



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO GENOTÓXICO *IN VITRO* DE LARIMSH™**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**SANDRA GABRIELA HERNÁNDEZ GUZMÁN**



**MÉXICO, D.F.**

**2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Perla Carolina Castañeda López**

**VOCAL:**                   **Profesor: Martha Patricia Coello Coutiño**

**SECRETARIO:**           **Profesor: Lourdes Monserrat Sordo Cedeño**

**1er. SUPLENTE:**       **Profesor: Tzvetanka Dimitrova Dinkova**

**2º SUPLENTE:**           **Profesor: Sara Rosario Cruz Morales**

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS,  
LABORATORIO DE MEDICINA GENÓMICA Y TOXICOLOGÍA AMBIENTAL.**

**ASESOR DEL TEMA:**

**Lourdes Monserrat Sordo Cedeño**

\_\_\_\_\_

**SUSTENTANTE:**

**Sandra Gabriela Hernández Guzmán**

\_\_\_\_\_

## Índice

1.- Resumen.....	1
2.- Introducción.....	3
2.1.- Cáncer y carcinogénesis.....	3
2.2.- Tratamiento contra el cáncer.....	4
2.3.- Larimsh.....	5
2.4.- Genotoxicidad.....	7
2.5.- Marcadores biológicos.....	7
2.6.- Ensayo de micronúcleos.....	8
2.6.1.- Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.....	8
2.6.2.- Criterios para evaluar células en el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.....	11
2.6.3.- Criterios para contabilizar micronúcleos.....	11
2.7.- Citotoxicidad.....	12
2.8.- Línea celular HepG2.....	12
3.- Justificación.....	14
4.-Hipótesis.....	15
5.- Objetivo general.....	15
5.1.- Objetivos particulares.....	15
6.- Materiales y métodos.....	16
6.1.- Donadores.....	16
6.2.- Extracción de linfocitos de sangre periférica.....	16
6.3.- Cultivo de linfocitos.....	17
6.4.- Tratamiento.....	17
6.5.- Citotoxicidad.....	17

6.6.- Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN).....	18
6.7.- Línea celular HepG2.....	18
6.8.- Análisis estadístico.....	21
7.- Resultados.....	22
7.1.- Efectos citostáticos, citotóxicos y genotóxicos de Larimsh™ en linfocitos humanos.....	22
7.2.- Efectos citostáticos y genotóxicos de Larimsh™ de los posibles metabolitos de Larimsh™ utilizando la línea celular HepG2 como modelo de activación metabólica.....	27
8.- Discusión.....	29
9.- Conclusiones.....	32
10.- Referencias.....	33

## Índice de figuras

FIGURA 1A.	Origen de los micronúcleos por la pérdida de cromosomas completos y fragmentos de cromosomas acéntricos durante la anafase	9
FIGURA 1B.	Formación de un puente nucleoplásmico derivado de un cromosoma dicéntrico.	9
FIGURA 2.	Determinación del citoma. Efectos cromosómicos en células expuestas a xenobióticos, detectados mediante el ensayo de micronúcleos con bloqueo la citocinesis.	10
FIGURA 3.	Diagrama de flujo del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, índice nuclear y del ensayo de viabilidad en linfocitos humanos.	19
FIGURA 4.	Diagrama de flujo del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis e índice nuclear en la línea celular HepG2.	20
FIGURA 5A.	Efecto citotóxico de LR a las concentraciones de 0.5, 1.5 y 3.0 mM.	24
FIGURA 5B.	Efecto citostático LR a las concentraciones de 0.5, 1.5 y 3.0 mM.	24
FIGURA 6A.	Evaluación de la citotoxicidad de LR a las concentraciones de 50, 300 y 500 $\mu$ M.	25
FIGURA 6B.	Evaluación de los efectos de LR en la proliferación celular a las concentraciones de 50, 300 y 500 $\mu$ M.	25
FIGURA 6C.	Evaluación de la genotoxicidad de LR a las concentraciones de 50, 300 y 500 $\mu$ M.	25
FIGURA 7A.	Efectos citotóxicos de LR en linfocitos de tres donadores por triplicado, a las concentraciones de 2.5, 10 y 50 $\mu$ M.	26
FIGURA 7B.	Efectos citostáticos de LR en linfocitos de tres donadores por triplicado, a las concentraciones de 2.5, 10 y 50 $\mu$ M.	26
FIGURA 7C.	Efectos genotóxicos de LR en linfocitos de tres donadores por triplicado, a las concentraciones de 2.5, 10 y 50 $\mu$ M.	26
FIGURA 8A.	Efectos citostáticos de los posibles metabolitos de LR.	28
FIGURA 8B.	Efectos genotóxicos de los posibles metabolitos de LR.	28

## Índice de tablas

Tabla1.	Clasificación de carcinogénos químicos	3
Tabla 2.	Análisis por cromatografía de gases de Larimsh	5
Tabla 3.	Donadores.	16

## Abreviaturas

IARC: Agencia Internacional sobre la Investigación de Cáncer.

LR: Larimsh

HepG2: Línea celular de carcinoma hepatocelular ATTCC

FDA/BrEt: Diacetato de fluoresceína / 2,7-diamino-10-etil-9-fenil-bromuro de fenantridinio

MN: Micronúcleo (s)

ADN: Ácido desoxirribonucleico

Puntos AP: puntos apurínicos

AC: Aberraciones cromosómicas

ICH: Intercambio de cromátides hermanas

CBMN: Ensayo de micronúcleos por bloqueo de la citocinesis

BN: Células binucleadas

Cyt-B: Citocalacina-B

Mo: Células mononucleadas

Po: Células polinucleadas

IN: Índice de división nuclear

GN: Gemación nucleoplásmica

PN: Puente nucleoplásmico

PHA: fitohemaglutinina

EtBr: Bromuro de etidio

FDA: Diacetato de fluoresceína

UV: Ultravioleta

rpm: revoluciones por minuto

MMC: Mitomicina C

EMEM: Eagle's minimum essential medium

DMSO: dimetilsulfóxido

## 1 Resumen

En la actualidad la incidencia de cáncer en el mundo es alta. De acuerdo a la Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer (IARC, por sus siglas en inglés) y a su proyecto Globocan 2008<sup>1</sup>, en México para los hombres, el cáncer de próstata es el de mayor incidencia, mientras que el cáncer de pulmón es el que ha cobrado mayor número de vidas. Entre las mujeres mexicanas la mayor incidencia y mortalidad la tiene el cáncer de mama.

Esta situación ha propiciado mayor atención a este problema y ha intensificado la investigación en cáncer, así como el desarrollo de nuevas terapias que mejoren el estado de los pacientes que lo padecen.

En México, se ha desarrollado un posible tratamiento llamado Larimsh™ (LR), que consiste en una mezcla de compuestos de bajo peso molecular obtenidos a partir de la fracción ligera del petróleo tratada mediante catálisis metálica. Éste tratamiento cuenta con un estudio que evalúa su eficacia al ser usado en ratones a los que les fueron inoculadas células de leucemia linfóide y a enfermos terminales con cáncer de próstata<sup>2</sup>. Sin embargo, no han sido evaluados diversos parámetros, entre ellos, los efectos genotóxicos del mismo. Es importante evaluar la genotoxicidad de cualquier tratamiento antes de ser utilizado como terapia, debido a que con ello es posible determinar si el tratamiento es capaz de causar daños a nivel genético y por ende si éste podría agravar o causar enfermedades al paciente.

La IARC clasifica al petróleo y algunos de sus derivados como carcinógenos para los humanos. LR™ se encuentra compuesto por la fracción ligera del petróleo, la cual contiene compuestos aromáticos, nitrogenados, con azufre, alcanos, alquenos isoprenoides y cicloparafinas. La mayoría de ellos son compuestos clasificados por la IARC como probables o posibles carcinógenos para el humano.

El objetivo de este trabajo fué evaluar el efecto citotóxico, citostático y genotóxico *in vitro* de LR en linfocitos humanos, así como el de sus posibles metabolitos a través de la línea celular HepG2.

La citotoxicidad fue evaluada mediante la técnica de doble tinción con diacetato de fluoresceína/bromuro de etidio (FDA/BrEt) en cultivos de linfocitos humanos. El efecto citostático y genotóxico fue determinado a través de la técnica de micronúcleos (MN) con bloqueo de la citocinesis en linfocitos humanos y en la línea celular HepG2.

Los resultados mostraron que a las concentraciones estudiadas LR, no produce efectos genotóxicos en linfocitos humanos *in vitro*. Sin embargo, sí se observó una disminución significativa en la proliferación a partir de la concentración de 10µM. Asimismo, se observó citotoxicidad desde la concentración 300 µM. La posible activación metabólica de LR por la línea celular HepG2, a las concentraciones estudiadas, solo ocasionó cambios significativos en la citostaticidad a la concentración más alta que se pudo evaluar (1.5

mM). No se observaron cambios significativos en la genotoxicidad de dichas células *in vitro*.

## 2 Introducción

### 2.1 Cáncer y carcinogénesis

El cáncer es una enfermedad resultado de una serie de mutaciones, que en algunos casos tiene un componente de predisposición genética. La palabra cáncer hace referencia a un subgrupo de lesiones neoplásicas. Una neoplasia se define como una proliferación anormal heredada y relativamente autónoma de un tejido en el que la regulación de la expresión de los genes está alterada. Ésta alteración de la expresión de los genes esta mediada por mutaciones en los mismos.<sup>42</sup>

El desarrollo de cáncer está dirigido por la acumulación de una serie de alteraciones que afectan la expresión de los genes del ADN en el genoma humano. Dichas alteraciones pueden ser resultado de mutaciones causadas por factores de riesgo tanto ambientales como endógenos o cambios epigenéticos. Estos cambios no afectan únicamente la función de las proteínas codificadas en los genes alterados, también alteran la manera en que la célula crece, se replica, sobrevive, así como la forma en que responde al estrés. Para identificar las causas y las consecuencias de estos cambios es necesario comprender los mecanismos detrás del desarrollo del cáncer, pudiendo así predecir los factores de riesgo, diseñar terapias eficientes y estrategias de prevención.

La carcinogénesis es el proceso a través del cual una célula sana tras la acumulación de una serie de mutaciones en su ADN (ácido desoxirribonucleico) se transforma en una célula transformada, capaz de formar una neoplasia.<sup>42</sup> La carcinogénesis puede ser causada por sustancias químicas. La clasificación de los carcinógenos químicos se muestra en la tabla 1:

Tipo de carcinógeno químico	Ejemplos
<b>Carcinógenos orgánicos</b>	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), las dialquilnitrosaminas, los nitritos (que se metabolizan a nitrosaminas o nitrosamidas carcinógenas) y la aflatoxina B1.
<b>Carcinógenos inorgánicos</b>	Numerosos elementos inorgánicos y sus combinados, incluidos los de cadmio, cromo, níquel, plomo, berilio y arsénico, son carcinógenos.
<b>Carcinogénesis hormonal</b>	Algunos cánceres son secundarios a la producción endógena anormal de determinadas hormonas. Otra posibilidad es que una producción excesiva o un deterioro de los mecanismos homeostáticos del organismo originen una

	transformación neoplásica.
<b>Carcinogénesis química por la alimentación</b>	Una dieta hipercalórica, el consumo excesivo de alcohol o diversos contaminantes químicos presentes en los alimentos, como la aflatoxina B1, son carcinógenos para los seres humanos.
<b>Carcinogénesis por mezclas de sustancias químicas definidas o indefinidas</b>	Hay pocos estudios sobre las mezclas de carcinógenos químicos. Las combinaciones ambientales más comunes se encuentran en el humo del tabaco y en otros productos de combustión, como las emisiones de los automóviles por el tubo de escape y la contaminación atmosférica. La interacción entre las sustancias contenidas en la mezcla puede ser <i>aditiva, sinérgica o inhibitoria</i> .

Tabla1. Clasificación de carcinógenos químicos.

La iniciación de un cáncer por parte de las sustancias químicas es la interacción covalente de algunas de las sustancias con las macromoléculas. Algunos de los compuestos originales necesitan biotransformarse en un metabolito capaz de establecer directamente una unión covalente con las macromoléculas. Los carcinógenos químicos que necesitan ser metabolizados para ejercer su efecto carcinógeno se denominan procarcinógenos, mientras que sus metabolitos hiperreactivos se denominan procarcinógenos finales.

## 2.2 Tratamiento contra el cáncer

El creciente conocimiento sobre la biología molecular del cáncer se puede aplicar para hacer frente a la enfermedad en tres niveles: prevención, diagnóstico y tratamiento. La mayoría de los tumores pueden prevenirse al no exponerse a los factores que los provocan. Los tumores pueden ser detectados en su fase inicial de desarrollo mediante exploraciones y pueden ser extirpados antes de que produzcan metástasis.<sup>42</sup> Actualmente algunas de las opciones para tratar de erradicar el cáncer son:

- Extracción quirúrgica las células malignas.
- Destrucción de las células con agentes químicos.
- Destrucción de las células mediante radiaciones.

Por lo general los tratamientos que matan las células transformadas también son tóxicos para las células normales, por lo que es de suma importancia desarrollar nuevos tratamientos dirigidos específicamente a la destrucción del tumor. La comprensión de los mecanismos normales de control y cómo se alteran los tipos de cáncer específicos permiten diseñar fármacos dirigidos contra el cáncer de forma más precisa. Conociendo mejor qué genes son amplificados, cuales son deletados y cuales mutados en las células de un tumor determinado, es posible empezar a diseñar tratamientos más precisos y específicos para cada paciente de forma individual.

### 2.3 Larimsh™

El aumento en la incidencia del cáncer a nivel mundial, así como en nuestro país ha intensificado la investigación y el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer. En México se está evaluando un posible tratamiento contra el cáncer llamado Larimsh (LR).

Larimsh (LR) es una mezcla de hidrocarburos de bajo peso molecular obtenida de la fracción ligera del petróleo a través de catálisis metálica (usando metales del cuarto y sexto grupo de la tabla periódica) seguida de una exposición de luz UV de alta frecuencia y baja longitud de onda. Es una solución de apariencia translúcida color café con un fuerte olor a petróleo cuya densidad es de 0.867 g/mL.<sup>2</sup> LR fue patentado a principios del 2001.<sup>3</sup>

El análisis por cromatografía de gases (CG) muestra que LR tiene 213 compuestos diferentes (Tabla 2. Análisis de Larimsh por CG) que incluyen: alcanos alifáticos (hepta- y octadecanos), alquenos-isoprenoides (pristano y fitano), cicloparafinas (naftenos de series de ciclohexano y decano), compuestos aromáticos y compuestos que contienen nitrógeno, oxígeno y azufre, así como trazas de metales. El peso molecular promedio de LR es de 237 daltones.<sup>2</sup>

Tabla 2. Análisis por cromatografía de gases de Larimsh

Componente	% peso
Azufre	1.5
Carbón	85.3
Hidrógeno	12.8
Nitrógeno	0.03
Oxígeno	0.37
Saturados	65.3
Olefinas	4.2

<b>Aromáticos</b>	
<b>Monoaromáticos:</b>	16.3
<b>Diaromáticos:</b>	10.0
<b>Poliaromáticos:</b>	4.2
<b>Peso molecular promedio:</b>	237

Actualmente, se está administrando LR a individuos con cáncer terminal interesados en tomar una terapia alternativa, observándose en algunos casos una franca mejoría.<sup>2</sup> Sin embargo, hasta el momento no se tienen datos acerca del mecanismo de acción, la farmacocinética, la farmacodinámica, el metabolismo y la genotoxicidad de LR.

El análisis del efecto genotóxico *in vitro* de Larimsh se realizó a petición del generador de esta fórmula, con la finalidad de tener un estudio preliminar de los efectos genotóxicos de la mezcla; la información acerca de la mezcla fue proporcionada por él. Hasta la fecha, en la literatura sólo existe un artículo en una revista indizada sobre los efectos antineoplásicos de LR. En este artículo, el autor menciona que LR es una mezcla sumamente lipofílica, que podría atravesar la membrana celular y producir suficientes moléculas de agua para inducir la rehidratación de los ácidos nucleicos particularmente en los tejidos que estuvieran proliferando más rápidamente. Esto basado en su propuesta de que la pérdida de moléculas de agua entre las uniones de las bases nitrogenadas de la cadena de ADN es la causa de que se produzca el cáncer. Las moléculas de agua serían proporcionadas por las moléculas de hidrocarburos de bajo peso molecular contenidas en LR. Asimismo, en este artículo se reporta un estudio preclínico en el que se administró LR a ratones Balb-C inoculados con células de leucemia linfóide, no encontrándose señales de toxicidad, exceptuando una alopecia reversible tras dejar el tratamiento. En los ratones tratados con LR se observó un aumento en el tiempo de vida con respecto a sus controles no tratados. Por otra parte, LR se administró a pacientes con cáncer terminal de próstata, donde su expectativa de vida diagnosticada, aumentó con respecto a los controles no tratados, además de apreciarse una disminución considerable en los niveles del antígeno prostático en sangre.<sup>2</sup>

No se encuentra reportado hasta el momento ningún estudio de este mecanismo propuesto.

Esta teoría está basada en la interpretación de un artículo teórico de Robertson y cols. (2004)<sup>26</sup>, el cual menciona que la formación de las bases nitrogenadas de la cadena del ADN involucra la hidrólisis simultánea de dos moléculas cíclicas de ácido polifosfórico mediante compuestos intermediarios inestables. Asimismo menciona que la unión de las bases nitrogenadas con la moléculas de azúcar, así como la formación de la cadena

lineal y la doble hélice del ADN se forman a través de la hidratación y deshidratación del ácido polifosfórico.

## 2.4 Genotoxicidad

La genotoxicidad estudia los efectos que ejercen los agentes químicos, físicos y biológicos en la integridad, expresión y regulación del material genético de los organismos.<sup>4</sup>

Las pruebas de toxicología genética identifican sustancias con actividad genotóxica con el fin de detectar el riesgo de exposición a éstas, caracterizar la relación dosis-respuesta y los mecanismos implicados en el efecto <sup>5,6</sup>. Existe una amplia gama de pruebas para identificar mutágenos e investigar la relación entre éstos y sus efectos carcinogénicos.<sup>7</sup>

Las sustancias químicas pueden producir alteraciones en el ADN de manera directa sobre las bases formando productos de adición covalente llamados aductos o indirectamente intercalando un compuesto entre los pares de bases del ADN. Las bases alquiladas también pueden dar lugar a una pérdida de bases del ADN dejando puntosapurínicos o apirimidínicos, denominados puntos AP, donde la inserción de bases incorrectas causan mutaciones.

Muchos compuestos que no son mutagénicos ni carcinogénicos por sí mismos adquieren esa capacidad al ser activados por el metabolismo de los mamíferos. Son los llamados promutágenos y procarcinógenos. El sistema de activación metabólica más usado en pruebas con cultivos celulares es un sobrenadante posmitocondrial de hígado de rata con los amortiguadores y cofactores apropiados, llamado fracción S9. A pesar de su utilidad, los sistemas de activación metabólica *in vitro* no imitan a la perfección el metabolismo de los mamíferos. Otro sistema de activación metabólica es el uso de líneas celulares provenientes del hígado, las que por ser tejido específico contienen el paquete enzimático característico del hígado capaz de activar metabólicamente los xenobióticos objeto de evaluación.

## 2.5 Marcadores biológicos

Los marcadores biológicos o biomarcadores son indicadores de la variación de componentes o procesos bioquímicos o celulares que pueden ser medidos en muestras biológicas <sup>8,12</sup> La genotoxicidad puede ser evaluada a través de marcadores biológicos.

Los biomarcadores se clasifican en tres tipos:

*Exposición:* son aquellos que permiten evidenciar la presencia de un xenobiótico y calcular su concentración o la de sus metabolitos, en fluidos biológicos.<sup>9</sup>

*Efecto*: determinan las alteraciones bioquímicas, fisiológicas, genéticas o moleculares que sufre un organismo y que, dependiendo de su magnitud, se identifican como un trastorno de la salud o una enfermedad potencial o definida.<sup>9</sup>

*Susceptibilidad*: implica una interacción especial del xenobiótico con las características genéticas del individuo.<sup>9,10</sup>

Con respecto a los biomarcadores de efecto, existen múltiples pruebas para detectar la inducción de daño genético en humanos tanto *in vivo* como *in vitro*, entre las cuales se encuentran: las aberraciones cromosómicas (AC), el intercambio de cromátides hermanas (ICH), la electroforesis unicelular en gel o ensayo cometa, el ensayo de micronúcleos (MN), entre otras<sup>11</sup>

## **2.6 Ensayo de micronúcleos**

El estudio del daño al ADN a nivel de cromosomas es esencial en la genética toxicológica porque las mutaciones en cromosomas son eventos importantes en la carcinogénesis. Las anomalías en los cromosomas son consecuencia directa y manifestación de daño a nivel del ADN.<sup>13</sup>

El ensayo de micronúcleos es una técnica frecuentemente usada para evaluar agentes clastogénicos (rompimientos cromosómicos) o aneugénicos (pérdida de cromosomas completos) en cultivos de linfocitos humanos. Es un ensayo para evaluar la genotoxicidad de las sustancias y es de los más usados para identificar agentes carcinogénicos.<sup>14,15</sup>

La técnica inicialmente se desarrolló para cultivos de linfocitos humanos, pero se ha adaptado en diferentes tipos de células como eritrocitos, fibroblastos, células exfoliadas de epitelio bucal y de orina, células de tumores sólidos, células de médula ósea e incluso líneas celulares inmortalizadas.<sup>13,16</sup>

Los MN son corpúsculos intracitoplásmicos de cromatina separados del núcleo principal que se forman durante la transición de metafase a anafase. Se encuentran en el citoplasma y se originan a partir de rompimientos de cromosomas que pueden ocurrir en G1 o G2, o bien, por cromosomas que sufren rezago anafásico (daño del huso acromático) o inactivación del centrómero.<sup>13,15</sup>

### **2.6.1 Ensayo de Micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN)**

La técnica de MN con bloqueo de la citocinesis, usa la citocalacina B (Cyt-B) para bloquear la citocinesis sin detener la cariocinesis.<sup>16</sup> La Cyt-B, es un metabolito obtenido del hongo *Helminthosporium dematoideum* que actúa como inhibidor de la polimerización de la actina requerida para la formación del microfilamento que constriñe el citoplasma

entre los núcleos hijos durante la citocinesis. En consecuencia el uso de Cyt-B da origen a células binucleadas (BN) tras llevarse a cabo una sola división celular. La frecuencia de MN se cuenta en células BN, lo que permite una comparación confiable del daño cromosómico entre poblaciones de células que pueden ser diferentes en su cinética de división celular<sup>13</sup> (Figura 1).

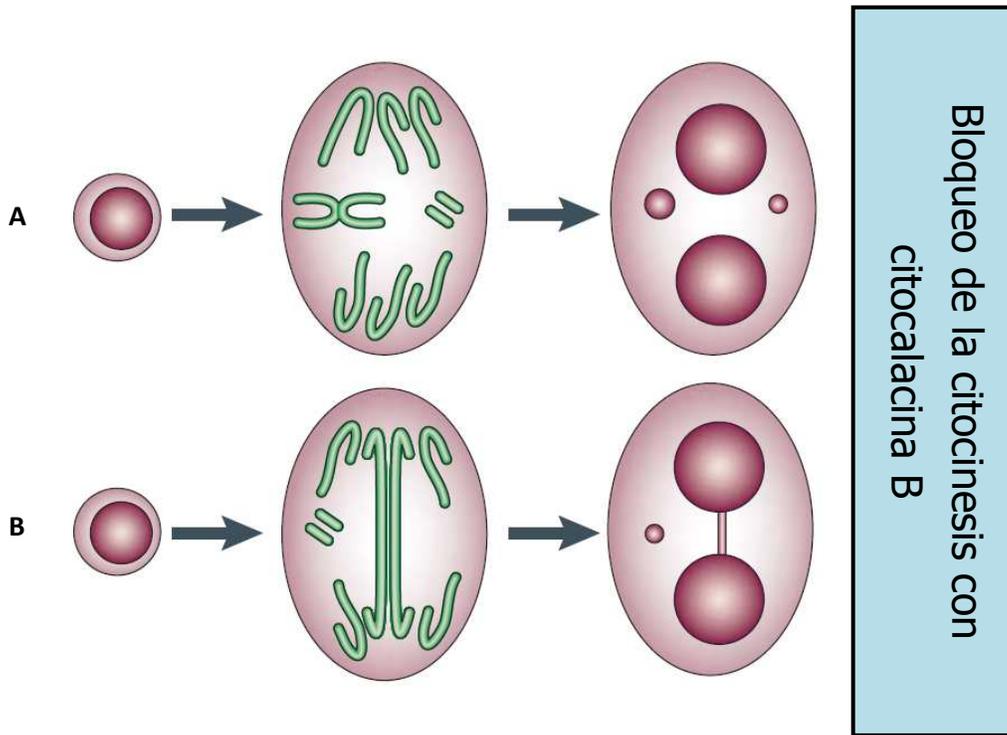


Figura 1. A) Origen de los MN por la pérdida de cromosomas completos y fragmentos de cromosomas acéntricos durante la anafase. B) Formación de un puente nucleoplásmico derivado de un cromosoma dicéntrico.<sup>20</sup> (Figura tomada y modificada de Fenech, M., 2007)

La citostaticidad determina los efectos sobre la proliferación celular. Se puede evaluar a través de la frecuencia de las células mononucleadas (Mo), binucleadas (BN) y polinucleadas (Po). Esto se determina mediante el cálculo del Índice de división nuclear (IN).

$$IN = [Mo + 2BN + 3Po] / N^{\circ} \text{ de células contadas}$$

Existen factores que pueden afectar la frecuencia de MN como la edad, el género, la dieta (ej. la deficiencia de ácido fólico y vitamina B12) y el estilo de vida (consumo de alcohol y drogas, hábito de fumar, etc.).<sup>17, 18, 19</sup>

Originalmente la técnica de MN se contempló como un sistema para contabilizar MN. Actualmente se incluye el conteo de la frecuencia de puentes nucleoplásmicos (PN), gemaciones nucleoplásmicas (GN), células muertas (por necrosis o apoptosis) y el IN que

también son indicadores de daño al material genético. La evaluación de todos estos parámetros se le conoce como el ensayo del citoma<sup>12, 13, 15</sup> (Figura.2).

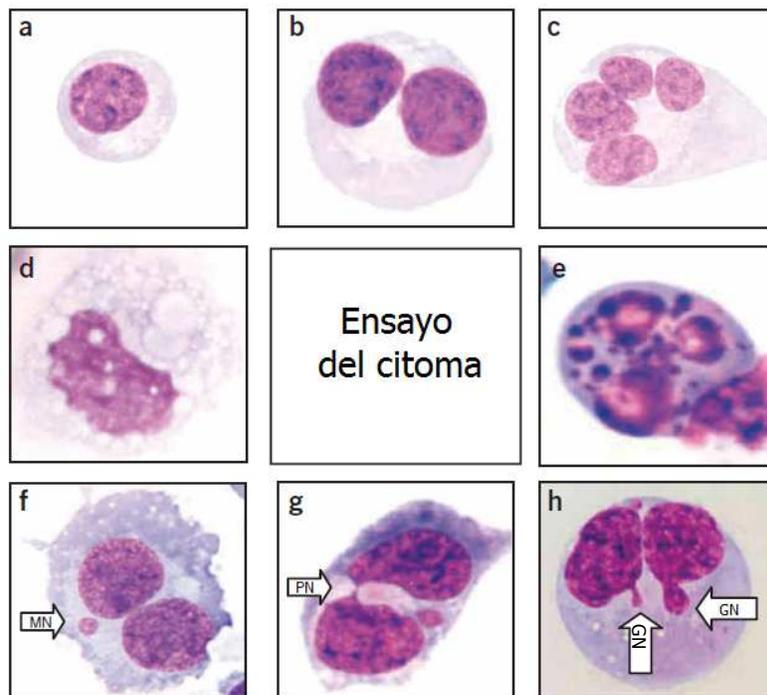
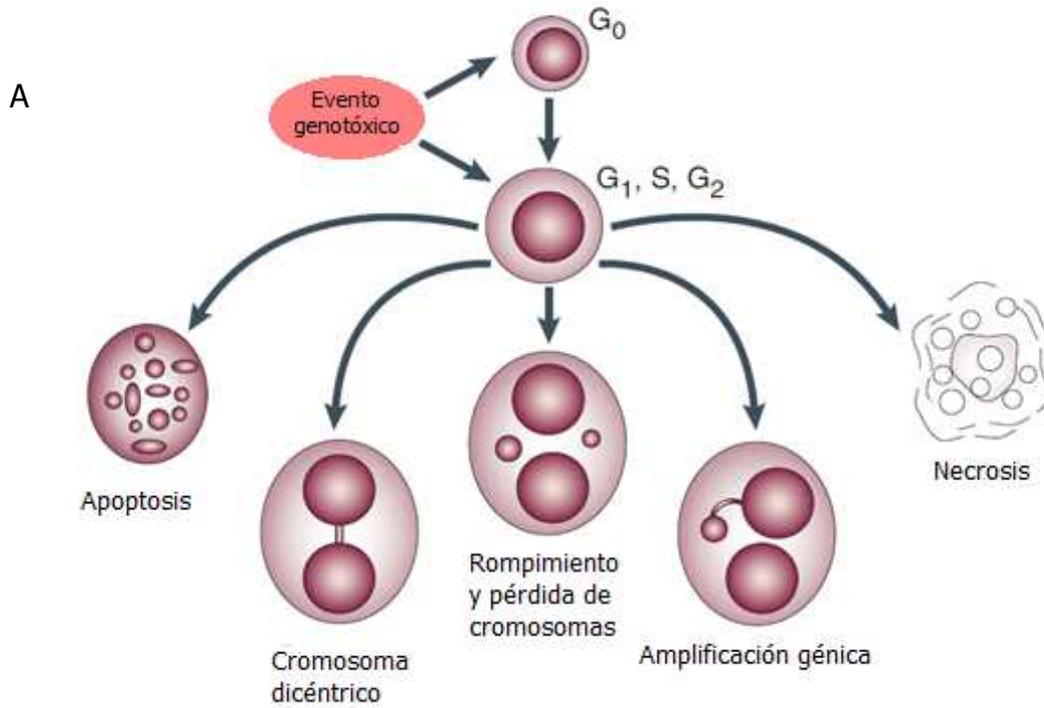


Figura 2. Determinación del citoma. Efectos cromosómicos en células expuestas a genotóxicos detectados mediante el ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis. Las fotomicrografías

muestran: a) célula Mo, b) célula BN, c) célula Po, d) célula necrótica, e) célula apoptótica, f) célula BN que contiene un MN, g) una célula BN con un PN y un MN y h) una célula BN con tres GN.<sup>20</sup> (Figura tomada y modificada de Fenech, M., 2007)

### **2.6.2 Criterios para evaluar células en el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis**

Las células que se cuentan en el ensayo de MN con bloqueo de la citocinesis deben cumplir con los siguientes criterios:<sup>15, 21</sup>

- Las células deben ser binucleadas.
- La membrana de la célula binucleada debe estar intacta y debe ser posible distinguirla de las células adyacentes.
- Los dos núcleos en la célula deben tener sus membranas intactas y deben estar situados dentro del citoplasma.
- Ambos núcleos deben tener aproximadamente el mismo tamaño, la misma morfología y una tinción similar.
- Dos núcleos en una célula binucleada pueden estar juntos, pero idealmente no deben encimarse. Una célula con núcleos encimados puede ser contabilizada sólo si las membranas de ambos núcleos pueden distinguirse claramente una de otra.

### **2.6.3 Criterios para contabilizar micronúcleos**

Los micronúcleos son morfológicamente idénticos a los núcleos, pero más pequeños. Para su conteo deben cumplir con los siguientes criterios:<sup>15, 21</sup>

- El diámetro de los MN en linfocitos humanos usualmente varía entre 1/16 y 1/3 del diámetro promedio de los núcleos principales. La forma de los MN es redonda u ovalada.
- Los MN no son refringentes, y por ende pueden distinguirse bien de los artefactos así como de las partículas de colorante.
- Los MN no se encuentran unidos ni traslapados a los núcleos principales.
- Los MN pueden tocar la membrana de los núcleos principales, pero no traslaparse con ellos. Las membranas de los núcleos principales deben distinguirse perfectamente de la membrana de los MN.
- Los MN usualmente tienen una tinción muy similar a la de los núcleos principales, aunque ocasionalmente se tiñen con una intensidad menor.

## 2.7 Citotoxicidad

La citotoxicidad se evaluó a través de la viabilidad celular, la cual se cuantificó determinando el porcentaje de sobrevivencia de las células al ser expuestas por cierto tiempo al tratamiento. Se utilizó la técnica de doble tinción con diacetato de fluoresceína/bromuro de etidio (FDA/EtBr, Sigma). Esta técnica evalúa la actividad metabólica de los lisosomas y la integridad de la membrana nuclear<sup>27</sup> y es utilizada para evaluar citotoxicidad. El bromuro de etidio indica la pérdida irreversible de la membrana celular, tiñe a los ácidos nucleicos de las células cuya membrana nuclear se encuentra dañada y les confiere un color rojo al ser observadas en el microscopio de fluorescencia. El FDA entra en las células cuya membrana se encuentra intacta, es hidrolizado en el lisosoma, liberando a la fluoresceína la cual le confiere un color verde a las células al ser observadas en el microscopio de fluorescencia.

## 2.8 Línea celular HepG2

La biotransformación es la conversión metabólica de sustancias químicas endógenas y xenobióticos en compuestos más hidrosolubles; en ella participan un pequeño número de enzimas que tienen una amplia especificidad por el sustrato. Algunas de estas enzimas se sintetizan en respuesta al xenobiótico, pero la mayoría se trata de enzimas constitutivas. Estas enzimas se distribuyen a lo largo de todo el cuerpo, en animales vertebrados la fuente más abundante de ellas se encuentra en el hígado. Las reacciones catalizadas por las enzimas que biotransforman xenobióticos se dividen en dos grupos, denominados fase I y fase II.<sup>4</sup> La fase I (biotransformación) está caracterizada por reacciones de oxidación, reducción e hidrólisis que adicionan al sustrato grupos funcionales como  $-OH$ ,  $SH$  o  $-NH_2$ , y suelen dar lugar a un pequeño aumento de la hidrofilia. La fase II (conjugación), abarca la glucuronidación, la sulfonación, la acetilación, la metilación, la conjugación con glutatión y la conjugación con aminoácidos tales como la glicina, la taurina y el ácido glutámico, cuya finalidad es aumentar la polaridad del sustrato conjugado favoreciendo su excreción.<sup>23</sup> Estas dos fases hacen al sustrato más soluble en agua, y por ende más susceptible a ser excretado permitiendo la desintoxicación.

La modificación provocada por la biotransformación puede variar los efectos biológicos de los xenobioticos. En ocasiones, los metabolitos del compuesto principal son los responsables de los efectos genotóxicos, por lo que también es necesario el estudio de sus efectos.

Los cultivos primarios de hepatocitos son considerados el estándar de oro de modelo *in vitro* de metabolismo de xenotóxicos y estudios de citotoxicidad, por ser altamente predictivos. Por ser células extraídas directamente de una biopsia de hígado, los hepatocitos en cultivo expresan el panel completo de enzimas metabolizadoras de Fase I y Fase II. Sin embargo, obtener una biopsia de hígado de humano es una técnica muy invasiva, la escasez de muestras de hígado humano, los complicados procesos de aislamiento, su limitado lapso de vida, la variabilidad individual y costos son grandes limitaciones para el uso de este modelo. El cultivo de líneas celulares inmortalizadas

derivadas de hígado soluciona esas limitaciones, por estar disponibles y ser fenotípicamente estables. Las células HepG2 altamente diferenciadas nos proveen de un modelo *in vitro* de fácil acceso, que expresa casi por completo el panel de enzimas metabolizadoras del hígado. Ésta es una línea celular epitelial que proviene de un carcinoma hepatocelular de un adolescente masculino de 15 años.<sup>24, 25</sup>

### **3 Justificación**

A través del tiempo la exposición a xenobióticos es causa de preocupación sobre todo ante el desconocimiento de sus posibles efectos a largo plazo como alteraciones genéticas y reproductivas, enfermedades de origen mutacional como el cáncer, la arteriosclerosis, la diabetes, el parkinson y enfermedades autoinmunes. En los últimos años el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer se ha intensificado. En México se ha desarrollado una posible terapia contra el cáncer llamada Larimsh™. Este posible tratamiento no cuenta con estudios que evalúen sus efectos genotóxicos. Es importante evaluar dichos efectos de las nuevas terapias, antes de ser administradas y comercializadas, para evitar efectos adversos, que puedan causar daños a nivel del genoma y por consiguiente, agravar o causar enfermedades al paciente.

LR actualmente se está administrando como terapia alternativa a personas con cáncer de próstata en estado terminal, situación alarmante debido a que este supuesto tratamiento no cuenta con suficiente evidencia científica que avale su seguridad y eficacia. Y cuyo uso se encuentra únicamente sustentado mayormente en eventos anecdóticos y en un único estudio preclínico reportado. Varios compuestos que presenta LR en su composición son reportados por la IARC como carcinogénicos. Esto aumenta la preocupación de su administración a seres humanos porque se pensaría que en lugar de actuar como antineoplásico, LR podría ser una mezcla de potentes carcinógenos que agravarían el estado de salud de las personas que lo toman como tratamiento, e incluso podría ser un factor en el desarrollo de cáncer en personas que no lo padecen si lo utilizaran.

## 4 Hipótesis

Larimsh, es un xenobiótico (compuesto ajeno al organismo) que podría producir efectos genotóxicos, citotóxicos y citostáticos por ser una mezcla proveniente del petróleo que contiene, entre otros, compuestos aromáticos y trazas de metales.

## 5 Objetivo general

Evaluar el efecto citostático, citotóxico, y genotóxico *in vitro* de Larimsh™ en linfocitos humanos, así como el de sus posibles metabolitos a través de la línea celular HepG2.

### 5.1 Objetivos particulares

- Evaluar por medio de la técnica de doble tinción con diacetato de fluoresceína/bromuro de etidio (FDA/BrEt) el efecto citotóxico de Larimsh™ en linfocitos humanos *in vitro*.
- Evaluar el efecto citostático y genotóxico de Larimsh™ por medio de la técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis en linfocitos humanos *in vitro*.
- Evaluar el efecto citostático y genotóxico de los posibles metabolitos de Larimsh™ utilizando como modelo de activación metabólica la línea celular HepG2 a través de la técnica de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis.

## 6 Materiales y métodos

Los esquemas generales de la metodología empleada se encuentran en las figuras 3 y 4.

### 6.1 Donadores

Para el estudio fueron utilizados linfocitos provenientes de sangre periférica heparinizada obtenida por venopunción de siete donadores de sangre masculinos de entre 24 y 50 años de edad, aparentemente sanos, no fumadores, sin exposición a plaguicidas o bajo tratamiento médico (Tabla 3). Los linfocitos extraídos fueron cultivados y expuestos a LR, para posteriormente evaluar la genotoxicidad del tratamiento.

Donador	Edad (años)
D1	32
D2	50
D3	25
D4	33
D5	38
D6	27
D7	33

Tabla 3. Donadores.

### 6.2 Extracción de linfocitos de sangre periférica

El aislamiento de los linfocitos a partir de sangre periférica se realizó en condiciones de esterilidad, por gradiente de densidad. Para realizar la metodología se utilizó la solución comercial Histopaque 1077 (Sigma). En 6mL de Histopaque colocados previamente en un tubo cónico de 15mL, se adicionaron por estratificación 3 mL de sangre total. El gradiente se centrifugó a 1600 rpm por 25 minutos. Se tomó el anillo de linfocitos, se lavó en un tubo con 10 mL de RPMI-1640 (Sigma, R-4130) y se centrifugó a 3000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se retiró y el botón se resuspendió en 1 mL de RPMI-1640 (Figura 3).

### 6.3 Cultivo de linfocitos

Los linfocitos extraídos fueron cultivados en 5 mL de medio RPMI-1640 (Sigma, R-4130) suplementado con aminoácidos no esenciales al 1% (Sigma), L-glutamina al 1% (Sigma) y suero fetal bovino inactivado al 10% (Gibco). La proliferación de los linfocitos fue estimulada mediante la adición de Fitohemaglutinina (PHA, Sigma) en una concentración final en cultivo de 50 µg. Las células se incubaron a 37° C por 72 horas. El tratamiento correspondiente se dió a las 24 horas; posteriormente a las 48 horas se adicionaron 15 µL de Citocalacina B (2 mg/mL, Sigma) para inhibir la citocinesis celular y a las 72 horas se realizó la cosecha celular (Figura 3).

### 6.4 Tratamiento

En algunos casos los experimentos se realizaron por duplicado y en otros por triplicado. Las concentraciones de Larimsh se evaluaron en tres categorías de concentración:

- a) 0.5 mM, 1.5 mM y 3 mM → Dos donadores
- b) 50 µM, 300 µM y 500 µM → Tres donadores por duplicado
- c) 2.5µM, 10 µM y 50 µM → Tres donadores por triplicado

En cada ensayo se utilizó un control negativo, un control del disolvente (DMSO) y un control positivo de Mitomicina C (MMC) a una concentración no citotóxica (0.1 µM) aunque si con la presencia un efecto genotóxico (Figura3).

Las concentraciones evaluadas de Larimsh fueron calculadas con base en la dosis diaria administrada a los pacientes del estudio realizado por Rodríguez y cols., que es de 1.5 g/día<sup>2</sup>. Un individuo promedio que pesa 75 Kg tendría una concentración sanguínea equivalente a 1.4 mM de Larimsh en un volumen sanguíneo de 4.5 L.

$$PM_{\text{promedio}} \text{ LR} = 237$$

$$1.5 \text{ g LR} ( 1 \text{ mol} / 237 \text{ g LR} ) = 6.3 \times 10^{-3} \text{ mol LR}$$

$$6.3 \times 10^{-3} \text{ mol LR} / 4.5 \text{ L} = 1.4 \times 10^{-3} \text{ M} = 1.4 \text{ mM}$$

### 6.5 Citotoxicidad

La citotoxicidad se evaluó a través de la viabilidad celular, la cual se cuantificó determinando el porcentaje de sobrevivencia de los linfocitos después de ser expuestos por 48 horas a las diferentes concentraciones de Larimsh (Figura 3). Se determinó a través de la técnica de doble tinción con diacetato de fluoresceína/bromuro de etidio (FDA/EtBr, Sigma). Al término del cultivo (72 horas) se tomó una alícuota de 500 µL de linfocitos, se centrifugó durante 5 min a 4000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se

adicionaron 10  $\mu$ L de solución de trabajo (1.6 mL PBS, 30  $\mu$ L EtBr (1 mg/mL), 5  $\mu$ L de FDA (5mg/ mL acetona), se homogenizó y se observó al microscopio de fluorescencia (Olympus BX-60). Se considera que una sustancia es citotóxica, cuando provoca una disminución de la viabilidad celular por debajo de 70%.

### **6.6 Ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis (CBMN)**

El ensayo de micronúcleos se llevó a cabo tomando en cuenta los criterios establecidos por Fenech (2003). La extracción, cultivo y tratamiento de los linfocitos se realizó de acuerdo a los apartados correspondientes antes mencionados. A las 72 horas se realizó la cosecha celular. En la cosecha, las células se resuspendieron suavemente, posteriormente se prefijaron añadiendo 1 mL de solución fresca de Carnoy (metanol-ácido acético glacial 3:1 a 4°C). Se centrifugaron a 1200 rpm por 10 minutos, se les eliminó el sobrenadante hasta aproximadamente 1 mL y se adicionó solución fijadora hasta un volumen de 3 mL (fijación). Se realizaron otros tres lavados con solución fijadora siguiendo el mismo procedimiento. Se realizaron laminillas. Éstas se tiñeron con los colorantes eosina y azul de metileno. Finalmente las laminillas se evaluaron al microscopio (Olympus BH-2). El efecto genotóxico fue determinado evaluando la frecuencia de micronúcleos en 1000 células binucleadas (Figura 3).

La citostaticidad es una medida del estado de proliferación de las células. Se determinó mediante el recuento de células mononucleadas (Mo), binucleadas (BN) y polinucleadas (Po). La actividad citostática se calculó mediante la fórmula del índice nuclear (IN):

$$IN = [Mo + 2BN + 3Po] / N^{\circ} \text{ total de células contadas}$$

### **6.7 Línea celular HepG2**

Se realizaron cultivos de la línea celular HepG2, en medio EMEM con glutamina suplementado al 10% con suero fetal bovino inactivado (GIBCO), y antibiótico al 2% (GIBCO). El esquema de cultivo de la línea celular fue el mismo que se empleó para los linfocitos, pero sin estimulación con fitohemaglutinina. Las células se cultivaron en placas de 24 pozos. Todos los cultivos fueron incubados a 37°C, y 5% CO<sub>2</sub>. Las células se levantaron con tripsina al 0.05%, la cual se inactivó con medio EMEM suplementado. Se resuspendieron suavemente, se prefijaron con solución de Carnoy. Posteriormente, las células se pasaron a tubos de vidrio para continuar con el proceso de fijación y lavado (Figura 4).

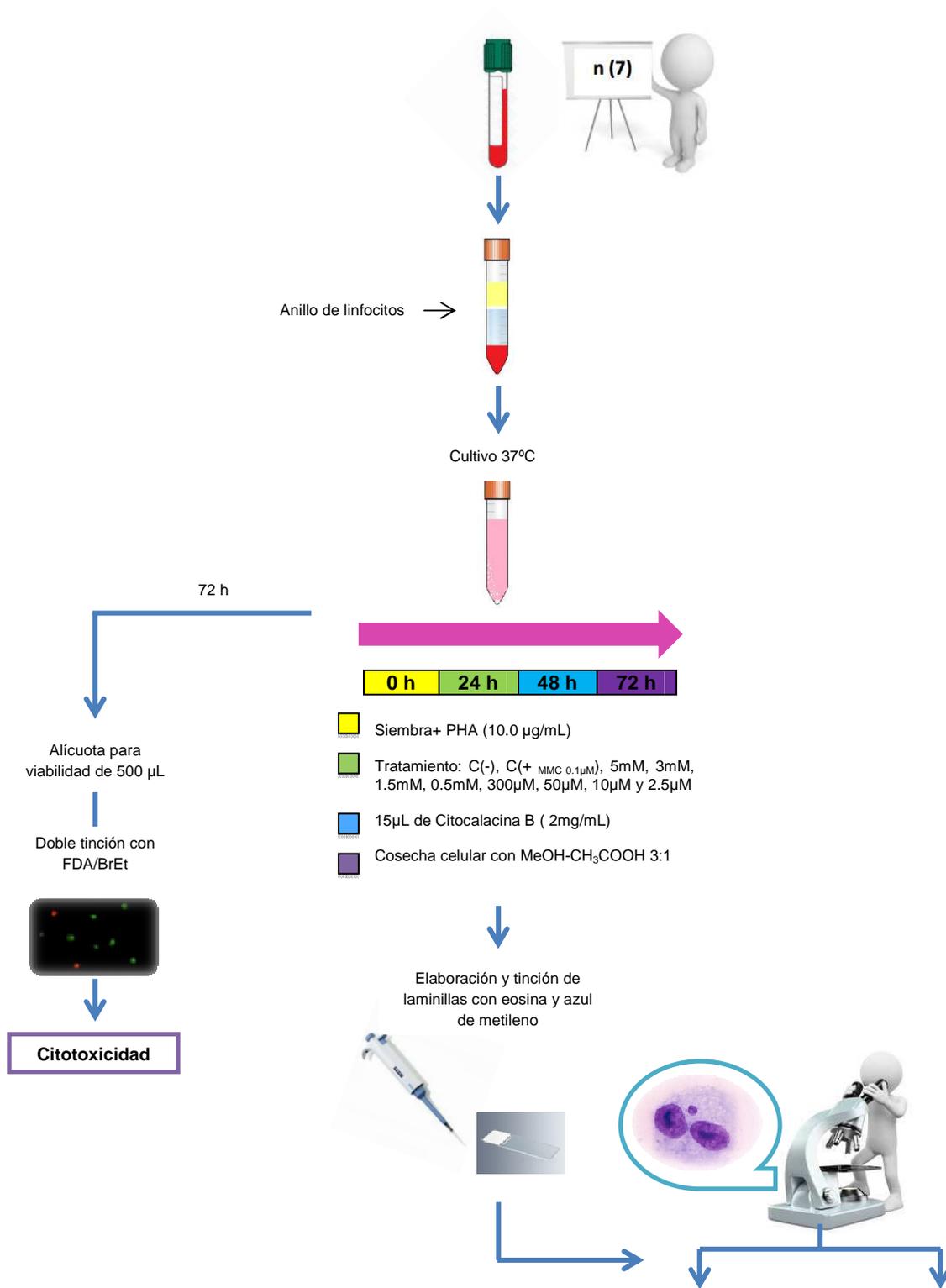


Figura 3. Diagrama de flujo del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis, índice nuclear y del ensayo de viabilidad en linfocitos humanos.

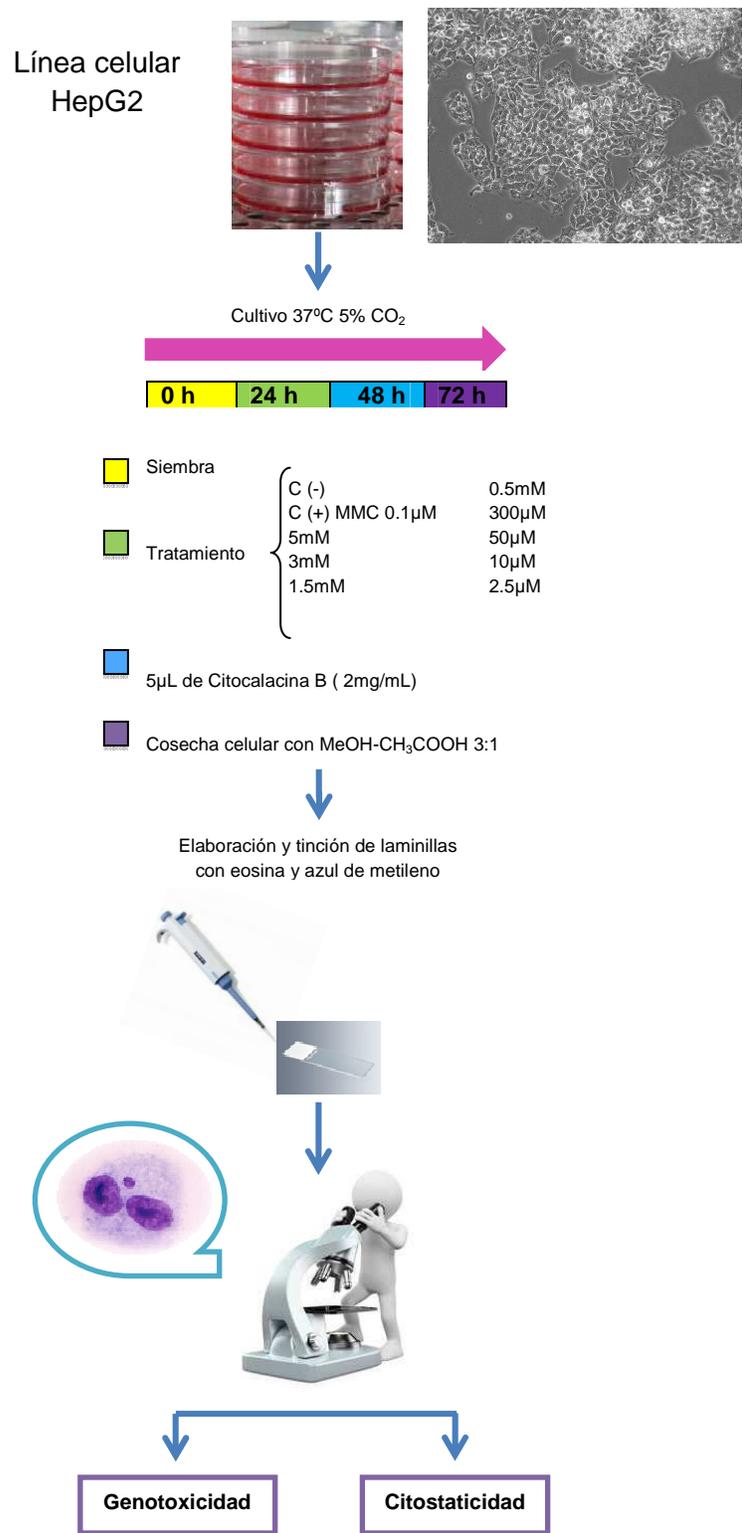


Figura 4. Diagrama de flujo del ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis e índice nuclear en la línea celular HepG2.

## **6.8 Análisis estadístico**

Todos los resultados en este estudio se expresaron como promedios y desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el programa Graph Pad 5.0. Se determinó la distribución de los datos por medio de las pruebas de: Kolmogorov-Smirnov, Se utilizó la prueba de ANOVA de una vía y la prueba de comparación múltiple de Tukey. El nivel de significancia considerado fue de  $*p < 0.05$ . Los valores de significancia se reportan con respecto al control negativo y al control de disolvente (DMSO). No se encontraron diferencias significativas entre ambos controles mediante la prueba t de Student.

## 7 Resultados

### 7.1 Efectos citostáticos, citotóxicos y genotóxicos de Larimsh™ en linfocitos humanos.

La citotoxicidad se evaluó a través del porcentaje de sobrevivencia de las células (viabilidad celular) tras su exposición a LR. La citostaticidad se evaluó a través de la cuantificación de la proliferación celular utilizando como parámetro el Índice nuclear (IN). La genotoxicidad se evaluó a través de la frecuencia de micronúcleos en las células tras su exposición a LR.

Se realizó una primera curva de LR que incluyó la dosis diaria administrada (1.4 mM) en los pacientes de acuerdo al estudio de Rodríguez y cols<sup>2</sup>. Las concentraciones evaluadas fueron 0.5, 1.5 y 3 mM utilizando linfocitos de dos de los seis donadores (D1 y D7). Se observó que a estas concentraciones LR tiene un efecto citostático y citotóxico severo sobre los linfocitos humanos *in vitro* reflejándose en una disminución casi por completo de la proliferación celular y una disminución casi del 50 % en la viabilidad celular en la concentración mas alta evaluada con respecto al control negativo. Se obtuvieron resultados únicamente de un donador, ya que los linfocitos del otro individuo fueron más sensibles. Con estas concentraciones no fue posible evaluar un efecto genotóxico debido a que las células murieron o no proliferaron (Figura 5).

Se realizó una segunda curva con concentraciones diez veces más bajas con el fin de determinar los efectos genotóxicos de LR. En ésta, se utilizaron linfocitos de 3 de los seis donadores (D1, D2 y D3) y se realizaron dos repeticiones de cada uno. Se incluyó la concentración de LR más baja de la primera curva (0.5 mM = 500 µM), misma que se consideró como la concentración más alta. Las concentraciones evaluadas fueron 50, 300 y 500 µM.

Las concentraciones de 50 y 300 µM mostraron un ligero efecto citotóxico. A estas concentraciones se observa una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la viabilidad con respecto al control negativo a partir de 50 µM, la cual es aún más significativa ( $p < 0.0001$ ) a la concentración de 500 µM (Figura 6A).

La proliferación celular evaluada a través del IN disminuyó significativamente a partir de la concentración 300 µM. El IN a 500 µM mostró un valor promedio de 1.02, lo que significa que no hubo proliferación (Figura 6B).

La determinación de la frecuencia de MN con estas concentraciones, no mostró cambios significativos con respecto al control negativo hasta la concentración de 300 µM. En 500 µM, nuevamente no fue posible realizar la determinación de los MN debido a que no hubo proliferación de las celular (Figura 6C).

En ocasiones, algunos compuestos a concentraciones bajas, presentan comportamientos paradójicos ocasionados posiblemente por interacción con componentes celulares, efectos esteroquímicos o por activación de mecanismos de detoxificación. Por ello, se evaluó también el comportamiento del LR a concentraciones aún más bajas, realizando

una tercera curva. La concentración de LR más baja de la segunda curva (50  $\mu\text{M}$ ), se utilizó como la concentración más alta en la nueva curva. Las concentraciones evaluadas fueron 2.5, 10 y 50  $\mu\text{M}$ . En la Figura 7 se muestran los resultados de citotoxicidad, citostaticidad y genotoxicidad de tres de los seis donadores (D4, D5 y D6) por triplicado.

No se observaron efectos en la viabilidad celular, ni daño genotóxico en ninguna de las concentraciones utilizadas (Figura 7A y 7C). Sin embargo, a concentraciones de 10 y 50  $\mu\text{M}$  de LR, se observó una disminución significativa de la proliferación celular (Figura 7B).

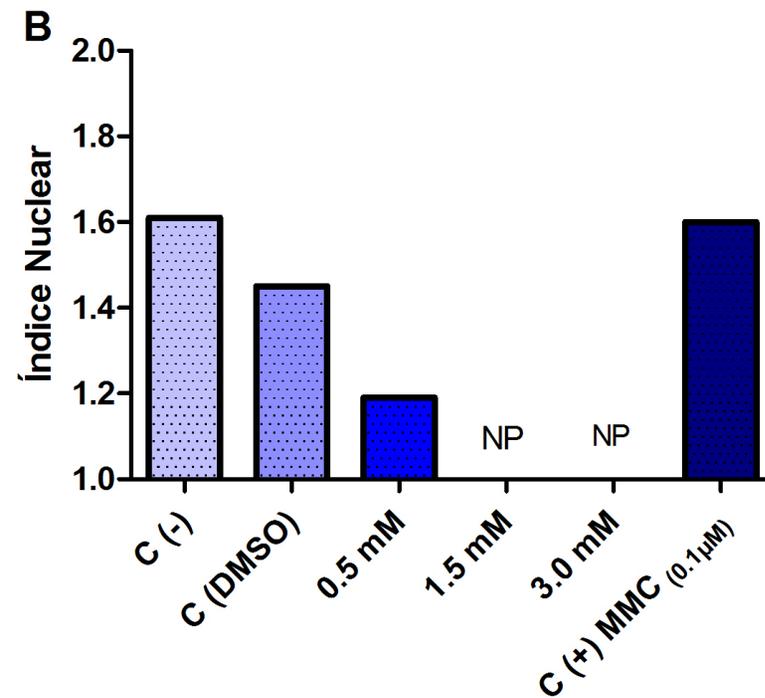
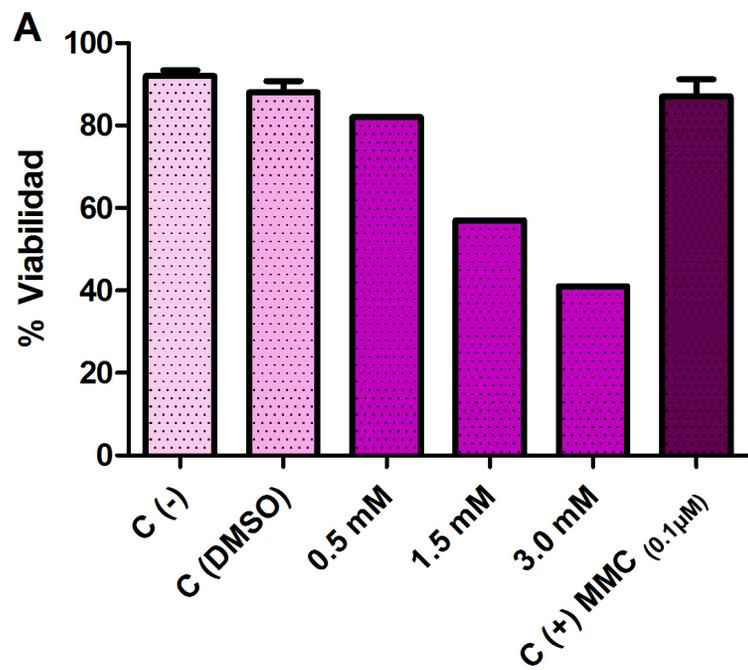


Figura 5. Efecto citotóxico y citostático de LR a 0.5, 1.5 y 3.0 mM. A) Determinación de la citotoxicidad de LR por la técnica de FDA/EtBr. B) Efecto de LR en la proliferación celular. Datos de un donador (D1). NP = No hubo proliferación celular.

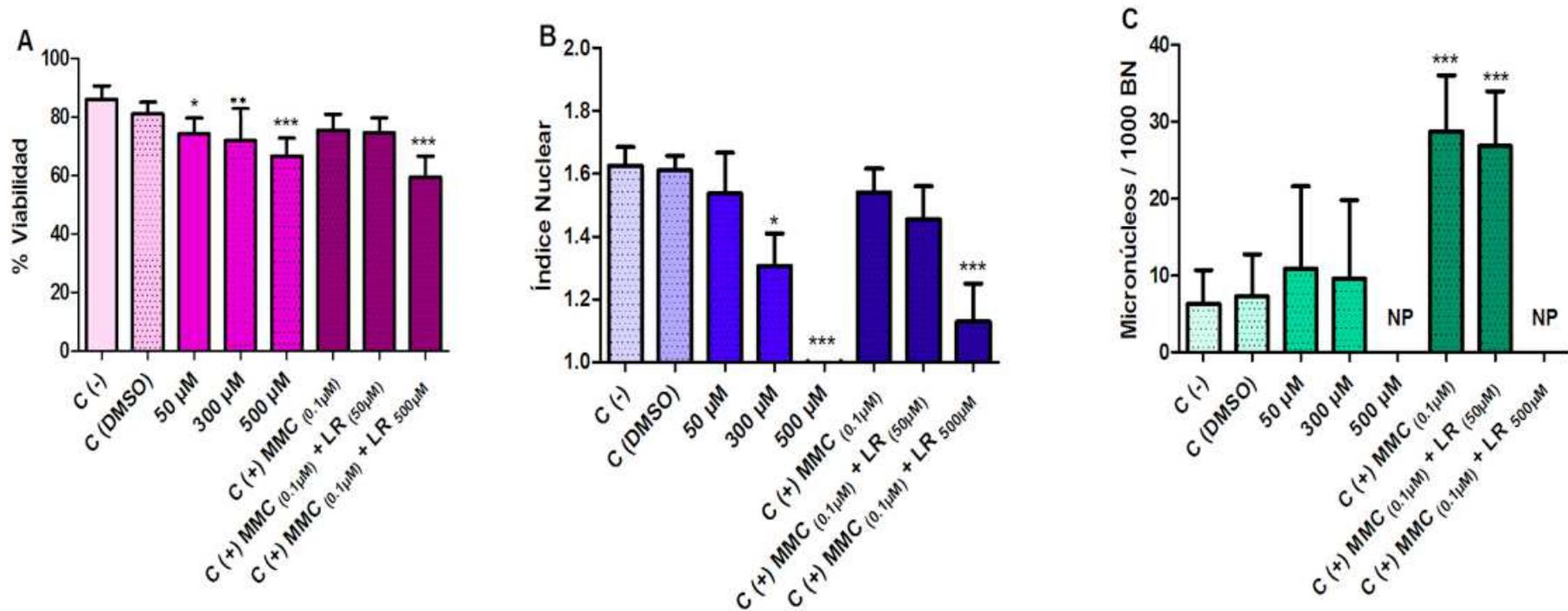


Figura 6. Evaluación de la citotoxicidad, citostaticidad y genotoxicidad de LR a concentraciones de 50, 300 y 500  $\mu$ M en tres donadores por duplicado (D1, D2 y D3). A) Citotoxicidad de LR. B) Efectos de LR en la proliferación celular. C) Genotoxicidad de LR. Se aplicó la prueba de ANOVA de una vía, con la prueba de comparación múltiple de Tukey \* $p < 0.05$ . NP = No hubo proliferación celular.

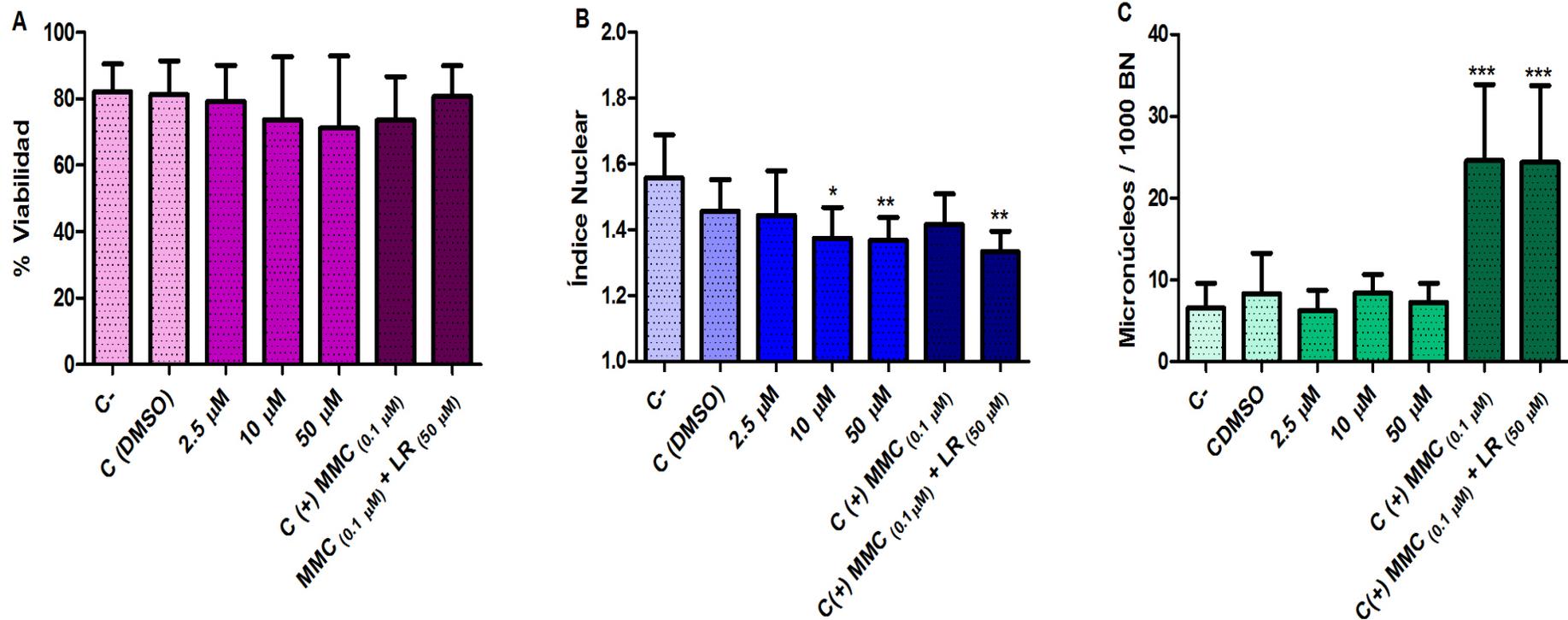


Figura 7. Efecto citotóxico, citostático y genotóxico de LR en linfocitos de 3 donadores por triplicado (D4, D5 y D6), a concentraciones de 2.5, 10 y 50 μM. A) Efectos citotóxicos. B) Efectos citostáticos. C) Efectos genotóxicos. Se aplicó la prueba de ANOVA de una vía, con la prueba de comparación múltiple de Tukey \*p<0.05

## **7.2 Efectos citostáticos y genotóxicos de los posibles metabolitos de Larimsh™, utilizando la línea celular HepG2 como modelo de activación metabólica.**

Para evaluar el efecto de los posibles metabolitos de LR, se utilizó como modelo la línea celular HepG2, cuya característica es tener la maquinaria enzimática para llevar a cabo el metabolismo.

Se realizó una curva por duplicado con la línea celular HepG2. En los tratamientos de LR, se incluyó la dosis diaria administrada (1.4 mM) a los pacientes del estudio realizado por Rodríguez y cols<sup>2</sup>. Las concentraciones evaluadas de LR fueron del orden micromolar (2.5, 10, 50, 100, 300 y 500  $\mu$ M) y milimolar (1.5, 3, 5 y 10 mM). En las concentraciones de 2.5 a 500  $\mu$ M no se observaron diferencias significativas con respecto al control negativo en cuanto a citostaticidad y genotoxicidad (Figura 8). La proliferación celular disminuyó significativamente ( $p < 0.0001$ ) cuando las células se expusieron a una concentración de 1.5mM o más de LR. El efecto genotóxico a concentraciones superiores a 500  $\mu$ M, no se determinó ya que a esas concentraciones las células no proliferaron.

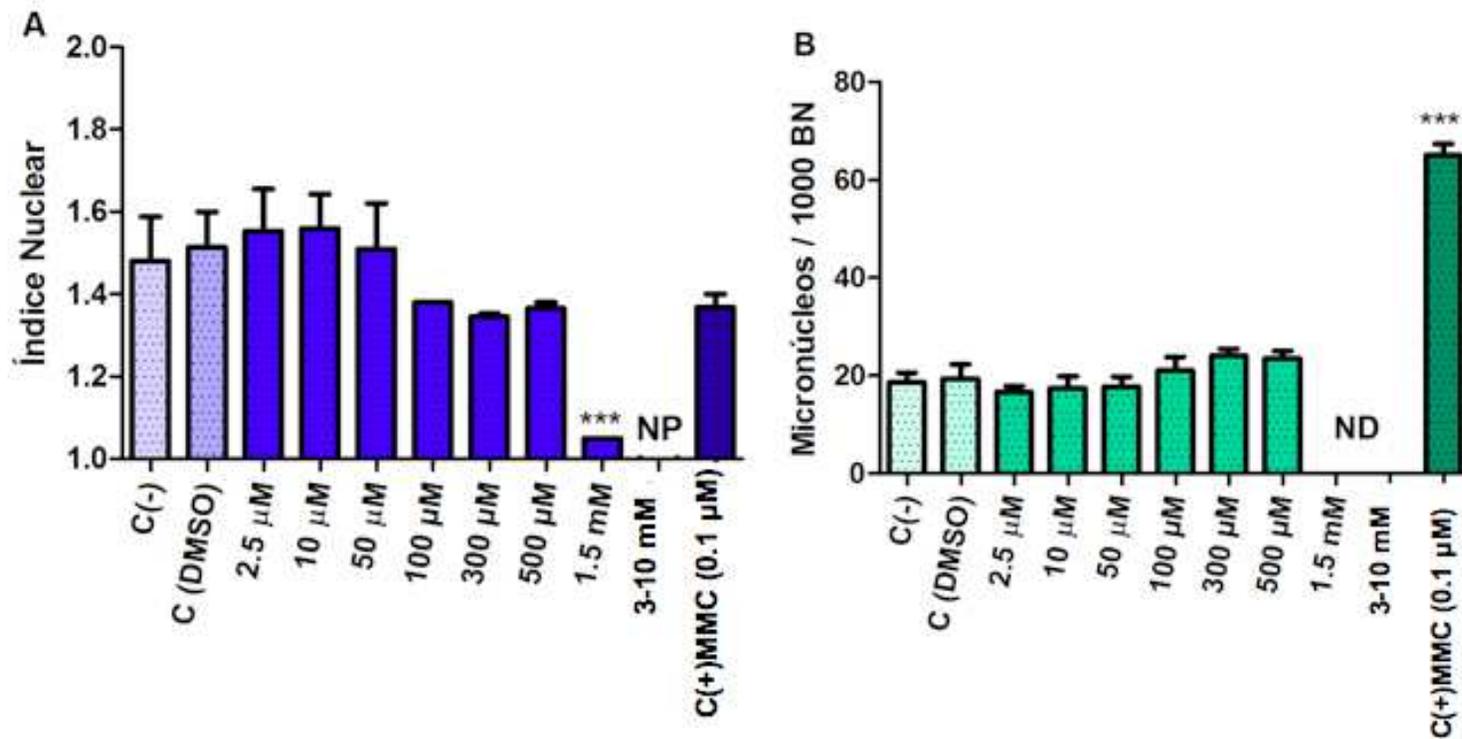


Figura 8. Evaluación del efecto citostático y genotóxico de LR en células HepG2 metabólicamente activas. A) Efecto citostático de los posibles metabolitos de LR. B) Efecto genotóxico de los posibles metabolitos de LR. Se aplicó la prueba de ANOVA de una vía, con la prueba de comparación múltiple de Tukey \* $p < 0.05$ . NP = no hubo proliferación celular; ND = no se determinó por no haber células binucleadas.

## 8 Discusión

Las células cancerosas tienen características que las distinguen de las células normales como: proliferación incontrolada, resistencia a la apoptosis, incapacidad para diferenciarse, invasividad, capacidad para inducir metástasis, etc. La terapia contra el cáncer se encuentra enfocada a destruir o eliminar las células malignas a través de cirugía, irradiación, fármacos citotóxicos (Cisplatino, Carboplatino, Ciclofosfamida, Vincristina, Topotecan, etc.) y fármacos citotóxicos dirigidos (anticuerpos monoclonales como el rituximab y alentezumab; Trastuzumab e Imatinib). Un antineoplásico ideal debe ser capaz de disminuir la proliferación celular y causar la muerte celular de manera selectiva sin producir efectos genotóxicos. En la realidad, la mayoría de los antineoplásicos que actualmente se utilizan, son antiproliferativos no selectivos y pueden generar daño genotóxico. Existe una discusión relevante sobre el riesgo-beneficio del tratamiento y los aspectos relacionados con la calidad de vida de los enfermos.<sup>28</sup>

Larimsh™ (LR) es una mezcla de hidrocarburos de bajo peso molecular. Entre los compuestos que forman parte de la mezcla se encuentran isopreno (2B, IARC), naftaleno (2B, IARC) y benzopiridina, los cuales tienen gran importancia por sus propiedades mutagénicas y carcinogénicas. Estos compuestos han sido clasificados por la IARC como probables carcinógenos al ser humano.<sup>29, 30, 31</sup> Algunos más como los bifenilos policlorados (2A, IARC) y los bifenilos polibromados (2A, IARC) se clasifican como carcinógenos y probables carcinógenos al ser humano, respectivamente.<sup>32, 33</sup> El ciclohexano, también contenido en LR, no cuenta con estudios que evalúen su potencial carcinogénico.<sup>34, 35</sup> En el caso de la decalina, sólo hay evidencia de actividad carcinogénica basada en el aumento de incidencias de neoplasmas tubulares y feocromocitoma en ratas F344/N macho expuestas a ciertas concentraciones.<sup>36</sup> Se sabe que el tetrahidronaftaleno (también presente en esta mezcla), incrementa la incidencia de adenoma túbulo-renal en ratas F344/N macho; en ratas F344/N hembra se relaciona la exposición a un aumento de casos de neoplasmas hepatocelulares y pólipos uterinos.<sup>37</sup> El 2-metilnaftaleno<sup>38</sup> presenta un ligero aumento en las aberraciones cromosómicas producidas en cultivos de linfocitos humanos en presencia de la fracción S9, sin embargo, sería relevante estudiar su efecto en un sistema *in vivo*.

A pesar de que LR consiste en una mezcla que contiene diversas sustancias, que de manera aislada están catalogadas como carcinógenas, llama la atención que el comportamiento de la exposición a la mezcla *in vitro* mostró un efecto citostático (disminución en la proliferación celular) significativo en un rango amplio de concentración (2.5 y 300  $\mu$ M), además de causar muerte celular (citotoxicidad) y no causar efectos genotóxicos en un modelo de linfocitos humanos *in vitro*.

Se utilizó la línea celular HepG2 como modelo de activación metabólica, no encontrando efectos citostáticos ni genotóxicos. Cabe resaltar que siendo ésta una línea procedente de un hepatocarcinoma, se esperaría que Larimsh, como “antineoplásico”, fuera capaz de disminuir la proliferación celular de estas células. Este efecto citostático se observó en las

células HepG2 a partir de la concentración 1.5 mM, mientras que en los linfocitos humanos (células sanas) la citostaticidad fue significativa a partir de la concentración 10  $\mu$ M (2 órdenes de magnitud menor). Este hecho sugiere que LR no actuó como agente citostático sobre las células cancerígenas HepG2, por lo que sería conveniente utilizar una batería de líneas celulares para corroborarlo.

La mayoría de los estudios sobre los efectos de las sustancias químicas en los sistemas biológicos se llevan a cabo evaluando una sustancia a la vez. Sin embargo, en el mundo real estamos expuestos a mezclas de sustancias químicas presentes en el medio ambiente y por exposición ocupacional. Las interacciones observadas entre los componentes de una mezcla química a altas concentraciones en animales, no necesariamente tendrán el mismo tipo de efecto y magnitud en humanos expuestos a concentraciones aún menores de la mezcla.<sup>39</sup> Además, la vía de administración, la dosis, la permeabilidad de los compuestos, los blancos y el metabolismo son factores que también influirán en los efectos de un xenobiótico.

Cuando se tienen mezclas, la respuesta en las células es más compleja, ya que además intervienen factores como: impedimento estérico, saturación o inhibición enzimática, competencia por receptores, etc. LR es una mezcla compleja que no presentó efectos genotóxicos a las concentraciones estudiadas. Este comportamiento pudiera deberse a uno o varios de los factores antes mencionados. Un ejemplo es la oxidación del estireno y del butadieno, llevada a cabo por el citocromo P450 2E1, situación donde el estireno inhibe competitivamente al butadieno.<sup>39</sup> Otro ejemplo, es la mezcla benceno-tolueno. El benceno, importante disolvente presente en la gasolina y el humo del cigarro, se conoce por sus propiedades carcinogénicas. El tolueno protege contra la genotoxicidad inducida por el benceno reduciendo los niveles de sus metabolitos en médula ósea de ratón.<sup>39</sup> En humanos también se observó la mutua supresión del metabolismo entre el benceno y el tolueno, tras cuantificar los metabolitos de ambos en la orina de trabajadores chinos expuestos a los compuestos solos y a la mezcla de ellos, reafirmando así el efecto protector del tolueno.<sup>40</sup>

El estudio de mezclas químicas es muy complejo por muchas razones: se requiere realizar un gran número de experimentos que permitan evaluar cada una de las posibles combinaciones entre sus componentes, se desconocen las combinaciones importantes, se desconocen las concentraciones adecuadas a evaluar y no siempre se conocen por completo los efectos tóxicos de cada uno de los componentes. Evaluar experimentalmente mezclas químicas en muchas ocasiones no es práctico ni costeable. En estos casos se usan diseños estadísticos y diseños factoriales para evaluar predictivamente las interacciones de las posibles combinaciones de los compuestos que forman la mezcla.<sup>41</sup> Estos métodos predictivos presentan sus propias limitaciones, ya que al ser modelos matemáticos requieren inferir el comportamiento de los mecanismos de acción a altas y bajas concentraciones, lo que implica un gran problema de extrapolación, aun cuando se conozca la toxicidad de la cada uno de los compuestos.

LR es una mezcla compleja de derivados del petróleo de composición variada, la evaluación del riesgo que la mezcla representa a la salud humana se encuentra fuera del alcance de este estudio debido a que se desconoce con precisión la composición de la mezcla. Además, no sería posible evaluar todas las interacciones entre sus 213 componentes, aún cuando éstos se conocieran. Sin embargo, dada la complejidad de la mezcla, diversos factores podrían estar involucrados en su comportamiento y ser los responsables de la anulación de los efectos genotóxicos e inclusive de los efectos citostáticos y citotóxicos inducidos por LR.

El cáncer es una enfermedad compleja multifactorial ya que en él intervienen factores ambientales, físicos, químicos, biológicos, hormonales, genéticos y epigenéticos.

Se tiene bien caracterizado el proceso a través del cual se desarrolla la transformación celular que da origen al cáncer: la carcinogénesis. Las etapas de la carcinogénesis son: iniciación, promoción, progresión, invasión y metástasis.

El mecanismo de acción de LR propuesto por Rodríguez y cols. plantea el origen del cáncer como una enfermedad unifactorial ocasionada por la deshidratación del ADN, el cual además de no contar con un sustento científico que lo corrobore, no muestra congruencia con el proceso de carcinogénesis que se encuentra ampliamente sustentado en la literatura.

## 9 Conclusiones

Larimsh en el modelo de linfocitos humanos:

- Indujo citostaticidad a partir de la concentración de 10  $\mu\text{M}$  con respecto al control negativo,
- Indujo citotoxicidad a partir de la concentración de 50  $\mu\text{M}$ , siendo altamente citotóxico con la concentración de 300  $\mu\text{M}$ .
- No generó efectos genotóxicos y sólo fue posible evaluarlo en concentraciones por debajo de 300  $\mu\text{M}$ .

Larimsh en el modelo de activación metabólica con la línea celular HepG2:

- No produjo efectos citostáticos ni genotóxicos significativos con respecto al control negativo en las concentraciones de 2.5 a 500  $\mu\text{M}$ .
- Disminuyó la proliferación celular a partir de la concentración de 1.5 mM.

No ocasionó el efectos genotóxicos y solo fue posible evaluarlo en concentraciones menores a 500  $\mu\text{M}$ .

## 10 Referencias

1. GLOBOCAN 2008 (IARC) *Section of Cancer Information* (6/08/2013)
2. Rodríguez-Pérez R, García-Montañez M, Lemus-Balcazar H, DeLaRosa Viejo M, Grijalva-Monreal J, Castell-Rodríguez AE, Ramírez-González MD. *Clinical efficacy of a petroleum-derived product (Larimsh) used as compassionate treatment in patients with terminal prostate cancer*. Proc. West Pharmacol. Soc. 50: 143-51 (2007).
3. Rodríguez Pérez, R. *Un proceso mejorado para la obtención de un producto auxiliar en el tratamiento de la artritis y para evitar o curar el cáncer y el producto resultante*. Mexican patent application PA/a/2001/010282  
Sitio web oficial del producto Larimsh™ (Visitado el 26/09/13)  
<http://www.larimsh.com/>
4. Casarett y Doull. *Fundamentos de toxicología*. Curtis D. Pp 51, 78-103, 118-120, 138-141,143 y 147.
5. Casarett y Doull. *Manual de toxicología*. Editorial Mc Graw Hill, 5ª edición. México, 2001. Pp. 214-215
6. Rodríguez, R. *Las toxinas ambientales y sus efectos genéticos. Serie: La ciencia para todos*. Fondo de Cultura Económica. ILCE. V3. Libros electrónicos, 1995, (visitado en Junio 2013).  
<http://bibliotecadigital.ilce.edu.mx/sites/ciencia/volumen3/ciencia3/124/html/toxinas.html>
7. Arango SS. *Biomarcadores para la evaluación de riesgo en la salud humana*. Rev. Fac. Nac. Salud Pública 2011; 30(1): 75-82
8. Garte s y Bonassi S. *Linkining toxicology to epidemiology: biomarkers and new technologies-especial issue overview*. Mutat Res, 2005. 592: 3-5
9. Gil F. *El papel de los biomarcadores en Toxicología Humana*. Revista de Toxicología, 2000; 17:19-26
10. Ostrosky, P. Gonsebatt, M.E. *El tejido linfocitario en la evaluación de biomarcadores de efecto*. Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 2006.
11. Pastor S, Gutiérrez S, Creus A, Cebulska-Wasilewska A, Marcos R. *Micronuclei in pberipheral blood lymphocytes and buccal epithelial cells of polish farmers exposed to pesticides*. Mutat Res, 2001. 495:147-156.
12. Michael Fenech. *Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology*. Toxicology 181/182 (2002) 411/416
13. Fenech, Michael. *The in vitro micronucleus technique*. Mutation Research 455 (2000) 81-95
14. G. Iarmarcovai, M. Ceppi , A. Botta , T. Orsie` re , S. Bonassi. *Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis*. Mutation Research 659 (2008) 274–283
15. Thomas, P. Fenech, M. *Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay in Lymphocytes*. Vladimir V. Didenko (ed.), DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, vol.

682, DOI 10.1007/978-1-60327-409-8\_16, © Springer Science+Business Media, LLC 2011

16. Swapan, Samanta. Pranab, Dey. *Micronucleus and its applications*. Timely review. 2010 Wiley periodicals. Diagnostic Cytopathology, Vol 40, No 1.
17. Fenech, M. Bonassi, S. *The effect of age, gender, diet and lifestyle on DNA damage measured using micronucleus frequency in human peripheral blood lymphocytes*. Mutagenesis vol. 26 no. 1 pp. 43–49, 2011.
18. Fenech, M. *Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death*. Mutation Research 600 (2006) 58–66
19. Xiayu Wu. *Vitamin B12 and Methionine Deficiencies Induce Genome Damage Measured Using the Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay in human B Lymphoblastoid Cell Lines*. Nutrition and Cancer, 65(6), 866–873 Copyright 2013.
20. Fenech, M. *Cytokinesis-block micronucleus cytome assay*. Protocol. Nature Publishing Group, 2007.
21. Fenech, M. *HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures*. Mutation research 534 (2003) 65-75
22. Williams RT (1971) *Detoxification Mechanisms*. John Wiley & Sons, Inc., New York.
23. Parkinson A (1996) *Toxicology the Basic Science of Poisons*. McGraw-Hill, New York.
24. ATCC® HB-8065™ Product Sheet HepG2
25. Stefan Wilkening, Frank Stahl, and Agustinus Bader. *Comparison of primary human hepatocytes and hepatoma cell line hepg2 with regard to their biotransformation properties*. Drug metabolism and disposition vol. 31, no. 8 2003. German Research Centre for Biotechnology, Organ- und Gewebekultur, Braunschweig, Germany (S.W., F.S.); and University of Tuebingen, Institute of Anatomy, Tuebingen, Germany (A.B.) (Received February 26, 2003; accepted April 24, 2003)
26. [Robertson, D.S. Cellular formation of DNA and RNA and the relationship to tumour cell development. Med. Hypoth. 2004; 62\(1\), 97-111](#)
27. . Aeschbacher M., Reinhardt C., Zbinden G. (1986). *A rapid cell membrane permeability test fluorescent dyes and flow cytometry*. Cell Biology and Toxicology; 2(2):247-255.
28. Rang, H. Dale, M. *Farmacología*. 6a ed. Elsevier, 2008. Cap Quimioterapia antineoplásica, pp 719-733.
29. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans volume 60, 71. 1999.
30. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans volume 82. 2002.

31. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans volume 56. 1993.
32. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans volume 18, sup 7 107, in prep.
33. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans volume 41, sup 7 107, in prep.
34. DECOS (Dutch Expert Committee for Occupational Standards) (1990) Cyclohexane. Health-based recommended occupational exposure limit, RA 15/90, Sdu Uitgeverij, Den Haag.
35. Greim, H. (1996) Cyclohexane, Occupational Toxicants, Critical data evaluation for MAK values and classification of carcinogens Vol. 8, Wiley-VCH, Weinheim.
36. NTP Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of decalin (cas no. 91-17-8) in f344/n rats and b6c3f mice and a toxicology study of decalin in male nbr rats (inhalation studies). National toxicology program.o. box 12233 research triangle park, nc 27709. January 2005
37. NTP Technical report on the toxicology and carcinogenesis studies of tetralin(cas no. 119-64-2)in f344/n rats and b6c3f1 mice and a toxicology study of tetralin in male nbr rats(inhalation studies). National toxicology program.o. box 12233 research triangle park, nc 27709. April 2011
38. Scientific Opinion on Flavouring Group Evaluation 25, Revision 2 (FGE.25Rev2): Aliphatic and aromatic hydrocarbons from chemical group 311 EFSA Panel on Food Contact Materials, Enzymes, Flavourings and Processing Aids (CEF)2, 3 European Food Safety Authority (EFSA), Parma, Italy PP 28 *metilnaftaleno*
39. Bond, J., M. Medinsky. *Health risk assessment of chemical mixtures from a research perspective*. Toxicol Letters. 1995; 82/82:521-525
40. Inoue, O.,K. Seiji, T. Watanabe, M. Kasahara, M. Nakatsuka, S.Yin y M. Ikeda. *Mutual metabolic suppression between benzene and toluene in man*. Int. Arch. Ocup. Enviro Health. 60:15-20.
41. J. P. Groten. *Mixtures and interactions*.Food and chemical toxicology 38 (2000) S65-S71
42. Alberts, B. Johnson, Lewis, A. *Biología Molecular de la célula*. 5a ed. Barcelona, 2010. Pp 1205-1240, 1256-1264