28**(4): p. 468-76.
44. Borregaard, N., *Neutrophils, from marrow to microbes*. *Immunity*, 2010. **33**(5): p. 657-70.
45. Amulic, B., et al., *Neutrophil function: from mechanisms to disease*. *Annu Rev Immunol*, 2012. **30**: p. 459-89.
46. Ley, K., E. Smith, and M.A. Stark, *IL-17A-producing neutrophil-regulatory Tn lymphocytes*. *Immunol Res*, 2006. **34**(3): p. 229-42.
47. Hager, M., J.B. Cowland, and N. Borregaard, *Neutrophil granules in health and disease*. *J Intern Med*, 2010. **268**(1): p. 25-34.
48. Chow, O.A., et al., *Statins enhance formation of phagocyte extracellular traps*. *Cell Host Microbe*, 2010. **8**(5): p. 445-54.
49. Guimaraes-Costa, A.B., et al., *Leishmania amazonensis promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009. **106**(16): p. 6748-53.
50. Nowak, K., E. Jabłońska, and W. Ratajczak-Wrona, *Neutrophils life under estrogenic and xenoestrogenic control*. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2018.
51. Summers, C., et al., *Neutrophil kinetics in health and disease*. *Trends Immunol*, 2010. **31**(8): p. 318-24.
52. Galli, S.J., N. Borregaard, and T.A. Wynn, *Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils*. *Nat Immunol*, 2011. **12**(11): p. 1035-44.
53. Mogensen, T.H., *Pathogen recognition and inflammatory signaling in innate immune defenses*. *Clin Microbiol Rev*, 2009. **22**(2): p. 240-73, Table of Contents.
54. Paul, W.E., *Fundamental immunology*. 2013, Philadelphia: Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
55. Coussens, L. and Z. Werb, *Inflammation and cancer*. *Nature*, 2002. **420**(6917): p. 860-7.
56. Maskrey Benjamin, H., et al., *Mechanisms of Resolution of Inflammation*. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2011. **31**(5): p. 1001-1006.
57. Lim, K.M., et al., *Suppression of skin inflammation in keratinocytes and acute/chronic disease models by caffeic acid phenethyl ester*. *Arch Dermatol Res*, 2015. **307**(3): p. 219-27.
58. Shaw, T.E., et al., *Eczema prevalence in the United States: data from the 2003 National Survey of Children's Health*. *J Invest Dermatol*, 2011. **131**(1): p. 67-73.
59. Bieber, T., *Atopic dermatitis 2.0: from the clinical phenotype to the molecular taxonomy and stratified medicine*. *Allergy*, 2012. **67**(12): p. 1475-82.
60. Mortz, C.G., et al., *Atopic dermatitis from adolescence to adulthood in the TOACS cohort: prevalence, persistence and comorbidities*. *Allergy*, 2015. **70**(7): p. 836-45.
61. Elias, P.M. and M. Steinhoff, *"Outside-to-inside" (and now back to "outside") pathogenic mechanisms in atopic dermatitis*. *J Invest Dermatol*, 2008. **128**(5): p. 1067-70.
62. Thyssen, J.P., J.P. McFadden, and I. Kimber, *The multiple factors affecting the association between atopic dermatitis and contact sensitization*. *Allergy*, 2014. **69**(1): p. 28-36.

63. Usatine, R.P. and M. Riojas, *Diagnosis and management of contact dermatitis*. Am Fam Physician, 2010. **82**(3): p. 249-55.
64. Bourke, J., I. Coulson, and J. English, *Guidelines for the management of contact dermatitis: an update*. Br J Dermatol, 2009. **160**(5): p. 946-54.
65. Brasch, J., et al., *Guideline contact dermatitis: S1-Guidelines of the German Contact Allergy Group (DKG) of the German Dermatology Society (DDG), the Information Network of Dermatological Clinics (IVDK), the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the Working Group for Occupational and Environmental Dermatology (ABD) of the DDG, the Medical Association of German Allergologists (AeDA), the Professional Association of German Dermatologists (BVDD) and the DDG*. Allergo J Int, 2014. **23**(4): p. 126-138.
66. Thyssen, J.P., et al., *The epidemiology of contact allergy in the general population--prevalence and main findings*. Contact Dermatitis, 2007. **57**(5): p. 287-99.
67. Parisi, R., et al., *Global epidemiology of psoriasis: a systematic review of incidence and prevalence*. J Invest Dermatol, 2013. **133**(2): p. 377-85.
68. Chanussot, C., & Arenas, R., *Psoriasis. Estudio descriptivo y comorbilidades en 114 pacientes*. Dermatología Cosmética, Médica y Quirúrgica, 2015. **13**(1): p. 20-23.
69. Grozdev, I., N. Korman, and N. Tsankov, *Psoriasis as a systemic disease*. Clinics in Dermatology, 2014. **32**(3): p. 343-350.
70. Oji, V. and T.A. Luger, *The skin in psoriasis: assessment and challenges*. Clin Exp Rheumatol, 2015. **33**(5 Suppl 93): p. S14-9.
71. Wiegler, N. and S. McBane, *Psoriasis*. American Academy of Family Physicians, 2013.
72. Lu, X., et al., *Nanoparticles Containing Anti-inflammatory Agents as Chemotherapy Adjuvants: Optimization and In Vitro Characterization*. The AAPS Journal, 2008. **10**(1): p. 133-140.
73. Wehling, M., *Non-steroidal anti-inflammatory drug use in chronic pain conditions with special emphasis on the elderly and patients with relevant comorbidities: management and mitigation of risks and adverse effects*. Eur J Clin Pharmacol, 2014. **70**(10): p. 1159-72.
74. Scarpignato C, L.A., Hunt R et al, *Antiinflamatorios no Esteroides en Pacientes con Artrosis*. BMC Medicine, 2015. **19**(13).
75. Saklatvala, J., *Glucocorticoids: do we know how they work?* Arthritis Research & Therapy, 2002. **4**: p. 4.
76. Kowalczyk, P., et al., *The effects of dissociated glucocorticoids RU24858 and RU24782 on TPA-induced skin tumor promotion biomarkers in SENCAR mice*. Mol Carcinog, 2014. **53**(6): p. 488-97.
77. Sardar, S. and A. Andersson, *Old and new therapeutics for Rheumatoid Arthritis: in vivo models and drug development*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 2016. **38**(1): p. 2-13.
78. Marovac, J., *Investigation and development of new drugs: from the molecule to drug*. Revista medica de Chile, 2001. **129**(1): p. 99-106.
79. Ugalde, A. and N. Homedes, *The impact of researchers loyal to Big Pharma on the ethics and quality of clinical trials in Latin America*. Salud colectiva, 2015. **11**(1): p. 67-86.
80. Drews, J., *Drug Discovery: A Historical Perspective*. Science, 2000. **287**(5460): p. 1960-1964.

81. Talevi, A. and L.E. Bruno-Blanch, *Screening Virtual: una herramienta eficaz para el desarrollo de nuevos fármacos en Latinoamérica*. Latin American Journal of Pharmacy, 2009. **28**(1): p. 141-150.
82. Prieto-Martínez, F.D. and J.L. Medina-Franco, *Diseño de fármacos asistido por computadora: cuando la informática, la química y el arte se encuentran*. Revista TIP, 2018. **21**(2): p. 124-134.
83. Rodríguez Chanfrau, J.E. and R. Vandama Ceballos, *Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos: una institución al servicio de la salud*. Revista Cubana de Farmacia, 2003. **37**(3): p. 1-1.
84. Waldman, S.A. and A. Terzic, *Farmacología y terapéutica : principios para la práctica*. 2010, México: Manual Moderno.
85. Guerrero, G.A.M. and M. Lorenzana-Jiménez, *Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos*. Rev Fac Med UNAM, 2009. **52**(6).
86. Vilar-Compte, D. and E.S. Rojas, *Estudios experimentales. Ensayo clínico aleatorio*, in *Epidemiología Clínica*. 2013. p. 52.
87. Bayona, A. and N. Fajardo, *Desarrollo de nuevos medicamentos: oportunidades y beneficios para el Perú*. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública, 2012. **29**(4): p. 521-528.
88. Gonzales, A.R., *Evaluación del Sistema de Farmacovigilancia utilizado en México*. Instituto Nacional de Salud Pública, 2012.
89. NOM, *Norma Oficial Mexicana NOM-220-SSA1-2012, Instalación y operación de la farmacovigilancia*. Secretaría de Salud. Publicada en el Diario Oficial de la Federación el, 2013. **7**(01).
90. Klaassen, C.D. and J.B. Watkins, *Casarett & Doull's essentials of toxicology*. 2015: McGraw Hill Professional.
91. REACH, U.E. *Marco reglamentario de gestión de las sustancias químicas (REACH)*, Agencia Europea de Sustancias y Preparados Químicos. 2013 octubre de 2017].
92. de la Vega, I.F., et al., *Toxicología en Salud Ocupacional*. Revista Cubana de Higiene y Epidemiología, 2004. **39**(1): p. 52-60.
93. Jiménez, M.R. and G.R. Kuhn, *Toxicología fundamental*. 2009: Ediciones Díaz de Santos.
94. Asante-Duah, K., *Public Health Risk Assessment for Human Exposure to Chemicals*. 2017, Springer Netherlands.
95. Rhodes, C., et al., *Principles of testing for acute toxic effects*. Stockton Press, New York, NY(USA). 1993., 1993.
96. Schleder, E., et al., *A national validation study of the acute-toxic-class method--an alternative to the LD50 test*. Arch Toxicol, 1992. **66**(7): p. 455-70.
97. Goldenthal, E.I., *A compilation of LD50 values in newborn and adult animals*. Toxicology and applied pharmacology, 1971. **18**(1): p. 185-207.
98. Oliver, G.J., *Opportunities for using fewer animals in acute toxicity studies*. 1986.
99. OECD, *Guideline 425: acute oral toxicity—up-and-down procedure*. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, 2001. **2**: p. 12-16.
100. Schwarzenbach, G., H. Ackermann, and P. Ruckstuhl, *Komplexone XV. Neue Derivate der Imino-diessigsäure und ihre Erdalkalikomplexe. Beziehungen zwischen Acidität und Komplexbildung*. Helvetica Chimica Acta, 1949. **32**(4): p. 1175-1186.
101. Leidinger, W., *Los ácidos aminofosfónicos*. Revista de Química, 1988. **2**(2): p. 171-179.

102. 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.
103. Ordóñez, M., J. Luis Viveros-Ceballos, and I. Romero- Estudillo, *Stereoselective Synthesis of  $\alpha$ -Aminophosphonic Acids through Pudovik and Kabachnik-Fields Reaction*. 2017.
104. Tyka, R., *Novel synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonic acids*. Tetrahedron Letters, 1970. **11**(9): p. 677-680.
105. Redmore, D., *Chemistry of phosphorous acid: new routes to phosphonic acids and phosphate esters*. The Journal of Organic Chemistry, 1978. **43**(5): p. 992-996.
106. Engelmann, M. and J. Pikl, *Organic compound and process of preparing the same*. US Patent, 1942. **2**.
107. Engelmann, M. and J. Pikl. *Phosphonic acids derived from organic acylamidomethyl compounds*. US Pat., 2304156, 1942. in Chem. Abstr. 1943.
108. Wong, R.Y. and N.S. Bunker, *Method for preparation of N-phosphonomethylglycine*. 1985, Google Patents.
109. Kraicheva, I., *Synthesis and NMR spectroscopic study of a new anthracene derived schiff base and a bis (aminophosphonate) obtained from it*. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 2003. **178**(1): p. 191-197.
110. Kraicheva, I., P. Finocchiaro, and S. Failla, *Synthesis and NMR spectroscopic study of a new bis (aminophosphonate) with terminal furyl groups*. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 2002. **177**(12): p. 2915-2922.
111. Fields, S. and O.-k. Song, *A novel genetic system to detect protein-protein interactions*. Nature, 1989. **340**(6230): p. 245.
112. Boduszek, B., *An efficient synthesis of l-aminophosphonic acids and esters bearing heterocyclic moiety*. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 1995. **104**(1-4): p. 63-70.
113. Boduszek, B., *The acidic cleavage of pyridylmethyl (amino) phosphonates. Formation of the corresponding amines*. Tetrahedron, 1996. **52**(38): p. 12483-12494.
114. Boto, A., et al., *One-pot synthesis of  $\alpha$ -amino phosphonates from  $\alpha$ -amino acids and  $\beta$ -amino alcohols*. Tetrahedron letters, 2005. **46**(45): p. 7807-7811.
115. Wang, Q., et al., *Synthesis, X-ray crystal structure, DNA/protein binding and cytotoxicity studies of five  $\alpha$ -aminophosphonate N-derivatives*. Bioorganic Chemistry, 2016. **69**: p. 132-139.
116. Fang, Y.-L., et al., *One-Pot Three-Component Synthesis of Novel Diethyl ((2-oxo-1, 2-dihydroquinolin-3-yl)(arylamino) methyl) phosphonate as Potential Anticancer Agents*. International journal of molecular sciences, 2016. **17**(5): p. 653.
117. Atherton, F.R., C.H. Hassall, and R.W. Lambert, *Synthesis and structure-activity relationships of antibacterial phosphonopeptides incorporating (1-aminoethyl) phosphonic acid and (aminomethyl) phosphonic acid*. Journal of medicinal chemistry, 1986. **29**(1): p. 29-40.
118. Thomas, K., et al., *Design, synthesis and docking studies of new quinoline-3-carbohydrazide derivatives as antitubercular agents*. European journal of medicinal chemistry, 2011. **46**(11): p. 5283-5292.

119. Zakir, S., M. Patel, and M. Farooqui, *Synthesis of new  $\alpha$  aminophosphonate system bearing Indazole moiety and their biological activity*. European journal of medicinal chemistry, 2012. **50**: p. 39-43.
120. Deng, S.-L., et al., *Synthesis of ursolic phosphonate derivatives as potential anti-HIV agents*. Phosphorus, Sulfur, and Silicon and the Related Elements, 2007. **182**(5): p. 951-967.
121. Chen, M.-H., et al., *Synthesis and antiviral activities of chiral thiourea derivatives containing an  $\alpha$ -aminophosphonate moiety*. Journal of agricultural and food chemistry, 2009. **57**(4): p. 1383-1388.
122. Sathishkumar, Y., et al., *Fungistatic Activity of an  $\alpha$ -Aminophosphonate Chitosan Derivative against Aspergillus niger on Controlled Microgravity*. 한국미생물학회 학술대회논문집, 2016: p. 18-18.
123. Devarayan, K., et al., *Effect of microgravity on fungistatic activity of an  $\alpha$ -aminophosphonate chitosan derivative against aspergillus niger*. PloS one, 2015. **10**(10): p. e0139303.
124. Staake, M., et al., *Phosphonoxins III: synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonate analogs of antifungal polyoxins with anti-Giardia activity*. Organic letters, 2010. **12**(20): p. 4596-4599.
125. Sekhar, K.C., et al., *Phosphorylated ganciclovir derivatives: design, synthesis and in vitro and in vivo immunomodulatory activity*. Medicinal Chemistry Research, 2014. **23**(5): p. 2242-2251.
126. Cordero, R.A.D.L.C., et al., *Beta-hydroxy-gamma-aminophosphonates for treating immune disorders*. 2016, Google Patents.
127. Kafarski, P. and B. Lejczak, *Synthesis of phosphono- and phosphinopeptides*. ChemInform, 2000. **31**(48): p. no-no.
128. Kafarski, P. and B. Lejczak, *Aminophosphonic acids of potential medical importance*. Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents, 2001. **1**(3): p. 301-312.
129. Bigge, C.F., et al., *Exploration of N-phosphonoalkyl-, N-phosphonoalkenyl-, and N-(phosphonoalkyl) phenyl-spaced. alpha.-amino acids as competitive N-methyl-D-aspartic acid antagonists*. Journal of medicinal chemistry, 1992. **35**(8): p. 1371-1384.
130. Schmutz, M., et al., *The competitive NMDA receptor antagonists CGP 37849 and CGP 39551 are potent, orally-active anticonvulsants in rodents*. Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology, 1990. **342**(1): p. 61-66.
131. Allen, M.C., et al., *Renin inhibitors. Synthesis of transition-state analog inhibitors containing phosphorus acid derivatives at the scissile bond*. Journal of Medicinal Chemistry, 1989. **32**(7): p. 1652-1661.
132. Wang, Q., et al., *Exploration of alpha-aminophosphonate N-derivatives as novel, potent and selective inhibitors of protein tyrosine phosphatases*. Eur J Med Chem, 2012. **49**: p. 354-64.
133. Dake, S.A., et al., *Ionic liquid promoted synthesis, antibacterial and in vitro antiproliferative activity of novel  $\alpha$ -aminophosphonate derivatives*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2011. **21**(8): p. 2527-2532.
134. Huang, X.-C., et al., *Synthesis and antitumor activities of novel  $\alpha$ -aminophosphonates dehydroabiatic acid derivatives*. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2013. **23**(19): p. 5283-5289.

135. Pierré, A., et al., *Preclinical Antitumor Activity of a New Vinca Alkaloid Derivative, S 12363*. Cancer Research, 1991. **51**(9): p. 2312-2318.
136. Atherton, F.R., C.H. Hassall, and R.W. Lambert, *Synthesis and structure-activity relationships of antibacterial phosphonopeptides incorporating (1-aminoethyl) phosphonic acid and (aminomethyl) phosphonic acid*. Journal of medicinal chemistry, 1984. **29**(1): p. 29-40.
137. Ali, N.a.S., et al., *Synthesis of new  $\alpha$  aminophosphonate system bearing Indazole moiety and their biological activity*. European Journal of Medicinal Chemistry, 2012. **50**: p. 39-43.
138. Ouahrouch, A., et al., *Design, Synthesis, and Antiviral Activity of Novel Ribonucleosides of 1,2,3-Triazolylbenzyl-aminophosphonates*. Archiv Der Pharmazie, 2016. **349**(1): p. 30-41.
139. Camdem, J.B., *Pharmaceutical composition for inhibiting the growth of the cancers*, T.P.G. Company, Editor. 2000: USA.
140. Qin, Y., et al., *Synthesis and antifungal properties of (4-tolyloxy)-pyrimidyl- $\alpha$ -aminophosphonates chitosan derivatives*. International Journal of Biological Macromolecules, 2014. **63**: p. 83-91.
141. Sun, L., et al., *Characterization of Two Novel N-Methyl-D-aspartate Antagonists: EAA-090 (2-[8,9-Dioxo-2,6-diazabicyclo [5.2.0]non-1(7)-en2-yl]ethylphosphonic Acid) and EAB-318 (R- $\alpha$ -Amino-5-chloro-1-(phosphonomethyl)-1H-benzimidazole-2-propanoic Acid Hydrochloride)*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2004. **310**(2): p. 563-570.
142. Kuruva, c.s., et al., *Phosphorylated ganciclovir derivatives: Design, synthesis and in vitro and in vivo immunomodulatory activity*. Vol. 23. 2013.
143. DeForrest, J., et al., *Fosinopril, a phosphinic acid inhibitor of angiotensin I converting enzyme: in vitro and preclinical in vivo pharmacology*. Journal of cardiovascular pharmacology, 1989. **14**(5): p. 730-736.
144. Abdou, W.M., R.F. Barghash, and M.S. Bekheit, *Multicomponent reactions in a one-pot synthesis of  $\alpha$ -aminophosphonates and  $\alpha$ -aminophosphonic diamides with anti-inflammatory properties*. Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly, 2011. **142**(6): p. 649.
145. Abdou, W.M., R.F. Barghash, and M.S. Bekheit, *Carbodiimides in the Synthesis of Enamino-and  $\alpha$ -Aminophosphonates as Peptidomimetics of Analgesic/Anti-inflammatory and Anticancer Agents*. Archiv der Pharmazie, 2012. **345**(11): p. 884-895.
146. Grzywa, R., et al., *Synthesis of novel phosphonic-type activity-based probes for neutrophil serine proteases and their application in spleen lysates of different organisms*. Chembiochem, 2014. **15**(17): p. 2605-12.
147. Naydenova, E., et al., *Synthesis, cytotoxicity and clastogenicity of novel  $\alpha$ -aminophosphonic acids*. Amino Acids, 2007. **33**(4): p. 695-702.
148. Trela, Z., H. Kleszczynska, and J. Sarapuk, *Physiological and hemolytic toxicity of some aminophosphonates*. Z Naturforsch C, 2001. **56**(9-10): p. 838-42.
149. Allen, J.G., et al., *Phosphonopeptides as antibacterial agents: metabolism and pharmacokinetics of alafosfalin in animals and humans*. Antimicrob Agents Chemother, 1979. **16**(3): p. 306-13.
150. PharmaExpert. *Way2Drug PASS Online*. 2018; Available from: <http://www.pharmaexpert.ru/passonline/>.

151. NOM, *Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.*, in *DOF*. 1999.
152. Lee, S.-H., et al., *Suppression of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin inflammation in mice by transduced Tat-Annexin protein*. *BMB Reports*, 2012. **45**(6): p. 354-359.
153. Carlson, R.P., et al., *Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents*. *Agents Actions*, 1985. **17**(2): p. 197-204.
154. Gordon, J.S., et al., *Topical N-acetyl-S-farnesyl-L-cysteine Inhibits Mouse Skin Inflammation, and Unlike Dexamethasone, its Effects Are Restricted to the Application Site*. *Journal of Investigative Dermatology*, 2008. **128**(3): p. 643-654.
155. Griffiths, R.J., et al., *Pharmacological modification of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate induced inflammation and epidermal cell proliferation in mouse skin*. *Agents and Actions*, 1988. **25**(3): p. 344-351.
156. Carlson, R.P., J. Chang, and A.J. Lewis, *Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents*. *Agents and actions*, 1985. **17**(2): p. 197-204.
157. Rao, T., et al., *Comparative evaluation of arachidonic acid (AA)- and tetradecanoylphorbol acetate (TPA)-induced dermal inflammation*. Vol. 17. 1994. 723-41.
158. Dahl, J.B., et al., *Post-operative analgesic effects of paracetamol, NSAIDs, glucocorticoids, gabapentinoids and their combinations: a topical review*. *Acta Anaesthesiol Scand*, 2014. **58**(10): p. 1165-81.
159. Liu, W., et al., *Synthesis and biological evaluation of curcumin derivatives containing NSAIDs for their anti-inflammatory activity*. *Bioorg Med Chem Lett*, 2015. **25**(15): p. 3044-51.
160. Sherwood, E.R. and T. Toliver-Kinsky, *Mechanisms of the inflammatory response*. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol*, 2004. **18**(3): p. 385-405.
161. Abdou, W.M., N.A. Ganoub, and E. Sabry, *Synthesis and quantitative structure-activity relationship study of substituted imidazophosphor ester based tetrazolo[1,5-b]pyridazines as antinociceptive/anti-inflammatory agents*. *Beilstein J Org Chem*, 2013. **9**: p. 1730-6.
162. Ordóñez, M., J.L. Viveros-Ceballos, and I. Romero-Estudillo, *Stereoselective Synthesis of  $\alpha$ -Aminophosphonic Acids through Pudovik and Kabachnik-Fields Reaction*, in *Amino Acid-New Insights and Roles in Plant and Animal*. 2017, IntechOpen.
163. Grzywa, R., et al., *Synthesis of Novel Phosphonic-Type Activity-Based Probes for Neutrophil Serine Proteases and Their Application in Spleen Lysates of Different Organisms*. *ChemBioChem*, 2014. **15**(17): p. 2605-2612.
164. Nalamachu, S. and R. Wortmann, *Role of indomethacin in acute pain and inflammation management: a review of the literature*. *Postgrad Med*, 2014. **126**(4): p. 92-7.
165. Sun, X., et al., *Compare the efficacy of inhaled budesonide and systemic methylprednisolone on systemic inflammation of AECOPD*. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics*, 2015. **31**: p. 111-116.



*"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"*

Cuernavaca, Mor., 13 de mayo de 2019.

**Dr. David Martínez Duncker Ramírez**

Director

Facultad de Medicina

Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Evaluación del efecto anti-inflamatorio y toxicidad aguda de nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno **Misael López Castillo**. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

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.

**Atentamente**



**Dr. Juan José Acevedo Fernández**

*"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"*

Cuernavaca, Mor., 13 de mayo de 2019.

**Dr. David Martínez Duncker Ramírez**  
Director  
Facultad de Medicina  
Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Evaluación del efecto anti-inflamatorio y toxicidad aguda de nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno **Misael López Castillo**. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

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.

**Atentamente**



**Dra. Gabriela Castañeda Corral**

*"1919-2019: en memoria del General Emiliano Zapata Salazar"*

Cuernavaca, Mor., 13 de mayo de 2019.

**Dr. David Martínez Duncker Ramírez**  
Director  
Facultad de Medicina  
Presente:

Estimado Dr. Martínez Duncker, por este conducto me permito informarle que he revisado el trabajo de Tesis "**Evaluación del efecto anti-inflamatorio y toxicidad aguda de nuevos  $\alpha$ -aminofosfonatos**", que para obtener el grado de Maestro en Medicina Molecular me proporcionó el alumno **Misael López Castillo**. Le comunico que su contenido es adecuado y suficiente, por lo que de acuerdo al artículo 110 del Reglamento de Posgrado de la UAEM le otorgo:

**Dictamen I se aprueba el trabajo de tesis tal como se presenta.**

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.

**Atentamente**



**Dr. Jesús Santa Olalla Tapia**