

00361



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

2

TOXICIDAD AGUDA Y EFECTO
HIPOTENSOR DE NO₂⁻, NO₃⁻, L-ARGININA Y
OXOBOROLIDINONA DE L-ARGININA
MODULADOS POR AZUL DE METILENO

293054

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

Q.F.I. MARTHA ELENA BRAVO AVILA

DIRECTOR DE TESIS: DR. JOSÉ GUADALUPE TRUJILLO FERRARA

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

***EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE
BIOQUÍMICA CELULAR DE LA ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
DEL INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL, BAJO LA DIRECCIÓN
DEL DR. JOSÉ G. TRUJILLO FERRARA***

Este trabajo está dedicado con todo cariño a la memoria de mi padre, Sr. Nicolás Bravo Alarcón.

Con mucho cariño a mi madre, a mis hermanos con especial cariño a Mary. A todos mis sobrinos.

Con Amor a Raúl, por su apoyo y comprensión.

Agradezco de manera especial a todo el cuerpo de sinodales.

Gracias por su ayuda al Dr. Juan Manuel Araujo A.

Gracias a Mary, José Luis y a Arturo por su colaboración

Gracias de manera especial a Marlen por su ayuda.

A mis amigos y compañeros.

Agradezco a SUPERA su apoyo para la realización de este trabajo

**AGRADEZCO AL DR. TRUJILLO
FERRARA SU EMPEÑO Y DEDICACIÓN
PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE
TRABAJO**

INDICE

| | PAGINA |
|------------------------|--------|
| RESUMEN | 1 |
| INTRODUCCION | 3 |
| OBJETIVOS GENERALES | 13 |
| OBJETIVOS PARTICULARES | 13 |
| MATERIAL Y METODOS | 14 |
| RESULTADOS | 21 |
| DISCUSION | 38 |
| CONCLUSIONES | 41 |
| BIBLIOGRAFIA | 42 |

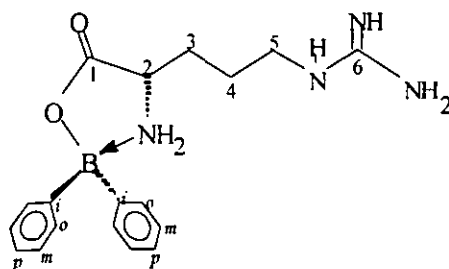
RESUMEN

La formación de óxido nítrico ($\bullet\text{N}=\text{O}$), constituye un fenómeno ampliamente difundido en los sistemas biológicos, y participa en la regulación de la comunicación y función celular, permitiendo una gran variedad de acciones biológicas, las cuales incluyendo la modulación de la presión arterial dependiente del endotelio; citotoxicidad por células fagocíticas y relajación de músculo liso. El $\bullet\text{N}=\text{O}$, es sintetizado a partir del grupo guanidino de la L-arginina por la enzima óxido nítrico sintasa (ONS) y posteriormente se oxida para formar nitrito (NO_2^-) y nitrato (NO_3^-). Uno de los receptores al óxido nítrico, es la guanilciclase, que al activarla produce guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y responsable de la vasorrelajación. Del mismo modo, el $\bullet\text{N}=\text{O}$ se une a las proteínas que contienen al grupo ferrohemo forma metahemoglobina (mHb). Todas estas acciones son inhibidas por el azul de metileno, una fenotiazina que también inhibe los efectos tóxicos de NO_2^- y de L-arginina pero, no los de NO_3^- .

Por otro lado, se ha demostrado que los derivados de L-arginina con modificaciones en el extremo guanidino actúan como inhibidores de la ONS y que los derivados de L-arginina con modificaciones tanto en la cadena metilénica como en el extremo α -amino y α -carboxilo son sustrato de la misma enzima. Entonces, es posible la síntesis de un compuesto que, solamente con modificaciones en el extremo α -amino y α -carboxilo pero no en el guanidino sea sustrato de la ONS, si estos cambios le confieren al nuevo compuesto otras características que favorezcan su absorción distribución y facilite su acceso al sitio de acción como sustrato de la enzima sería mucho mejor. Los derivados borínicos de L-aminoácidos tienen la característica de aumentar la lipofilicidad del aminoácido y ser muy estables en pH de 2 a 8, lo que les confiere la posibilidad de tener mejor biodisponibilidad que los L-amino -ácidos solos.

En este trabajo se reporta la síntesis de la oxoborolidinona de L-Arginina, molécula relacionada estructuralmente con la L-arginina, aminoácido que participa en la formación de $\bullet\text{N}=\text{O}$. El compuesto fue caracterizado por espectrofotometría de masas y resonancia magnética nuclear (RMN) de ^1H , ^{13}C y ^{11}B . Los efectos biológicos probados fueron toxicidad aguda, efecto hipotensor y formación de mHb, en rata Wistar hembras y machos.

Los resultados mostraron que el compuesto sintetizado corresponde a la oxoborolidinona de L-arginina, pues el espectro de RMN fue congruente con la estructura, particularmente del ^{11}B tetracoordinado con absorción en + 5 ppm. En la intoxicación aguda, los animales mostraron síntomas de toxicidad semejantes a las de NO_2^- ; asimismo el efecto hipotensor se presentó en concentraciones de compuesto en el orden de ηg cuyo efecto es semejante al del NO_2^- pero es más potente que L-arginina, para formar mHb y todas estas acciones son moduladas por el azul de metileno. Lo anterior hace pensar que el efecto del compuesto es vía la formación de óxidos de nitrógeno. No obstante, es necesario realizar más experimentos para demostrar fehacientemente su mecanismo de acción.



Oxoborolidinona de L-arginina

La estructura química anterior es la propuesta para la oxoborolidinona de L-arginina la cual muestra un compuesto heterocíclico, que contiene un anillo de 5 miembros, con alta potencialidad biológica; al igual que una gran variedad de fármacos, tanto de origen vegetal como sintéticos heterocíclicos. Aunque el hecho de que una molécula contenga un heterociclo no determina su actividad biológica, sin embargo la introducción de un anillo de este tipo tiene la posibilidad de proteger a la molécula y aumentar su actividad biológica, de aquí el interés de generar compuestos con modificaciones en su estructura molecular que les confiera mayor reconocimiento por la enzima. La oxoborolidinona de L-arginina tiene un elevado efecto hipotensor, ofreciendo así una buena alternativa para el control de la presión sanguínea como relajante efectivo de la musculatura lisa vascular. Las características químicas del anillo le confieren una gran estabilidad a la hidrólisis en un rango de pH de 4 a 8 y a temperaturas elevadas y la disminución de su solubilidad en agua mejora su coeficiente de reparto y por consiguiente su biodisponibilidad es mejor; permitiéndole actuar por tiempos mas prolongados.

INTRODUCCION

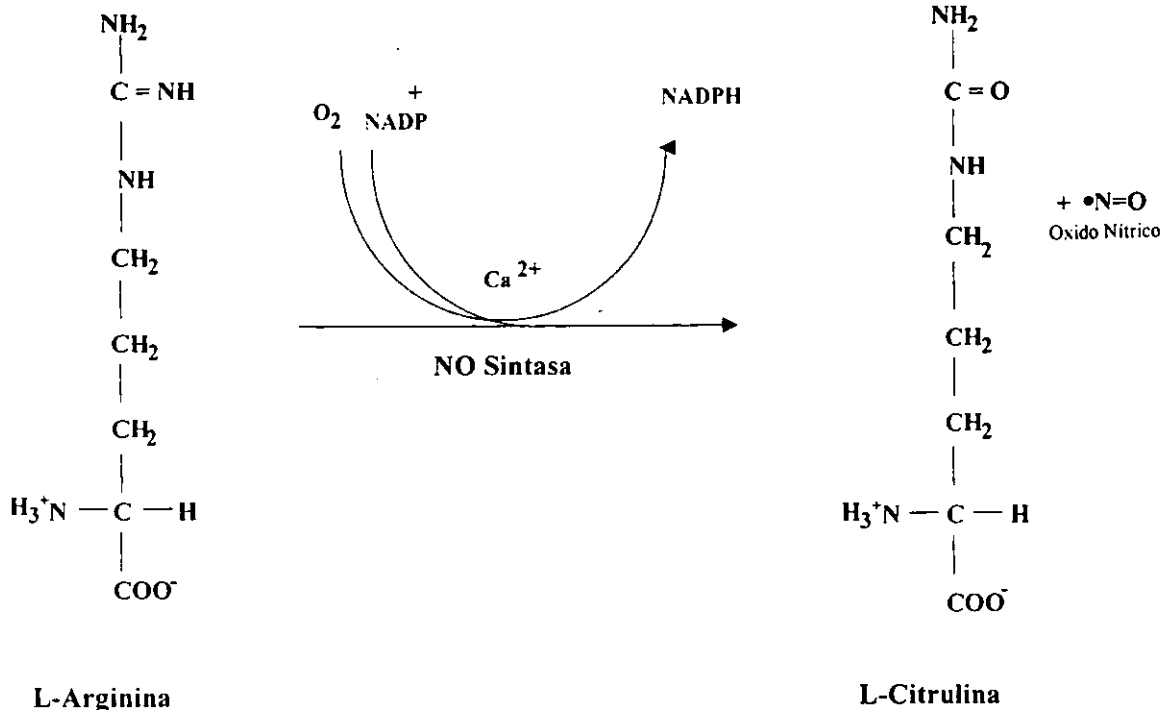
Desde que Furchgott, informó que la vasodilatación es mediada por un factor relajante derivado del endotelio (FRDE)¹⁻⁴, se ha intensificado su estudio encontrándose que su naturaleza química y sus propiedades farmacológicas son idénticas a las del •N=O, formado a partir de la L-arginina en el endotelio vascular^{5,6,7}, por acción de una oxidasa dependiente de Ca⁺⁺ de función mixta, la ONS. presente en muchos tejidos de mamíferos.

La ONS pertenece a una familia de enzimas que producen •N=O y citrulina de L-arginina en presencia de NADPH y O₂. Esta familia de enzimas presenta tres isoformas: La neuronal (ONSn); la endotelial (ONSe) y la inducible (ONSi); las dos primeras son constitutivas y dependientes de calcio/calmodulina la isoforma inducible es independiente de calcio, es regulada en transcripción, se produce en respuesta a ciertos estímulos. La ONSi y la ONSn son enzimas citosólicas, mientras que la ONSe está unida a la membrana⁸ y es la única que dispara la acción de la célula endotelial vascular⁸, las tres isoformas requieren de tetrahidrobiopterina (H₄B) como uno de sus cofactores para su función catalítica.

La ONSe es una enzima dimérica con Km de 3µM, y mantienen una estructura de bidominio con el sitio catalítico en el dominio hemo, están ubicados en este dominio, los sitios de unión para NADPH, FAD, FMN; para el sustrato y para la H₄B. No se conoce exactamente la función de la H₄B pero se sabe que debe de encontrarse en forma reducida para que se pueda llevar a cabo el efecto catalítico, también se ha identificado un enlace disulfuro involucrando un par de residuos de "cisteína", uno para cada monomero en coordinación con un átomo de zinc^{8,9}.

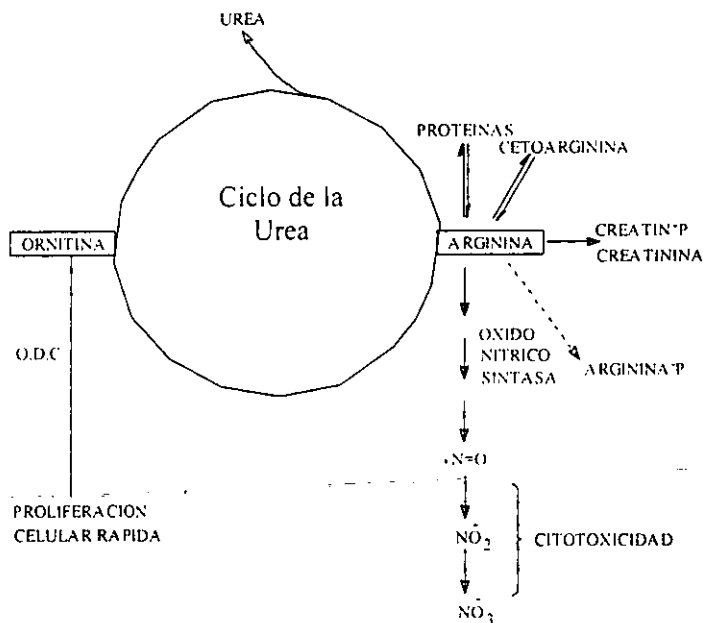
El •N=O difunde desde las células de origen hacia las células vecinas, en donde se une al grupo hemo de la guanilciclase, activándola para producir guanosín monofosfato cíclico (GMPc) y vasorrelajación^{10,11,12}.

El •N=O es inestable y su vida media breve (6-10 s), después de formarse, es oxidado a NO₂⁻ y NO₃⁻. La reacción general propuesta para su biosíntesis, es la siguiente.



Formación de •N=O y citrulina de L-arginina

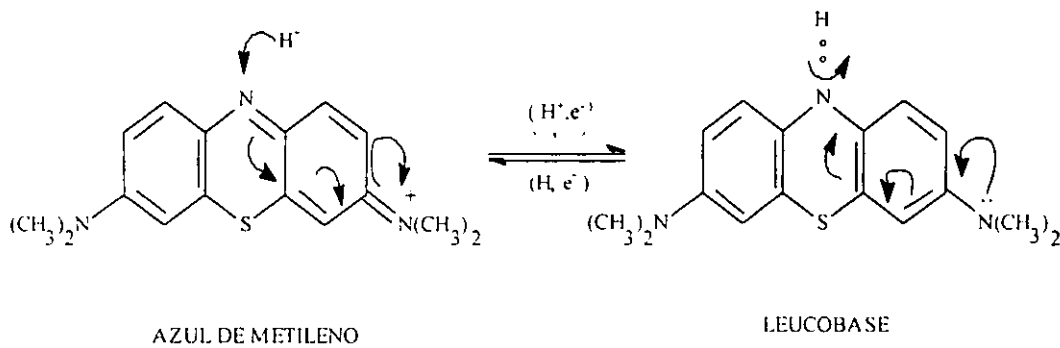
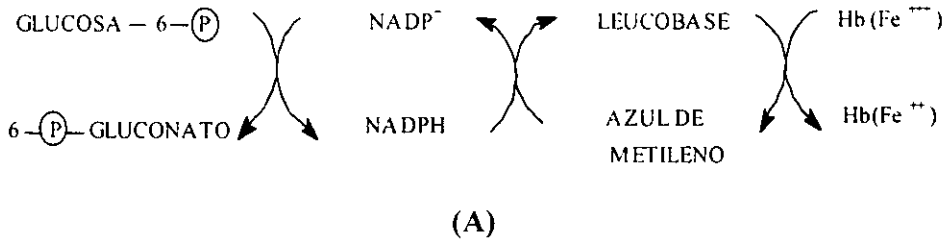
METABOLISMO DE ARGININA Y ORNITINA



Esquema 1. Papel central de la L-arginina en el ciclo de la urea, en la formación de óxidos de nitrógeno y en la proliferación celular¹³. La L-arginina puede ser útil en la terapia de procesos citotóxicos por generar •N=O

Los óxidos de nitrógeno se oxidan NO_2^- y NO_3^- . Los NO_2^- tienen la capacidad de transformar la hemoglobina (Hb) a mHb por un proceso de óxido-reducción, como se observa en el esquema 2 (A).

De manera similar, por un mecanismo de óxido-reducción el azul de metileno inhibe a la guanilciclase^{12,14} y revierte sus efectos como se muestra en el esquema 2 A y 2 B.



Esquema 2. Eventos de Óxido – Reducción en la formación de metahemoglobina.

Estructura química de la forma oxidada y reducida del azul de metileno (leucobase), se observa el desplazamiento electrónico que se efectúa cuando se reduce la molécula de azul de metileno.

Potencial de óxido-reducción del NADPH-NADP E° -0.324 Volts

Potencial de óxido-reducción del azul de metileno E° 0.011 Volts

El esquema anterior sugiere que la transformación de mHb (Fe^{3+}) a hemoglobina (Fe^{2+}) es realizada por el azul de metileno¹⁴, que es capaz de llevarlo a cabo por su potencial de óxido-reducción de 0.011 volts. Este valor indica que el potencial de reducción del azul de metileno es alto, puede aceptar fácilmente un electrón del NADPH y después cederlo a la mHb, que se encuentra en forma férrica (Fe^{3+}). Lo que sugiere que en la forma activa, el grupo hemo de la guanilato ciclasa se encuentra en forma férrica (Fe^{3+}), por esta razón el azul de metileno inhibe a la enzima¹⁴ y es utilizado en la transformación de mHb a hemoglobina (Hb).

Por lo otro lado, para realizar los estudios en donde está implicada la acción de la ONS se utilizan derivados de L-arginina con modificaciones en el extremo guanidino para inhibir a la enzima y derivados con modificaciones en la cadena metilénica o en el extremo α -amino y α -carboxilo los cuales podrían funcionar como sustrato, por esta razón se pensó en que era posible la síntesis de un compuesto derivado de la L-arginina al que se le incorporen modificaciones en el extremo α -amino y α -carboxilo, sin modificar el extremo guanidino y que estas modificaciones le confieran lipofilicidad sin perder estabilidad y el reconocimiento con la enzima en pH fisiológico. Las oxoborolidinonas¹⁵ de L-aminoácidos en general y, en particular, la oxoborolidinona de L-arginina, son compuestos sintéticos que se obtienen por condensación del aminoácido con el ácido difenilborínico con enlace coordinado boro-nitrógeno ($\text{B} \rightarrow \text{N}$), formando un anillo de 5 miembros¹⁵. Este tipo de compuestos es estable a la hidrólisis, a la alta temperatura y en pH de 2 a 8, lo cual hace que sean potencialmente atractivos para estudios biológicos.

Por lo anterior, los propósitos de este trabajo fueron:

1. Sintetizar y caracterizar a la oxoborolidinona de L-arginina, molécula relacionada estructuralmente con la L-arginina, aminoácido que participa en la formación de ($\bullet\text{N}=\text{O}$);
2. Probar sus efectos biológicos como: toxicidad aguda, efecto hipotensor y formación de mHb, en rata Wistar hembras o machos;
3. Modulación de estos efectos por azul de metileno; y,
4. Comparación de los efectos biológicos con L-arginina, NO_2^- y NO_3^- .

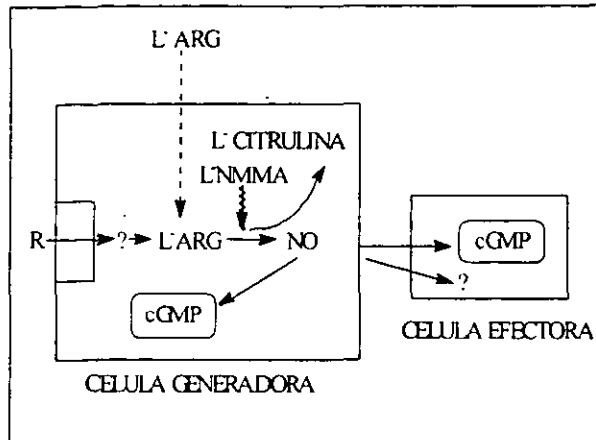
Hace algunos años se demostró que el $\bullet\text{N}=\text{O}$ es una sustancia idéntica al FRDE de Furchgott¹⁻⁴, que es sintetizado por el endotelio vascular a partir del aminoácido L-arginina⁹⁻¹². El $\bullet\text{N}=\text{O}$, en condiciones normales, es un gas y es una molécula de estructura muy sencilla, que tiene una gran actividad biológica, probablemente debido a su comportamiento como radical libre, ya que posee un electrón no apareado que le confiere gran reactividad química y lo hace paramagnético. Se sabía que este compuesto era producido por las bacterias, pero se desconocía que tuviera tantas funciones y todas ellas de vital importancia.

Recientemente, se ha incrementado el estudio del óxido nítrico y se han encontrado múltiples e importantes funciones que demuestran su comportamiento como uno de los reguladores biológicos más importantes¹⁶, ver esquema 3. Entre el gran número de actividades biológicas que se le atribuyen, se encuentran las siguientes:

- 1) Es un potente vasodilatador
- 2) Tiene actividad citotóxica
- 3) Mantiene la comunicación celular en el Sistema Nervioso Central (S.N.C)¹⁶
- 4) Inhibe la agregación de plaquetas
- 5) Modula a los neurotransmisores excitadores
- 6) Es inhibidor de la proliferación celular

El $\bullet\text{N}=\text{O}$ es una sustancia humoral inestable, con un tiempo de vida media de 6-10 s, que fue identificado por Furchgott. Tan pronto como se produce reacciona con el oxígeno o el agua y se convierte en NO_2^- y NO_3^- , por tal motivo su determinación se efectúa en forma indirecta a través de NO_2^- , NO_3^- o mHb.

Normalmente el hombre elimina pequeñas cantidades de NO_2^- y NO_3^- , lo que hizo pensar que provenían de los conservadores de algunos alimentos enlatados¹⁷, los NO_2^- también se utilizan en cuarteles, cárceles e internados como inhibidores del *libido*.

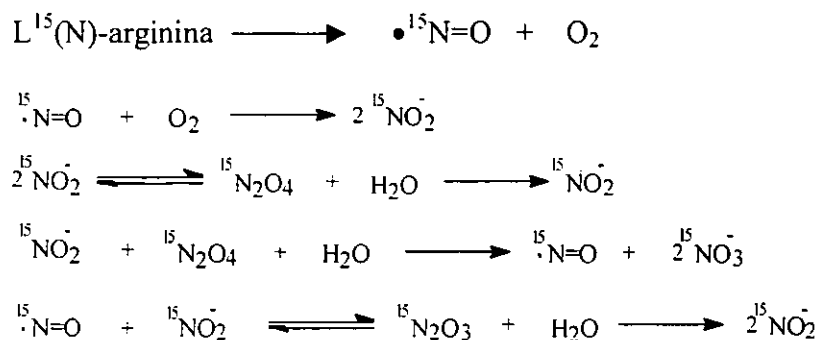


Esquema 3. Comunicación celular: El $\bullet\text{N}=\text{O}$ mantiene la comunicación celular en el S.N.C.

Estudios posteriores a 1956, señalaron el peligro de ingerir alimentos con un alto contenido en nitritos por presentar la posibilidad de transformarse en nitrosaminas, compuestos que son altamente cancerígenos; debido a esto, el consumo de NO_2^- y NO_3^- se redujo considerablemente. Posteriormente, en 1981, Tannenbaum^{17,18} comprobó que tanto el hombre como los animales de experimentación sometidos a una dieta carente de NO_2^- y NO_3^- seguían eliminando cantidades apreciables de estas sustancias y surgió la duda de su origen. Tannenbaum observó también que uno de los pacientes que estaba estudiando excretaba cantidades muy elevadas de NO_3^- , hecho que asoció a una infección intestinal. Posteriormente demostró una correlación entre la endotoxina bacteriana inyectada a ratas, con la excreción de NO_3^- , lo que fue confirmado por Warren. En estos trabajos, se hicieron experimentos (en ratas con diferentes dietas) y con macrófagos^{19,20} en cultivo con diferentes cantidades de endotoxina bacteriana e interferón gamma y se observó que no producen NO_3^- si no hay L-arginina en el medio de cultivo. Se experimentó en ratas con dietas carentes de L-arginina, lo cual permitió concluir que el $\bullet\text{N}=\text{O}$ es un gas tóxico que se generaba a partir del grupo guanidino de la L-arginina.

Estos y otros experimentos permitieron descubrir una enzima que cataliza la biosíntesis de NO_3^- a partir de L-arginina, la NOS, teniendo como intermediario al $\bullet\text{N}=\text{O}$. En esta vía sintética se produce NO_2^- y un aminoácido, la citrulina, lo cual indica que el origen del nitrógeno del NO_3^- es el grupo guanidino de la L-arginina²¹.

Cuando se usa L-arginina marcada²¹ con ¹⁵N (L¹⁵N-arginina) se obtiene •¹⁵N=O marcado y la secuencia de reacciones para comprobar que el •N=O se genera a partir de L-arginina son las siguientes (esquema 4).



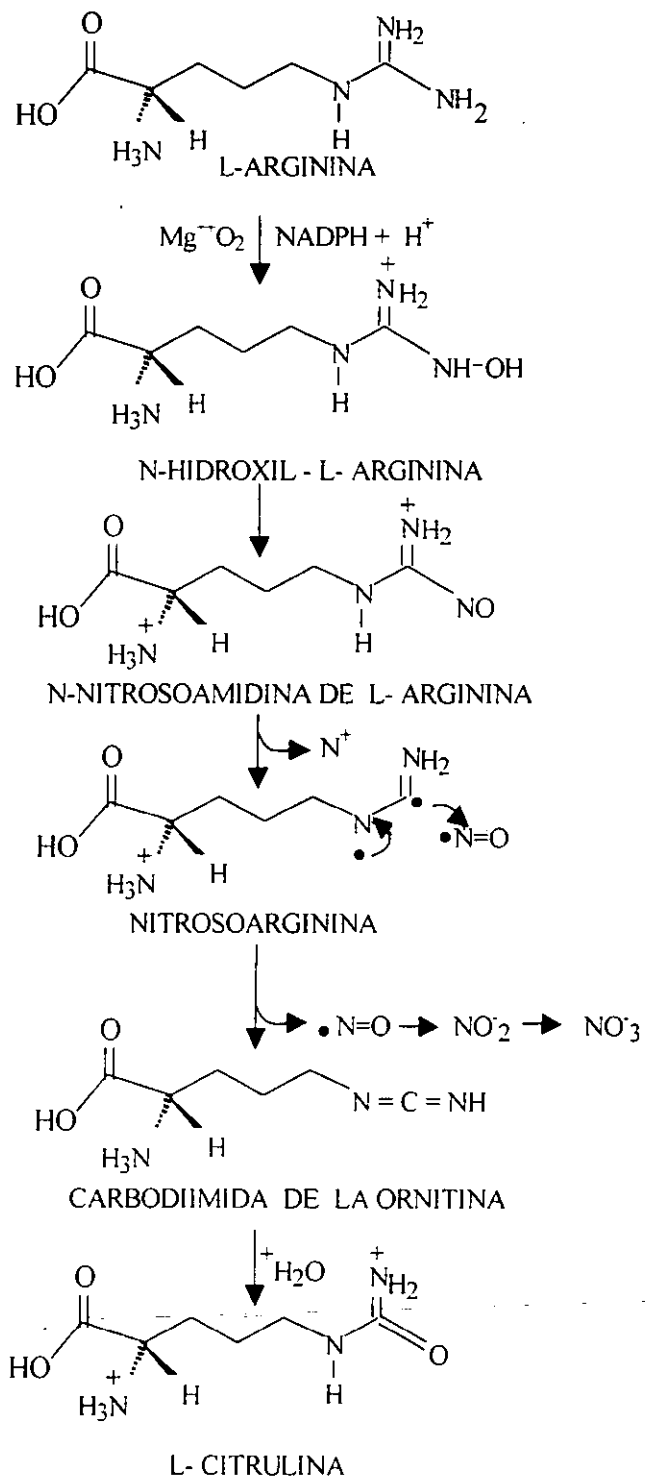
Esquema 4

La ONSe, es una enzima constitutiva en las células endoteliales y neuronas; en macrófagos esta enzima es inducible. El precursor en la biosíntesis del NO₃⁻ es el •N=O, gas tóxico para las células tumorales. Es indispensable para la función de los macrófagos²². Hibbs; comprobó que la monometil-L-arginina (N^G-monometil arginina) es un inhibidor de la ONSe y se ha comprobado que bloquea la formación de NO₃⁻ y la capacidad de los macrófagos para destruir células tumorales²³.

Una propiedad biológica del •N=O, de gran importancia y que interesa destacar, es su participación en la dilatación de los vasos sanguíneos por activación de la guanilciclase y concomitante acumulación del GMPc. La activación de la guanilciclase se debe a la formación de un complejo sulfoferrohemo de la enzima con el •N=O, induciendo un cambio conformacional que eleva el GMPc y desencadena su acción sobre la célula receptora, como se muestra en el esquema 3.

El esquema 4 muestra la vía biosintética de óxidos de nitrógeno. Los vasos sanguíneos, se dilatan por relajación de los músculos, debido a la acción de ciertos neurotransmisores como la acetilcolina, sin embargo, otros neurotransmisores como la noradrenalina producen vasoconstricción y ocasionan hipertensión.

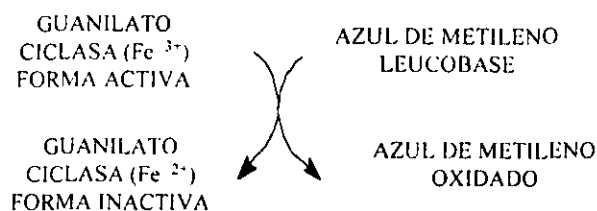
BIOSINTESIS DE ÓXIDO NITRICO



Esquema 5. Secuencia de reacciones propuestas para la biosíntesis de óxido nítrico, en ella se observa que el compuesto final es el NO_3^- ; se deduce que el $\bullet\text{N}=\text{O}$ se oxida a NO_2 finalmente termina en NO_3^- y L-citrulina

De igual modo ocurre con el $\bullet\text{N}=\text{O}$ en la comunicación celular pues se produce en el cerebro por la acción de la ONS (constitutiva), que actúa como un potente mediador de la acción de diferentes neurotransmisores excitadores. El mecanismo propuesto para la biosíntesis del $\bullet\text{N}=\text{O}$ en macrófagos, requiere NADPH y es estimulada por Mg^{++} , esquema 5.

Por otro lado, el azul de metileno es un colorante fenotiazinico sintético con propiedades de óxido-reducción, que ha sido probado con buenos resultados como reductor. La reducción intracelular, es catalizada por enzimas que requieren NADPH o FADH_2 como cofactor. Por lo que, este colorante inhibe la vaso-relajación inducida por óxido nítrico, peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos. Dado que es un buen inhibidor de la guanilciclase²⁵. De esta forma es como, datos recientes han demostrado que la acción vasodilatadora de los nitrovasodilatadores inorgánicos del tipo del NaNO_2 y de la Nitroglicerina es inhibida por azul de metileno^{25,26,27}, debido a que transforma la guanilciclase (Fe^{3+}), forma activa, a guanil ciclase (Fe^{2+}) o, forma inactiva, esta acción del azul de metileno impide la vasodilatación y atenúa el efecto hipotensor, como se muestra en el esquema 6.



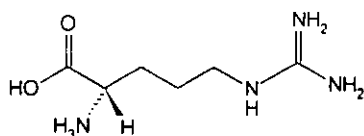
Esquema 6

Por otro lado, como Hibbs comprobó que los derivados de L-arginina con modificaciones en el grupo guanidino actúan como inhibidores de la ONS. Otros investigadores han comprobado que los derivados de la L-arginina con modificaciones en la cadena lateral o en el extremo α -amino y α -carboxilo actúan como-sustrato de la misma, induciendo la formación de $\bullet\text{N}=\text{O}$. De igual forma, los compuestos heterocíclicos, ocupan un lugar muy importante entre las moléculas que hacen posible la vida, como las bases púricas y pirimidicas que forman parte de los ácidos nucleicos y que constituyen la base de la información genética; una gran variedad de fármacos tanto de origen vegetal como sintéticos son heterocíclicos^{28,29}, este hecho motiva el estudio biológico de nuevos compuestos de este tipo que tengan algún efecto biológico.

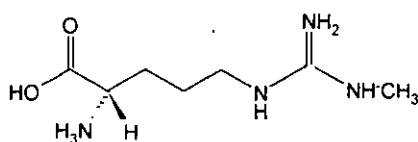
Las oxoborolidinonas, compuestos heterocíclicos que están siendo probados en la terapia de enfermedades cancerosas y que llevan a cabo su mecanismo de acción por captura de neutrones de ^{10}B , han servido de base para este proyecto, pues son estables a la hidrólisis, a alta temperatura y a pH de 2 a 8 y su característica de heterociclo les confiere mayor biodisponibilidad. En particular, la oxoborolidinona de L-arginina^{28,29,30}, aparte de cumplir con estas características, cumple con la condición de no contener modificaciones en el grupo guanidino y por lo tanto, se supone será sustrato de la ONSe. Porque el boro incluido en los dos grupos funcionales le permite comportarse como zwitterion, de manera similar al aminoácido libre lo que le facilitaría su unión a la enzima.

La L-arginina es el sustrato natural de la ONSe y los análogos de este aminoácido como la L-N^G monometil L-arginina (L-NMMA) actúa como inhibidor de la formación de NO_2^- , NO_3^- de L-arginina en anacrófagos y se ha visto que su acción es estereoespecífica y actúa a nivel de la enzima. En cambio la N α -benzoil L-arginina actúa como sustrato de la ONSe, al observar la similitud de su estructura con la oxoborolidinona de L-arginina sugiere que su comportamiento sea como sustrato de la ONS.

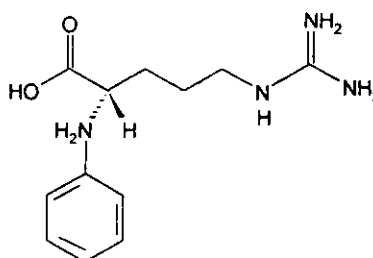
Si se observan las estructuras de los diversos derivados de L-arginina que funcionan como inhibidores, o como sustrato y la estructura de la oxoborolidinona de L-arginina³¹, se comprenderá esta suposición, por lo que, es de esperarse que dicha oxoborolidinona actuará como sustrato de la enzima ONS y producirá efectos tóxicos agudos similares a los producidos por los óxidos de nitrógeno, efecto hipotensor y la formación de mHb; su efecto será modulado por el azul de metileno. Todo lo anterior será comparado con el efecto producido por L-arginina. NO_2^- y NO_3^- .



L-arginina



N-monometil L-arginina (L-NMMA)



N α -benzoil L-arginina

Objetivos generales

Sintetizar y caracterizar un compuesto relacionado estructuralmente con la L-arginina, que presente propiedades biológicas semejantes a este aminoácido, que será sustrato de la ONSe, probar sus efectos biológicos sin y con azul de metileno y compararlos con L-arginina, NO_2^- , NO_3^- .

Objetivos particulares

1. Sintetizar y caracterizar espectroscópicamente a la oxoborolidinona de L-arginina.
2. Probar los siguientes efectos biológicos, en ratas Wistar hembras o machos, del compuesto sintetizado:
 - a) Determinar Toxicidad aguda (Dosis letal media, DL_{50})
 - b) Determinar Efecto hipotensor (Dosis efectiva media, DE_{50})
 - c) Determinar de manera indirecta la formación de $\bullet\text{N}=\text{O}$ como mHb
 - d) Modulación de estos efectos por azul de metileno
3. Comparar los efectos biológicos probados del compuesto sintetizado sin y con modulación por azul de metileno con:
 - a) L-arginina
 - b) NO_2^-
 - c) NO_3^-

MATERIAL Y MÉTODOS

a) MATERIAL

Todos los reactivos empleados en este trabajo, fueron grado analítico.

Resonancia Magnética Nuclear

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) se emplea para estudiar una gran variedad de núcleos, incluyendo ^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{19}F , ^{11}B y ^{31}P . Como el carbono y el hidrógeno son los componentes principales de las moléculas orgánicas, son muy útiles el protón ^1H , el ^{13}C y, para nuestro caso, también el ^{11}B . Los protones son magnéticamente activos, cuando hay una combinación correcta de campo magnético y de radiación electromagnética, se dice que el protón se encuentra en resonancia y se determina su energía de absorción. Por lo tanto los núcleos utilizados para resonancia deben ser magnéticamente activos.

Equipo Utilizado:

Espectrofotómetro Beckman DU-6.

Espectrofotómetro Jeol GSX-270.

Espectrofotómetro Perkin Elmer IGF.

Espectrofotómetro Perkin Elmer UV/VIS Lambda 2S.

Potenciómetro Beckman.

b) MÉTODOS

I. Síntesis de la oxoborolidinona de L-arginina.

La oxoborolidinona de L-arginina utilizada, se sintetizó en el laboratorio de Bioquímica de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, según la técnica reportada por Trujillo-Ferrara²⁹.

Se prepararon dos soluciones:

Solución A. En un matraz con refrigerante se disolvieron 3.0 g de L-arginina (base libre) en aproximadamente 5 ml. de agua acidulada a pH 3.

Solución B. En un matraz Erlenmeyer se disolvieron una cantidad equimolar, más un excedente del 10%, de ácido difenilborínico en aproximadamente 20 ml. de etanol; en seguida se hace separar el ácido difenilborínico de la etanolamina agregando agua destilada acidulada a pH 3 hasta formar una solución lechosa; inmediatamente se extrae el ácido difenil borínico adicionando éter etílico y separando en un embudo de separación la fase etérea. Esta fase se vierte al matríz con refrigerante de la solución A. Esta última operación se realiza por tres ocasiones.

Posteriormente se coloca el matraz con refrigerante a reflujo por 4 horas y a 60°C, se deja precipitar, posteriormente, el precipitado se filtra y lava con hexano.

Las siguientes determinaciones fueron realizadas en el Bioterio de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional, utilizando rata Wistar macho con un peso de 250 g. en promedio.

II. Determinación de la toxicidad aguda de oxoborolidinina de L-arginina sin y con azul de metileno

Para determinar la DL_{50} de la oxoborolidinona de L-arginina se trataron 10 lotes de 10 animales, cada uno con diferentes dosis del compuesto, a cada animal se le aplicó un

volumen correspondiente a la centésima parte su peso, por vía intraperitoneal y se compararon los resultados de las observaciones con un lote testigo, el que se trató con solución isotónica de NaCl. La DL_{50} se estimó por el método de Hill adaptado a la respuesta media (ver fórmula). Para los cálculos se aplicó la siguiente fórmula $\ln p/q = n \ln dosis$ y la DL_{50} se estima cuando $p=q$, de la gráfica correspondiente.

Para determinar la DL_{50} de la oxoborolidinona de L-arginina modulada por azul de metileno, se trataron lotes de animales a los que se administró, por vía intraperitoneal, un volumen correspondiente a la milésima parte de su peso, una solución de azul de metileno a concentraciones de 3.73 mg/k de peso, previo a la aplicación, por la misma vía, de diferentes dosis del compuesto de prueba con lapsos de tiempo de 10, 20 y 30 minutos.

La DL_{50} se determinó por el método de Hill., modificado para DL_{50}

$$p = \frac{\text{No de Animales muertos}}{\text{No. de Animales tratados}} \quad \text{Se graficó } \ln P/q \text{ vs } \ln \text{Dosis}$$

$$\therefore q = 1-P$$

III. Determinación de la toxicidad aguda de L-arginina, NO_2^- y NO_3^- sin y con azul de metileno

Las determinaciones de la toxicidad aguda de L-arginina, NO_2^- y NO_3^- sin y con azul de metileno se efectuó de forma similar a la determinación con el compuesto sintetizado. Para determinar la DL_{50} de L-arginina, NO_2^- y NO_3^- , por separado, se trataron 10 lotes de 10 animales cada uno con diferentes dosis de los compuestos, a los cuales se aplicó un volumen correspondiente a la centésima parte su peso, por vía intraperitoneal, y se compararon los resultados de las observaciones con el lote testigo correspondiente, los compuestos de prueba fueron preparados en solución isotónica de NaCl. De igual forma, la DL_{50} se estimó por el método de Hill adaptado a la respuesta media y, para los cálculos se aplicó la misma fórmula.

La determinación de la toxicidad aguda modulada por azul de metileno para L-arginina, NO_2 y NO_3 se realizó mediante el tratamiento de lotes de animales a los que se administró, por vía intraperitoneal, un volumen correspondiente a la milésima parte su peso, de la solución de azul de metileno a concentraciones de 3.73 mg/k de peso y, por la misma vía, se aplicaron diferentes dosis de los compuestos de prueba respectivos a intervalos de 10, 20 y 30 minutos.

Antes de realizar los ensayos de efecto hipotensor, los animales fueron anestesiados con uretano en un medio acuoso, este anestésico se eligió por ser uno de los que producen menos efectos cardiovasculares y fue seleccionado después de realizar pruebas con otros anestésicos: por tal motivo los animales no presentaron alteración en la frecuencia cardíaca. Después de realizar una disección cuidadosa se dejó estabilizar al animal antes de aplicar el compuesto, los animales que presentaron hemorragia o sangrado por un error en la disección fueron eliminados.

Para las siguientes determinaciones se utilizaron 60 ratas Wistar macho. Los animales fueron anestesiados con solución acuosa de uretano al 25 %, vía intraperitoneal. Se realizó disección de tráquea y paquete vascular de cuello, traqueostomía para asegurar una buena ventilación, canalización con instalación de catéter en arteria carótida y, se conectó a un transductor de presión arterial para su monitoreo. Para la aplicación de los compuestos de prueba se disecó e instaló catéter en vena femoral homolateral e, inmediatamente se administró 0.1 ml de heparina (300 UI/0.1 ml), como anticoagulante. Se dejó estabilizar la presión arterial por 20 minutos y se inició la aplicación de las soluciones.

IV. Determinación del efecto hipotensor de la oxoborolidinina de L-arginina sin y con azul de metileno

a) Sin azul de metileno. Se prepararon soluciones de concentración 1×10^{-6} , 1×10^{-9} , 1×10^{-12} y 1×10^{-15} mg/k de peso corporal del compuesto sintetizado y se administró un volumen equivalente a la milésima parte del peso del animal en lapsos de tiempo de 10 minutos o hasta que la presión basal se estabilice (5 administraciones) y, se registraron las modificaciones de tensión arterial.

b) Con azul de metileno. Previo al tratamiento con el compuesto, se administró un volumen equivalente a la centésima parte del peso de animal de una solución de azul de metileno, a concentración 3.73 mg/kg de peso corporal. En seguida se administró el compuesto de prueba correspondiente, de la misma forma que se indicó arriba y se registraron las modificaciones de la tensión arterial.

V. Determinación del efecto hipotensor de L-arginina, NO_2^- y NO_3^- sin y con azul de metileno

a) Sin azul de metileno. Se prepararon soluciones de clorhidrato de L-arginina, NaNO_2 y NaNO_3 a concentraciones equivalentes a las siguientes dosis de 25, 50, 100, 150 y 200 mg/kg de peso corporal, para aplicar un volumen equivalente a la milésima parte del peso del animal a intervalos de 10 minutos. En cada caso se realizaron 5 administraciones y se registraron las modificaciones de la tensión arterial.

b) Con azul de metileno. De igual forma que con el compuesto sintetizado, previo al tratamiento con los compuestos de prueba, se administró la solución de azul de metileno y en seguida se realizó el tratamiento con el compuesto respectivo, asimismo se registraron las modificaciones de la tensión arterial.

VI. Determinación indirecta de $\bullet\text{N}=\text{O}$ por medio de mHb

El método seguido para la determinación de mHb³², está basado en la oxidación de la Hb, que se lleva a cabo por la presencia de NO_2^- , en sangre, generado a partir de L-arginina.

Se prepararon soluciones de NaNO_2 equivalentes a dosis de 6.4, 12.8, 25.6 y 38.4 mmoles de NO_2^- por kg de rata; y, soluciones de clorhidrato de L-arginina equivalentes a dosis de 187, 250, 341 y 562 mmoles de L-arginina por kg de rata.

Esta determinación se realizó en rata Wistar hembra con peso entre 260-300 g, a las que se les aplicó, a un lote NaNO_2 y al otro clorhidrato de L-arginina para obtener mHb y cuantificarla espectrofotométricamente a 620 y 635 nm.

Las ratas se anestesiaron con una solución de uretano al 25%, vía intraperitoneal

Determinación de metahemoglobina

Reactivos

Amortiguador de fosfatos 0.017 M pH 6.6

Ferricianuro de potasio al 20%

Cianuro de sodio al 10%

Hidróxido de amonio neutro

Cianuro de sodio neutro (preparado una hora antes de usarse, mezclado a partes iguales de cianuro de sodio al 10% y ácido acético glacial al 12%)

Procedimiento

A 10 ml de buffer de fosfato 0.017 M pH 6.6 se agregan 0.1 ml de sangre total fresca y se vierten a una celda fotocolorimétrica. La mezcla se deja en reposo durante 5 min y se lee a 635 nm, se ajusta el aparato con un blanco de agua destilada, la lectura se toma como (L_1).

1. Se agrega una gota de solución neutra de cianuro de sodio para convertir la mHb a cianometahemoglobina (mHbcn), después de 2 min. se hace una segunda lectura (L_2) a 635 nm, previo ajuste.

La diferencia de las 2 lecturas tomadas (L_1-L_2), es proporcional a la concentración de mHb.

3. Si la solución permanece turbia, se agrega 1 gota de NH_4OH y se hace una tercera lectura (L_3) a 620 nm, previo ajuste.
4. Pipetear 2 ml. de la solución anterior, colocarlos en un tubo de ensaye, agregar 8 ml de buffer de fosfatos 0.017 M pH 6.6 y 1 gota de ferricianuro de potasio al 20%.
5. Dejar el tubo en reposo durante 2 min para que la oxihemoglobina (HbO_2) se convierta en mHb, después se agrega 1 gota de NaCN al 10%, para convertir la mHb total en mHbcn para la determinación de Hb total. Después de 2 min se hace una cuarta lectura

(L₄) a 540nm, previo ajuste con agua destilada y 1 gota de ferricianuro de potasio al 20% y NaCN al 10%.

Las concentraciones de los derivados de Hb, se calculan a partir de las siguientes ecuaciones, en las cuales T, M y S, representan g /100 ml. de sangre de:

Hb total (t), mHb y sulfohemoglobina (sHb) respectivamente

$$T = \frac{100 \times L_1}{2.38} \quad M = \frac{100 (L_1 - L_2)}{2.77} \quad S = \frac{1000 L_3 - (8.35 \times M) - 4.4 \times T}{100}$$

T = Hemoglobina total

M = Metahemoglobina

S = Sulfohemoglobina

RESULTADOS

I. Síntesis de la oxoborolidinona de L-arginina.

La molécula sintetizada tiene las siguientes características:

| | |
|---------------------|--|
| Formula Condensada: | $C_{18}N_4O_2BH_{22}$ |
| Peso Molecular: | 329g/mol |
| Punto de fusión: | $245^{\circ}C \pm 2$ |
| Color: | Polvo Blanco |
| Solubilidad: | Soluble en metanol y agua, Insoluble en éter etílico y hexano. Es una molécula polar |

La estructura del compuesto fue verificado por medio del análisis de RMN, 1H , ^{13}C y ^{11}B y espectrometría de masas.

Espectroscopia de RMN 1H , ^{11}B y ^{13}C

El espectro de RMN de ^{11}B se determinó en un espectrómetro Joel GSX-270 usando como disolvente dimetilsulfóxido hexadeuterado (DMSO- d_6).

Los espectros de resonancia de 1H y ^{13}C se determinaron en un espectrómetro Joel GSX-270 en DMSO- d_6 usando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Su estructura es la siguiente:

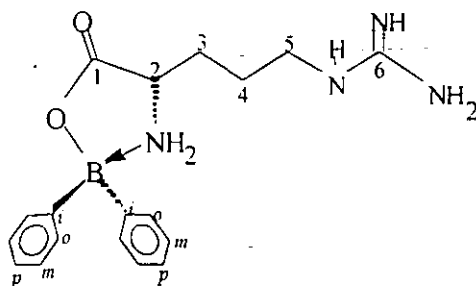


Tabla 1. De Asignaciones

| ¹ H | | ¹³ C | | ¹¹ B | |
|-------------------|-------|-----------------|--------------|------------------------------------|-----|
| Átomo | ppm | átomo | ppm | átomo | ppm |
| H-orto | 7.384 | C-1 | 173.1 | B | 5.0 |
| H-meta | 7.207 | C-2 | 55.0 | Señal característica ancha de boro | |
| H-para | 7.146 | C-3 | 25.540 | | |
| H-2 | 3.072 | C-4 | 26.920 | | |
| H-3 | 2.470 | C-5 | 36.698 | | |
| H-4 | 2.838 | C-6 | 157.0 | | |
| H-5 | 2.472 | C-i | 147.4, 147.8 | | |
| H-NH | 3.333 | C-o | 132.7 | | |
| H-NH ₂ | 7.389 | C-m | 130.0 | | |
| | | C-p | 128.5 | | |

Tabla de asignaciones, en partes por millón (ppm), obtenida del espectro de RMN de ¹H, ¹³C y ¹¹B.

En las Figuras 1, 2 y 3 se muestran los espectros de RMN de ^1H , ^{13}C , y ^{11}B , respectivamente, con lo que caracteriza plenamente el compuesto sintetizado.

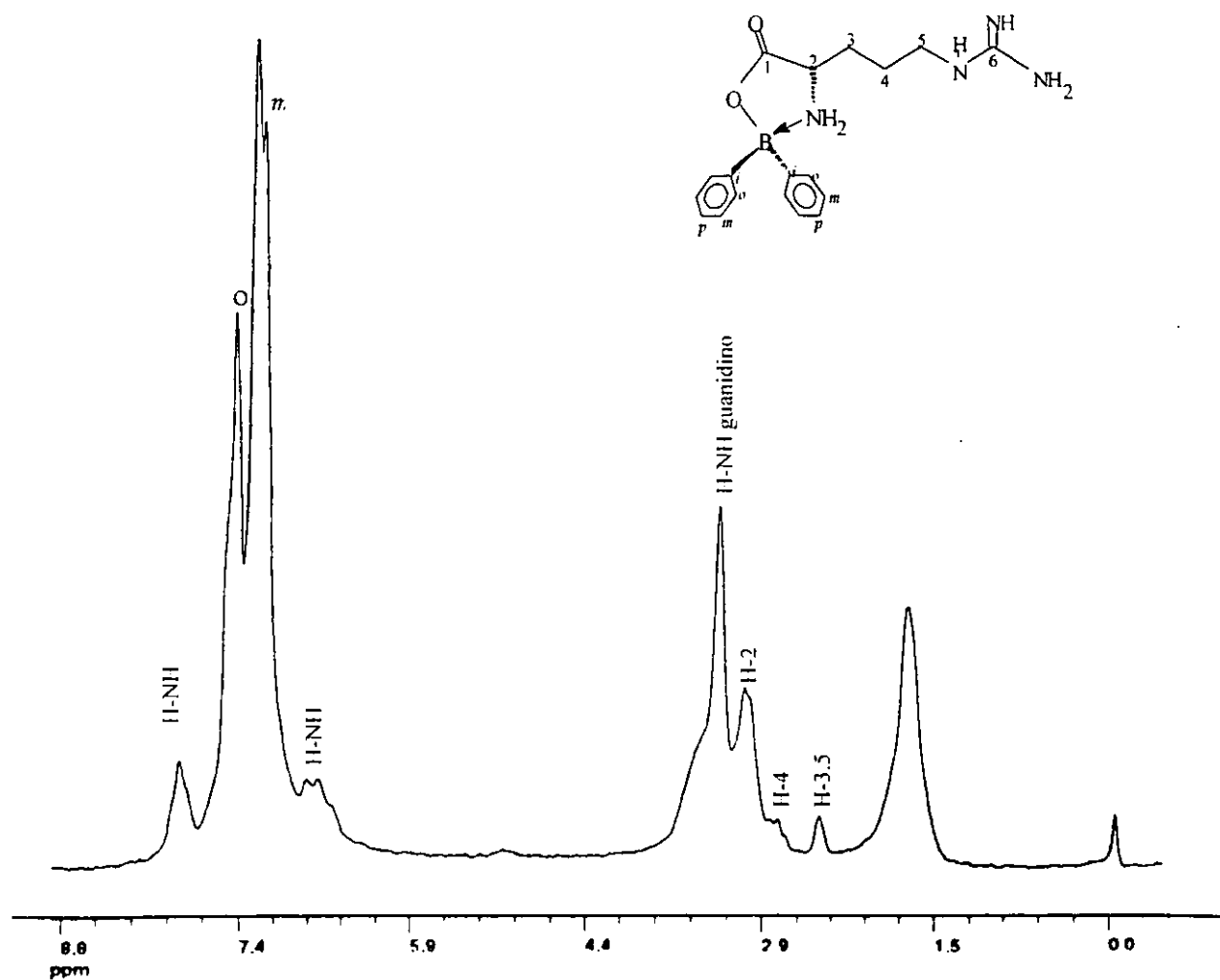


Figura 1

Espectro de RMN de ^1H para oxoborolidinona de L-arginina. Se obtienen desplazamientos químicos (δ) en (ppm) que para ^1H con sus diferentes posiciones y funciones abarca un rango de 0 a 10 ppm, usando como referencia interna TMS.

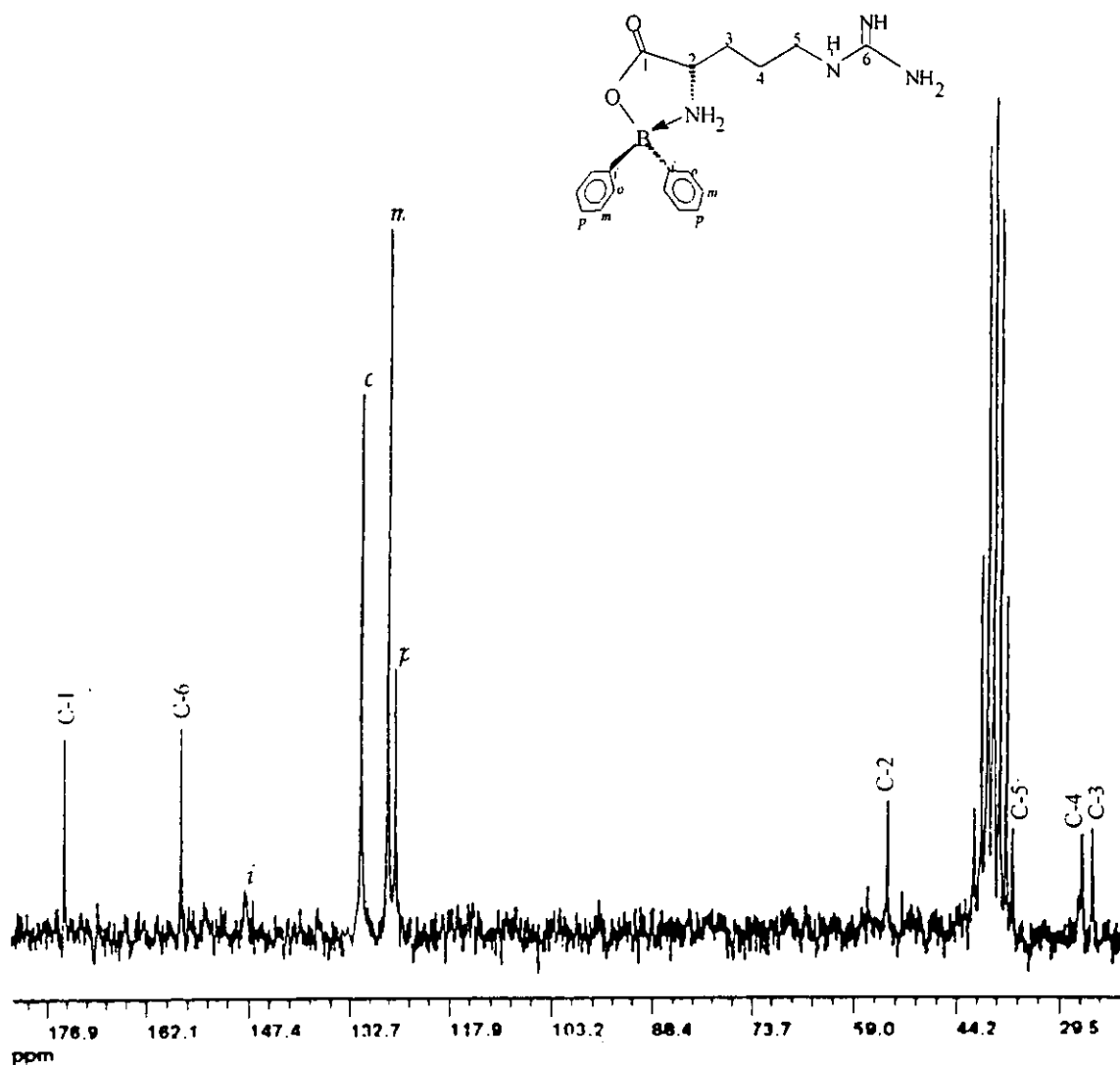


Figura 2

Espectro de RMN de ^{13}C , para oxoborolidinona de L-arginina. El desplazamiento químico (δ) en ppm., de ^{13}C (en sus diferentes posiciones) se encuentra generalmente en el rango de 0 a 240 ppm, utilizando como referencia interna TMS.

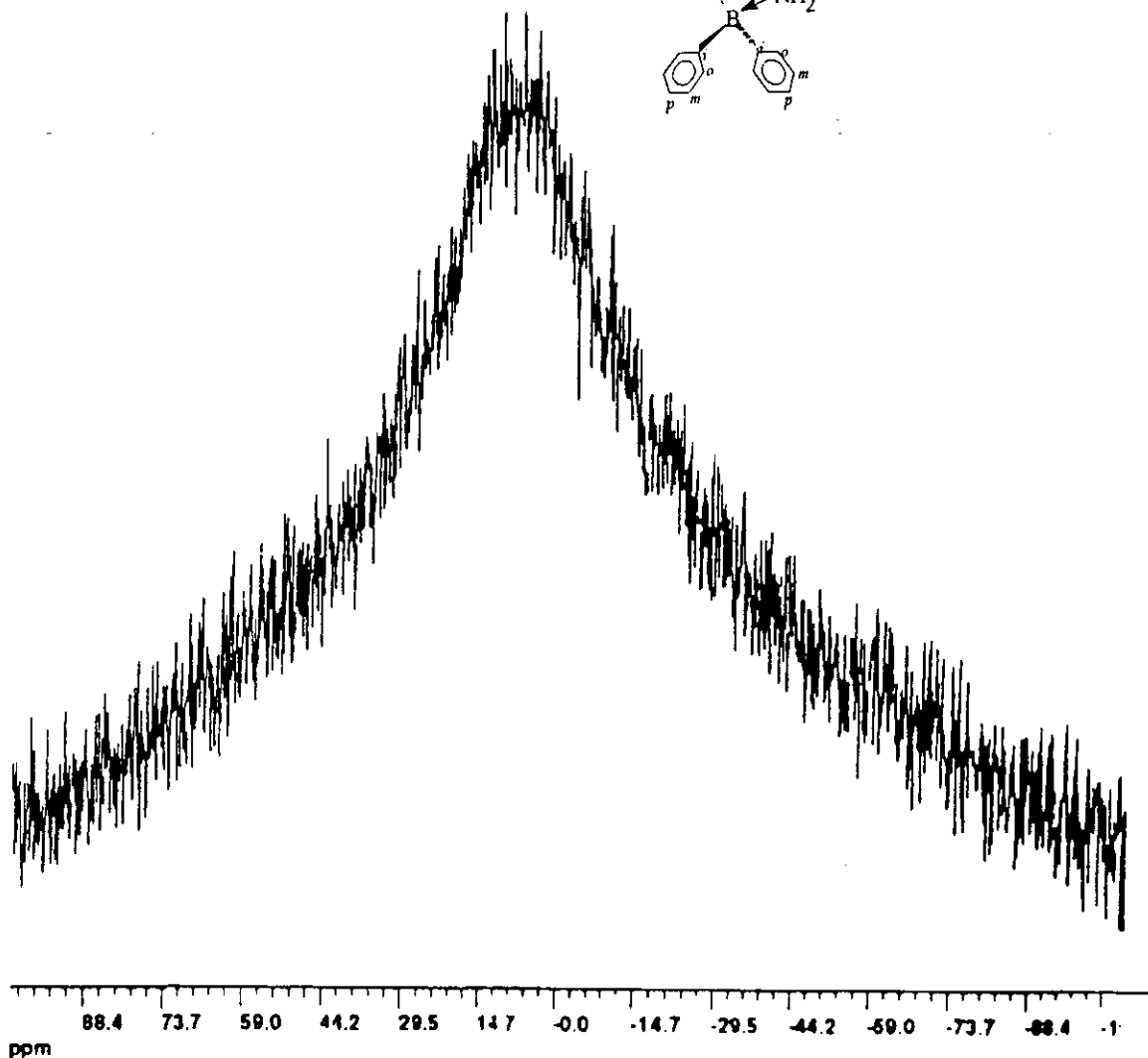
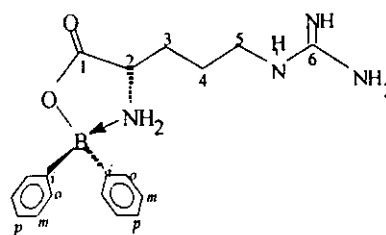


Figura 3

Espectro de RMN de ^{11}B , para oxoborolidinona de L-arginina. El desplazamiento químico (δ) de ^{11}B es de 5 ppm, el boro tetracoordinado absorbe en el rango de 1-6 ppm, utilizando como referencia interna TMS.

I. Determinación de la toxicidad aguda de oxoborolidinina de L-arginina sin y con azul de metileno

a) Sin azul de metileno. Se observaron síntomas como: irritabilidad, diarrea, contracción de músculos abdominales, flacidez y aspecto cianótico. La muerte se produjo por paro respiratorio. Los animales murieron entre los 10 y los 40 minutos posteriores a la aplicación. La DL_{50} estimada fue de 169.0 mg/k de peso corporal, como se puede apreciar en la Figura 4.

b) Con azul de metileno. Se observaron síntomas similares, la muerte se produjo por paro respiratorio y la curva sufrió un desplazamiento hacia la derecha.

II. Determinación de la toxicidad aguda de L-arginina, NO_2^- y NO_3^- sin y con azul de metileno

a) Sin azul de metileno. los animales presentaron síntomas de irritabilidad, contracción muscular abdominal muy acentuada, posteriormente flacidez, diarrea y aspecto cianótico. Una diferencia con respecto a los demás compuestos de prueba es que cuando se administró $NaNO_3$ los animales presentaron manifestaciones de irritabilidad. La muerte se presentó entre los 10 y 40 minutos posteriores a la aplicación, para todos los casos. Como se puede observar, muy similar a la obtenida con el compuesto sintetizado. Las DL_{50} estimadas para cada compuesto fueron las siguientes, Figuras 5 a 7:

1. Clorhidrato de L-arginina 3.85 g/k de peso corporal, Figura 5
2. $NaNO_2$ 79.68 mg/k de peso corporal, Figura 6
3. $NaNO_3$ 2.29 g/k de peso corporal, Figura 7

b) Con azul de metileno. Los síntomas y la muerte son similares pero, se observa un desplazamiento de la curva a la derecha. Los valores de DL_{50} para los compuestos de prueba fueron los siguientes:

1. Clorhidrato de L-arginina 3.8 g/k de peso corporal, Figura 5
2. $NaNO_2$ 114.20 g/k de peso corporal, Figura 6
3. $NaNO_3$ 2.29 g/k de peso corporal, Figura 7

III. Determinación del efecto hipotensor de la oxoborolidinina de L-arginina sin y con azul de metileno

a) Sin azul de metileno. En el efecto hipotensor, Figura 8A, se obtuvo una curva con pendiente positiva. Con un valor de dosis efectiva 50 (DE_{50}) muy bajo, 15.2×10^{-9} mg/k de peso corporal.

b) Con azul de metileno. En el efecto hipotensor, Figura 8B, la curva obtenida tiene forma parabólica, lo que indica un efecto no dependiente de la dosis.

IV. Determinación del efecto hipotensor de de L-arginina, NO_2^- y NO_3^- sin y con azul de metileno

a) Sin azul de metileno. El efecto hipotensor para L-arginina, $NaNO_2$ y $NaNO_3$ se manifestó por curvas con pendiente positiva similar a la obtenida con en compuesto sintetizado, las DE_{50} para cada compuesto fueron, Figuras 9 a 11:

1. Clorhidrato de L-arginina 40.44 mg/k, Figura 9
2. $NaNO_2$ 2.06×10^{-9} mg/k, Figura 10
3. $NaNO_3$ 9.32×10^{-9} mg/k, Figura 11

b) Con modulación. Las curvas obtenidas tienen pendiente positiva pero, con desplazamiento hacia la derecha, las DE_{50} para cada compuesto fueron:

1. Clorhidrato de L-arginina 77.44 mg/k, Figura 9
2. $NaNO_2$ 2.2×10^{-6} mg/k, Figura 10
3. $NaNO_3$ no tuvo cambios significativo, Figura 11

V. Determinación indirecta de $\bullet N=O$ por medio de mHb

Se obtuvieron curvas de saturación semejantes para los compuestos de prueba, Figuras 12 y 13, las que sugieren que la transformación de Hb a mHb, se lleva a cabo de acuerdo a la concentración de NO_2^- y L-arginina administrados y al tiempo. Con NO_2^- se obtuvo la mayor cantidad de mHb, equivalente a 183.1 mmoles, en un tiempo de 70 minutos, Figura 12. En la segunda gráfica, después de la administración de L-arginina, Figura 13, la mayor cantidad de mHb se obtuvo a los 70 y 50 minutos con valores equivalentes a 9.2 y 9.0 mmoles de mHb respectivamente.

Los resultados se resumen en las siguientes tablas:

Tabla II : Toxicidad DL₅₀

| | |
|--|-----------------------------|
| Oxoborolidinona de L-Arginina | 169.0 mg/k de peso corporal |
| L-arginina | 3.85 g/k de peso corporal |
| NaNO ₂ Sin azul de metileno | 79.58 mg/k de peso corporal |
| NaNO ₂ Con azul de metileno | 114.2 mg/k de peso corporal |
| NaNO ₃ | 2.29 g/k de peso corporal |

Tabla III : Efecto hipotensor DE₅₀

| | |
|--|---|
| oxoborolidinona de L-Arg. sin azul de metileno | 15.2x10 ⁻⁹ mg/k de peso corporal |
| oxoborolidinona de L-Arg. con azul de metileno | Saturación. No hay efecto dosis respuesta |
| L-arginina sin azul de metileno | 40.44 mg/k de peso corporal |
| L-arginina con azul de metileno | 77.47 mg/k de peso corporal |
| NaNO ₂ sin azul de metileno | 2.06x10 ⁻⁹ mg/k de peso corporal |
| NaNO ₂ con azul de metileno | 2.2x10 ⁻⁶ mg/k de peso corporal |
| NaNO ₃ con y sin azul de metileno | 9.32x10 ⁻⁹ mg/k de peso corporal |

Tabla IV : MHb obtenida en función de la dosis de NO₂⁻

| | |
|--|-------------------|
| 38.4 mmoles de NO ₂ ⁻ /k | 185 mmoles de mhb |
| 25.6 mmoles de NO ₂ ⁻ /k | 55 mmoles de mhb |
| 12.8 mmoles de NO ₂ ⁻ /k | 20 mmoles de mhb |
| 6.4 mmoles de NO ₂ ⁻ /k | 28 mmoles de mhb |

Tabla V : MHb obtenida en función de la dosis de L-Arginina

| | |
|--------------------------|--------------------|
| 562.5 mmoles de L-Arg/k. | 18.0 mmoles de mhb |
| 341.0 mmoles de L-Arg/k | 13.0 mmoles de mhb |
| 250.0 mmoles de L-Arg/k | 9.5 mmoles de mhb |
| 187.0 mmoles de L-Arg/k | 9.0 mmoles de mhb |

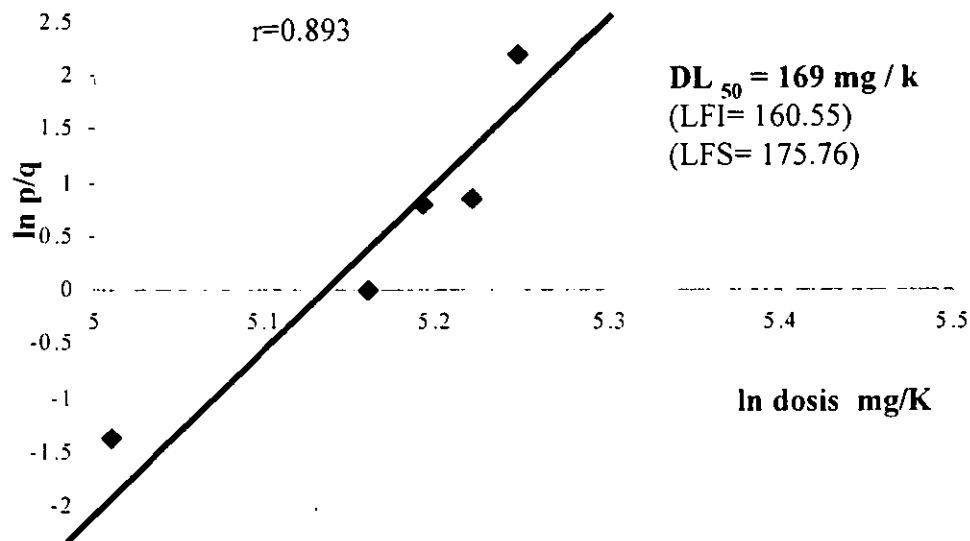


Figura 4.- Estimación de la DL_{50} de Oxoborolidinona de L-arginina en rata Wistar macho (230-270g), según el método de Hill modificado. La dosis letal media fue de 169.0 mg/k de peso corporal.

$P = \text{No. de animales muertos} / \text{No. de animales tratados}$, $q = 1 - p$

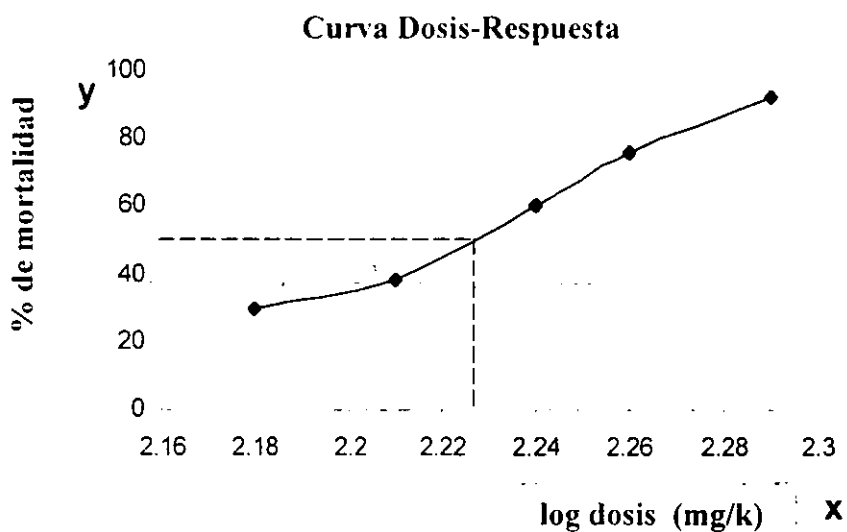


Figura4.- Estimación de la DL_{50} de Oxoborolidinona de L-arginina en rata Wistar macho

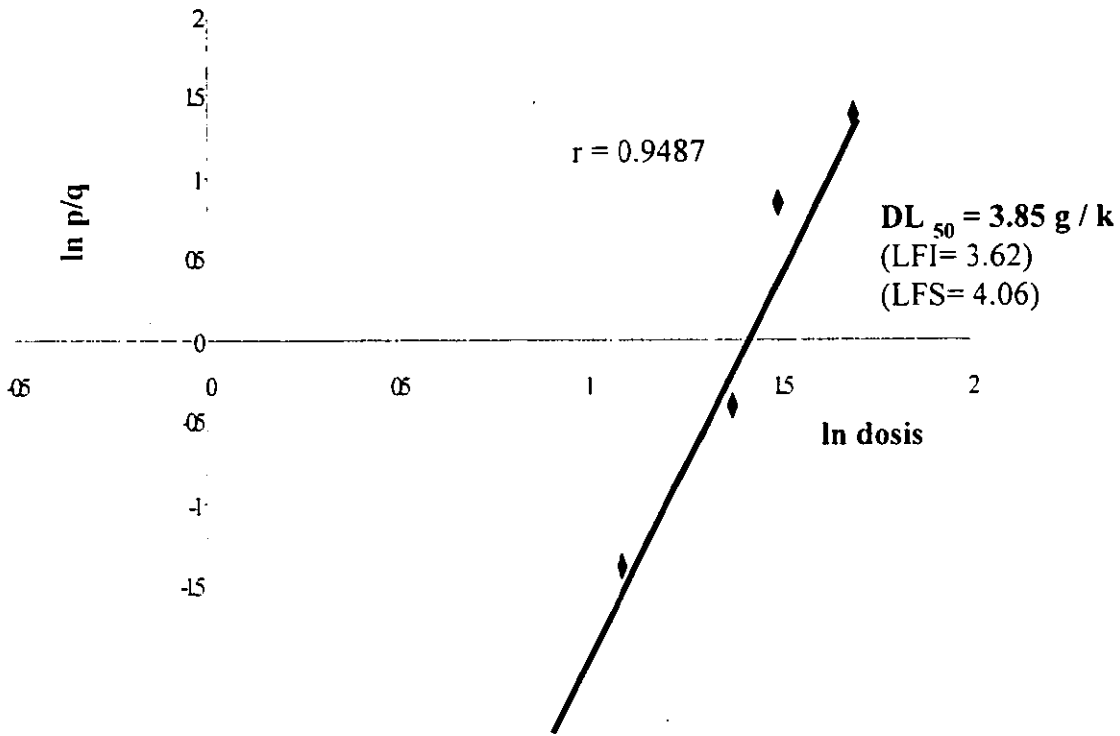


Figura 5.- Estimación de la DL_{50} del clorhidrato de L-arginina en rata Wistar macho (230-270g) según el método de Hill modificado. La dosis letal media se obtuvo con 3.85 g/k de peso corporal.
 $P = \text{No. De animales muertos} / \text{No. de animales tratados}, q = 1 - p$

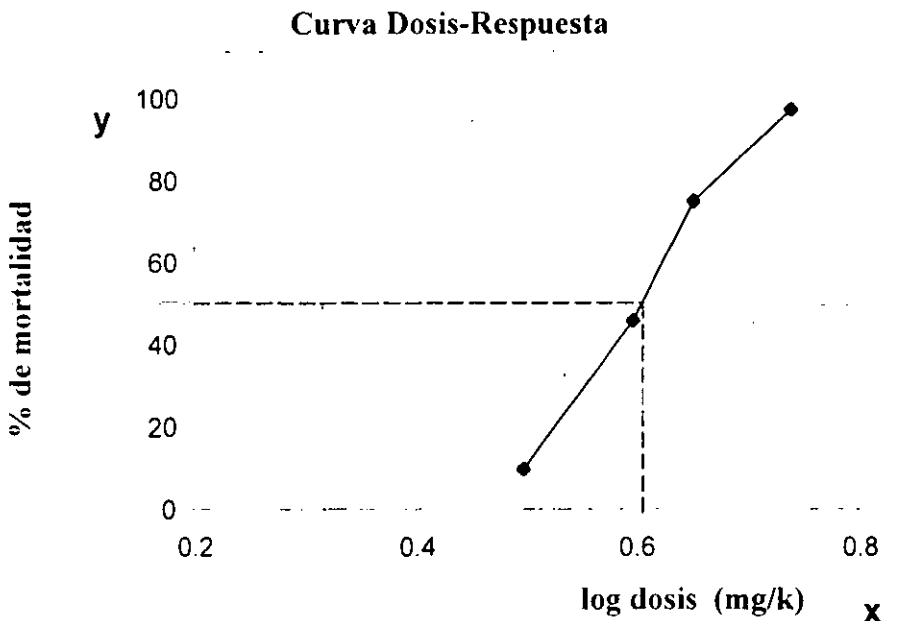


Figura 5.- Estimación de la DL_{50} del clorhidrato de L-arginina en rata Wistar macho. La dosis letal media se obtuvo con 3.85 g/k de peso corporal.

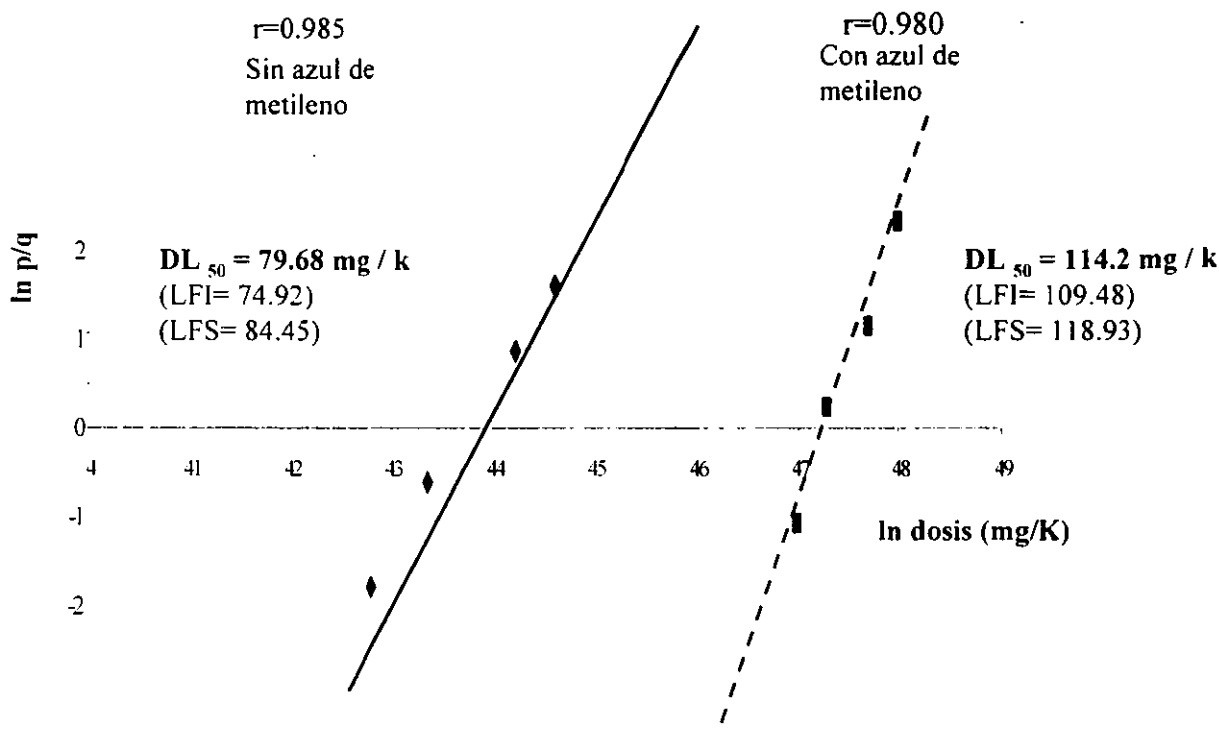


Figura 6.- Estimación de la DL_{50} de NaNO_2 en rata Wistar macho (230-270 g) en presencia y ausencia de azul de metileno, según el método de Hill modificado. Sin azul de metileno se obtuvo una DL_{50} de 79.68 mg/k de peso corporal y con azul de metileno, de 114.2 mg/k de peso corporal.

$P = \text{No de animales muertos} / \text{No de animales tratados}$, $q = 1 - p$

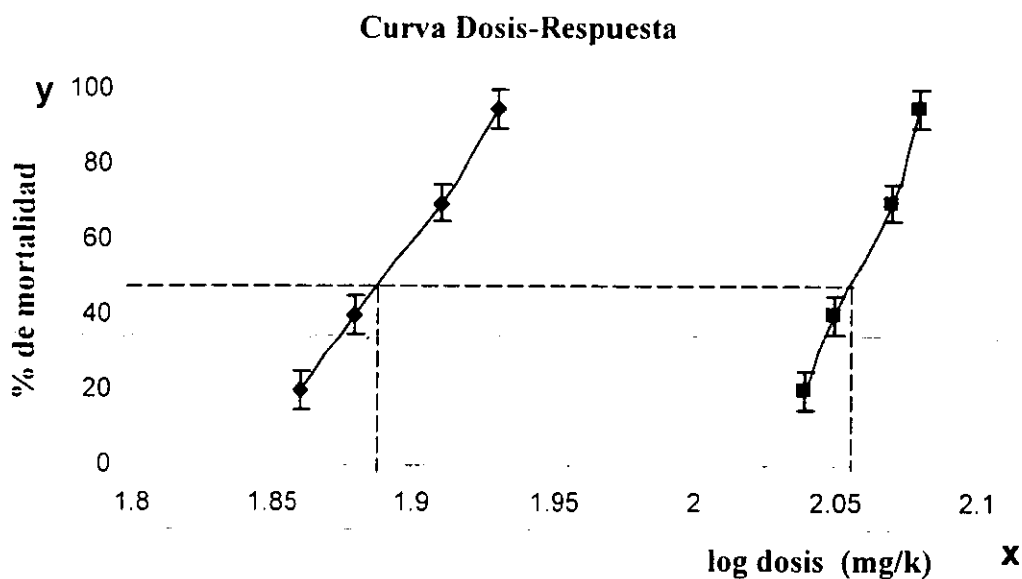


Figura 6.- Estimación de la DL_{50} de NaNO_2 en rata Wistar macho. En presencia y ausencia de azul de metileno.

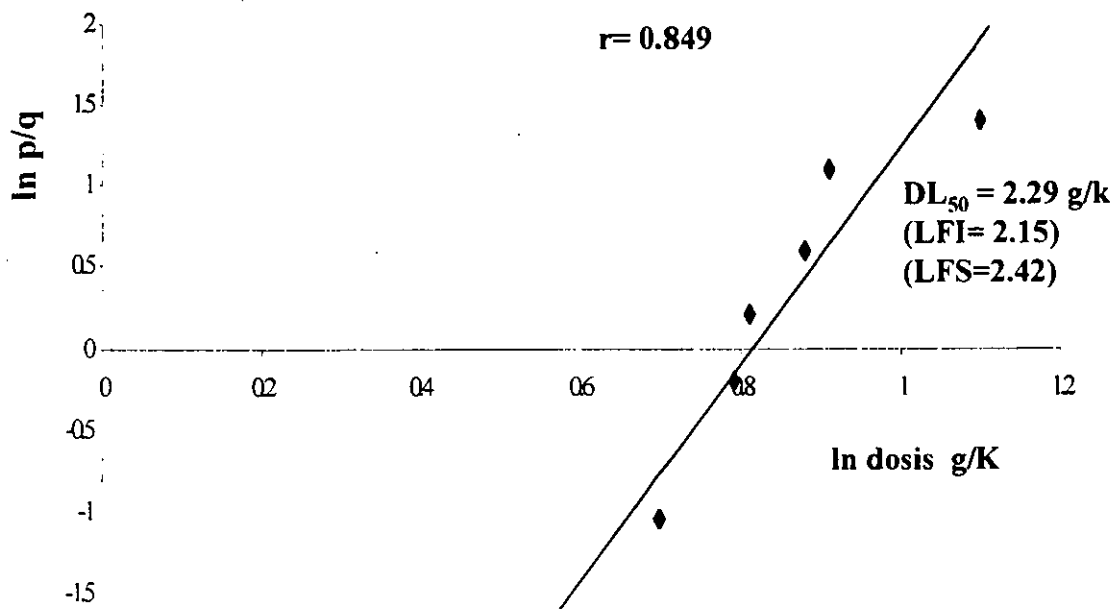


Figura 7.- Estimación de la DL_{50} de (NaNO_3) en rata Wistar macho (230-270g), según el método de Hill modificado. La dosis letal media fue de 2.29 g/k de peso corporal.

$P = \text{No de animales muertos} / \text{No de animales tratados}$, $q = 1 - p$

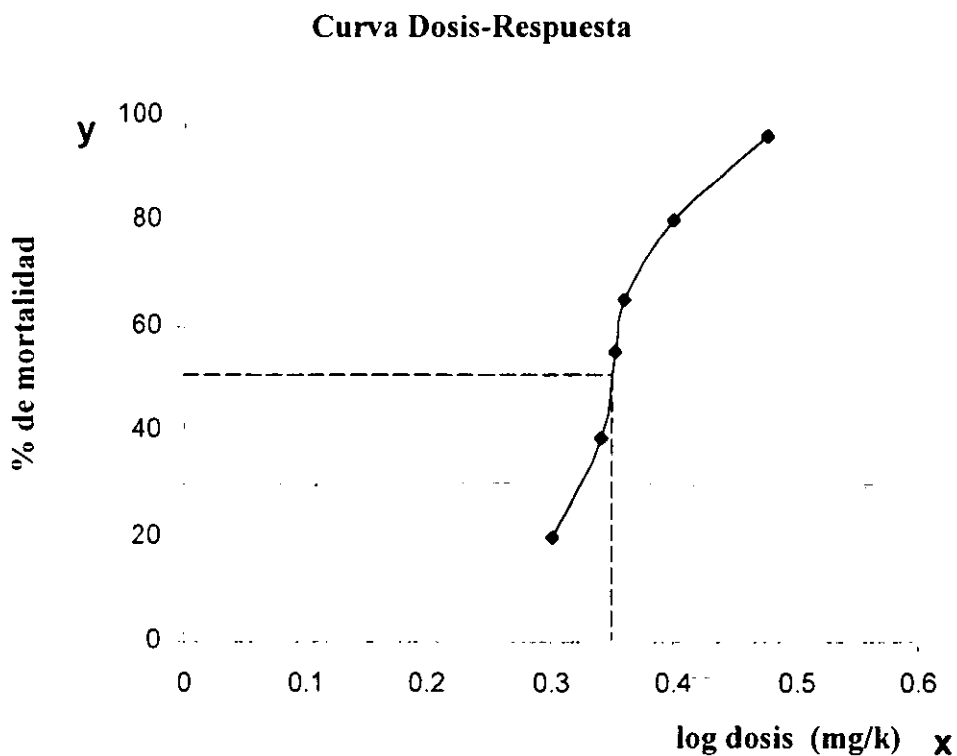


Figura 7.- Estimación de la DL_{50} de (NaNO_3) en rata Wistar macho sin azul de metileno

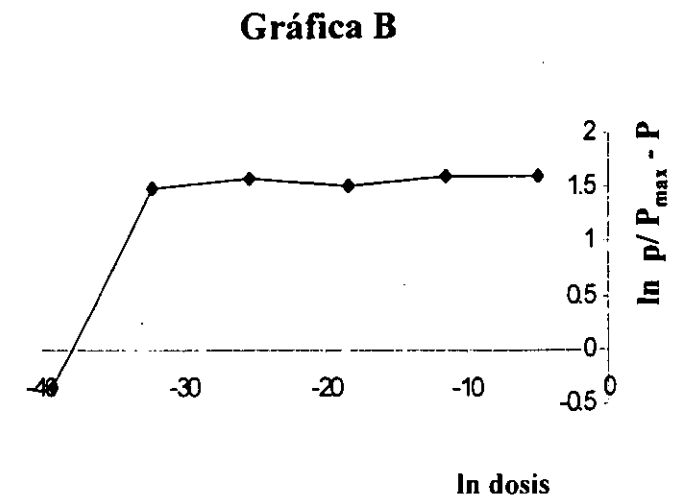
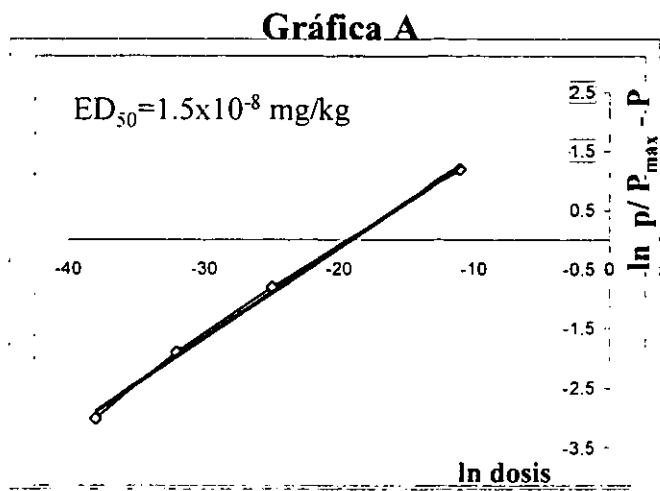


Figura 8.- Efecto hipotensor de oxoborolidinona de L-arginina en rata Wistar macho (230 – 270 g). según el método de Hill modificado. Gráfica A sin azul de metileno, gráfica B con azul de metileno, P_{max} es el efecto de la dosis máxima y P es el efecto a diferentes dosis.

Curvas Dosis- Respuesta

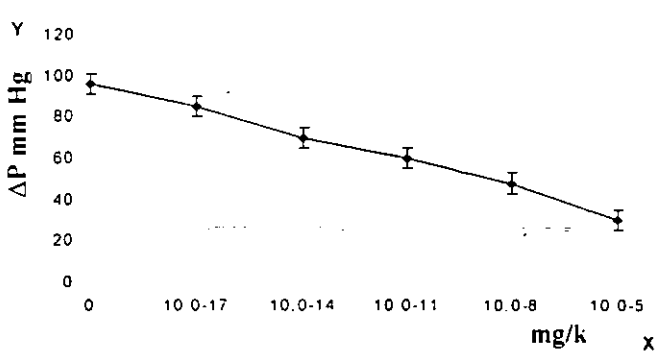


Figura 8A.- Efecto hipotensor de oxoborolidinona de L-arginina en rata Wistar macho sin azul de metileno.

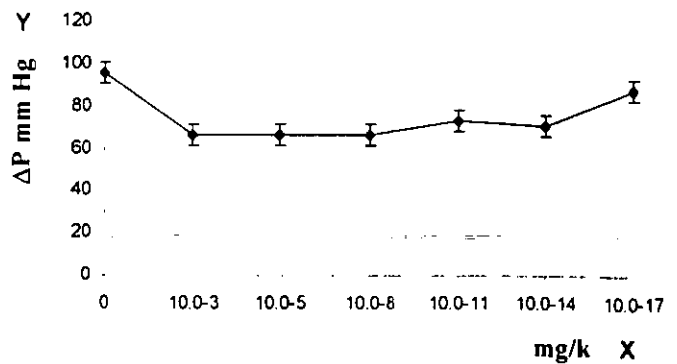


Figura 8B.- Efecto hipotensor de oxoborolidinona de L-arginina en rata Wistar macho con azul de metileno.

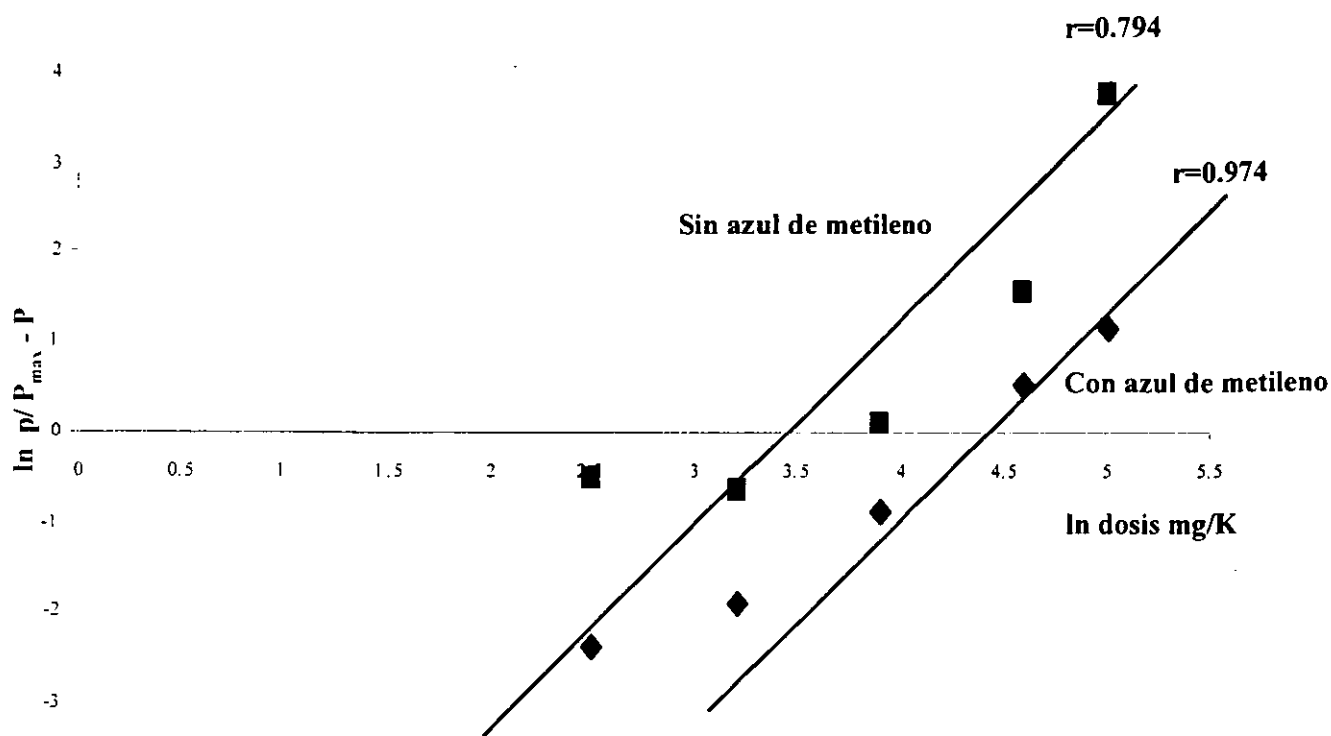


Figura 9.- Efecto hipotensor del clorhidrato de L-arginina en rata Wistar macho (230-270 g), según el método de Hill modificado. En ausencia de azul de metileno es de 40.44 mg/k de peso corporal y en presencia de azul de metileno se obtuvo de 77.47 mg/k de peso corporal. P_{\max} es el efecto de la dosis máxima y p es el efecto a diferentes dosis.

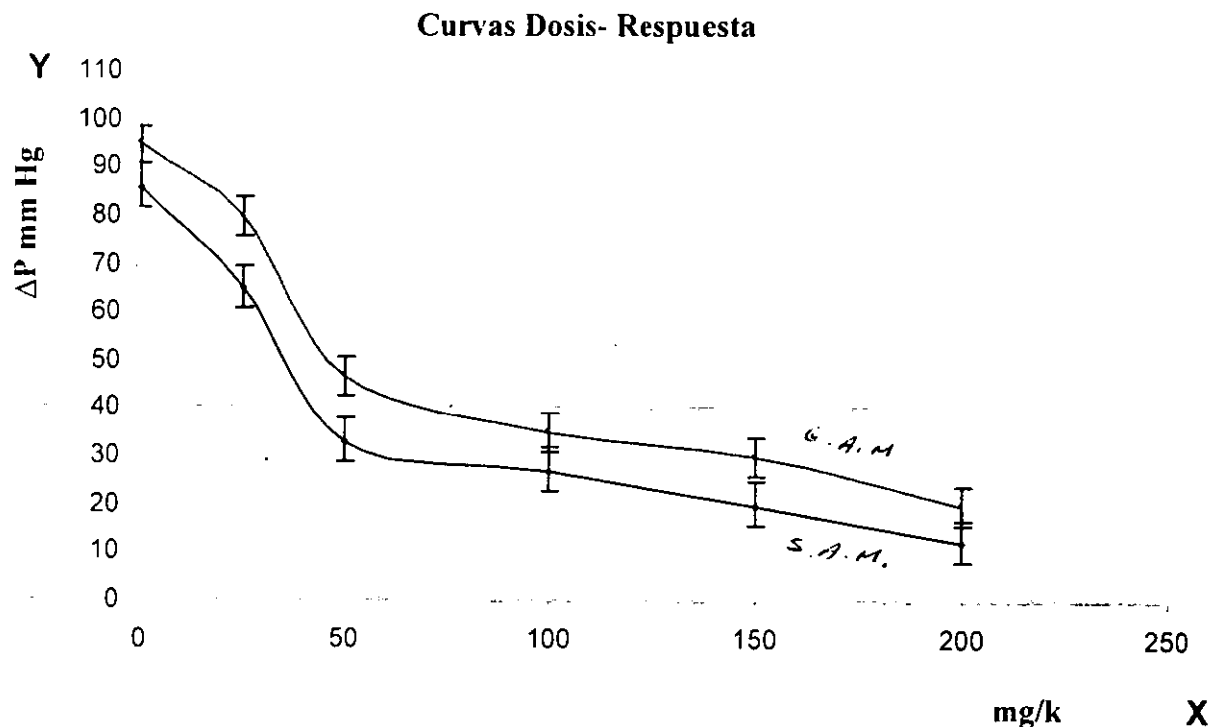


Figura 9.- Efecto hipotensor del clorhidrato de L-arginina en rata Wistar macho. Sin azul de metileno y con azul de metileno

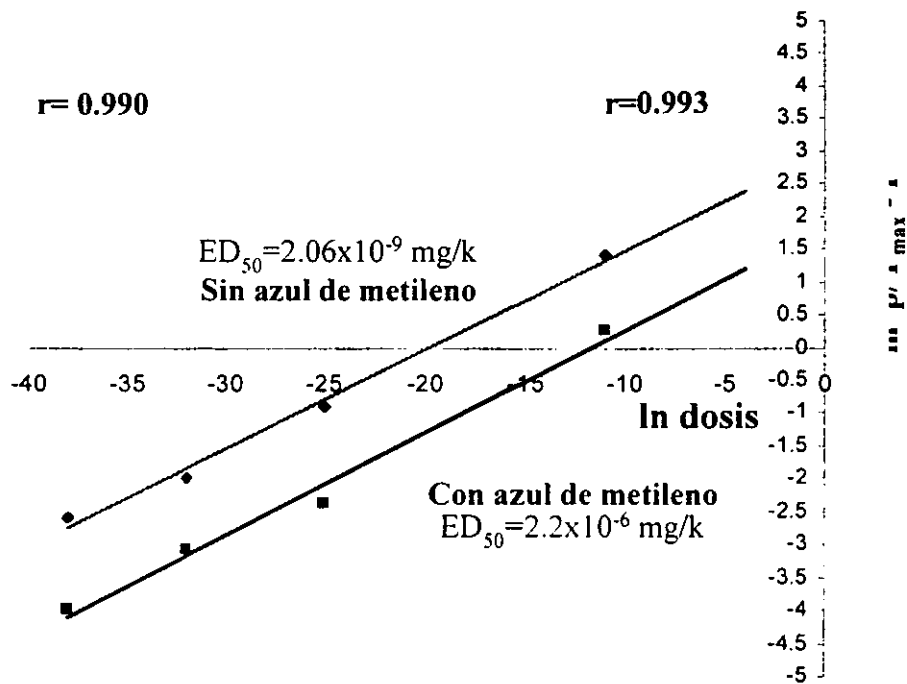


Figura 10.- Efecto hipotensor del NaNO_2 en rata Wistar macho (230-270g), según el método de Hill modificado. Sin azul de metileno, se obtuvo $2.06 \times 10^{-9} \text{ mg/k}$ recta de la izquierda y con azul de metileno se obtuvo $2.2 \times 10^{-6} \text{ mg/k}$ de peso corporal, recta de la derecha. P_{max} es el efecto de la dosis máxima y p es el efecto a diferentes dosis.

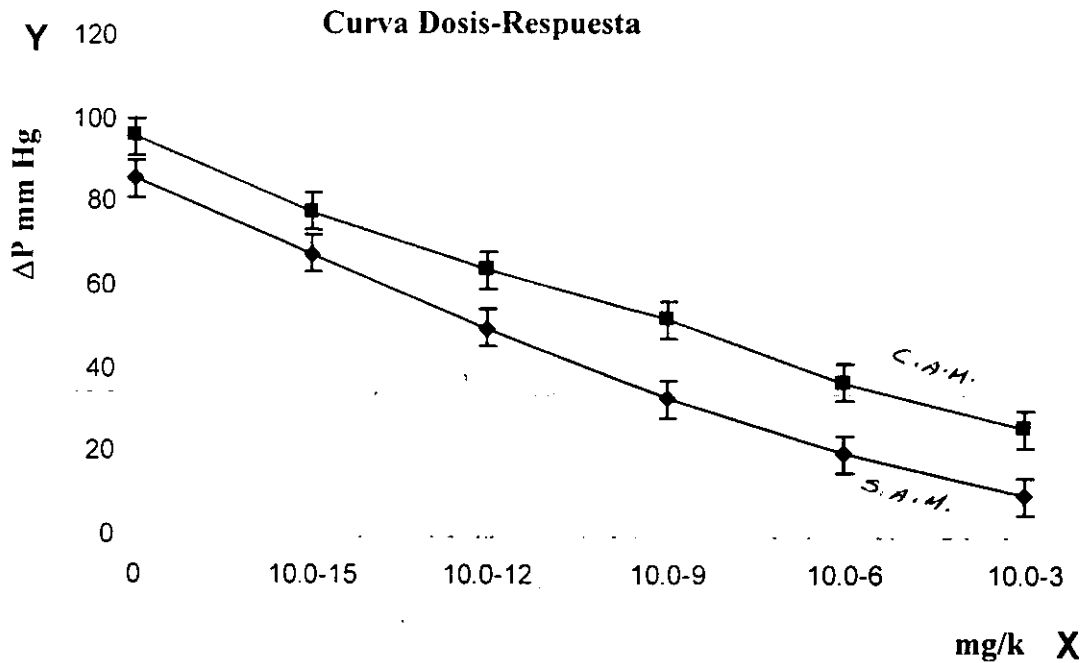


Figura 10.- Efecto hipotensor del NaNO_2 en rata Wistar macho. Sin azul de metileno y con azul de metileno

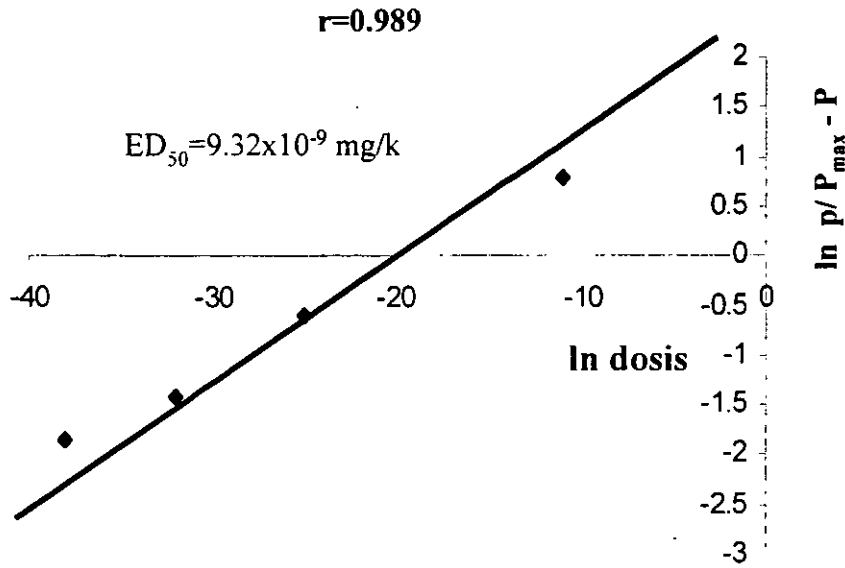


Figura 11.- Efecto hipotensor de NaNO_3 en rata Wistar macho (230-270g), según el método de Hill modificado. P_{\max} es el efecto de la dosis máxima y p es el efecto a diferentes dosis. $ED_{50} = 9.32 \times 10^{-9} \text{ mg/k}$ de peso corporal.

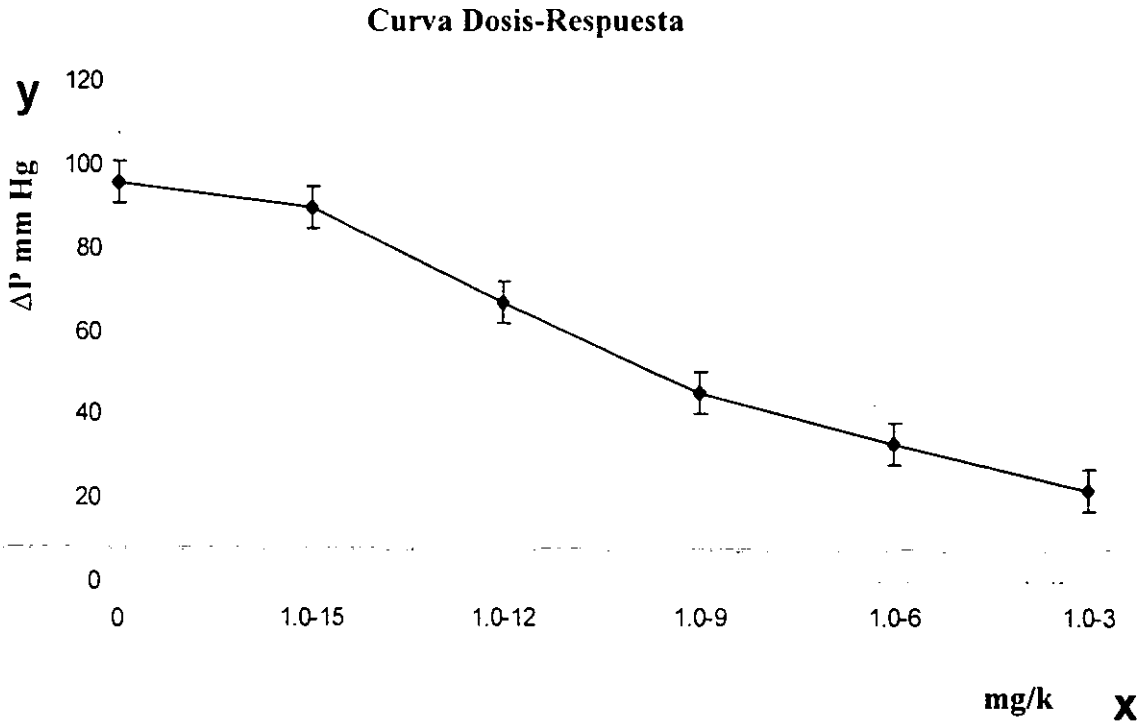


Figura 11.- Efecto hipotensor de NaNO_3 en rata Wistar macho.

| m moles Tiempo X(min) | NO ₂ 6.4 | 12.8 | 25.6 | 38.4 |
|-----------------------------|------------------------|------|------|-------|
| | ● | ▲ | ■ | X |
| 0 | 2.20 | 2.2 | 2.2 | 2.2 |
| 5 | 2.20 | 32.4 | 23 | 132.8 |
| 30 | 13.5 | 20.5 | 38.9 | 175.6 |
| 50 | 32.4 | 18.0 | 53.2 | 180.4 |
| 70 | 13.9 | 2.2 | 57.8 | 185.1 |
| 90 | 0 | 2.2 | 46.3 | 164.5 |

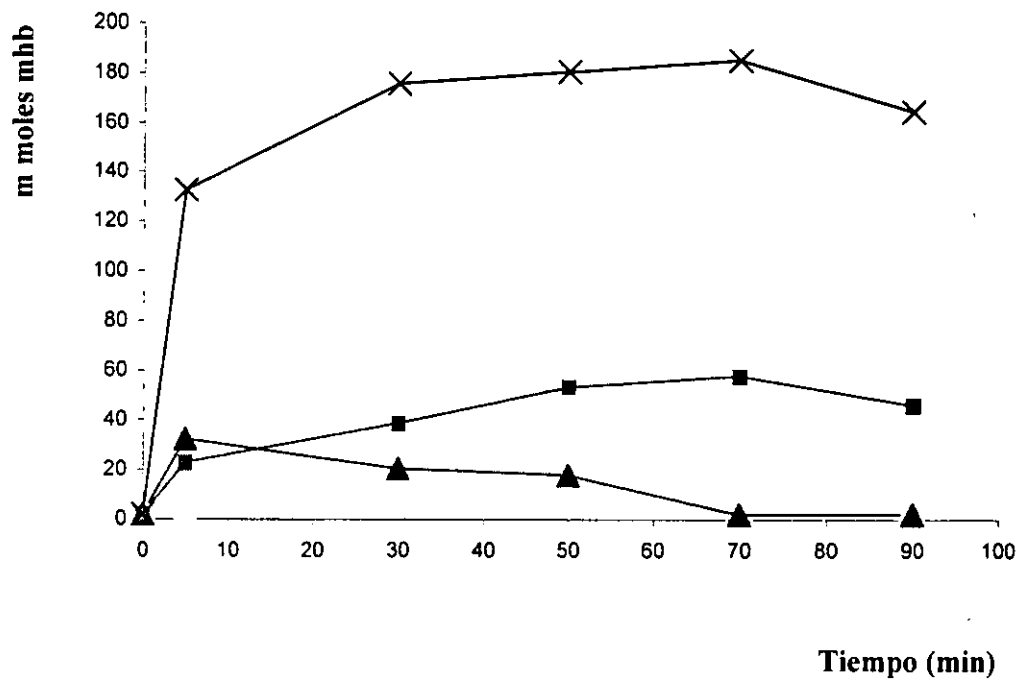


Figura 12

Determinación de metahemoglobina en rata Wistar hembra (150-200 mg), determinada en función del tiempo y de la dosis de nitritos.

Discusión:

Síntesis

La síntesis del derivado de L-arginina se corroboró mediante los métodos seleccionados que mostraron una estructura como la diseñada. Es decir, que la oxoborolidinona de L-arginina es un compuesto que cumple con las características propuestas;

- a) conservar libre el extremo guanidino,
- b) las modificaciones añadidas al extremo α -amino y α -carboxilo, para conformar un ciclo de 5 miembros con el ^{11}B , le confiere mayor lipofilicidad y,
- c) estabilidad a pH fisiológico.

Toxicidad aguda sin y con azul de metileno

Ahora bien, con respecto a la Toxicidad Aguda: los signos presentados por los animales mostraron la probabilidad de que la toxicidad aguda se lleve a cabo por la generación de óxidos de nitrógeno, porque las curvas muestran las mismas pendientes con los compuestos de comparación, lo cual sugiere que se comportan con el mismo mecanismo, lo que supone que el grupo guanidino del derivado de L-arginina, sintetizado es su precursor, y finalmente, todos los animales tratados con los compuestos de prueba presentaron los mismos síntomas y una clara cianosis. La DL_{50} para la oxoborolidinona de L-arginina fue de 169.0 mg/k de peso (160.55 a 175.76), valor muy cercano al obtenido con el NaNO_2 , pero 20 veces más potente que para la L-arginina. Sin embargo, es necesario aclarar que la diferencia de los resultados con NaNO_3 , sugiere un mecanismo distinto para la toxicidad, pues cabe destacar que, comparado con la administración de los demás compuestos de prueba, con el NaNO_3 los animales manifestaron irritabilidad, el cual muy probablemente se deba a una reacción más rápida hacia la formación de HNO_3 ; la DL_{50} encontrada es de 2.29 g/k de peso corporal (2.15 a 2.42) como se puede observar en la Figura 7 que muestra una curva con la misma pendiente, aunque denota menor toxicidad, por eso se pensó que probablemente la toxicidad se realice por un mecanismo diferente, y en menor grado.

Cuando los animales fueron tratados previamente con azul de metileno, la semejanza de las pendientes de las curvas y el desplazamiento a la derecha indican que el efecto probablemente se lleve a cabo por el mismo mecanismo, es decir, por activación de la guanilciclase⁶ ya que azul de metileno la inhibe con lo que impide la elevación del GMPc. Mientras que, para el caso del NaNO₃ con modulación por azul de metileno no fue detectable el cambio.

Efecto hipotensor con y sin azul de metileno

Efecto hipotensor de la oxoborolidinona de L-arginina. En la determinación del efecto hipotensor de este compuesto sin modulación se obtuvo una ED₅₀ de 15.2×10^{-9} mg/k de peso corporal; este es un efecto muy potente, comparado con el valor obtenido con NaNO₂ y \leftrightarrow NaNO₃ \leftrightarrow pues se sabe que moléculas que contienen grupos guanidino como la saxitoxina y la tetrodotoxina actúan bloqueando canales de sodio produciendo un efecto hipotensor potente, y mueren los animales por insuficiencia respiratoria³³. En cuanto a el efecto hipotensor con modulación por azul de metileno dio una curva parabólica que indica saturación de la enzima, sin embargo se sabe que la ONSe aumenta su actividad a concentraciones elevadas de L-arginina y no se ha observado saturación de la enzima, efecto que es denominado paradoja de L-argina^{34,35}, por tal motivo el mecanismo de acción del nuevo fármaco esta por dilucidarse. (Figura 8B).

Para el efecto hipotensor del clorhidrato de L-arginina se obtuvo una ED₅₀ de 40.44 mg/k de peso corporal sin modulación por azul de metileno; en cambio, con modulación por azul de metileno, se obtuvo una ED₅₀ de 77.4 mg/k de peso corporal. Este valor representa casi el doble de la ED₅₀ que se obtuvo sin modulación. Las dos curvas en esta determinación presentan la misma pendiente, lo que indica que el efecto hipotensor, se lleva a cabo por el mismo mecanismo o sea vía •N=O, NO₂⁻ y NO₃⁻. Se sugiere que el efecto hipotensor de L-arginina se debe a la formación de •N=O, a partir del grupo guanidino de este aminoácido que ejerce una acción directa sobre la vasorrelajación, el azul de metileno atenúa el efecto hipotensor, pues se sabe que inhibe a la guanil ciclase y en este experimento se demuestra que induce la hipertensión.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

El efecto hipotensor para el NaNO_2 dió una ED_{50} de 2.06×10^{-9} mg/k de peso corporal, tanto sin como con azul de metileno. Se obtuvo un desplazamiento de la curva a la derecha con una ED_{50} de 2.2×10^{-6} mg/k de peso, presentan exactamente la misma pendiente, lo que sugiere que este efecto se lleva a cabo por el mismo mecanismo pero, que con azul de metileno se abate.

El efecto hipotensor del NaNO_3 se manifestó con una ED_{50} de 9.32×10^{-9} mg/k de peso del animal y con modulación por azul de metileno no se obtuvo una protección significativa.

En este experimento, se comprobó que los NO_3^- reaccionan con igual intensidad que los NO_2^- pero ya no pueden oxidar a la Hb; en cambio los NO_2^- se oxidan a NO_3^- y su capacidad reaccionante es mayor. La pendiente obtenida se puede observar en la Figura 11.

Metahemoglobina

En la formación de mHb se obtuvo una respuesta mayor en función de la concentración de NO_2^- aplicados. Se observó que a mayor dosis de NO_2^- se obtuvo mayor formación de mHb del siguiente modo: con 38.4 mmoles de NO_2^- aplicados, se obtuvieron 185 mmoles de mHb; del mismo modo, como se puede apreciar en la misma Figura 12, 6.4 mmoles de NO_2^- forman 28 mmoles de mHb, 25.6 mmoles de NO_2^- producen casi 55 mmoles de mHb; es decir, que con mayor cantidad de NO_2^- se obtiene mayor cantidad de mHb. Esta relación se pierde, utilizando concentraciones más bajas de NO_2^- . Se obtuvo una concentración de 9 mmoles de mHb, que corresponde a la concentración más alta, Figuras 12 y 13. En esta forma, se cuantificó de manera indirecta el $\bullet\text{N}=\text{O}$.

El $\bullet\text{N}=\text{O}$ y NO_2^- oxidan a la hemoglobina en mHb y debido a que el $\bullet\text{N}=\text{O}$ tiene un tiempo de vida media ($t_{1/2}$) muy corto (6-10 s) se transforma rápidamente en NO_2^- y NO_3^- . El NO_2^- lleva a cabo la transformación de Hb a mHb. No existe una relación estequiométrica bien establecida de mHb y NO_2^- , pero se ha propuesto una relación de combinación 1:1. En nuestro resultado no se obtuvo exactamente esta relación, pero se demostró la formación de mHb, en todas las determinaciones que se llevaron a cabo.

Conclusiones

Por los resultados de RMN, se concluye que la oxoborolidinona es una molécula con un anillo de 5 miembros, que posee un átomo de B como heteroátomo además de O, N el boro es tetracoordinado y absorbe a 5 ppm., generalmente el boro tetracoordinado absorbe de 1-6 ppm., con esto se concluye que se trata de una oxoborolidinona.

La toxicidad que presenta éste compuesto es mayor que la de L-arginina y NO_3^- , pero es semejante a la de NO_2^- , las pendientes de las curvas indican que la toxicidad se lleva a cabo por el mismo mecanismo, este efecto se atenúa con azul de metileno para NO_2^- . Con azul de metileno se abate el efecto en los compuestos de comparación y para la oxoborolidinona de L-arginina, se obtiene una curva de saturación que actúa como un sustrato de la ONS.

En conclusión el azul de metileno, protege del efecto tóxico ya que la oxoborolidinona de L-arginina se encontró extremadamente potente, en el efecto hipotensor también se observa desplazamiento de la curva a la derecha en todos los casos. A excepción del NO_3^- todos los compuestos de prueba revirtieron su acción con azul de metileno.

Con respecto a la metahemoglobina, se encontró un incremento al aumentar el tiempo y las dosis tanto de NO_2^- como de L-arginina. Sin embargo es necesario aclarar los mecanismos de acción que se llevan a cabo con el derivado de L-arginina y de otros aminoácidos.

BIBLIOGRAFIA.

1. Furchgott, R. F., y Zawadski, J.V., "The obligatory role of endothelial cell in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine". *Nature*, 288: 373-376 (1980).
2. Amezcua, J. L., de Souza B.M., Palmer R.M.J., y Moncada S., "Inhibition of nitric oxide synthesis inhibits endothelium-dependent vasodilatation in the rabbit heart". *Br. J. Pharmacol.*, 96: 105 (1989).
3. Amezcua, J. L., Disting, G. J., Palmer y Moncada S., "Acetylcholine induces vasodilatation in the rabbit isolated heart through the release of nitric oxide. The endogenous nitrovasodilator. *Br. J. Pharmacol.*, 95: 830-834 (1988).
4. Furchgott, R. F., "The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle drug". *Ann. Rev. Pharmacol, Toxicol.*, 24:175-197 (1984).
5. Moncada, S., Palmer, R.M. J., y Higgs, E.A., "The discovery of nitric oxide as the endogenous nitrovasodilator". *Hypertension*, 12: 365-372 (1988).
6. Moncada, S., Palmer, R.M.J. y Higgs, E.A., "Biosynthesis of nitric oxide from L-arginine". *Biochem, Pharmacol.*, 38:1709-1715 (1989).
7. Palmer, R.M.J., Ress, D.D., Ashton, D.S. y Moncada, S. "L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation". *Biochem and Biophys. Res. Commun.*, 153: 1251-1256 (1989).
8. Raman, C. S., Huiying, Li., Pavel, Vladimir, K., Bettie S.y Poulos, L.T., "Crystal structure of constitutive endothelial nitric oxide synthase: A paradigm for pterin function involving a novel metal center". *Cell*, 95:939-950(1998)
9. Huiying, Li., Raman, C. S., Glase, B.C., Blasko, E., Young A.T., Parkinson F.S., Whitlow, M. y Poulos, L.T., "Crystal Structure of Zinc-free and - bound heme domain of human inducible nitric-oxide synthase". *J. Biol. Chem.* 274:21,276-21.284 (1999)
10. Ignarro, L.J., Adams, J.B. Horwitz, P.M. y Woodk, S. "Activation of soluble guanylate cyclase by NO-hemoproteins involves NO-heme exchange . *J. Biol. Chem.* 261: 4997-5002 (1986).

11. Doyle, MP, Hoekstra, J.W., "Oxidation of nitrogen oxides by bound dioxygen in hemoproteins". *J. Inorg. Biochem* 14: 351-358 (1981).
12. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K. S., Byrns, R.E. y Chaudhuri, G. "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 9 265-9 269 (1987).
13. Murray, K.R. y Granner K.D., "Bioquímica de Harper". 11a Ed. MM. p-276 (1988).
14. Gryglewski, R.J., Zembowics, A., Salvemini. D. Taylor, G.W.. y Vane, J. R. "Modulation of nitrovasodilators by methylene blue and pyocyanin". *Br.J.Pharmacol.*, 106: 838-845 (1992).
15. Morin, C., "The chemistry of boron analogues of biomolecules". *Tetrahedron* 50, 44: 12521-12569 (1984).
16. Snyder, S.H., "Nitric oxide as a neuronal messenger". *Trends Pharmacol. Sci.*, 12: 125-127 (1991).
17. Green, L.C., Wagner, A., Glogowski, I., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. y Tannenbaum, S.T., "Analysis of nitrate, and nitrite (¹⁵N) nitrate in biological fluids". *Anal. Biochem.* 126: 131-138 (1982).
18. Green, L.C., Tannenbaum, S.R. y Godman, P.. "Nitrate synthesis in the germ free and conventional rat". *Science*, 212: 56-58 (1981).
19. Struchr. D.J., y Marletta, M.A., "Mammalian nitrate biosynthesis, mouse macrophages produce nitrite and nitrate in response to Escherichia coli lipopolysaccharide". *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 82: 7738-7742 (1985).
20. Geng. Y-J., Hasson, G.K., y Holme. E., "Interferon gamma and tumor necrosis factor synergize to induce nitric oxide production and inhibit mitochondrial respiration in vascular smooth muscle cells". *Circ. Res.* 71: 1268-1276 (1992).
21. Marletta, M.A., Yoon. P.S., Iyengar, R., Leaf, C.D y J.S., Wishnok., "Macrophages oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate. nitric oxide is an intermediate". *Biochemistry*, 27: 8706-8711 (1988).
22. Collier. J. y Vallance, P., "Second messenger role for •N=O widen to nervous and immune system. *Trends Pharmacol. Sci.*, 10, 11: 428-431 (1989).

23. Hibbs, J.B., Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z., y Rachlin, E.M., "A citotoxic activated macrophage effector molecule". *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157: 87-94 (1988).
24. Kelmm y Schrader, J., "Nitric oxide and coronary vascular tone". *Cir.Res.*, 66, 6: 1564-1574 (1990).
25. Oktay, S., Onat, F., Karahen, F., Alican, I., Ozkut, U. y Yegen B., "Effect of methylene blue on blood pressure in rats". *Pharmacol.* 46: 206-210 (1993).
26. Trujillo, F.J.G, Bravo, A.M., Castro, M.L.V. y Yáñez, A.R., "Evaluación farmacológica de la L-arginina y óxidos de nitrógeno". Congreso Nacional de Farmacología. Sn. Miguel Allende, Gto. México. (Dic. 1992).
27. Bravo, A.M., Yáñez, A.R. y Trujillo, F.J., "Óxido nítrico, un importante regulador biológico". *Acta Médica; XXIX*, 113-114, 15-24 (1993).
28. Candance, J., Strong, E.H., Oshiaki, O. et. al, "Separation and determination of alphaaminoacids by oxoborolidinone formation". *Anal. Biochem.* 178:276-286. (1989)
29. Trujillo, F.J.G.,H., Castillo, D., Santillán, R. y Farfán, N., "X-ray crystallographic study of boroxazolidones obtained from L-ornithine, L-methionine, kainic acid and 2,6-pyridinedicarboxylic acid". *J. Organomet. Chem.* 571:21-29(1998).
30. Trujillo, F.J.G., Koizumi, G., Muñoz O. y Yáñez, A.R., "Antitumor effect and toxicity of two new active-site-directed irreversible ornithindecaboxylase and extrahepatic arginase inhibitors. *Can. Lett.* (1992).
31. Bravo A.M.E., Araujo A.J.M., Bustamante Q.A., Trujillo F.J.G., "Toxicidad y efecto hipotensor de oxoborolidinona de L-arginina y su modulación por azul de metileno, comparación con L-arginina, nitrito y nitrato". *Arch. del Instituto Nal. De Cardiología.* En Prensa.
32. Evelyn, K.A.; and Mallory. A.T., "Microdetermination of oxyhemoglobin, methehemoglobin and alfhemoglobin single sample of blood". *J. Biol. Chem.* 126 655-662. (1938)
33. Stryer L.: *Biochemistry.* Third Edition. New York. W. H. Freeman Company, 1013-1014 (1988).

34. Forstermann, U., Closs E.I., Pollock J.S., Nakane M., Schwarz P., Gath I. and Kleinert H. "Nitric oxide synthase isozymes-characterización, purification, molecular cloning and funtion". *Hypertensión* 23:1121-1131 (1994).
35. Closs, I.E., Stefan J.S., Sharafi M., and Förstermann U. "Sustrate supply for nitric-oxide synthase in macrophages and endothelial cells: role of cationic amino acid transporters". *Mol. Pharmacol.* 57:68 (2000).