



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y LA SALUD ANIMAL

ESTUDIO DEL EFECTO QUIMIOPROTECTOR DE LA ADMINISTRACIÓN
CONJUNTA DEL ÉSTER FENÉTILICO DEL ÁCIDO CAFEICO Y EL ANÁLOGO
LQM717 EN UN MODELO DE HEPATOCARCINOGENESIS QUÍMICA EN RATAS

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS

P R E S E N T A :

SAMANTHA JARDON XICOTENCATL

TUTOR PRINCIPAL:

DR. SAÚL VILLA TREVIÑO

Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional

COMITÉ TUTORAL:

DR. CARLOS GERARDO GARCÍA TOVAR

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán

DRA. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

CUAUTITLÁN IZCALLI, EDO. DE MEX. AGOSTO 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.

Cuando uno nace pobre, *ser estudioso es el mayor acto de rebeldía contra el sistema.*

- Anónimo -

Este trabajo está dedicado a la persona más importante de mi vida...

A MI HIJO MATÍAS

*Para que este trabajo te motive a hacer grandes cosas.
Espero que algún día estés orgulloso de mí, porque no hay madre más orgullosa de su hijo que yo.*

Te amo con todo mí ser, mi pequeño.

A S E S O R E S D E T E S I S

Dr. Saúl Villa Treviño

Investigador Emérito.

Laboratorio 50. Departamento de Biología Celular.

Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

Dr. Carlos Gerardo García Tovar

Profesor Investigador Departamento de Ciencias Biológicas.

Laboratorio 4. Unidad de Investigaciones Multidisciplinaria.

Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán.

Universidad Nacional Autónoma de México.

Dra. María de Lourdes Juárez Mosqueda

Profesor Investigador Departamento de Morfología.

Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia.

Universidad Nacional Autónoma de México.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio 50 del Departamento de Biología Celular perteneciente al Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).

Se contó además con una beca-crédito del CONACYT para estudios de posgrado con clave de registro: 486348.

Se agradece la impresión de esta tesis, a la Universidad Nacional Autónoma de México, a través del programa de apoyo a los estudios de posgrado (PAEP).

AGRADECIMIENTOS

A MI ESPOSO:

Jonathan

Por las palabras de aliento, por el abrazo oportuno, por la sonrisa y caricia en el momento más necesitado. Por no cortar mis alas y motivarme a volar alto para ser una mujer exitosa y feliz.

Por ser mi amor, mi amigo, mi compañero de vida; por eso y tantas cosas más... gracias.

TE AMO.

A MIS PADRES:

Leticia y Gerardo

Cada paso que doy por la vida lo hago pensando en ustedes con un gracias en el corazón. Espero que estén orgullosos de mí, porque no hay hija más orgullosa de sus padres que yo.

Enorgullecerlos a ambos ha sido la tarea más importante de mi existir.

A MIS HERMANAS:

Brenda y Berenice

Por ser la otra mitad de mi corazón; para que este trabajo las motive a hacer grandes cosas. Nunca podré expresar con palabras lo mucho que las amo.

A MIS SUEGROS:

Anita y Ariel

Por el apoyo incondicional que me han brindado siempre, por hacerme sentir parte de su familia y por el infinito amor y cuidados hacia mi pequeño Matías.

A DIOS:

Por tus innumerables bendiciones, por las personas que has cruzado en mí camino... Por regalarme vida para seguir cumpliendo mis sueños.

A LA UNAM

*Porque pertenecer a ti un día empezó como un sueño y hoy es una realidad.
Es un honor ser uno más de tus frutos.*

AL Dr. SAÚL VILLA TREVIÑO:

Por permitirme ser su tesista y abrirme las puertas de su laboratorio, por sus enseñanzas y motivaciones. Fue un placer trabajar con usted.

AL Dr. CARLOS GERARDO GARCIA TOVAR:

Por apoyarme siempre y darme el ejemplo de que una vida exitosa, es aún más grande cuando se acompaña de sencillez y humildad.

A LA Dra. MARÍA DE LOURDES JUÁREZ MOSQUEDA:

Por los consejos, lecciones y ayuda que me brindo durante mi proceso de formación.

AL Dr. GERMAN ISAURO GARRIDO FARIÑA:

Por su invaluable apoyo en la realización de este trabajo, por ser más que un asesor, por sus enseñanzas y amistad, le estoy profundamente agradecida.

AL Dr. TONATIUH ALEJANDRO CRUZ SÁNCHEZ, Dr. JUAN OCAMPO LÓPEZ Y A LA Dra. YESENNIA SÁNCHEZ PÉREZ.

Por permitirme trabajar en sus laboratorios, por el apoyo y los consejos.

AL DR. JESÚS ABRAHAM MÉNDEZ ALBORES:

Por su tiempo y recomendaciones, pero sobre todo por ser enseñarme que “Para enseñar no necesitas herir y para aprender no necesitas ser herido”.

A LOS DOCTORES QUE CONFORMAN MI JURADO DE TESIS:

*Por ayudarme a mejorar el presente escrito y enseñarme que ver los errores
te da la oportunidad de crecer.*

A MIS PROFESORES:

Que me permitieron aprender de cada uno de ellos.

A MIS AMIGAS:

Cynthia y Monse

*Con quienes viví, reí y sufrí esta emocionante etapa.
Las quiero.*

A MIS COMPAÑEROS DEL LAB 50 DEL DEPTO DE BIOLOGÍA CELULAR.

Ruth, Sol, Tita, Nancy, Moni, Samia, Sergio, Leo, Hugo
Por sus consejos, enseñanzas y amistad.

A MIS COMPAÑEROS DOCTORES Y ALUMNOS DEL LAB 4 DE LA UIM.

Ignacio, José Luis, Francisco, Leo, Mary, Miguel, Tania, Gaby.
Por sus consejos, enseñanzas y amistad.

ÍNDICE	Pág.
ABREVIATURAS	10
LISTAS DE FIGURAS	12
RESUMEN	13
ABSTRACT	14
I. INTRODUCCIÓN	15
1.1 EL CÁNCER	15
1.2 CÁNCER EN MEDICINA VETERINARIA	16
1.3 TRATAMIENTOS	17
1.4 QUIMIOPREVENCIÓN DE LA CARCINOGENESIS	18
1.5 EL ESTRÉS OXIDATIVO	19
1.6 ETAPAS DE LA CARCINOGENESIS QUÍMICA	21
1.7 MODELO MODIFICADO DEL HEPATOCITO RESISTENTE	21
1.8 ÉSTER FENÉTILICO DEL ÁCIDO CAFEICO (CAPE)	23
1.9 ANÁLOGO LQM 717	25
II. JUSTIFICACIÓN	27
III. HIPÓTESIS	27
IV. OBJETIVOS	28
4.1 OBJETIVO GENERAL	28
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	28
V. METODOLOGÍA	29
5.1 HISTOQUÍMICA DE ENZIMA GAMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA	32
5.2 HISTOLOGÍA	34
5.2.1 TINCIÓN DE HEMATOXILINA Y EOSINA	34
5.3 INMUNOHISTOQUÍMICA	36
5.3.1 Ki67	37
5.4 MÉTODO PARA MEDIR LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HÍGADO DE RATA	37
5.4.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD	39

5.5 MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ROS EN HÍGADO DE RATA	40
5.5.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO	42
VI. RESULTADOS	43
6.1 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÍNIMA QUIMIOPROTECTORA DEL CAPE Y LQM717	43
6.2 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA NECROSIS TISULAR HEPÁTICA	46
6.3 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DEL CAPE Y LQM717 SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR	48
6.4 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DEL CAPE Y LQM717 SOBRE LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA	49
6.5 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DEL CAPE Y LQM717 SOBRE LAS ROS	50
6.6 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DEL CAPE Y LQM717 SOBRE LA PRESENTACIÓN DE LESIONES PRENEOPLÁSICAS	52
6.7 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE EL PESO CORPORAL	56
6.8 EFECTO DEL CAPE Y LQM717 SOBRE LA PRESENTACIÓN DE TUMORES	57
VII. DISCUSIÓN	59
VIII. CONCLUSIONES	63
IX. PERSPECTIVAS	64
X. BIBLIOGRAFÍA	65
XI. APÉNDICE	71

ABREVIATURAS

°C	Grados centígrados
µL	Microlitro
2-AAF	2-Acetil-aminofluoreno
CAPE	Éster fenético del ácido cafeico
CHC	Carcinoma hepatocelular
DCF	2,7-diclorofluoresceina oxidada
DCFH	2,7-diclorofluoresceina reducida
DCFH-DA	dicloro-dihidrofluoresceina diacetato
DEN	Dietilnitrosamina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FHA	Focos hepáticos alterados
GGT+	γ-glutamil transpeptidasa positiva
GMMA	g-glutamil-1,4demetoxi-2-naftilamida
GSTP	Glutación S-transferasa-P
h	Horas
H ₂ Oe	Agua estéril
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrógeno
HP	Hepatectomía parcial
IP	Intraperitoneal
LQM717	Análogo CAPE
LPX	Lipoperoxidación
M	Molar
MDA	Malondialdehído
MDR	Resistencia a multidroga
MMHR	Modelo Modificado del Hepatocito Resistente
MNA	1,4-metoxi-2-naftilamida
mg	Miligramos
min	Minutos
mM	Milimolar

nm	Nanómetros
N7ETG	N7-etilguanina
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NT	No tratadas
PBS	Solución amortiguadora salina de fosfatos
PMSF	Fenilmetilsulfonilfluoruro
ROS	Especies reactivas de oxígeno
Rpm	Revoluciones por minuto
TA	Temperatura ambiente
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico
TC	Tratamiento completo
VEGF	Factor de crecimiento endotelial vascular

LISTA DE FIGURAS

- Fig. 1. Características de la célula cancerosa.
- Fig. 2. Modelo Modificado del Hepatocito Resistente.
- Fig. 3. CAPE.
- Fig. 4. LQM717.
- Fig. 5. Diseño experimental.
- Fig. 6. Análisis de imágenes con el software ImagePro Express.
- Fig. 7. Lipoperoxidación.
- Fig. 8. Reacción entre el TBA y el MDA.
- Fig. 9. Oxidación de H₂DCF a DCF.
- Fig. 10. Reacción GGT positiva al pretratamiento con distintas dosis de CAPE.
- Fig. 11. Dosis CAPE.
- Fig. 12. Reacción GGT positiva al pretratamiento con distintas dosis de LQM717.
- Fig. 13. Dosis LQM717.
- Fig. 14. Inicio de daño tisular 12 h pos DEN.
- Fig. 15. Efecto sobre la necrosis hepática.
- Fig. 16. Cuantificación de los núcleos Ki-67.
- Fig. 17. Efecto de los compuestos en la lipoperoxidación.
- Fig. 18. Efecto de los compuestos en generación de ROS.
- Fig. 19. Focos hepáticos alterados.
- Fig. 20. Focos hepáticos alterados GSTp positivos.
- Fig. 21. Determinación de lesiones preneoplásicas.
- Fig. 22. Efecto sobre la presentación de lesiones preneoplásicas.
- Fig. 23. Comportamiento del peso corporal por grupo durante la fase de iniciación de la carcinogénesis.
- Fig. 24. Efecto sobre la presentación de tumores hepáticos.

RESUMEN

El cáncer en los perros se ha hecho más frecuente y detectable en los últimos años debido al aumento de la esperanza de vida aunado a una mayor atención a la salud de las mascotas. La gama de lesiones neoplásicas observadas en los perros es tan diversa como en los pacientes humanos, sin embargo, a pesar de las intervenciones terapéuticas intensivas, la tasa de mortalidad sigue siendo inaceptablemente alta en ambas especies. Debido a que las mascotas domésticas comparten nuestro medio ambiente, un mayor estudio y aplicación de factores antitumorales en nuestro entorno común, beneficiaría a ambas especies, lo que podría llevar al desarrollo de nuevas familias de compuestos antitumorales menos tóxicos, con base en nuevos blancos moleculares.

La quimiopreención es un medio importante para hacer frente a esta enfermedad. El éster fenético del ácido cafeico (CAPE), es un compuesto fenólico derivado del propóleo al que se le ha detectado un efecto quimioprotector por su capacidad antioxidante. A partir de esta sustancia se han sintetizado análogos que buscan igualar y mejorar las propiedades del compuesto natural, aumentando su producción y reduciendo su elevado costo. En estudios recientes, el análogo LQM717 demostró tener un mayor efecto quimioprotector que el CAPE en la reducción de las lesiones preneoplásicas y tumorales, mostrando un poder terapéutico distinto al CAPE.

Dado que se ha estudiado el efecto de estas sustancias quimioprotectoras por separado, este trabajo se enfoca en el efecto de una posible sinergia terapéutica entre ambos compuestos, en un modelo de hepatocarcinogénesis química en ratas.

A B S T R A C T

Cancer in dogs has become more prevalent in recent years due to increased life expectancy coupled with increased attention to the health of pets. The range of observed cancers in dogs is as diverse as that of human patients, however despite intensive therapeutic interventions, mortality rates remain unacceptably high in both species. Because domestic pets share our environment, further study and application of antitumor factors in both species would benefit our common environment, which could lead to the development of new families of less toxic antineoplastic compounds based on new molecular targets to established.

Chemoprevention is an important way to tackle the disease. The caffeic acid phenethyl ester (CAPE) is a phenolic compound derived from propolis which are attributed a chemopreventive effect for its powerful antioxidant capacity. From this substance analogs were synthesized seeking to match and improve the properties of the natural compound, to increase production and reduce its high cost. Recent studies with LQM717 a CAPE analog proved to be greater than CAPE chemoprotective effect in reducing tumors and preneoplastic conditions, showing a different therapeutic power CAPE.

Since we have studied the chemoprotective effect of these substances separately, this work focuses on the effect of a potential therapeutic synergy between the two compounds in model of chemical hepatocarcinogenesis in rats.

I. INTRODUCCIÓN

1.1 EL CÁNCER

El cáncer es una patología con efectos devastadores sobre los seres humanos y los animales domésticos que se caracteriza por una proliferación incontrolada de células anormales, las cuales tienen la capacidad de invadir otros tejidos, teniendo un origen monoclonal ^(1,2,3). El cáncer es un proceso multietapas en el cual se presenta la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, confiriendo la transformación progresiva de células normales a células malignas. La célula tumoral se caracteriza por su resistencia a la muerte celular, evasión de los supresores de crecimiento, autosuficiencia de señales de crecimiento, capacidad de invasión y metástasis e inducción de la angiogénesis. Las células malignas se encuentran energéticamente desreguladas, son capaces de evadir la respuesta inmune, promover la inflamación, presentan inestabilidad genómica y mutaciones que le dan una capacidad proliferativa ilimitada (Fig.1) ^(4,5). Las alteraciones en estos procesos fisiológicos son responsables tanto de los cambios iniciales para la transformación neoplásica celular, así como de los cambios subsecuente en progresión tumoral, que resultan en la carcinogénesis ^(6,7).



Fig.1. Características de la célula cancerosa.

Los agentes que son capaces de inducir estas transformaciones son diversos, y los efectos de éstos pueden acumularse durante toda la vida. ⁽²⁾

1.2 CÁNCER EN MEDICINA VETERINARIA

En el campo veterinario se diagnostican cada vez más casos de cáncer en animales de mediana o avanzada edad y la evolución de la enfermedad en perros y gatos suele ser más rápida que la del cáncer similar en seres humanos ⁽²⁾. Debido a la ausencia de registros históricos confiables sobre la presentación de tumores, es difícil saber si la prevalencia de cáncer en perros está aumentando; sin embargo, el principal factor que posiblemente ha contribuido a un aumento en el diagnóstico de cáncer, es un aumento en la responsabilidad de los dueños hacia sus mascotas con el objeto de mejorar la salud y el bienestar de las mismas, lo que se refleja en prolongar el tiempo de vida y por tanto, el desarrollo de cáncer, cuya presentación se incrementa con la edad ⁽⁸⁾.

La vejez es un proceso biológico que resulta en una progresiva reducción de la capacidad de mantener la homeostasis interna y manejar el estrés ambiental externo, razón por la cual las neoplasias pueden ser una de las patologías más frecuente en animales de compañía. El cáncer es la causa de casi la mitad de las muertes en pacientes mayores a los 10 años de edad; más del 50% de los perros y del 35% de los gatos padecerán algún tipo de tumor en su vida. Los perros adquieren el cáncer con la misma incidencia que los seres humanos, mientras que en los gatos la incidencia es menor ^(8,9).

Los tumores malignos caninos han sido establecidos como modelos importantes del cáncer humano debido a su desarrollo espontáneo y la frecuencia con la que se presentan; está reportado que el comportamiento biológico de los tumores en los perros posee mayores características en común con los de los seres humanos, que con el cáncer inducido en roedores de laboratorio ⁽⁹⁾. Los perros comparten el medio ambiente con sus dueños y por lo tanto están expuestos a factores de riesgo similares; de ahí que la etiología y patogénesis de los tumores son probablemente similares ⁽⁸⁾. Los perros son cada vez más reconocidos como una valiosa herramienta en la oncología comparativa, presentándose en estos una

amplia gama de tipos de cáncer comparables tanto genética, fenotípica y morfológicamente ⁽⁹⁾.

Es importante destacar que una mayor variabilidad en los factores genéticos y ambientales afecta significativamente la expresión de la enfermedad, esto dificulta la pronta identificación de los factores tumorigénicos y antitumorales en los animales y en los seres humanos ⁽¹⁰⁾.

1.3 TRATAMIENTOS

La evaluación y el tratamiento de los pacientes con cáncer está creciendo en las clínicas veterinarias debido al conocimiento de la biología y los tratamientos tumorales, ello sumado a un mayor interés de los propietarios porque sus animales reciban un tratamiento que les aporte una mejor calidad de vida y prolongación de la misma ⁽³⁾.

La medicina veterinaria trata de manera rutinaria a pacientes con enfermedades crónicas que no se pueden curar (Diabetes mellitus, enfermedad articular degenerativa, enfermedad renal crónica, entre otras), el cáncer en cambio, se puede llegar a curar, por lo que es posible mejorar la calidad de vida de los pacientes y extender su vida. El cáncer es una enfermedad que se debe tratar en los animales ⁽⁴¹⁾.

La mayoría de los pacientes oncológicos muestran tolerancia a las terapias antitumorales, aun así su estado está unido a una serie de condiciones paraneoplásicas (anorexia, fatiga, inmunosupresión y pérdida de peso) que influirán en su calidad de vida ^(2,3). Por lo general, el tratamiento contra el cáncer canino es paliativo, siendo esto una excelente oportunidad para evaluar enfoques alternativos, sin embargo hay que tomar en consideración que la mayoría del cáncer avanzado es incurable, por lo que es importante para prolongar la supervivencia del individuo, tomar en consideración que el bloqueo del proceso de carcinogénesis a través de la quimioprevención, es una estrategia factible para la

prevención o inhibición del crecimiento tumoral de las células cancerígenas y de las metástasis ⁽⁹⁾.

1.4 QUIMIOPREVENCIÓN DE LA CARCINOGENÉISIS

La quimioprofilaxis o quimioprevención es la utilización de sustancias químicas para prevenir la aparición de una enfermedad ^(11, 12, 13, 14). Ha sido un área activa de investigación durante varias décadas, por lo que es ampliamente utilizada y aceptada fácilmente como una estrategia que reduce el riesgo de cáncer ⁽⁹⁾.

La quimioprevención del cáncer consiste en la utilización de determinadas sustancias químicas, naturales o sintéticas con el objetivo de prevenir, detener o revertir la fase de iniciación de la carcinogénesis evitando el desarrollo de una neoplasia maligna invasora ^(9, 11, 13, 14).

La aplicación de fármacos en la prevención del cáncer es posible, teóricamente, porque las sustancias empleadas en quimioprofilaxis han demostrado actividad antimutagénica, antiproliferativa y antioxidante en mayor o menor grado ^(14,15), sin embargo, también representa una opción terapéutica, ya que se puede utilizar en individuos aparentemente sanos con riesgo de cáncer para prevenir o reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad invasiva.

Los agentes quimiopreventivos, pueden emplearse ya sea solos o en conjunto con otros para retrasar dichos procesos ⁽⁹⁾. Ejemplos de fármacos de quimioprevención eficaces que han sido estudiados incluyen fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINES), receptor-c-ligando (PPARC) activados por proliferadores de peroxisomas, y algunos compuestos presentes en la dieta como la aflatoxina B1, acrilamida, nitrosaminas entre otros ^(9, 14, 16).

La investigación de los efectos antitumorales en esta área, se centra a nivel celular. En general se ha determinado que el efecto principal de las sustancias

quimioprotectoras, es la inducción de la apoptosis y detención del ciclo celular (17,18).

Otros mecanismos potenciales pueden incluir actividad antioxidante, la inhibición de enzimas relacionados con la promoción de tumores, tales como la ciclooxigenasa (COX) y lipooxigenasa (LOX), la inhibición de activación de la proteína - 1 así como la inhibición de factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), angiogénesis, inhibición de la activación del NFκB, entre otras (9, 14, 17, 19).

Las sustancias con efecto quimioprotector influyen en muchas vías de señalización relacionadas con el tumor, pero los mecanismos específicos por los que inducen la apoptosis o efectos antitumorales aún no se han dilucidado o están el proceso de ello (9, 20).

1.5 EL ESTRÉS OXIDATIVO

El estrés oxidativo participa en la carcinogénesis, por ello se ha considerado como estrategia para la prevención del cáncer el reforzamiento de los mecanismos celulares de defensa antioxidante (21).

La utilización del oxígeno por parte de las células genera metabolitos tóxicos, denominados Especies Reactivas del Oxígeno (ROS), lo cual requirió el desarrollo de mecanismos antioxidantes por parte de las células. Cuando la generación de ROS supera la capacidad de los mecanismos de defensa, se desarrolla el estrés oxidativo (EO), caracterizado por el incremento de estas especies potencialmente dañinas para las biomoléculas, lo que lo involucra en diversas enfermedades, dentro de ellas, el cáncer (19, 21).

Las ROS son metabolitos parcialmente reducidos derivados del oxígeno. Son moléculas muy inestables, lo que les da una vida media extremadamente corta y la capacidad de reaccionar con todas las moléculas de importancia biológica. Dentro de las más importantes se encuentran el radical superóxido (O_2^-), el

peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el radical hidroxilo (OH) y el radical peroxinitrito^(6, 19, 22).

Las ROS se generan en el organismo a partir de fuentes endógenas y exógenas. En las fuentes endógenas destaca la cadena transportadora de electrones, a nivel de los complejos I y III, fundamentalmente, los mecanismos de defensa antimicrobiana (macrófagos y neutrófilos), vías metabólicas productoras de mediadores inflamatorios, como la síntesis de eicosanoides. Las fuentes exógenas son aún más variables, estas pueden ir desde las radiaciones ultravioleta (UV), tóxicos inhalados o presentes en la dieta y medicamentos, entre otros⁽²³⁾.

Los mecanismos de defensa antioxidante que permiten contrarrestar las ROS incluyen: barreras fisiológicas, enzimas (superóxido dismutasa, catalasa, glutatión peroxidasa-glutatión reductasa, peroxiredoxinas), reparadores del daño oxidativo (transferrina, hemoglobina, haptoglobina y ceruloplasmina) y compuestos antioxidantes como las vitaminas A, E y C y la coenzima Q10^(7, 19, 23, 24).

La alta generación de ROS ocasiona daño oxidativo a las moléculas de importancia biológica. El daño a las proteínas genera proteínas oxidadas y el daño a los lípidos origina lipoperóxidos y otros radicales libres; el daño al DNA se considera el suceso crucial en la carcinogénesis. Se han reportado al menos 100 diferentes tipos de lesiones oxidativas al DNA⁽¹⁹⁾.

El ataque oxidante a esta molécula puede ocurrir a nivel de las bases nitrogenadas originando modificaciones de bases, tales como la 8-hidroxi,2'-desoxiguanosina (modificación altamente mutagénica), el timidín glicol y la 8-hidroxi-citosina, o en el azúcar produciendo pérdida de la base nitrogenada, lo cual genera sitios apurínicos o apirimidínicos (sitios AP) que promueve entrecruzamientos o rupturas de una cadena o de las dos cadenas del DNA, ocasionando inestabilidad genética y mutaciones, ambos procesos involucrados en la carcinogénesis⁽²⁰⁾.

El cáncer es *per se* una enfermedad inductora de estrés oxidativo. Las alteraciones metabólicas de las células neoplásicas, la infiltración tumoral por células inflamatorias y los tratamientos oncológicos específicos contribuyen a elevar los niveles de estrés oxidativo en los pacientes con cáncer ^(19,20).

Los estudios de laboratorio y en animales, han brindado amplias evidencias que vinculan al estrés oxidativo con la carcinogénesis. Las evidencias de participación del estrés oxidativo en la carcinogénesis han conducido a la hipótesis de que los suplementos de antioxidantes pueden ser útiles en su prevención ⁽⁶⁾.

1.6 ETAPAS DE LA CARCINOGENESIS

La quimioprevención puede ser aplicada en las etapas que componen la carcinogénesis:

- a) *Iniciación*. Por medio de mutaciones y cambios epigenéticos se llevan a cabo los cambios iniciales que producen las células iniciadas.
- b) *Promoción*. Las células iniciadas se multiplican clonalmente, las cuales permiten la acumulación de mutaciones originando células con cambios fenotípicos que dan lugar a las lesiones preneoplásicas.
- c) *Progresión*. Fase en las células dañadas genética y epigenéticamente se conducen autónomamente hacia la formación de tumores ⁽²⁵⁾.

1.7 MODELO MODIFICADO DEL HEPATOCITO RESISTENTE

Los estudios en modelos experimentales ayudan a esclarecer los principales procesos biológicos alterados durante la carcinogénesis y también permiten estudiar los posibles mecanismos de acción de agentes quimioprotectores y la sinergia entre ellos.

Entre los modelos experimentales que permiten probar el efecto quimioprotector de sustancias sobre la presentación y desarrollo de cáncer hepático destaca el Modelo Modificado del Hepatocito Resistente (MMHR) en la rata. En este modelo se reproducen las etapas de la carcinogénesis en el hígado de la rata en un periodo relativamente corto, como primer paso se realiza la administración intraperitoneal (IP) del agente iniciador N-dietilnitrosamina (DEN), a una dosis de 200 mg/kg de peso; el día 7,8,9 se administra el agente promotor, el carcinógeno 2-acetil-aminofluoreno (2-AAF), en una dosis de 20 mg/kg de peso, vía intragástrica en tres dosis seriadas, la tercer y última intervención es el estímulo proliferativo, el cual se lleva a cabo con la realización de una hepatectomía parcial (HP) de tres quintas partes del hígado de la rata. En este modelo a los 30 días se observa el mayor número de lesiones preneoplásicas y a partir de los nueve meses el cáncer se desarrolla progresivamente en el 100% de los animales. (Fig.2)

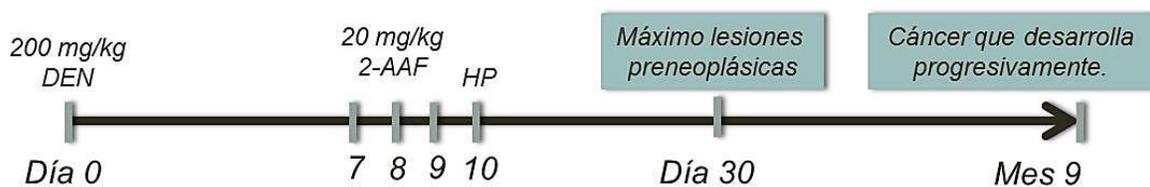


Fig.2. Modelo Modificado del Hepatocito Resistente. En este modelo con sólo tres intervenciones se reproducen las 3 etapas de la carcinogénesis en el hígado de ratas Fischer 344.

La DEN es el compuesto iniciador genotóxico que tiene la capacidad de inducir cambios estructurales en el DNA, genera una cantidad importante de ROS, produciendo a nivel celular estrés oxidativo, contribuye a la transformación celular maligna mediante daño directo al DNA, cambios en la expresión de proteínas y daño a lípidos ⁽⁶⁾.

Las isoformas del Citocromo P450 (CYP):CYP2E1, CYP1A1/2 y CYP2B1/2 son los bioactivadores de DEN ⁽¹¹⁾, que permiten la formación del ion etilcarbonio que genera daños al DNA por la formación de aductos etilados como la N7-etilguanina (N7ETG). Por la vía alterna genera una alta producción de nitritos ^(15, 26).

Los hepatocitos iniciados exhiben un fenotipo resistente, por la expresión de enzimas de detoxificación como la γ -glutamyl transpeptidasa (GGT) y la glutatión S-transferasa-P (GSTP) y son resistentes al efecto citotóxico del CCl₄, aflatoxina B1 y el 2-AAF ⁽²⁵⁾.

El compuesto promotor 2-AAF promueve selectivamente a los hepatocitos iniciados con fenotipo resistente, que junto con el estímulo de regeneración por la hepatectomía parcial, conllevan a la formación de focos de hepatocitos alterados (FHA) y lesiones menos transitorias conocidas como nódulos de hepatocitos, los cuales presentan gran estabilidad en ausencia de carcinógenos en los periodos subsecuentes con expresión abundante de las enzimas de detoxificación GGT y GSTP consideradas como importantes marcadores para la hepatocarcinogénesis química, lo que facilita la expansión clonal de las células preneoplásicas ^(15, 25).

Cada compuesto quimioprotector de interés puede ser estudiado bajo diferentes condiciones en el modelo, como puede ser diferente etapa, dosis o vía de administración.

1.8 ÉSTER FENÉTILICO DEL ÁCIDO CAFEICO (CAPE)

Entre las sustancias de origen natural a las que se les atribuye un efecto quimioprotector se encuentra el éster fenético del ácido cafeico (CAPE), que es un compuesto fenólico derivado del propóleo, posee un amplio espectro de actividades biológicas como antibacterial, anti-inflamatorio, antioxidante, antitumoral, antiproliferativo y neuroprotector ^(11, 15, 27).

El CAPE es un polvo de color blanco, cuya temperatura de almacenamiento es de -20 °C, es soluble en etanol, DMSO y acetato de etilo. Su fórmula empírica es $C_{17}H_{16}O_4$ y su peso molecular 284.31 g/mol ⁽²⁷⁾.

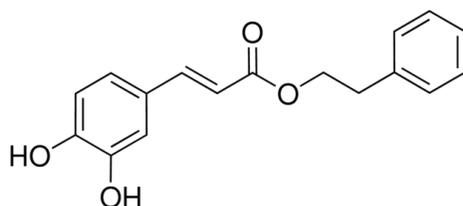


Fig. 3. CAPE. Estructura química del Éster fenetílico del ácido cafeico.

Las características principales del CAPE son su 3',4'-catecol del anillo el cual es importante para el potencial antioxidante y también permite capturar radicales libres. Los grupos hidroxilo disminuyen considerablemente su lipofilicidad y por lo tanto su capacidad de atravesar las membranas celulares (Fig.3).

Se ha reportado que el CAPE en dosis altas inhibe la proliferación celular y la síntesis de colágeno en células hepáticas de rata mientras que a dosis alta es capaz de producir apoptosis en hepatocitos ⁽²⁸⁾.

En estudios realizados en el MMHR se ha logrado disminuir la producción de ROS y la peroxidación lipídica, al ser administrado tanto en la iniciación como en la promoción a dosis única 20 mg/kg; CAPE disminuye la necrosis tisular observada 24 horas después de la administración de DEN, modificando la actividad enzimática, la cantidad de proteína, y los niveles de RNA mensajero de los citocromos 2B1/2, 1A1/2, 2E1, implicados en el metabolismo y bioactivación de la DEN además de inhibir la activación del NF- κ B ^(12, 15).

En estudios recientes se demostró que CAPE disminuye 88.8% la formación de la N7ETG a las 18 h después de la administración de DEN, con respecto a los controles ⁽¹⁵⁾.

En base a los estudios anteriores se ha propuesto que el mecanismo de quimioprotección observado en CAPE, consiste en modular los citocromos encargados del metabolismo y bioactivación de DEN, disminuyendo el estrés oxidativo, la necrosis y las especies químicas reactivas, previniendo de esta forma los eventos que conducen a la formación de células iniciadas.

1.9 ANÁLOGO LQM717

Por otro lado se han estudiado moléculas con estructura análoga al CAPE, buscando obtener compuestos que conserven la actividad biológica, además, que presenten ventajas como de ser económicos y de obtención fácil y rápida ⁽¹⁵⁾.

Un análogo es un fármaco cuya estructura se relaciona a la de otro fármaco pero sus propiedades químicas y biológicas pueden ser diferentes. El término “análogo” se refiere a compuestos químicos con una relación estructural cercana al compuesto padre. Se incluyen compuestos que tienen un parecido estructural, pero en donde uno o más átomos en su estructura han sido remplazados por otros. El término “derivados” se refiere a compuestos químicos que, al menos teóricamente, pueden ser obtenidos a partir de otro compuesto al que está estructuralmente relacionado. Un derivado químico debe mantener las características esenciales del compuesto padre incluyendo su estructura química básica; debe tener los grupos funcionales del compuesto padre sin modificar; mantener el número y posición de los dobles enlaces; mantener los sustituyentes y ser sustituido en los átomos de hidrógeno principalmente ⁽¹⁵⁾

La obtención del CAPE conlleva un proceso de extracción difícil de bajo rendimiento, proceso de purificación prolongado y su costo es elevado, por las propiedades terapéuticas que posee ha propiciado la síntesis de análogos que tengan la misma capacidad terapéutica de fácil obtención y con costos de producción económicos.

Uno de los análogos sintetizados es el denominado LQM717, el cual en estudios recientes ha demostrado tener un mayor efecto quimioprotector que CAPE en la reducción de las lesiones preneoplásicas y de tumores en el MMHR, ⁽¹⁵⁾ mostrando un poder terapéutico distinto al CAPE. El N-[(2-chlorophenyl)methyl]-Benzeneacetamide caracteriza por la ausencia de sustituyentes en el anillo A, la longitud de la cadena de unión entre los anillos A y B, así como el tipo de heteroátomos en la cadena y los sustituyentes en el anillo B (Fig.4).

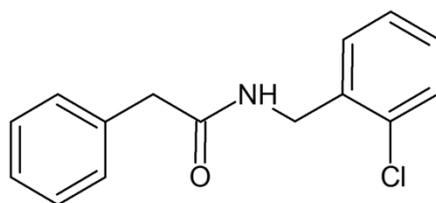


Fig.4. LQM717. Estructura química del N-[(2-chlorophenyl)methyl]-Benzeneacetamide.

El compuesto LQM717 administrado 12 h previas a la administración de DEN, disminuyó la formación del aducto N7EtG, la proliferación celular y la activación de NFκB, eventos suficientes para lograr la disminución en la formación de lesiones preneoplásicas y tumores, aunque los autores no descartaron otros mecanismos de acción.

El estudio del efecto de estas sustancias quimioprotectoras se ha realizado por separado, por lo tanto el realizar estudios sobre la posible sinergia terapéutica de éstas representa un campo de investigación prometedor.

II. JUSTIFICACIÓN

Dadas las características hipermutables de las células tumorales, la administración conjunta de dos sustancias con diferente efecto quimioprotector, tendrán un efecto sinérgico sobre la disminución de lesiones preneoplásicas en la fase de iniciación en el MMHR, por lo que se plantea como una posible aplicación en la quimioprevención tanto en animales como en el ser humano.

III. HIPÓTESIS

La administración conjunta de dos sustancias quimioprotectoras, tendrá un efecto sinérgico sobre la disminución de las lesiones preneoplásicas en un modelo de hepatocarcinogénesis química en ratas.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto quimioprotector de la administración conjunta del éster fenético del ácido cafeico y el análogo LQM 717, en la fase de iniciación en el MMHR.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

1. Establecer la dosis mínima de CAPE y LQM717, mediante la cuantificación de las lesiones preneoplásicas a 30 días, mediante la reacción histoquímica a la enzima gama glutamil transpeptidasa.

2. Determinar el efecto de la administración conjunta de CAPE-LQM717, sobre:

- a) El estrés oxidativo inducido 12h pos DEN, mediante la prueba de lipoperoxidación y ROS.
- b) El daño toxicológico inducido 48h pos DEN, mediante la determinación del área de necrosis por análisis histológico con la tinción convencional H-E.
- c) La proliferación celular inducida 48h pos DEN, cuantificando la inmunexpresión de Ki 67 mediante técnica inmunohistoquímica.
- d) La expresión de las enzimas de detoxificación hepática, gamma glutamil transpeptidasa y glutatión S-transferasa-P, a los 30 días, mediante histoquímica e inmunohistoquímica, respectivamente.

V. METODOLOGÍA

El estudio se realizó en 184 ratas Fischer-344, machos, de 180 a 200 g de peso. Las ratas se obtuvieron y mantuvieron en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV. Las condiciones de alojamiento que se emplearon fueron bajo un ambiente controlado e higiénico con temperatura de 23 °C, ciclos de 12 h luz/obscuridad y acceso libre a alimento y agua. El manejo de los animales se realizó en base a la NOM-062-ZOO-1999.

El proyecto se desarrolló en 2 etapas. Durante la primera etapa se trabajó con un total de 100 animales distribuidos en 10 grupos, 5 grupos para estudiar las dosis de 20, 10, 5 y 2.5 mg/kg de CAPE y 5 para dosis equimolares de LQM717, esto con la finalidad de determinar el efecto de la dosis mínima quimioprotectora, mediante la determinación de focos GGT positivos (Fig.5A).

En la segunda etapa se trabajó con 4 grupos: El primero fue el grupo dimetilsulfóxido (DMSO), ya que este compuesto es el vehículo de administración de CAPE y LQM717, en el grupo 2 se administró la dosis quimioprotectora mínima del CAPE, al grupo 3 se administró la dosis mínima del análogo y en el grupo 4 se llevó a cabo la administración conjunta de ambos compuestos. Estos protocolos son considerados en el diseño de esta investigación como pretratamientos y fueron administrados intraperitonealmente a los animales 12 horas previas a la administración del agente iniciador DEN.

En todos los grupos se inició la inducción de la carcinogénesis según el MMHR. La N-dietilnitrosamina, el 2-acetil-aminofluoreno (2-AAF) fueron adquiridos en Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO).

Todos los grupos estuvieron conformados por 21 animales cada uno, a los cuales se les aplicó la eutanasia en 4 diferentes tiempos después de la iniciación de acuerdo al análisis a realizar (Fig. 5).

- *1er Tiempo: 12 h post DEN.*

En este tiempo se sacrificaron 4 animales por grupo para evaluar el efecto de los compuestos sobre el estrés oxidativo, desbalance importante para la transformación celular maligna.

- *2do Tiempo: 48 h post DEN.*

En el segundo tiempo se sacrificaron 4 animales de cada grupo para cuantificar el efecto de los compuestos sobre la necrosis inducida por la DEN.

- *3er Tiempo: 30 días TC.*

A las 7 ratas restantes de cada grupo se les administró el TC en los tiempos establecidos en el MMHR sacrificándolas 30 días pos iniciación, para establecer el efecto de los compuestos sobre la presentación de lesiones preneoplásicas.

Como una prueba adicional en el presente estudio se sacrificaron ratas a los 11 meses pos TC para evaluar el efecto de la administración conjunta sobre la presentación de tumores.

- *4to tiempo (Adicional): 11 Meses TC.*

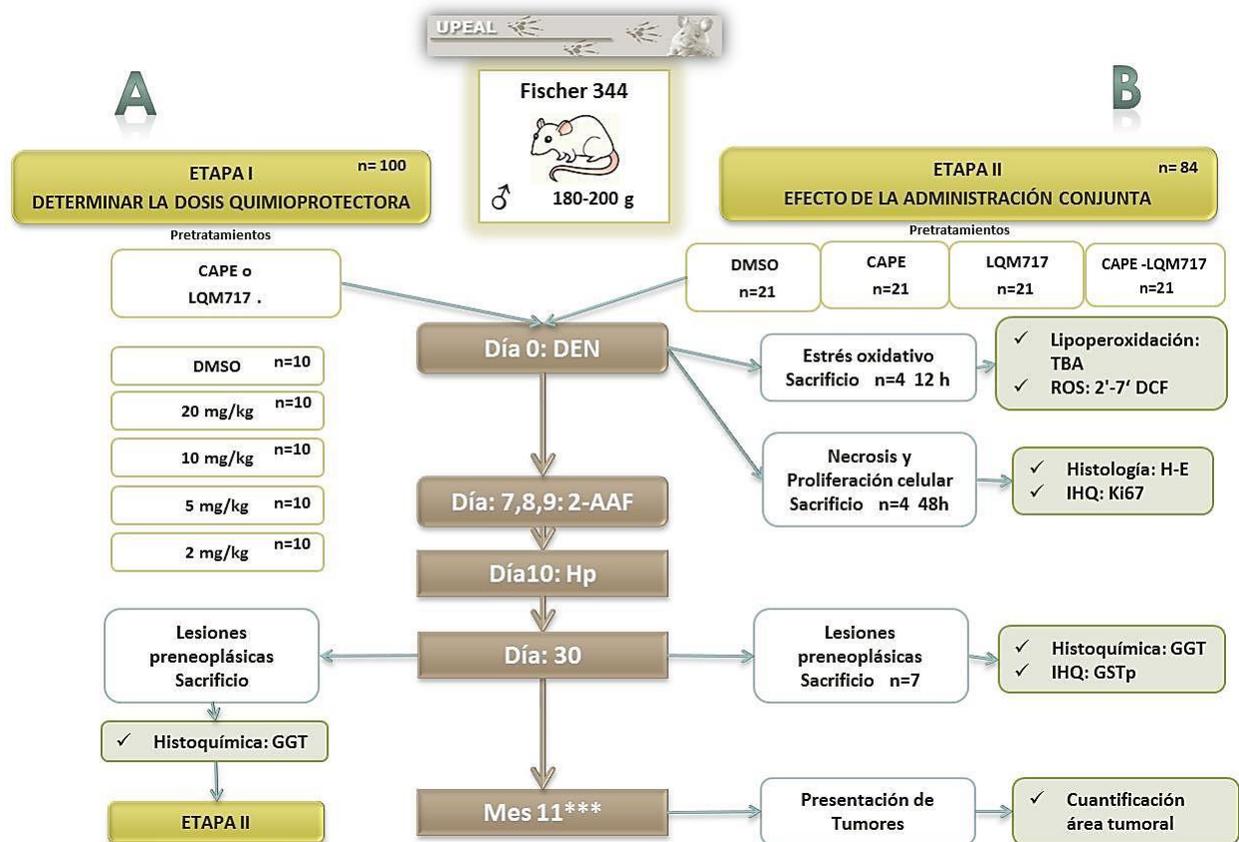


Fig. 5. Diseño experimental: Diagrama detallado de las dos etapas del proyecto de investigación. A: Durante la etapa 1 se determinó la dosis mínima a emplear de cada compuesto. B: En la etapa 2 los compuestos se trabajaron sus dosis efectivas mínimas administrados de manera individual y conjunta con su respectivo grupo testigo. ***Durante esta etapa se contempló el sacrificio de animales de cada grupo a los 11 meses del MMHR, con la finalidad evaluar y correlacionar el efecto sobre la presentación de tumores y el efecto en las lesiones preneoplásicas.

Posteriormente al sacrificio se llevó a cabo la extracción del hígado, el cual fue lavado en PBS a pH 7.4 para la posterior obtención de tres porciones de los diferentes lóbulos, los cuales fueron conservados en el agente crioprotector 2-metil-butano, sumergidos en nitrógeno líquido y almacenados a - 70°C hasta el momento de su empleo. Otra porción de cada lóbulo se fijó en formalina acuosa amortiguada al 4 % a una temperatura de 4°C, para su posterior deshidratación e inclusión en parafina. Los restos de cada hígado fueron congelados con nitrógeno líquido, para su almacenamiento a - 70 °C en el ultracongelador.

Para determinar que los compuestos CAPE y el LQM 717 se encontraban en condiciones óptimas de pureza, se realizó una resonancia magnética nuclear previa a la administración en los animales ^{Apéndice A}.

5.1 HISTOQUÍMICA DE LA ENZIMA GAMA GLUTAMIL TRANSPEPTIDASA.

La histoquímica es la técnica que estudia la localización topográfica de sustancias químicas y actividades metabólicas a nivel de tejido, células u organelos, conservando su estructura lo más íntegra posible ⁽²⁹⁾. La histoquímica enzimática se basa en la capacidad que tienen algunas enzimas del tejido de mantener funcional su centro activo, las células que poseen dichas enzimas se ponen de manifiesto mediante una reacción que convierte a sustratos solubles e incoloros en productos insolubles y coloridos. Los sustratos son específicos para la enzima y los productos se depositan en el lugar preciso donde se produjo la reacción, es decir, donde se localiza la enzima ⁽²⁹⁾.

Para la cuantificación de las lesiones preneoplásicas se empleó como marcador de daño hepático a la enzima GGT. La tinción histoquímica se realizó de acuerdo al método de Rutenburg (1969), se utilizó como sustrato la gamma glutamil-1,4-metoxi-2-naftilamida (GMNA), la cual es hidrolizada por la enzima y se libera el 1,4-metoxi-2-naftilamida (MNA), éste reacciona con la sal de diazonio presente en la mezcla de reacción para formar un colorante insoluble, el cual posteriormente

es quelado por el ión cúprico produciéndose una coloración rojo intenso en el sitio de la actividad enzimática.

Se empleó el criostato para obtener secciones de tejido congelado de 20 μ de espesor para su montaje en portaobjetos previamente gelatinizados. Las secciones montadas de tejido fueron fijadas en etanol al 96% durante 5 min a -20 °C, posteriormente fueron incubadas durante 20 min a temperatura ambiente en una solución de 2.5 mg/mL de GMMA, 0.5 mg/mL de glicil-glicina (Sigma Chemical) y 0.5 mg/mL de azul rápido (Sigma Chemical) en 25 mM de tris; concluido el tiempo de incubación se lavó brevemente con agua destilada y el precipitado de la actividad enzimática se fijó con una solución de sulfato cúprico 100 mM⁽³⁰⁾.

Las imágenes se captaron con una cámara digital NIKON COOLPIX P5100 y el posterior análisis se realizó empleando el software especializado ImagePro Express (Fig.6).

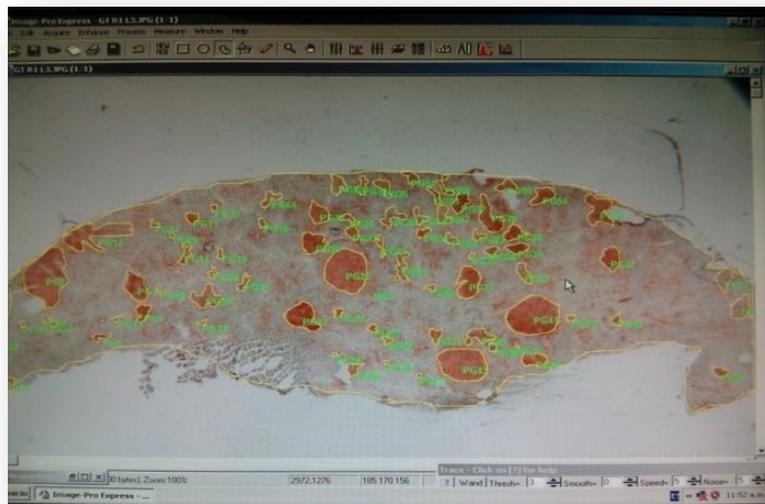


Fig. 6. Análisis de imágenes con el software ImagePro Express. El software ImagePro Express permite el análisis de imágenes con fines científicos realizando mediciones en base a unidades de calibración espacial predefinidas con exportación de datos a Microsoft® Excel para su posterior análisis.

5.2 HISTOLOGÍA.

La técnica histológica es un conjunto de procedimientos aplicados a un material biológico con la finalidad de prepararlo y conferirle las condiciones óptimas para poder observar, examinar y analizar sus componentes morfológicos por medio del microscopio.

La inclusión en parafina es una perfusión de la misma en los tejidos para crear un medio homogéneo, que permita la realización de los cortes de menor grosor con una precisión mayor que cuando los mismos se realizan por congelación^(29, 31).

Para el estudio morfológico las muestras se fijaron en formalina acuosa amortiguada al 10%, a 4°C durante 48 h, posteriormente las muestras fueron colocadas en histocassetes y se deshidrataron e incluyeron mediante el método de inclusión en parafina por medio de microondas⁽¹³⁾, con inmersiones consecutivas en soluciones crecientes de etanol: R-OH al 70% (2 cambios), R-OH 80%, R-OH 90% (2 cambios), al R-OH 96% (2 cambios) R-OH al 100% (3 cambios) y Xileno (2 cambios), en cada uno de los cambios las muestras se introdujeron en el microondas durante 1 min (potencia media-alta) y se mantuvieron en reposo durante 15 min antes de pasar al siguiente alcohol. Una vez terminado el proceso se sumergieron en 2 cambios de parafina y se incluyeron en bloques. Se realizaron cortes del tejido de 4 µ de espesor con el micrótopo Leica RM 2125 RT.

Las secciones de tejido embebidas en parafina, se sometieron al proceso de desparafinado y rehidratado para su posterior corte a 4 µm de grosor. Las secciones fueron teñidas con hematoxilina y eosina; el montaje final se realizó con resina sintética.

5.2.1 Tinción de hematoxilina y eosina.

El procedimiento de tinción consiste en que una estructura celular o tisular adquiera específicamente un color bajo la acción de una sustancia colorante.

Se considera que una estructura se ha coloreado o teñido cuando al ser lavada con el líquido que disuelve al colorante, no se decolora. El colorante se une a la sustancia coloreable combinándose con ella íntimamente debido a la presencia de agrupaciones moleculares ácidas o básicas en los componentes celulares o tisulares que se unen respectivamente a los cromógenos básicos y ácidos de los colorantes, formando sales insolubles.

La coloración de hematoxilina - eosina se considera como la técnica de tinción de uso más frecuente en el estudio de células y tejidos, permite tener una herramienta sencilla para determinar si existe daño tisular. Consiste en la tinción de los núcleos mediante una hematoxilina, previamente oxidada y transformada en hemateína a la que se le añade una sustancia mordiente para formar una laca (para tal fin se usan sales metálicas de aluminio, plomo o hierro). Los núcleos se colorean de azul, azul morado, violeta, pardo oscuro o negro, dependiendo de los agentes oxidantes y mordientes que se utilizaron. El citoplasma y material extracelular es teñido por la eosina, que les confiere diversos grados de color rosado ⁽³²⁾.

La detección de la necrosis en el tejido hepático se realizó en base al análisis de imágenes, identificando pérdida de la arquitectura tisular (zonas con ausencia de hepatocitos) adyacente a las venas centrales con presencia de infiltrado mononuclear. Se capturaron un total de 10 campos al azar de los 3 lóbulos hepáticos por rata a un aumento de 10X.

La obtención del porcentaje de área necrosada se realizó restando está del área total visualizada sobre el campo.

Las imágenes se captaron con una cámara digital NIKON COOLPIX P5100 acoplada a un adaptador para microscopio; posteriormente las imágenes se analizaron con el software especializado ImagePro express.

5.3 INMUNOHISTOQUÍMICA

Técnica en la cual se emplean anticuerpos para detectar antígenos en un corte o sección de tejido biológico. Utilizando la unión específica de los anticuerpos con los antígenos, es posible localizarlos y visualizarlos cortes histológicos gracias a que los anticuerpos específicos están marcados con fluoróforos o enzimas ⁽²⁹⁾.

Se realizaron cortes seriados de 3 μ de espesor de las muestras incluidas en parafina provenientes de ratas sacrificados 48h posteriores a la administración de DEN, para la detección de Ki67 y de ratas sacrificadas 30 días post TC para la detección GSTp, los cortes se montaron en portaobjetos silanizados y se desparafinaron a una temperatura entre 58 a 60°C durante toda la noche. Posteriormente se rehidrataron en el tren de corrida (Xilol I, Xilol II, Xilol/Alcohol, Alcohol 96°, Alcohol 80°, alcohol 60° y H₂O desionizada mediante 50 sumergidas en vasos de coplin. Los antígenos fueron expuestos en buffer de citratos 10 Mm pH 6.0 en una olla de presión por 30 min. Una vez enfriados los tejidos se permeabilizaron 10 min con TBS-Tritón 0.2%, e incubaron en H₂O₂ al 0.3% en metanol por 20 min a TA, transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados con TBS 1X para el proseguir con el bloqueo de sitios inespecíficos con Cas-Block (Cat. 00-8120, Zymed) durante 20 min en cámara húmeda para Ki67 y en albumina sérica bovina (BSA) al 2% para GSTp. Se agregó el anticuerpo primario diluido en Cas-Block 1:50 para Ki-67 (abcam ab66155) o en BSA 2% para GST-p (Santa Cruz sc-28494) respectivamente, incubando a 4°C durante toda la noche. Se realizó un lavado con TBS-Tween al 0.1% y Tween 1X para agregar el anticuerpo secundario anti-rabbit-HRP (Santa Cruz sc-2357) a una dilución de 1:150 para Ki67 y anti-goat-HRP (Invitrogen 81-1620) para GSTp e incubarlo durante 60 min a temperatura ambiente, finalizando el periodo de incubación se lavó con TBS-Tween al 0.1% y Tween 1X.

El revelado de la inmunotinción se realizó colocando un 1 mL de H₂O desionizada, una gota del reactivo 1 (Sustrato buffer), 2 (Solución DAB) y 3 (Peróxido de hidrogeno) del DAB-Plus substrato Kit (Cat. 00-2020, Zymed, San Fco.California

USA). En cuanto se observó un color marrón en el sitio esperado se detuvo la reacción sumergiendo los tejidos en H₂O desionizada. La contratinción se realizó con hematoxilina y la deshidratación de los tejidos en el tren de corrida inverso para finalizar con el montaje en resina sintética.

5.3.1 Ki 67

El valor pronóstico de los marcadores tumorales de proliferación celular ha sido tema de múltiples estudios. El antígeno ki67 es una proteína altamente relacionada con la proliferación celular debido a la correlación existente entre el marcaje del antígeno ki67 de los nucléolos durante las fases G1, S, G2 y M (ausente en la fase G0), y el grado histopatológico de las lesiones malignas y supervivencia de los pacientes ⁽³³⁾.

La inmunexpresión de Ki67 fue determinada empleando la técnica de inmunohistoquímica, el número de núcleos positivos fue cuantificado mediante el software especializado ImagenJ, en el cual se analizaron 10 campos tomados al azar, a un aumento de 10X por segmento de tres ratas por grupo. Los datos fueron sometidos al análisis y el análisis estadístico con ANOVA seguida del test de Tukey mediante el software GraphPad Prism 4.

5.4 MÉTODO PARA MEDIR LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA EN HÍGADO DE RATA.

La peroxidación lipídica es uno de los indicadores más utilizados para evaluar la formación de radicales libres, indicadores clave de estrés oxidativo.

Los ácidos grasos insaturados presentes en las membranas celulares son un blanco común de los radicales libres. Las reacciones ocurren típicamente en cadena donde un radical libre captura un hidrógeno del carbono insaturado para formar agua. Esto deja un electrón desapareado en el ácido graso que es capaz de capturar el oxígeno, formando un lipoperóxido, el cual es inestable y se descompone para formar una serie compleja de compuestos, que incluyen compuestos de carbonilo reactivos, tales como malondialdehído (MDA) (Fig.7).

Para estudiar sí el mecanismo quimioprotector de la administración conjunta de CAPE y su análogo está relacionado con una actividad antioxidante, se evaluaron sus efectos sobre la lipoperoxidación y la presencia de ROS inducida por la metabolización de DEN.

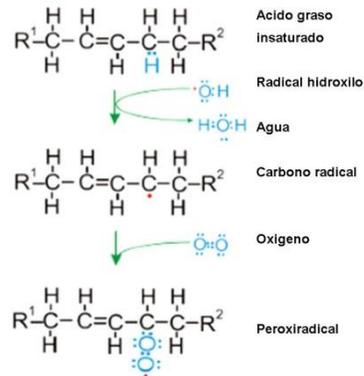


Fig. 7 Lipoperoxidación. Cuando un ácido graso insaturado es atacado por un radical hidroxilo este roba un hidrogeno para formar agua, lo que predispone a la interacción con oxígeno para formar un peroxirradical inestable.

Debido a que la detección de las especies reactivas de oxígeno es difícil por su corta vida media, se utilizan indicadores químicos indirectos para su cuantificación.

Se empleó el ensayo de las especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) que es el método más frecuente para determinar el grado de lipoperoxidación membranaral debido a su sensibilidad y simplicidad. La prueba determina la concentración de MDA, como principal metabolito formado por el rompimiento de ácidos grasos poliinsaturados resultantes de la peroxidación lipídica. El MDA ha sido identificado como un producto que reacciona con el ácido tiobarbitúrico formando cromóforos con absorción a 550 nm de longitud de onda ⁽²²⁾ (Fig.8).

Los resultados se expresan como nano molas de MDA/miligramo de proteína.

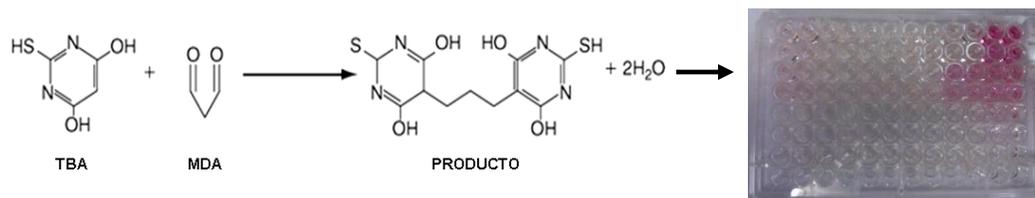


Fig. 8. La reacción entre el TBA y el MDA. El MDA es el principal metabolito formado por el rompimiento de ácidos grasos poliinsaturados, este reacciona con el TBA formando un producto colorido que se puede monitorear a 550 nm de longitud de onda.

Para el ensayo se pesaron 30 mg de hígado congelado el cual fue homogeneizado en 1 mL de buffer 100 mM Tris-Base, 150 mM NaCl y 1mM PMSF pH 7.4. Del homogeneizado total se colocaron 50µl en un tubo de tapa con rosca y se adicionaron 30 µL del buffer Tris 150 Mm pH 7.4 más 300 µL de TBA al 0.4% disuelto en ácido acético al 20% (pH 3); la mezcla se homogeneizó e incubó en el termoblok TECHNE DRI-BLOCK DB2A, 1h a 100°C. Posteriormente las muestras se colocaron en hielo durante 10 min, transcurrido el tiempo se agregó 200µL de KCL al 1.2% y 500 µL de piridina/butanol en proporción 1:15 para su centrifugación a 7500 rpm durante 15 min a 4°C. Del sobrenadante se tomaron 200µL para transferirlas por duplicado a una placa de 96 pozos y realizar la medición en un lector de placas a 532 nm de longitud de onda ⁽³⁴⁾.

Además, se realizó una dilución 1:10 del homogeneizado para determinar la concentración de proteínas por medio del método de Bradford.

5.4.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE BRADFORD.

Método colorimétrico para la cuantificación de proteínas. Se basa en la unión de un colorante, Comassie Blue G-250 a las proteínas. El colorante, en solución ácida, existe en dos formas una azul y otra naranja. Las proteínas se unen a la forma azul para formar un complejo proteína-colorante con un coeficiente de extinción mayor que el colorante libre. Este método es sensible (1-15 µg), simple,

rápido, barato y pocas sustancias interfieren en su determinación. Entre las sustancias que interfieren están los detergentes y las soluciones básicas ⁽³⁵⁾.

Para determinar proteínas fue necesario preparar el reactivo Bradford 5X. En el primer pozo se colocó una alícuota de 40 μL de muestra diluida en 280 μL de PBS 1X y se llevó a 400 μL con el reactivo Bradford, en el pozo 2, 3, 4, 5, 6 fueron colocados 160 μL de PBS y 40 μL de reactivo Bradford. Del pozo 1, 100 μL fueron transferidos al pozo 2 después de homogeneizar por pipeteo se transfirieron 100 μL al pozo 3 y así sucesivamente hasta el pozo 5 del cual se desecharon los 100 μL ya que el pozo 6 fue usado como blanco.

La absorbancia fue leída a 595 nm de longitud de onda en el lector de ELISA. Se realizó una curva patrón de solución madre de BSA (1mg/mL) con: 0,5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.312 y 0.156 μg de BSA.

Los resultados se analizaron a través del análisis de varianza (ANOVA), seguido por el test de Tukey, con una $p < 0,05$ como nivel de significancia con el software especializado para análisis estadísticos GraphPad prism 4.

5.5 MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE ROS EN HÍGADO DE RATA.

La oxidación de diclorofluorescín 2'-7' (H₂DCF) a 2'-7'diclorofluoresceína (DCF) se ha utilizado muy ampliamente para la cuantificación de H₂O₂. La forma diacetato, H₂DCFDA y su acetoximetil éster H₂DCFDA-AM son tomados por células, en las que esterasas no específicas celulares, actúan sobre él para escindir los grupos lipófilos, lo que resulta en un compuesto cargado que se queda atrapado dentro de la célula.

La oxidación de H₂DCF por ROS convierte a la molécula en 2'-7' diclorofluoresceína (DCF), que es altamente fluorescente (Fig.9). Las longitudes de onda reportadas para la medición de la fluorescencia de DCF son 498 nm para la excitación y 522 nm para la emisión.

Originalmente se pensaba, que la DCF era específica para el peróxido de hidrógeno, pero evidencia reciente ha demostrado que otras ROS tales como nitrato y ácido hipocloroso pueden oxidar H₂DCF ⁽³⁶⁾.

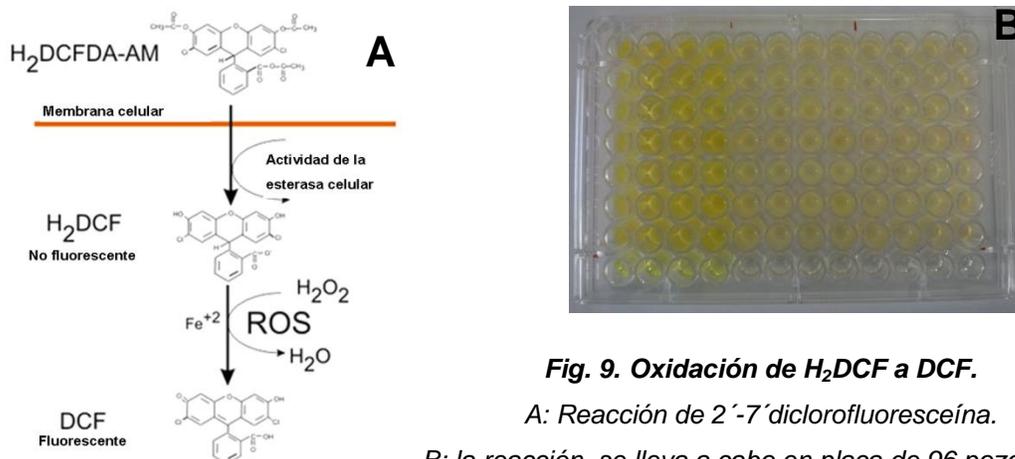


Fig. 9. Oxidación de H₂DCF a DCF.

A: Reacción de 2'-7'diclorofluoresceína.

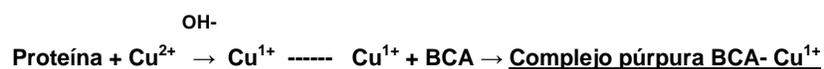
B: la reacción se lleva a cabo en placa de 96 pozos en la cual la fluorescencia puede ser leída a 522 nm de emisión.

Las ROS fueron detectadas mediante la reacción de la DCF. Para esta prueba se pesaron 50 mg de hígado conservado a -80°C, el cual fue homogeneizado en 1 mL de buffer 100 mM Tris-Base, 150 mM NaCl y 1mM PMSF pH 7.4.

En una placa de 96 pozos se colocó 40 µl del homogeneizado más 10 µL diclorofluoresceína a 100 µM y 50 µL de TRIS 150 mM. La placa se envolvió en aluminio para proteger de la luz e incubó 1 h a 37 °C en el equipo Heidolph Unimax 1010, transcurrido el tiempo se leyó a fluorescencia de 515 nm de emisión y 480 nm de excitación en el equipo lector de fluorescencia TRF, FI, FRET, absorbencia y lector de microplacas de luminiscencia TECAN GENious. La fluorescencia se corrigió restando blancos en cada experimento (DCF en buffer).

5.5.1 DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DEL ÁCIDO BICINCONÍNICO.

El ácido bicinconínico es un compuesto capaz de formar un complejo púrpura intenso con iones Cu^{1+} en medio alcalino. Este reactivo forma la base de un método analítico capaz de monitorizar el ión cuproso producido en una reacción entre las proteínas con Cu^{2+} en medio alcalino (reacción de Biuret). La estabilidad del reactivo y el cromóforo proporciona un método para la cuantificación de proteínas que es sencillo, rápido, muy sensible, y que muestra una gran tolerancia a compuestos que afectan a otros métodos ⁽³⁴⁾.



La mezcla de trabajo se realizó mezclando 100 partes de ácido bicinconínico más 2 partes de sulfato cúprico (B9643-1L Sigma Chemical). En una placa de 96 pozos se colocaron 10 μL de la muestra más 200 μL de la mezcla de trabajo. La placa fue incubada en termoblok durante 10 min a 90°C , posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente durante 10 min y se leyó a 570 nm en el lector de ELISA. Se realizó una curva estándar en base a 5 puntos de BSA 0, 1.25, 2.5, 5, 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

VI. RESULTADOS

6.1 DETERMINACIÓN DE LA DOSIS MÍNIMA QUIMIOPROTECTORA DEL CAPE Y LQM717

En el presente estudio mediante inmunohistoquímica de GGT se probaron los efectos de la administración a dosis menores a la del marco de referencia (Fig. 10 y 12), para la realización del análisis, sobre el número de focos y el porcentaje de área positiva (Fig. 11 y 13), para ello se emplearon las dosis de 20, 10, 5 y 2 mg/kg para CAPE y dosis equimolares para LQM717.

El Grupo de CAPE a 20mg/kg mostró una diferencia estadística mayor en la reducción del número de focos y el % de área GGT+ en relación al grupo control (Fig. 12)

En el grupo del LQM 717, a 10 mg/kg evidenció el mayor efecto en la reducción tanto del número de focos como el porcentaje de área, superando así a la dosis reportada de 18 mg/Kg (Fig.13B), la cual solo igualó esta representatividad estadística en el % de área (Fig. 13A).

Esta información se usó como referente para establecer las dosis para la administración conjunta.

Una vez determinado el efecto del pretratamiento de los compuestos sobre las lesiones preneoplásicas en el MMHR en la rata, los efectos de la administración conjunta se compararon con la de CAPE y LQM717 administrado de forma individual.

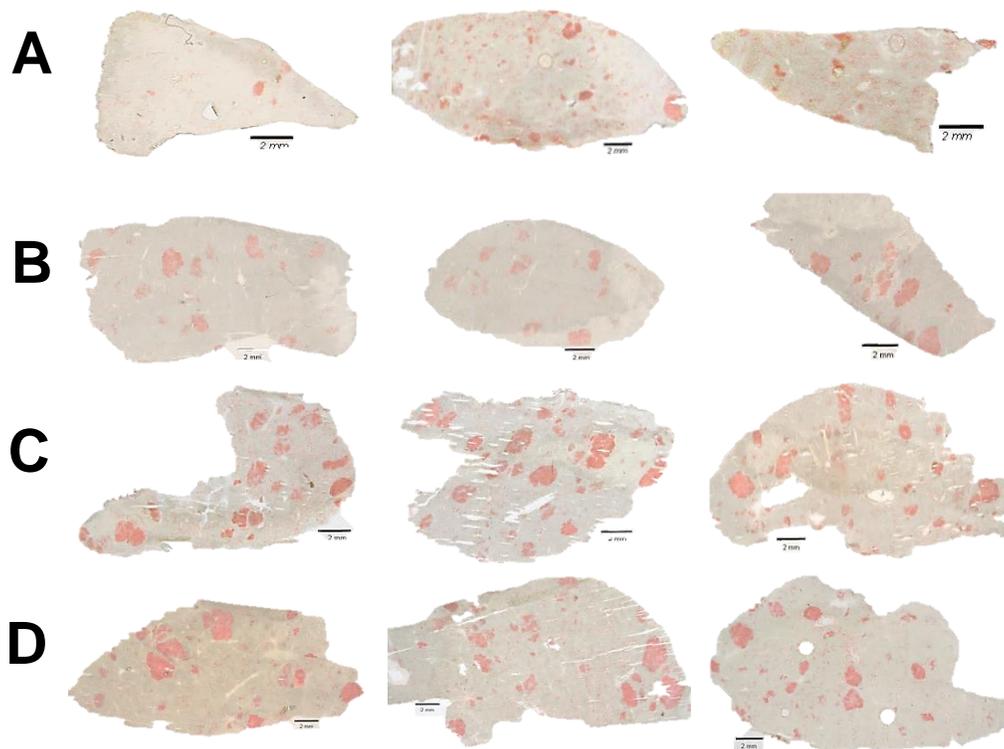


Fig.10. Reacción GGT positiva al pretratamiento con distintas dosis de CAPE. El grupo administrado con 20 mg/Kg manifestó la menor cantidad de sitios de producción cuya tonalidad es rojiza. Los focos GGT positivos son considerados lesiones preneoplásicas en el MMHR. . Histoquímica, 20 μ m. Imagen macroscópica.
 A: 20 mg/Kg, B: 10 mg/Kg, C: 5 mg/Kg, D: 2.5 mg/Kg.

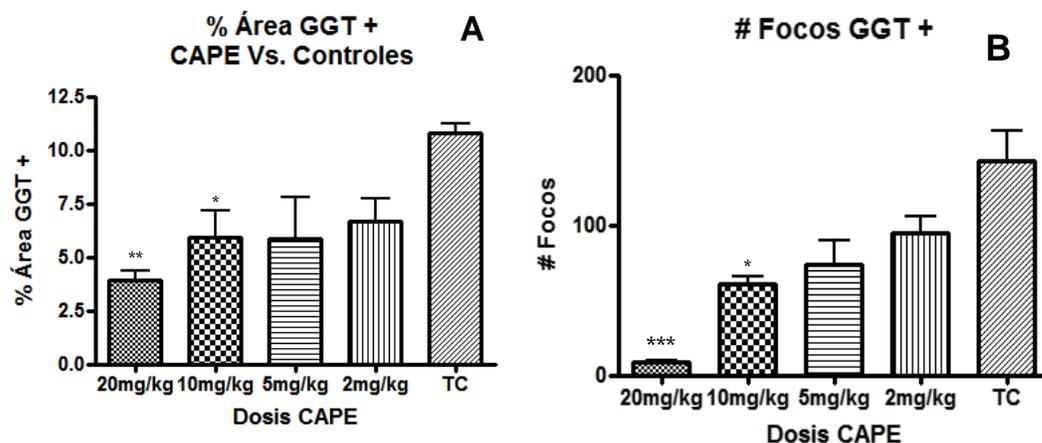


Fig.11. Dosis CAPE. Análisis ANOVA para porcentaje de área de la GGT+/tejido(A) y número de focos (B) considerados como FHA. Secciones de tres lóbulos/rata/ tratamiento (n=6) fueron analizadas. En el grupo NT so se detectaron focos GGT+. Los grupos con pre tratamiento fueron comparadas con el grupo (DMSO + TC), siendo el grupo pretratado con 20 mg/Kg, el de mayor diferencia estadística. $P = < 0.0001$ ***

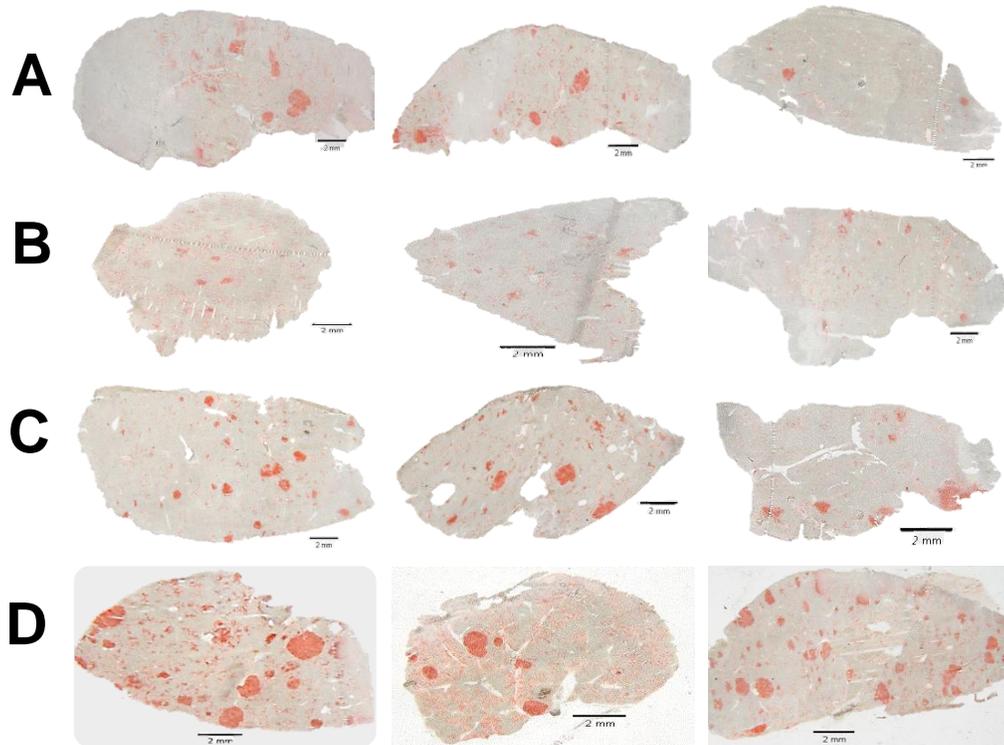


Fig. 12. Reacción GGT positiva al pretratamiento con distintas dosis de LQM717. El grupo administrado con 10 mg/Kg manifestó la menor cantidad de sitios de producción cuya tonalidad es rojiza. Los focos GGT positivos son considerados lesiones preneoplásicas en el MMHR.
 . Histoquímica, 20 μ m. Imagen macroscópica.
 A: 20 mg/Kg, B: 10 mg/Kg, C: 5 mg/Kg, D: 2.5 mg/Kg.

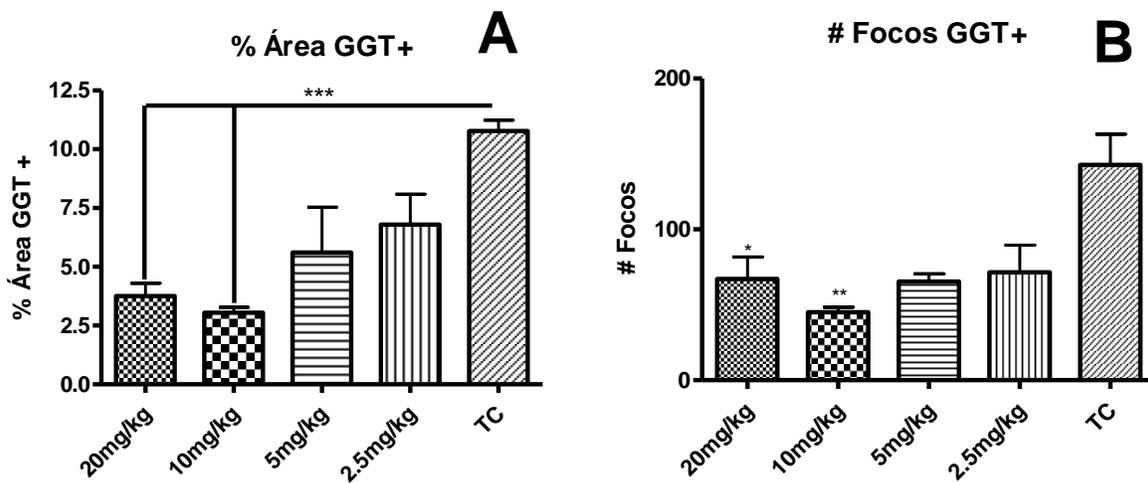


Fig.13. Dosis LQM717. Análisis ANOVA para porcentaje de área de la GGT+/tejido(A) y número de focos (B) considerados como FHA. Secciones de tres lóbulos/rata/ tratamiento (n=6) fueron analizadas. En el grupo NT so se detectaron focos GGT+. Los grupos con pre tratamiento fueron comparadas con el grupo (DMSO + TC), siendo el grupo pretratado con 10 mg/Kg, el de mayor diferencia estadística en el % de área. $P = < 0.0001$ ***

6.2 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE LA NECROSIS TISULAR HEPÁTICA

Para analizar el efecto quimioprotector sobre el daño toxicológico a nivel tisular producido por el metabolismo de DEN, se realizó el estudio histopatológico 12h posteriores a su administración (Fig.14). En los grupos LQM717 y administración conjunta se observa inicio de daño tisular predominante al área circundante de venas hepáticas (Fig. 14B y C, Cabeza de flecha), desprendimiento de la membrana basal, pérdida de la arquitectura acordonada de hepatocitos así como distintos daños degenerativos en las células. En el grupo CAPE no se observaron dichos cambios (Fig. 14A).

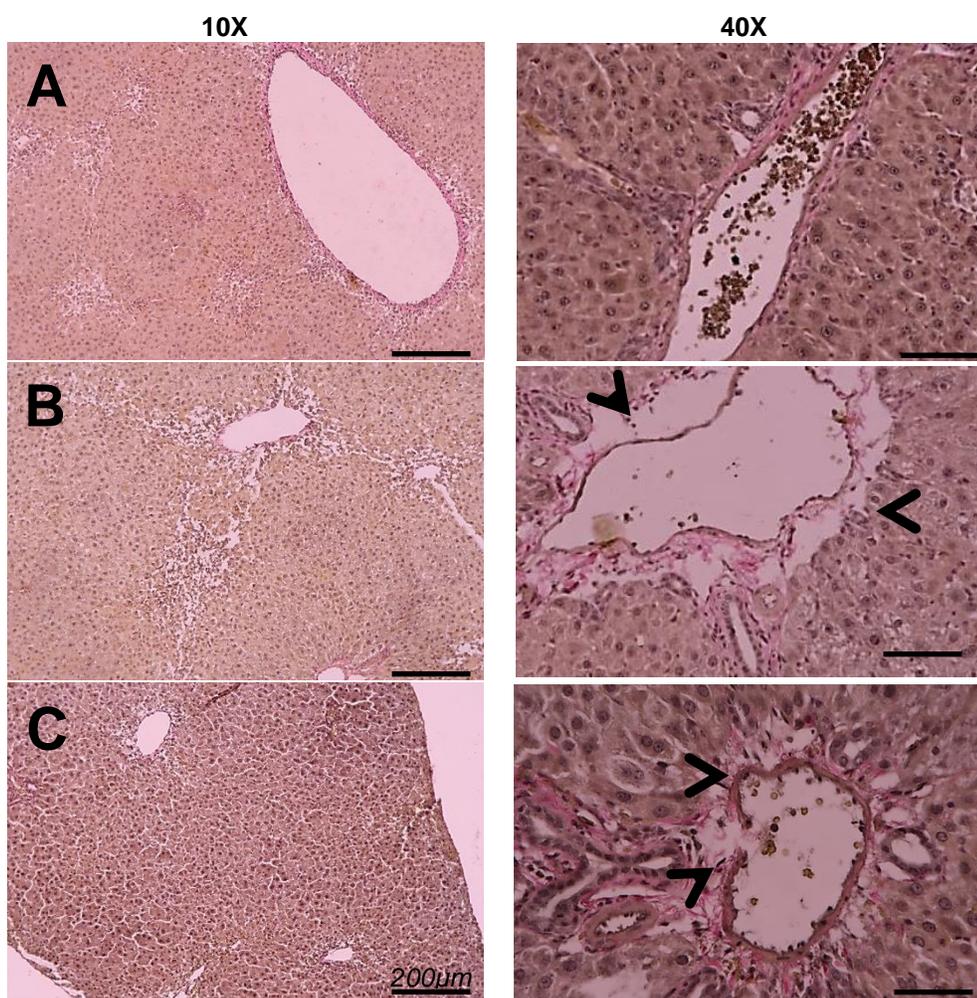


Fig.14. Inicio de daño tisular 12 h pos DEN. La respuesta tisular hepática al metabolismo de la DEN de los grupos pre tratados fue realizado a las 12h pos administración (Tiempo1), en el cual se observó daño tisular en venas centrolobulillares con desprendimiento de membrana basal vascular.

Las cabezas de flecha señalan las zonas dañadas. Histología. Tricrómica de Van Gieson,

10 y 40X. A: CAPE+DEN, B: LQM717+DEN, C: CAPE-LQM717 + DEN.

El punto máximo de daño se estableció a las 48 horas posteriores a la administración de DEN. El pre tratamiento disminuyó la necrosis tisular masiva producida por el metabolismo de DEN en relación al grupo DMSO-DEN (Fig. 15B, C, D), sin embargo no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos con pretratamiento (Fig. 15F). Los tratamientos protegieron de la necrosis hepática en un 55.7% (CAPE), 60.5% (LQM717) y 65.9 % (CAPE-LQM717) respectivamente.

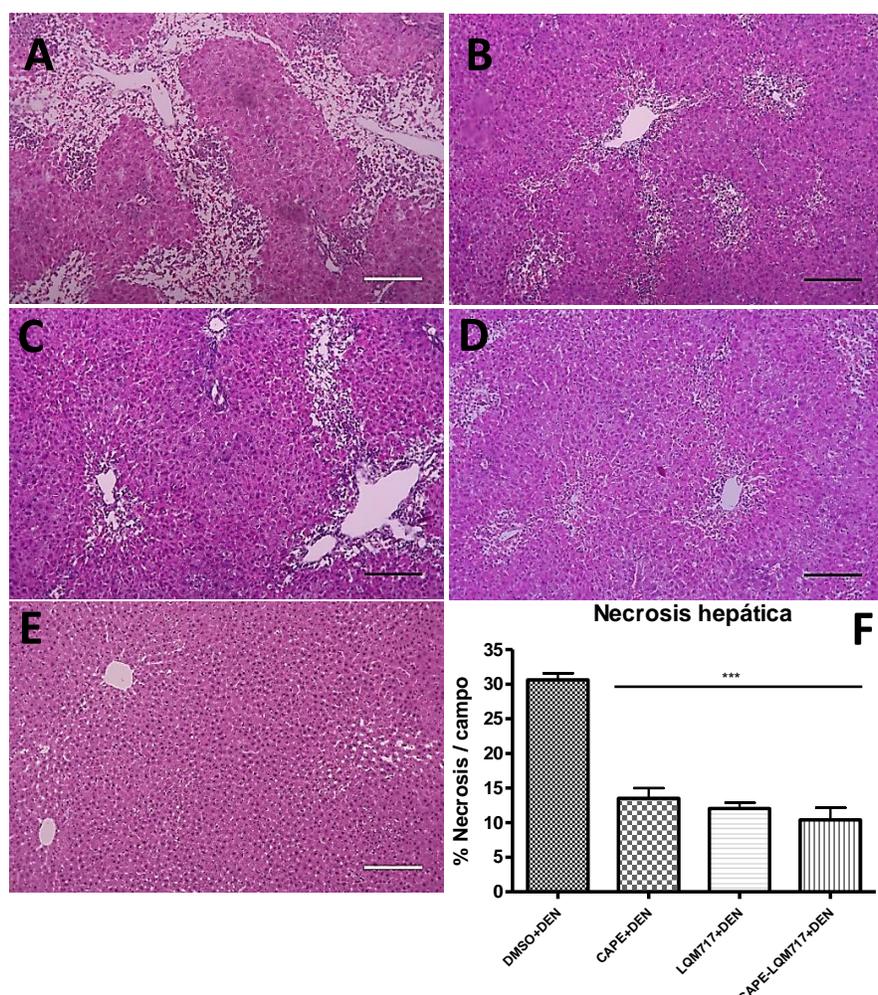


Fig.15. Efecto sobre la necrosis hepática. La necrosis tisular por el metabolismo de la DEN fue determinada por histología. A las 48h (Tiempo 2) es posible observar daño tisular en los todos los grupos tratados con DEN (A, B, C y D). (F). El test de Tukey no evidencio diferencias estadísticas entre los grupos de la administración conjunta e individual cuando $p < 0.05$. Datos obtenidos a partir de experimentos independientes con 4 ratas de cada grupo.

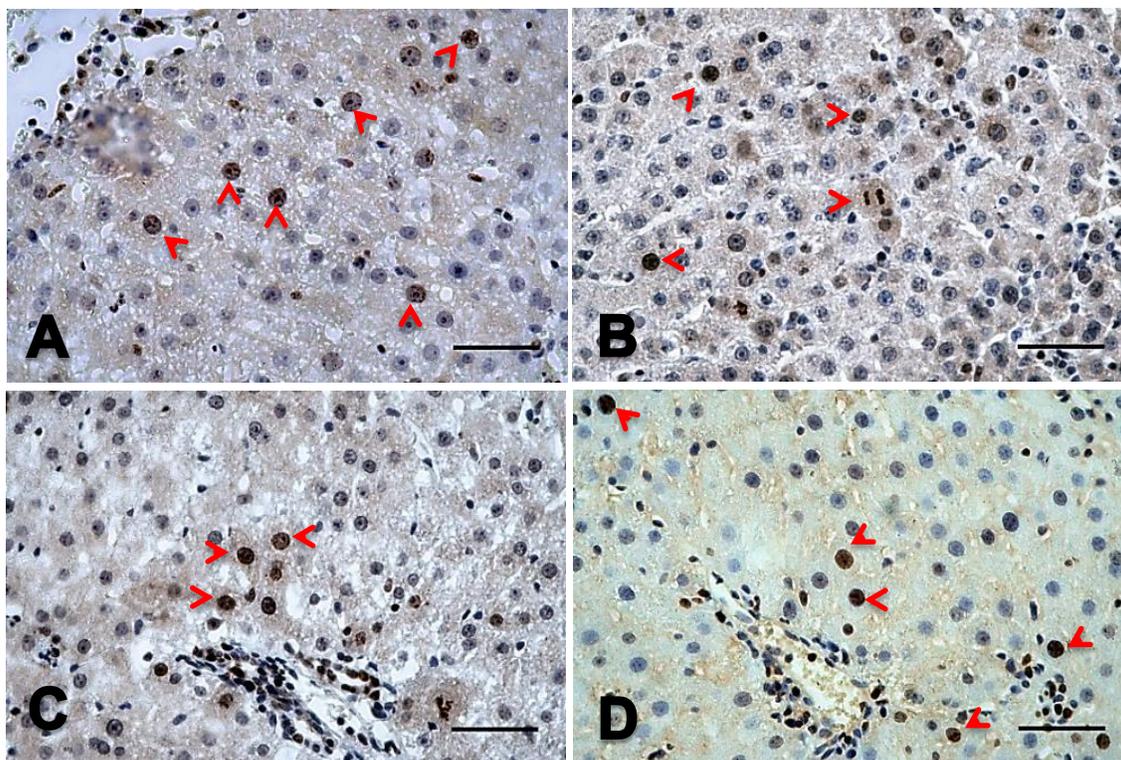
Histología. Hematoxilina y eosina, 10X.

A (DMSO+DEN), B (CAPE+DEN), C (LQM717+DEN), D (CAPE-LQM717+DEN), E (NT).

6.3 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR

El efecto de la administración conjunta sobre la proliferación celular fue determinada mediante técnica inmunohistoquímica de la proteína nuclear Ki67.

En las ratas NT no se observaron núcleos Ki-67+. La administración de los compuestos sin DEN produjo una baja cantidad de núcleos Ki-67+ (Fig. 16E). El grupo tratado con DEN mostró la mayor cantidad de núcleos Ki67+ (Fig. 16A), mientras que, en los grupos pre tratados con los compuestos, se observó una disminución estadísticamente significativa en los núcleos positivos (Fig. 16B, C, D), siendo el grupo pretratado con el análogo LQM717 (Fig. 16C) el predominante reduciendo en un 74 % la expresión en relación al grupo administrado solo con DEN (Fig. 16 E).



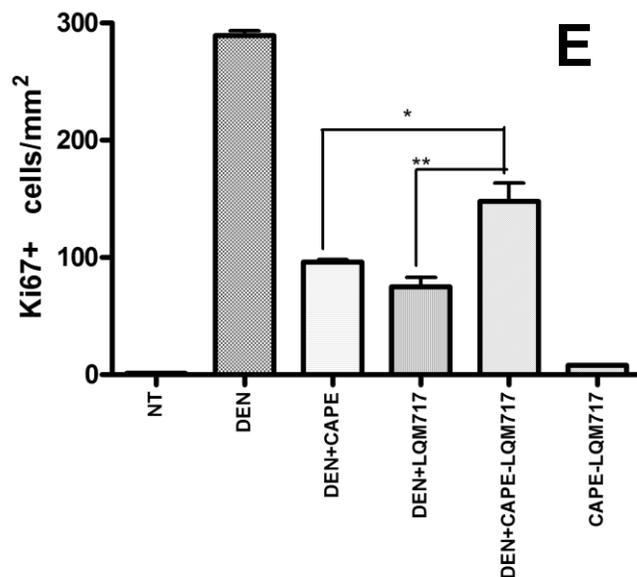


Fig. 16. Cuantificación de los núcleos Ki-67. El efecto de los tratamientos sobre la proliferación celular fue cuantificado por medio de la proteína Ki67. Los núcleos positivos al inmunomarcado predominaron en el grupo DEN (A), los pretratamientos disminuyeron la inmunoexpresión de manera significativa en relación al grupo DEN (E). Datos obtenidos a partir de experimentos independientes con 4 ratas por grupo $P < 0.05$, $**0.01$, $*0.05$, Inmunohistoquímica, 40X.

6.4 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA EN LA PEROXIDACIÓN LIPÍDICA

El metabolismo de DEN induce a un estado de estrés oxidativo. Para estudiar si la administración conjunta de CAPE y su análogo tiene un efecto quimioprotector antioxidante se evaluó el efecto que presenta sobre la peroxidación lipídica inducida por DEN, para ello se empleó la técnica TBARS la cual se determina la concentración de MDA (Fig. 8) que es el principal metabolito resultante de la lipoperoxidación.

Una dosis única de administración conjunta de los compuestos disminuyeron en un 40% el daño oxidativo en lípidos en relación al grupo control (DEN), mientras que el grupo con CAPE lo disminuyó en un 46.7%. La diferencia entre la administración conjunta o individual de los compuestos no mostró diferencias estadísticas significativas, el potencial quimioprotector del daño oxidativo a los lípidos se manifestó en todos los grupos (Fig.17). El grupo administrado con los compuestos sin DEN, mostró un ligero aumento en los niveles de lipoperoxidación atribuible al vehículo DMSO, en relación al grupo NT.

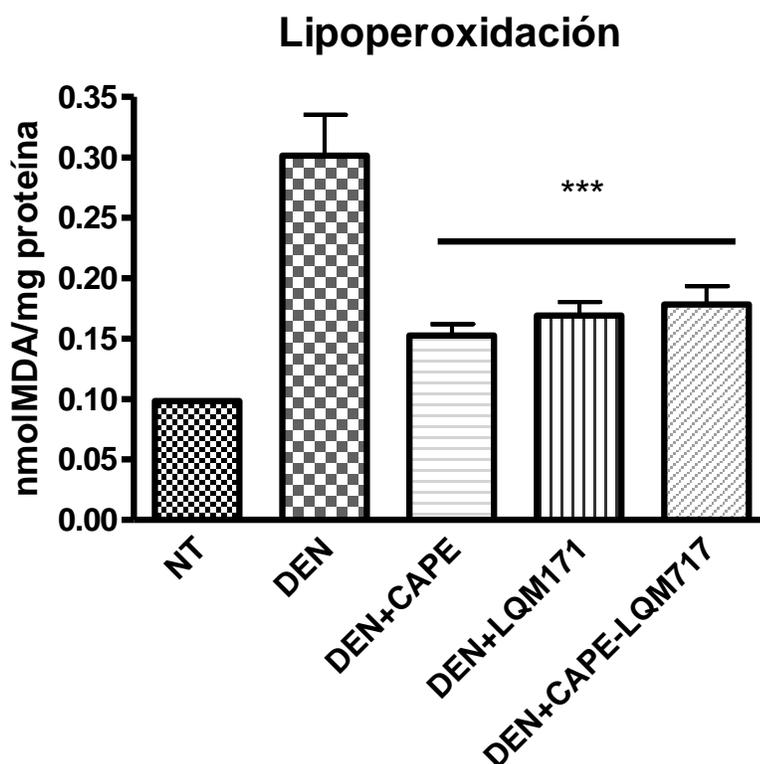


Fig. 17. Efecto de los compuestos en la lipoperoxidación. El efecto protector de los compuestos frente al daño oxidativo fue estudiado por la TBARS en ratas sacrificadas al tiempo 1. El pretratamiento con los compuestos reduce de manera significativa la lipoperoxidación en relación al grupo DEN, sin mostrar diferencia estadística entre la administración individual y conjunta. Datos obtenidos a partir de experimentos independientes con 4 ratas por grupo. Los resultados se expresan en nmol de MDA por mg de proteína. ***' 0.001

6.5 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN SOBRE LAS ROS

Además de los lipoperóxidos, el metabolismo de DEN tiene efecto sobre otras ROS tales como el H₂O₂, nitrato y ácido hipocloroso. Para establecer el efecto del tratamiento conjunto de CAPE y su análogo se llevó a cabo la prueba de oxidación de 2'-7' diclorofluorescín '(H₂DCF) a 2'-7'diclorofluoresceína (DCF).

Los animales sacrificados 12h post administración de DEN, mostraron niveles elevados en las unidades arbitrarias de fluorescencia por mg de proteína. El análisis estadístico de las lecturas para la medición de ROS, evidenció valores estadísticamente significativos en la reducción de las ua/mg de proteína en relación al grupo DEN (Fig. 18A). Sin embargo en el análisis entre los grupos de

CAPE, LQM717 y CAPE+LQM717, fue la administración conjunta el grupo predominante en los niveles más bajos de ROS 12h post DEN, aun sin la presencia de significancia estadística (Fig.18B).

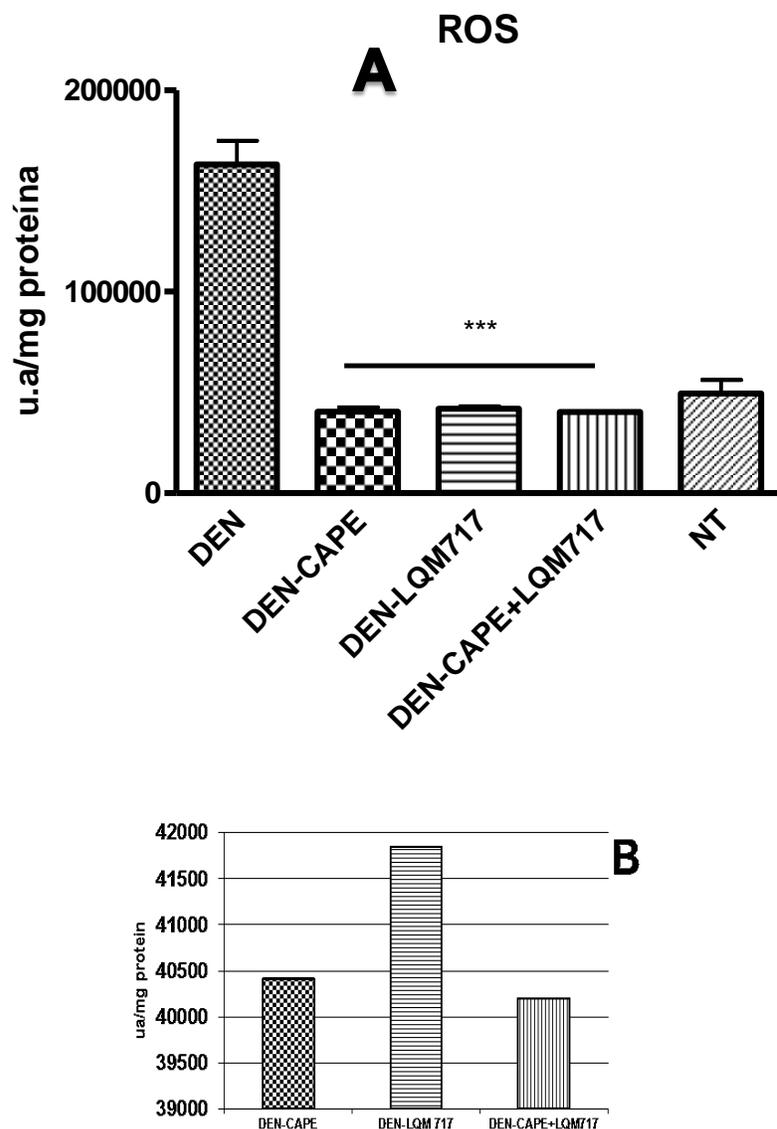


Fig. 18. Efecto de los compuestos en generación de ROS. El efecto protector contra el daño oxidativo por H_2O_2 , nitrato y ácido hipocloroso, fue determinado con la prueba de oxidación del H_2DCF al tiempo 1. Los compuestos disminuyeron significativamente el número de ROS en relación al grupo sin pretratamiento a DEN (A). La administración conjunta presentó el menor nivel u.a./mg de proteína, aun sin mostrar diferencia significativa con la administración individual por el Test de Tukey (B). Datos obtenidos a partir de experimentos independientes con 4 ratas de cada grupo. **** $P < 0.001$.

6.6 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA SOBRE LA PRESENTACIÓN DE LESIONES PRENEOPLÁSICAS

En los cortes histológicos teñidos con H-E es posible observar la arquitectura normal (Fig.15E) y las alteraciones de las células hepáticas (Fig. 15 A, B, C y D), algunos de estos cambios corresponden a FHA, esto fue corroborado por secciones seriadas procesadas por inmunohistoquímica de la enzima GST-p (Fig. 19), ésta es empleada como marcador de lesiones preneoplásicas en el MMHR por su especificidad al dar reacción positiva en los hepatocitos iniciados con fenotipo resistente que han formado los FHA en el parénquima del órgano (Fig. 20).

Otra enzima marcador de lesión preneoplásicas en nuestro modelo es la GGT, la cual en un hígado normal se localiza en las células epiteliales de los canalículos biliares (Fig. 21E).

Para determinar la magnitud de la alteración tisular se llevó a cabo un estudio cuantitativo por medio de la tinción histoquímica GGT (Fig. 21). El promedio del área GGT+ y el número de FHA de los animales con DMSO+TC se consideró como el 100% (Fig. 21A).

Los compuestos disminuyen significativamente la formación de lesiones preneoplásicas en relación al grupo sin pretratamiento (DMSO+TC), la administración conjunta mostró un efecto importante en la disminución de lesiones preneoplásicas sin embargo el análisis estadístico no evidenció una diferencia significativa entre los grupos CAPE, LQM717 Y CAPE-LQM717. (Fig.22)

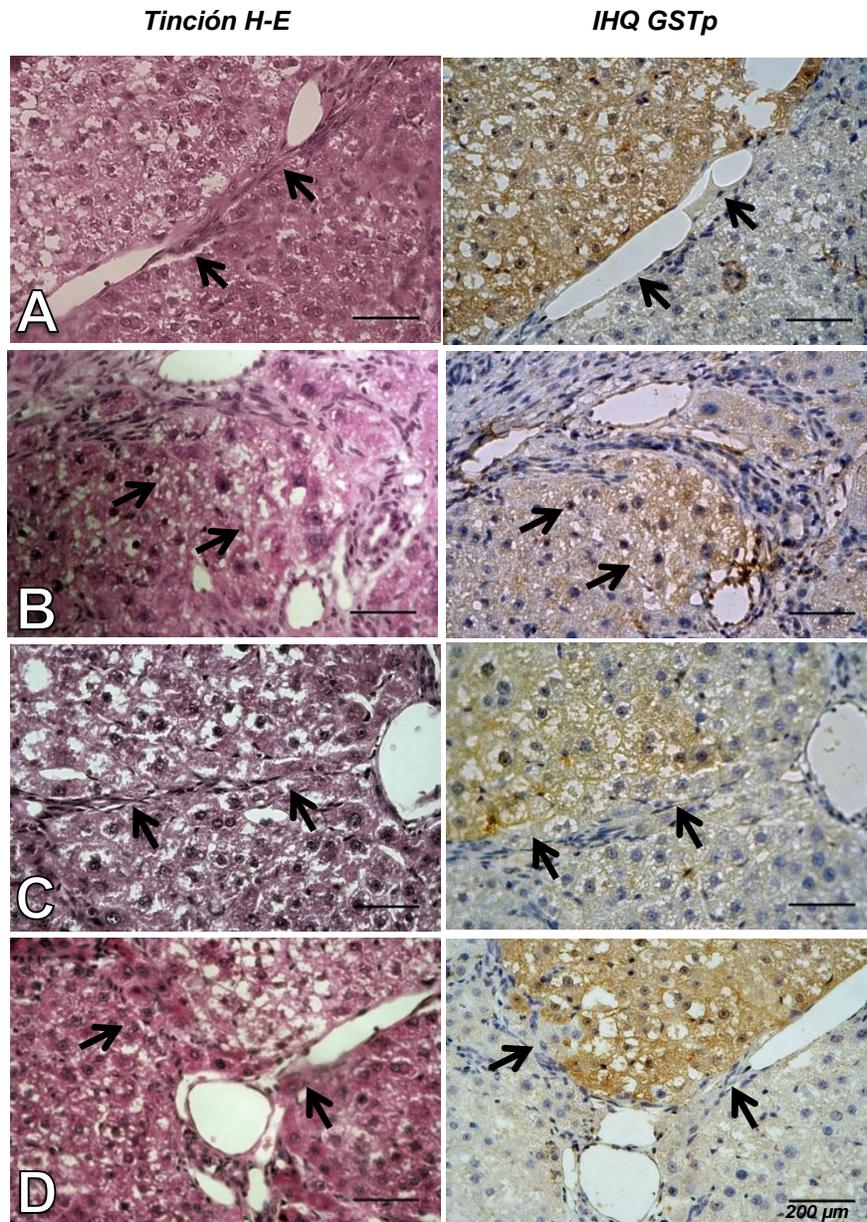


Fig.19. Focos hepáticos alterados (FHA). Cortes seriados fueron empleados para correlacionar los FHA observados en cortes teñidos con H-E y su expresión inmunohistoquímica de GSTp el cual es marcador de lesiones preneoplásicas en el MMHR. Las flechas delimitan los FHA.

Inmunohistoquímica, GSTp, 4 μ . 40X.

A (TC + Vehículo), B (CAPE + TC), C (LQM717 + TC), D (CAPE-LQM717 + TC).

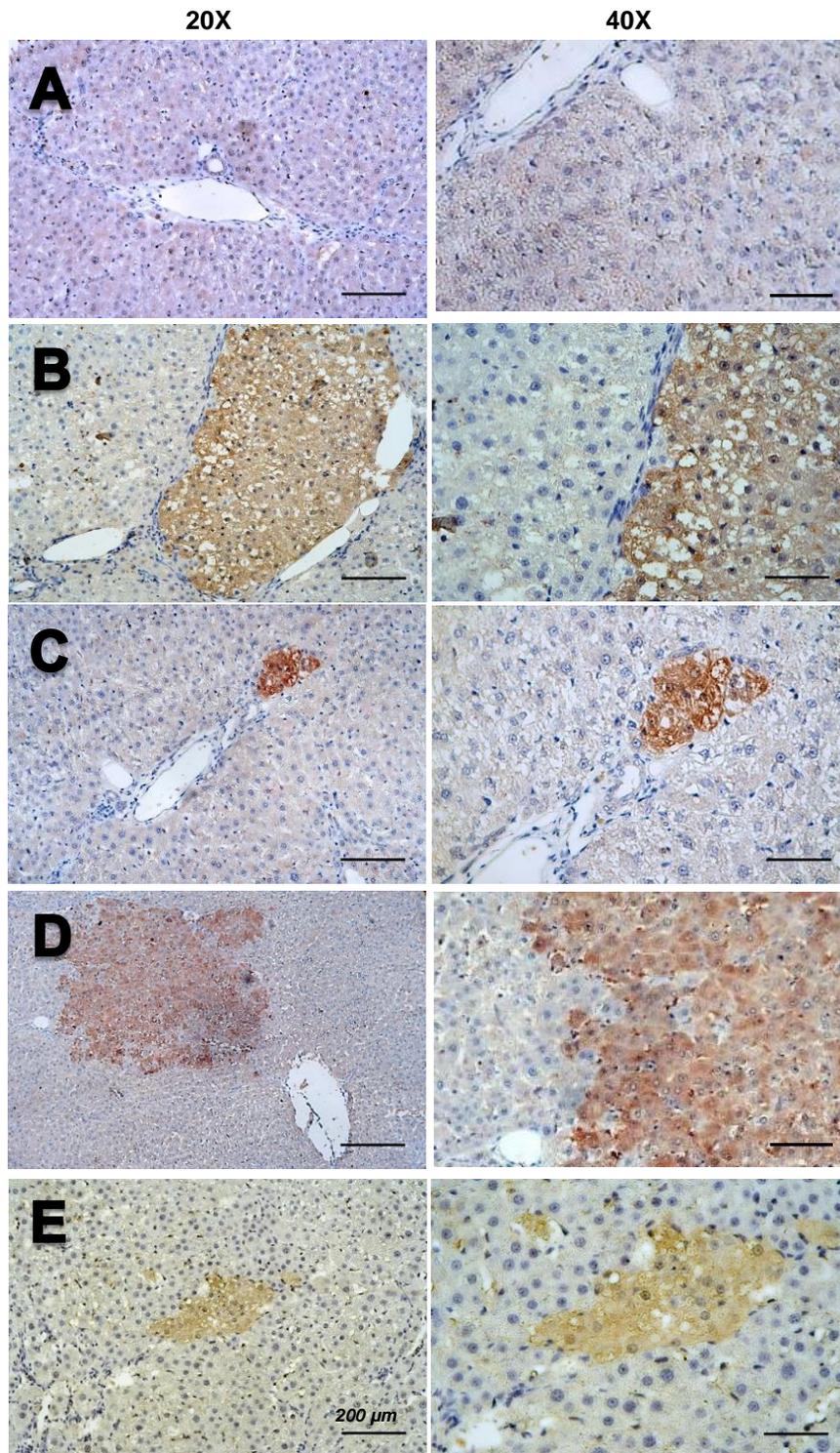


Fig.20. Focos hepáticos alterados GSTp positivos. Expresión IHQ de GSTp a nivel citoplasmático en los hepatocitos que conforman los FHA. En el grupo de ratas NT (A) no se detectaron focos GSTp+.

Imunohistoquímica, GSTp. 4 µm. 20X y 40X

A (NT), B (TC + Vehículo), C (CAPE + TC), D (LQM717 + TC), E (CAPE-LQM717 + TC).

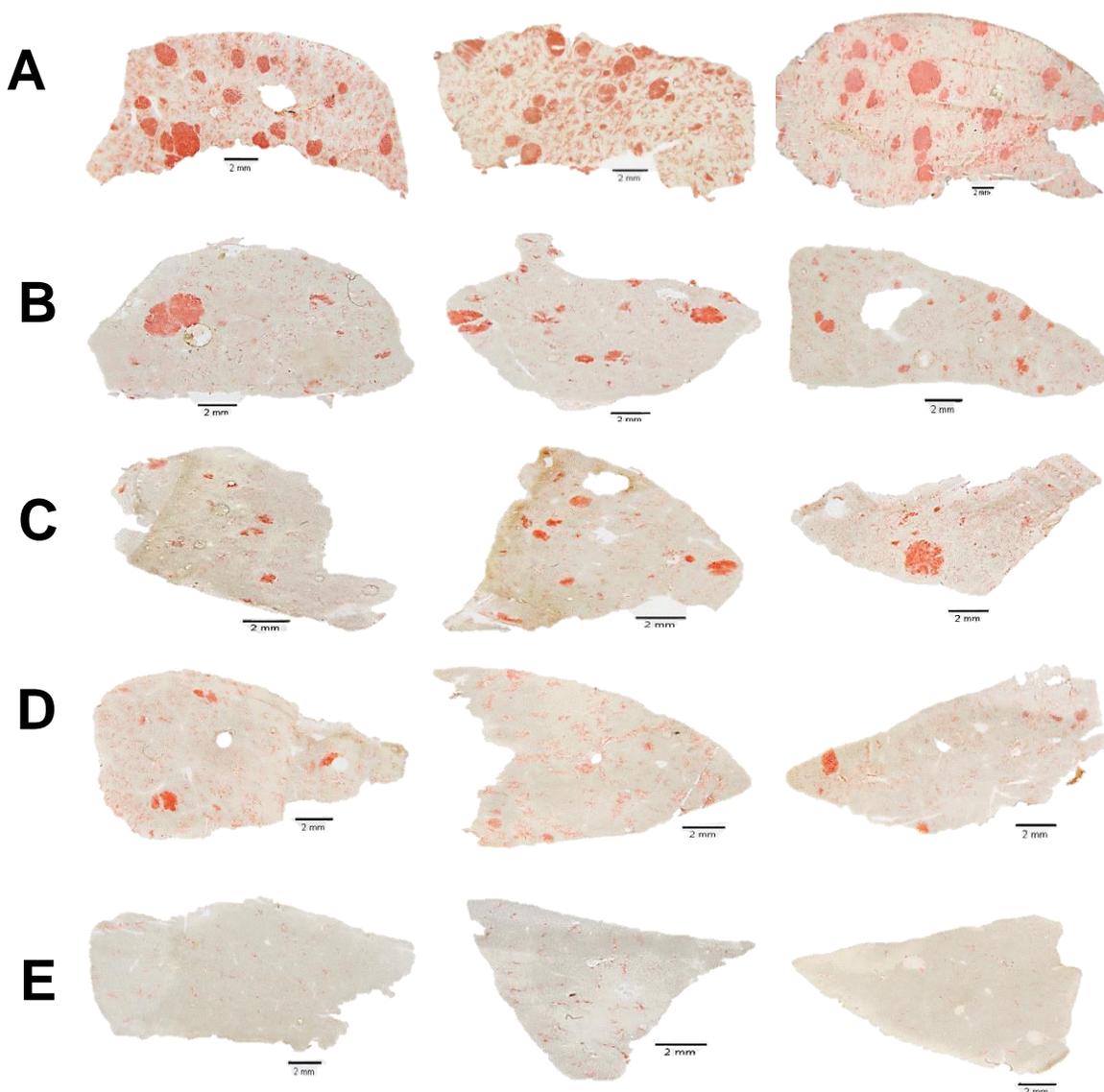


Fig.21. Determinación de lesiones preneoplásicas. El efecto quimioprotector de la administración conjunta de los compuestos contra la administración individual en la presentación de lesiones preneoplásicas fue establecido mediante el análisis de secciones de tres lóbulos por rata al tiempo 3. En el grupo NT no se detectaron focos GGT+. A (DMSO +TC), B (CAPE + TC), C (LQM717 + TC), D (CAPE-LQM717 + TC), E (NT). Imagen macroscópica, 20 μ m.

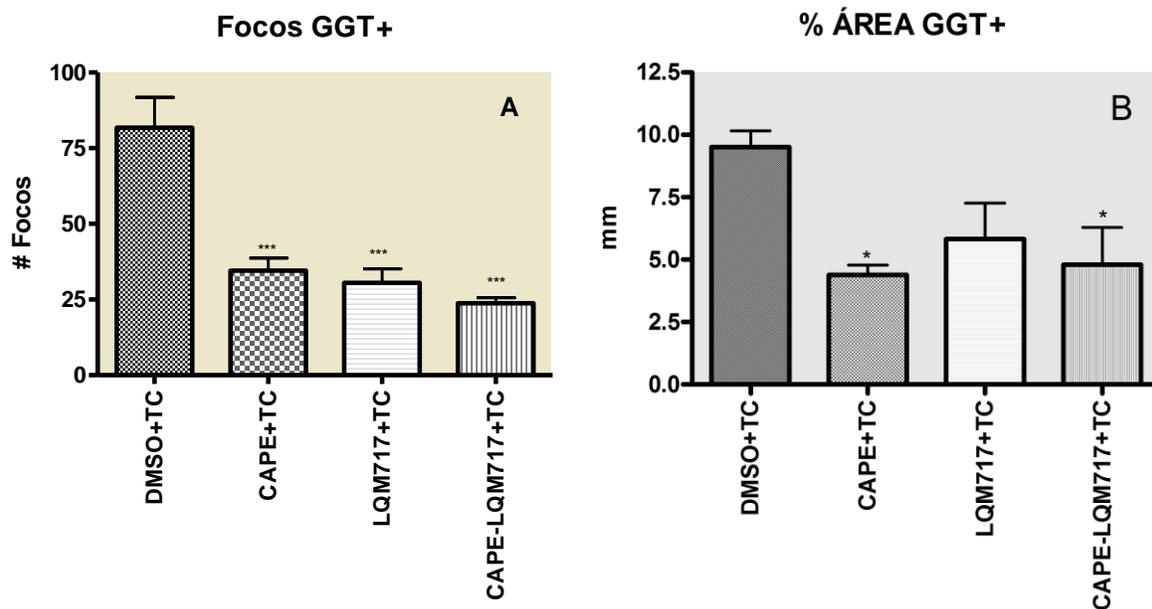


Fig.22. Efecto sobre la presentación de lesiones preneoplásicas. Los resultados de la histoquímica para GGT, fueron analizados con ANOVA. *** $p < 0.001$ * $p < 0.05$. Número de focos (A) y el porcentaje de área tisular (B). los pretratamientos disminuyeron el número de focos en relación al grupo son pretratamiento, el test de Tukey no mostro diferencia significativa entre los grupos pretratados. Datos obtenidos a partir de experimentos independientes con 4 ratas de cada grupo.

6.7 EFECTO DE LOS COMPUESTOS SOBRE EL PESO CORPORAL.

Las ratas de cada grupo fueron pesadas de manera individual durante las fases de iniciación y promoción del MMHR para determinar el efecto de los pretratamientos en la condición corporal de los animales.

La administración conjunta de CAPE y LQM 717 previnieron la pérdida súbita de peso durante la iniciación y la promoción en relación a la administración individual. La pérdida mayor en este periodo la presentan las ratas con tratamiento completo, mientras que en las ratas pre tratadas con CAPE+LQM717-NT la tendencia a ganar peso evidencia un desarrollo normal (Fig. 23).

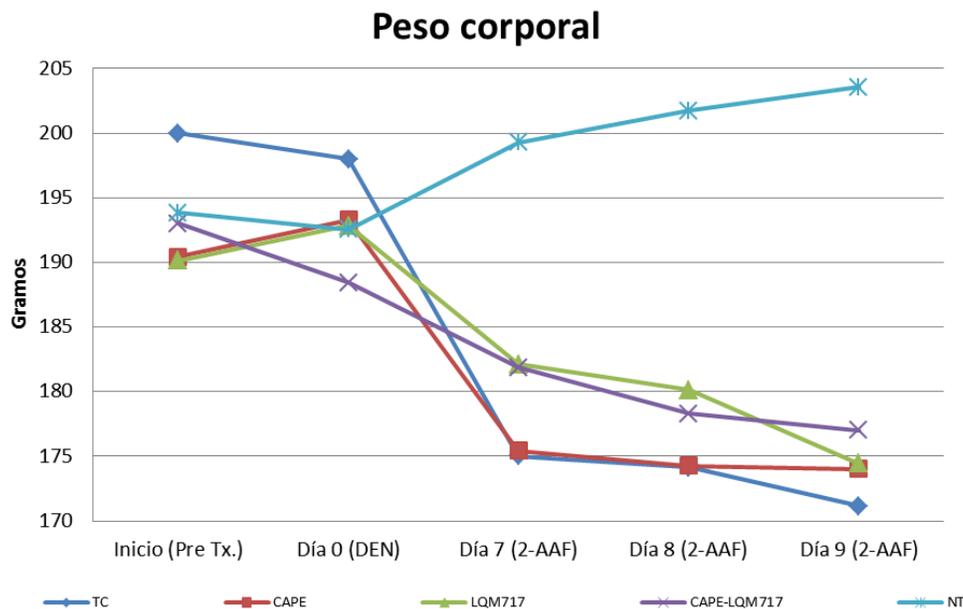


Fig. 23. Comportamiento del peso corporal por grupo durante la fase de iniciación de la carcinogénesis. El gráfico presenta el porcentaje promedio de cada grupo durante la iniciación y promoción la administración conjunta evito la perdida sunita de peso en los animales.

6.8 EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE LOS COMPUESTOS EN LA PRESENTACIÓN DE TUMORES.

La relación de los efectos protectores de los compuestos sobre la formación de tumores se estableció prolongando el tiempo de la eutanasia a los 11 meses. En estas ratas se investigó si la prevención en tiempos tempranos se traduce en la protección contra la formación de tumores hepáticos en el MMHR. Los resultados indican que el 100% de los animales presentaron tumores a los 11 meses post TC con un nivel de supervivencia 37.5% (Fig. 24B).

El grupo de la administración individual evidenció el mejor efecto protector obteniendo el 75 % de los animales sin lesiones hepáticas macroscópicas con un nivel de supervivencia del 50%. El porcentaje de ratas libres de tumores en el grupo de la administración conjunta fue del 40% con un nivel de supervivencia del 100%, los tumores de menor tamaño observados en este experimento correspondieron a este grupo (Fig. 24A)

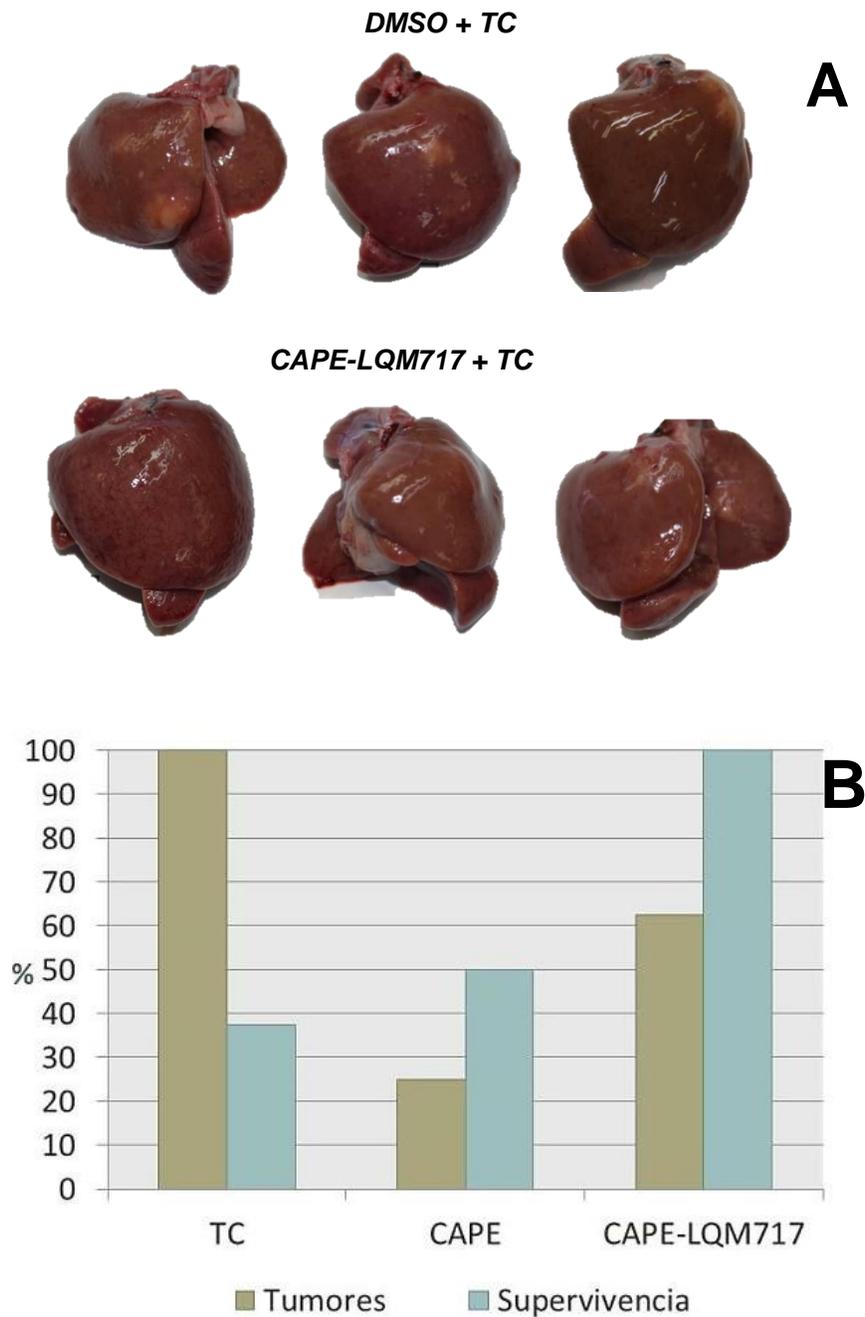


Fig. 24. Efecto sobre la presentación de tumores hepáticos. Como estudio adicional a esta investigación ratas sacrificadas a los 11 meses fueron empleadas para correlacionar los efectos sobre lesiones preneoplásicas Vs. la presentación de tumores en el hígado (A). La administración conjunta evitó el desarrollo tumoral en el 40% de los animales con un nivel de supervivencia por grupo del 100% (B). Imagen macroscópica (A).

VII. DISCUSIÓN

La quimioprevención del cáncer tiene por objeto prevenir, detener o revertir ya sea la fase de iniciación de la carcinogénesis o la progresión de las células neoplásicas a la malignidad. Los agentes quimiopreventivos, ya sea solos o en combinación con otros, pueden retrasar los procesos que conducen a cáncer invasivo, según Baek et al (2009).

Carrasco (2004) y Beltrán (2008), estudiaron al CAPE como un quimioprotector en la formación de FHA GGT+ al ser usado en la etapa de iniciación, a partir de éste se sintetizó el análogo LQM717. Macías, en el 2013, reporta que administrado en las mismas condiciones que CAPE logra mejorar el efecto quimioprotector, en la formación de lesiones preneoplásicas y tumores.

Para establecer el efecto de la administración conjunta, se determinó la dosis mínima de máximo efecto de cada uno de los compuestos. En trabajos previos no existía un referente de los efectos del CAPE y su análogo (a dosis diferentes de 20 mg/kg), por lo cual se probaron los efectos de los compuestos administrados a dosis menores a la del marco de referencia (20, 10, 5 y 2 mg/kg). El Grupo CAPE a 20mg/kg, mostró un mayor efecto quimioprotector, disminuyendo en el porcentaje el área ocupada por FHA en relación a los grupos DEN y de dosis menores. En el grupo LQM 717 la dosis de 9 mg/kg superó el efecto quimioprotector en relación a la dosis reportada de 18 mg/kg por Macías y col (2013); lo que indica que el comportamiento biológico de este análogo responde a una hormesis (fenómeno de respuesta a dosis caracterizado por una estimulación por dosis baja y una inhibición para dosis altas). Esta información se usó como referente para determinar las dosis para la administración conjunta (CAPE 20mg/kg + LQM717 9 mg/kg).

En este trabajo se estableció que los compuestos disminuyen significativamente la formación de lesiones preneoplásicas en relación al grupo sin pretratamiento

(DEN) congruente con lo reportado en el 2013 por Macías y col. La administración conjunta superó el efecto quimioprotector de LQM717 en un 2.6% sobre el número de focos GGT+, efecto importante en la disminución de lesiones preneoplásicas.

Los hepatocitos iniciados exhiben un fenotipo resistente, por la expresión de enzimas de detoxificación como GGT y GSTP, las cuales son consideradas como importantes marcadores para la hepatocarcinogénesis química según Macias et al (2013), Salcido et al (2009), Márquez, et al (2007), Pérez et al (2007) y Sanches et al (2005), por lo cual un efecto en la reducción de la expresión de estas enzimas está relacionado con un efecto quimioprotector al frenar la expansión clonal de las células preneoplásicas.

Durante la fase de iniciación de la carcinogénesis en el MMHR, se produce necrosis hepática y estrés oxidativo. Datos sobre el efecto del pretratamiento con CAPE por Beltrán y col en el 2008, así como del LQM717 por Macías y col en 2013, citan una disminución en la necrosis tisular producida por el metabolismo de DEN, congruentes con lo observado en el presente trabajo. La administración conjunta mejoró en un 5.4 a 10.2% el efecto de la administración individual respectivamente. En este trabajo se confirma que dosis única de los compuestos administrados de manera individual o conjunta bloquea el daño del carcinógeno, reduciendo el daño tisular a las 48 h después de su administración.

La necrosis tisular desencadena una serie de estímulos proliferativos en el tejido hepático circundante con la finalidad de restablecer el número de células y conservar la homeostasis. La capacidad de detención del ciclo celular es un efecto deseable de los quimioprotectores; Ki67 es una proteína altamente relacionada con la proliferación celular debido a la correlación existente entre el marcaje del antígeno ki67 de los nucléolos durante las fases G1, S, G2 y M (ausente en la fase G0). Una de las características de las células cancerosas es la proliferación celular descontrolada, por lo que la inmunexpresión de esta proteína está correlacionada

con la malignidad del tumor. El hígado es un órgano quiescente en el cual a menos que se presente un daño que lleve a los hepatocitos a superar el punto de no retorno y por ende los dirija a la apoptosis, no se encontrarán células en proliferación. Esto fue congruente con la ausencia de inmunomarcaje en los tejidos de las ratas NT; en contraparte, el grupo DEN fue el predominante en la inmunoexpresión de Ki67.

La administración de los compuestos sin posterior administración de DEN, produjo una baja cantidad de núcleos Ki-67+ la cual es atribuible al vehículo de CAPE y LQM717 que es el DMSO. La administración conjunta disminuyó en un 48.7% la inmunoexpresión de núcleos Ki67+ en relación al grupo DMSO, en los grupos de pretratamiento individual los porcentajes de reducción de la proliferación celular fue de 74% para LQM717 y 66.6% para CAPE; esto parece indicar que los compuestos administrados simultáneamente están estimulando la respuesta proliferativa del tejido hepático circundante. Sin embargo, el efecto final de las células proliferantes debe ser evaluado a tiempos largos para establecer si este responde a una estimulación del tejido sano para restablecer la homeostasis tisular, o permite que las células iniciadas entren en proliferación descontrolada que las conduzca a la transformación celular maligna.

Con respecto al efecto sobre el estrés oxidativo resultante del metabolismo de DEN, la inhibición de la peroxidación de lípidos de los compuestos administrados en conjunto fue menor comparada con la de CAPE en un 6.7%, caso contrario al efecto que presentó sobre la medición de ROS, ya que el grupo de la administración conjunta de CAPE y LQM717 fue el predominante con los niveles más bajos de ROS 12h post DEN, aunque estas pequeñas diferencias no fueron estadísticamente significativas en el Test de Tukey.

Por su estructura química CAPE ha sido clasificado como un potente antioxidante, por la capacidad de captación de sus grupos OH, sin embargo en estudios previos Macías y colaboradores (2014), reportan que el análogo LQM717 aún al carecer

de estos grupos y de propiedades antioxidantes in vitro, posee efectos en la reducción de lipoperóxidos medido mediante la reacción al TBA, pero no se ha estudiado el efecto de este análogo sobre las ROS. Nuestros resultados demuestran que el LQM717 posee un efecto similar a CAPE en la reducción de las ROS, esta propiedad es conservada al administrarlos en conjunto lo cual indica que el LQM717 puede estar estimulando los mecanismos antioxidantes a nivel celular, sin bloquear la capacidad antioxidante de CAPE.

La administración conjunta de CAPE y LQM 717 previnieron la pérdida súbita de peso durante la iniciación y la promoción, en relación a la administración individual. Las ratas con tratamiento completo presentaron el mayor porcentaje de pérdida de peso durante este periodo, mientras que en las ratas NT, la tendencia a ganar peso evidencia un desarrollo normal.

En la evaluación del efecto quimioprotector de los compuestos sobre la presentación de tumores en el MMHR, el 100% de los animales presentaron tumores a los 11 meses post TC con un nivel de supervivencia 37.5%. El grupo de la administración individual evidenció el mejor efecto protector obteniendo el 75% de los animales sin lesiones hepáticas macroscópicas con un nivel de supervivencia del 50%. El porcentaje de ratas libres de tumores en el grupo de la administración conjunta fue del 40% con un nivel de supervivencia del 100%, los tumores de menor tamaño observados en este experimento correspondieron a este grupo.

VIII. CONCLUSIONES

Aunque el efecto quimioprotector de los compuestos se encuentra presente al ser administrados en conjunto, los niveles en la reducción de la presentación de tumores no superaron a la administración individual, dicho efecto podría responder a un fenómeno de hormesis el cual propicie un aumento en la proliferación celular cuantificada en el presente estudio a las 48 horas post DEN, permitiendo que las células entren en división celular sin que los mecanismos de reparación tengan el tiempo suficiente para actuar de manera eficiente, esto comprometería a las células dañadas a conducirse de manera progresiva hacia la transformación celular maligna, siendo esta en porcentaje de manifestación y tamaño más restringida que los tumores observados en el grupo control, mejorando significativamente la condición corporal de los animales y los niveles de supervivencia en este estudio.

El compuesto LQM 717 puede emplearse a dosis de 9 mg/kg para evaluar su efecto quimioprotector. El mecanismo por el cual el análogo permite la reducción de ROS en el modelo rata bajo las condiciones descritas en esta investigación, debe ser establecido mediante pruebas que determinen los posibles mecanismos de acción de este en el modelo in vivo.

IX. PERSPECTIVAS

Se sugiere explorar diferentes condiciones (concentración, dosis, frecuencia de administración), combinaciones de compuestos quimioprotectores con estructura química y comportamiento biológico distinto (curcumina, quercetina, AINES, extracto de guanábana, etc) así como las posibles vías de mecanismos de acción de los mismos, que lleven a optimizar las condiciones de administración con la finalidad de reflejar un mayor efecto en la prevención del cáncer hepático en el MMHR.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Buriticá GE, Barbosa SX, Echeverry BD. (2009) **Carcinoma hepatocelular canino: reporte de un caso**. Revista MVZ Córdoba. 14(2), 1756-1761.
2. Morris J, Dobson J. (2002) **Oncología en pequeños animales**. Argentina: Intermédica Buenos Aires.
3. Pastor J, Planellas M. (2010) **Liver tumors: diagnosis and treatment**. Veterinary Focus Bachs. 20(3), 41.
4. Hanahan D, Weinberg RA. (2000) **The Hallmarks of Cancer Review Cell**. Journal Cell. 100, 57-70.
5. Hanahan D, Weinberg RA. (2011) **Review Hallmarks of Cancer: The Next Generation**. Journal Cell. 144, 02-013.
6. Sánchez PY, Carrasco LC, García CC, Pérez CJ, Hernández GS, Salcido NM, Alemán LM, Villa TS. (2005) **Oxidative stress in carcinogenesis. Correlation between lipid peroxidation and induction of preneoplastic lesions in rat hepatocarcinogénesis**. Cancer Letters. 217, 25-32.
7. Vázquez GV. (2011) **Efecto quimioprotector de quercetina en la iniciación del CHC**. Tesis Doctoral. CINVESTAV. México.
8. Dobson JM. (2013) **Breed-Predispositions to Cancer in Pedigree Dogs**. Hindawi Publishing Corporation. 23, 1-23.

9. Baek SJ, McEntee MF, Legendre AM. (2009) **Review paper: Cancer cheopreventive compounds and canine cancer.** Veterinary Pathology. 46, 576-588.
10. Alberts, Johnson, Lewis, Raff, Roberts y Walter. (2012). **Biología molecular de la célula.** España: Omega 5ta edición.
11. Beltrán R, Alemán L, Salcido N, Hernández G, Fattel F, Arce P, Arellanes R, Garcia R, Vázquez V, Sierra S y Villa T. (2008) **Evidence that the anticarcinogenic effect of caffeic acid phenethyl ester in the resistant hepatocyte model involves modifications of cytochrome P450.** Toxicological Sciences. 104(1), 100-106.
12. Carrasco LC, Márquez RL, Fattel FS, Arce PE, Pérez CJ y Villa TS. (2004) **Chemoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester on promotion in a medium-term rat hepatocarcinogenesis assay.** Journal Cancer. 108, 488-492.
13. Greenwald P. (2000) **Clinical review. Science, medicine and the future: Cancer chemoprevention.** BMJ 2000, 324; 714-718.
14. Martínez PI. (2000) **Quimiopreención del cáncer.** Revista Cubana de Oncología. 16(1), 67.
15. Macías PJR, Beltrán RO, Vásquez GVR, Salcido NME, Martínez SPA, Ruíz SMB, Ángeles AE y Villa TS. (2013) **The effect of caffeic acid phenethyl ester analogues in a modified resistant hepatocyte model.** Anticancer Drugs. 24 (4): 394-405

16. Salcido NM, Sierra SA, Beltrán RO, Macías PJ, Villa TS. (2009) **Celecoxib enhances the detoxification of diethylnitrosamine in rat liver cancer.** World Journal Gastroenterology. 15(19), 2345-2350.
17. Sánchez S, Benítez B. (2006) **Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas.** Cancerología. 1, 187-199.
18. Shipitsin M, Polyak k. (2008) **The cancer stem cell hypothesis: in search of definitions, markers, and relevance.** Laboratory Investigation. 88, 459-463.
19. Viñas G, Puig T, Porta R. (2012) **Oxidative stress in patients with cancer: two sides of the same coin.** Medicina Clínica. 139(4), 171-175.
20. Steward WP, Brown K. (2013) **Cancer chemoprevention: a rapidly evolving field.** British Journal of Cancer. 109, 1-7.
21. García TB, Saldaña BA, Saldaña LG. (2012) **Oxidative stress and antioxidants in cancer prevention.** Revista Habanera de Ciencias Médicas. 12(2), 187-196.
22. Montalvo JE, García PMA, Escalante TT, Peña SJ, Vázquez MH. (2011) **Caracterización bioquímica y niveles de lipoperoxidación en el preacondicionamiento hepático.** Redalib. 79, 32-140.
23. Miwa S, Muller FL, Beckman KB. (2008) **The basics of oxidative biochemistry. Oxidative stress in aging: From model systems to human diseases.** Humana Press. 11-37.

24. Klaunig JE, Zemin W, Xinzhu P, Shaoyu Z. (2011) **Oxidative stress and oxidative damage in chemical carcinogenesis.** Toxicology and Applied Pharmacology. 254, 86–99.
25. Pérez CJ, López GC, Fattel FS, Arce PE, Alemán LL, Hernández GS, Le Berrey, Serguei JM , y Villa TS. (2006) **Gene expression profile related to the progression of preneoplastic nodules toward hepatocellular carcinoma in rats.** Neoplasia. 8(5), 373-383.
26. Barajas LM, Rosas LV. (2006) **Resultados de la aplicación de DEN a dosis bajas en un modelo de hepatocarcinogénesis en ratas.** Memorias congreso nacional de medicina homeopática. México.
27. Ozturk G, Ginis Z, Akyol S, Erden G, Gurel A, Akyol O. (2012) **The anticancer mechanism of caffeic acid phenethyl ester (CAPE): review of melanomas, lung and prostate cancers lung and prostate cancers.** European Review for Medical and Pharmacological Sciences. 16, 2064-2068.
28. Wen XZ, Jing Z, Chong LL, Bing Z, Rong QP, Xiing HP (2003) **Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells in vitro.** World Journal Gastroenterology. 9(6), 1278-1281.
29. Martínez y Gragera. (2008) **Fundamentos teóricos y prácticos de la histoquímica.** España: CSIC Press.
30. Rutenburg AM, Kim H, Fischbein JW, Hanker JS, Waserkrug HL, Seligman AM. **Histochemical and ultrastructural demonstration of gama-glutamyl transpeptidase activity.** (1969) Journal of Histochemistry & Cytochemistry. 17, 517-526.

31. Garrido FG, Cornejo CM. (2000) **Método de inclusión en parafina para diagnóstico rápido por medio de microondas.** Veterinaria México. 31(4), 375-379.
32. Garrido FG, Cornejo CM. Salinas JE. (2003) **Manual de colorantes para laboratorios de ciencias biológicas.** México: UNAM.
33. López MA. Gutiérrez JC, García FC, Herrero A. (2004) **Valor pronóstico de los marcadores tumorales de proliferación celular y angiogénesis en los oligodendrogliomas.** Oncología. 27(5), 289-296.
34. López AGS. (2010) **Participación del estrés oxidativo en los cambios en la metilación del DNA y la contribución en la formación de lesiones preneoplásicas en un modelo de hepatocarcinogénesis química en ratas Fischer-344.** Tesis Maestría. CINVESTAV. México.
35. Voet, Voet y Pratt. (2009) **Fundamentos de bioquímica.** España: Médica Panamericana.
36. Held PD, Newick K. (2008) **Using BioTek's Synergy™ HT Reader to Measure Reactive Oxygen Species (ROS) Generation in Stimulated Cells.** BioTek Instruments, Inc.
37. Becker RA, Shank RC. (1985) **Kinetics of formation and persistence of ethylguanines in DNA of rats and hamsters treated with diethylnitrosamine.** Cancer Research, 45(5), 2076-2084.
38. Bosch BJ, López PG, García FL, Prósper CF. (2007) **Stem cells and cancer: elucidating the origin of the cancer stem cell.** Revista de Medicina de la Universidad de Navarra. 51(2), 14-17.

39. Chávez BA, Pérez PC, Pérez CE, Carrasco LC, Rangel LE, Segura PB, Taja CL, Trejo BC, González FA, Candelaria M, Cabrera G y Dueñas GA. (2006) **Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines.** Cancer Cell International. 6(2), 1186-1475.

40. Márquez RL, Trejo SC, Cabrales RM, Arce PE, Sierra SA, Alemán LL, Fattel FS, Carrasco LC y Villa TS. (2007) **Co-Carcinogenic Effect of Cyclohexanol on the Development of Preneoplastic Lesions in a Rat Hepatocarcinogenesis Model.** Molecular Carcinogenesis. 46, 524-533.

CIBERGRAFIA

- a) <http://www.acalanthis.es/doc/oncologico.pdf> “El paciente oncologico”
- b) <http://cancer.mascotia.com/abc-de-la-oncologia-tumores,-neoplasias-y-cancer.html> MV Adelaida A. Goldman
- c) <http://guerreroegradocero.blogspot.mx/2012/11/perros-de-raza-fina-mas-propensos.html>
- d) <http://www.publimetro.com.mx/vida/aumentan-enfermedades-cronicas-en-perros-y-gatos/plft!CAeb8iG1flqUs8drM1s3VQ/>
- e) <http://www.wearethecure.org>

XI. APÉNDICE

A. RESONANCIA MAGNÉTICA DE LOS COMPUESTOS

Mediante estudios de resonancia magnética se estableció que los compuestos quimioprotectores se encontraban libres de contaminantes por lo cual se consideró que estos estaban bien purificados y en condiciones óptimas para administrarse a las ratas.

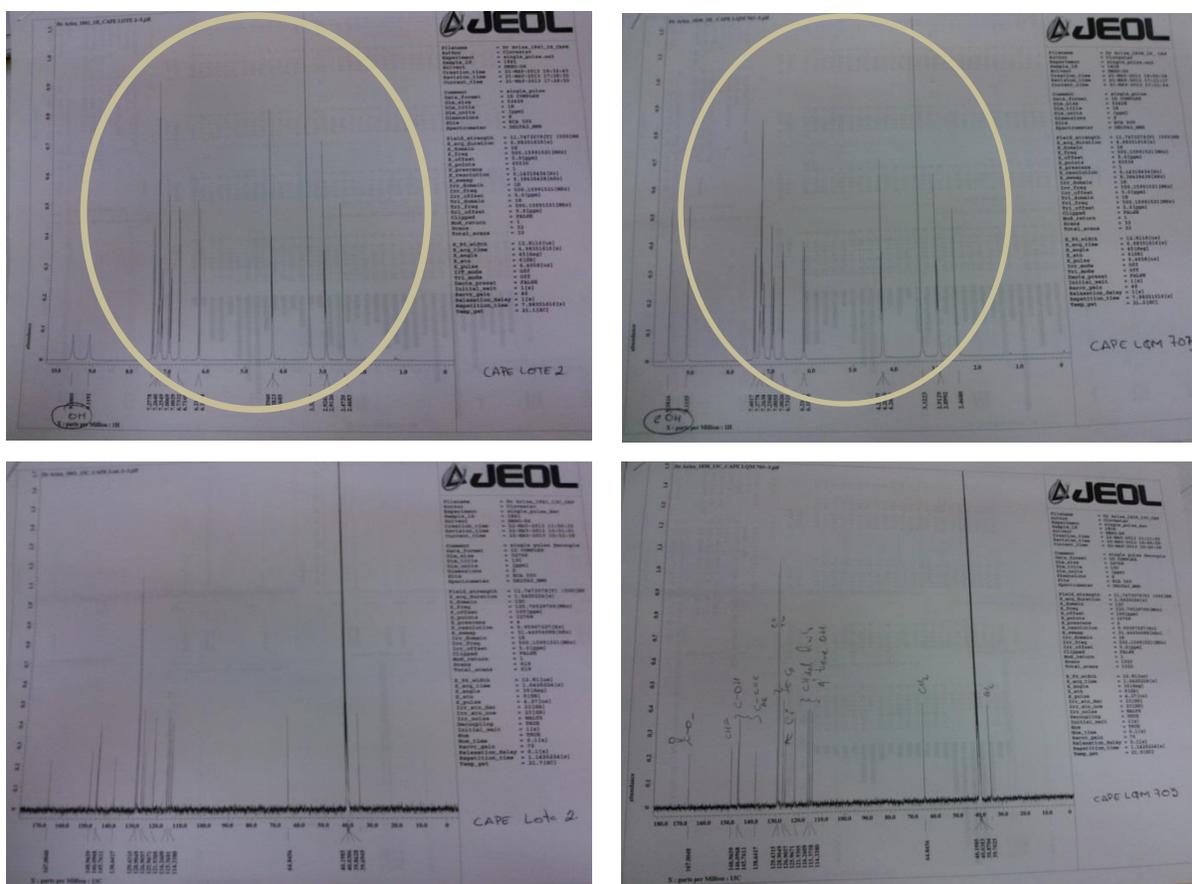
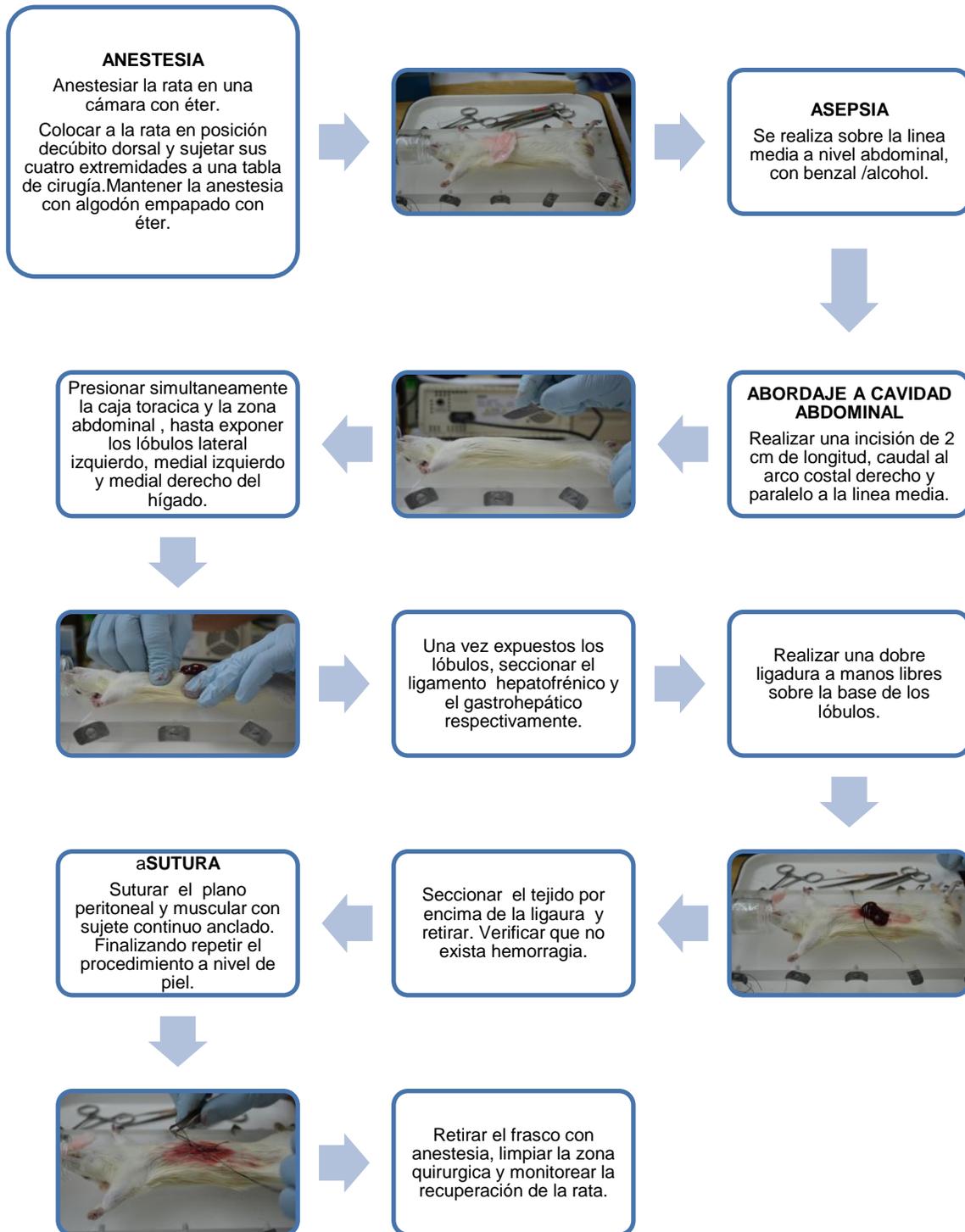


Fig.A. Los círculos indican un espectro similar, libre de señales contaminantes.

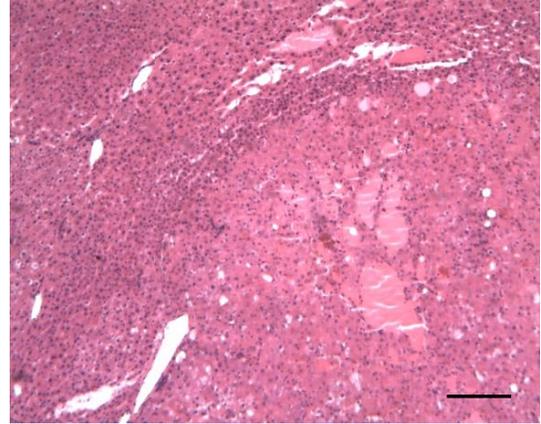
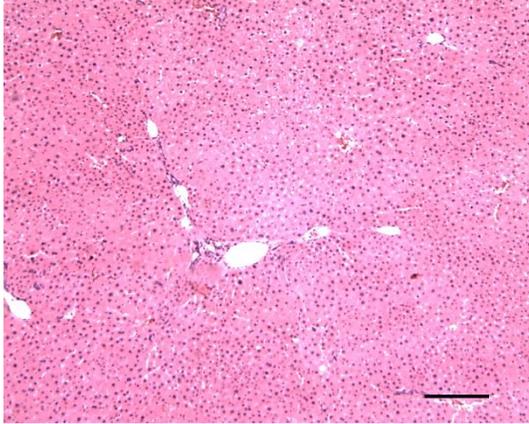
B. TÉCNICA DE HEPATECTOMÍA PARCIAL DE LA RATA. (HP)



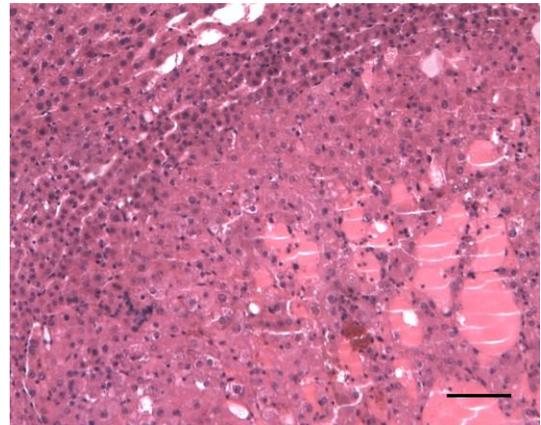
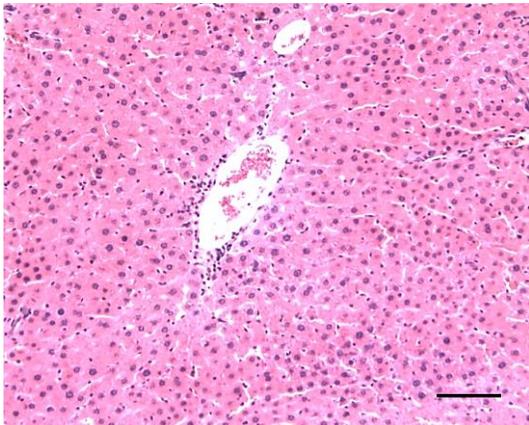
C. TINCIONES ESPECIALES TRATAMIENTO COMPLETO 11M

A) HEMATOXILINA Y EOSINA

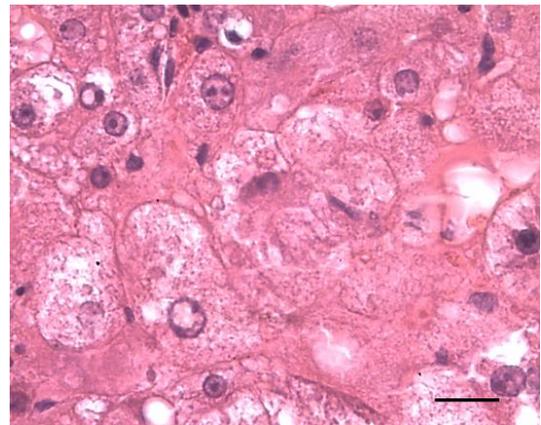
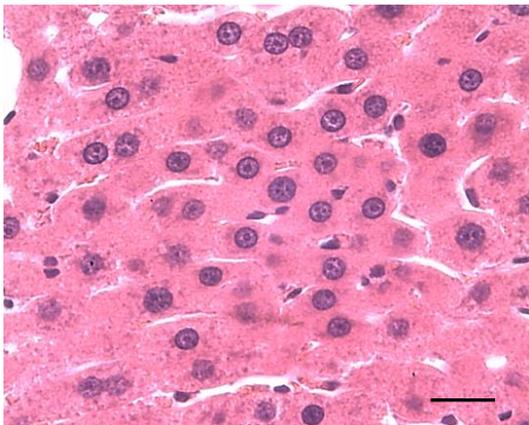
5X



10X

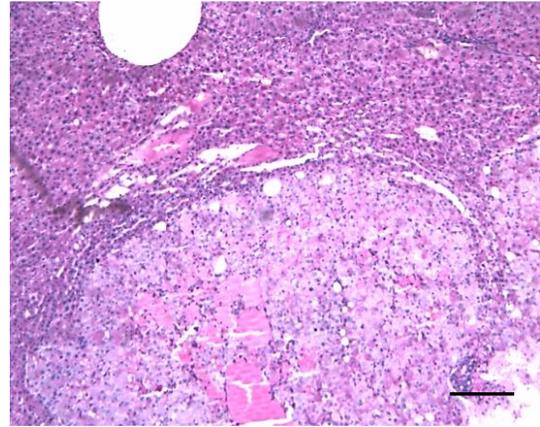
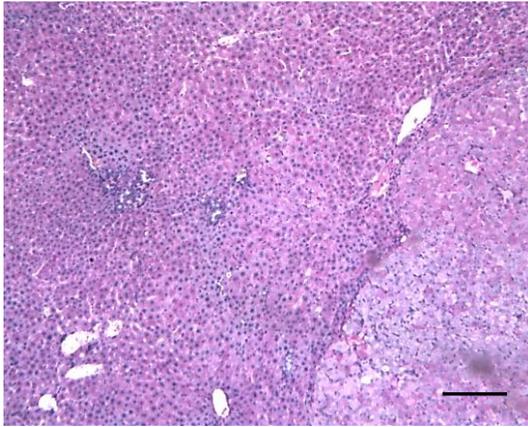


40X

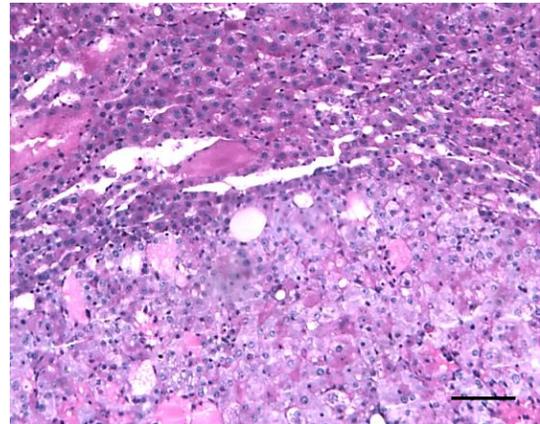
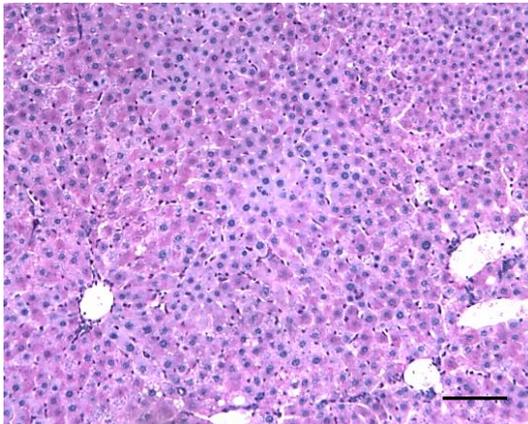


B) TRICRÓMICA DE GOMORI

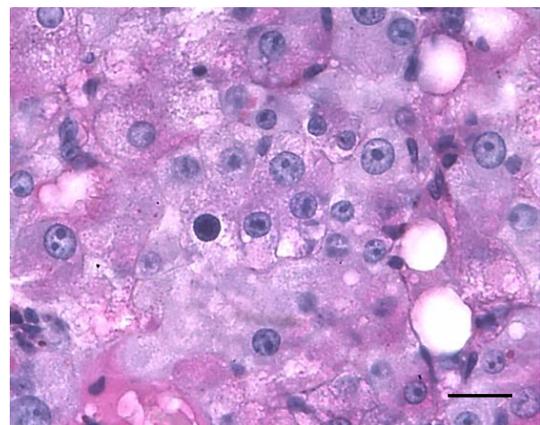
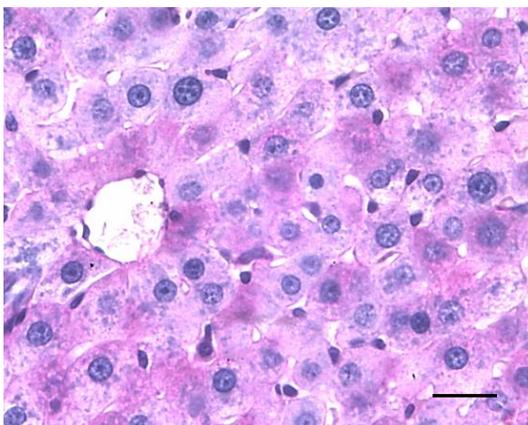
5X



10X

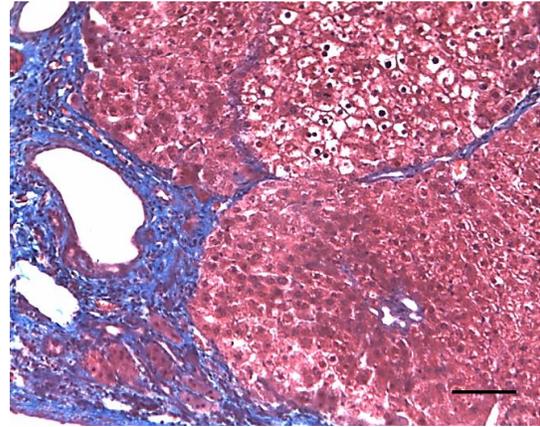
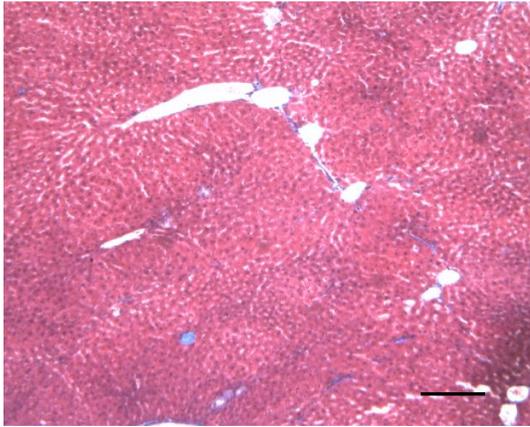


40X

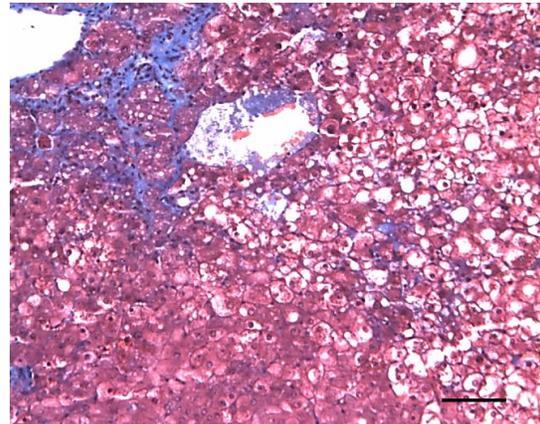
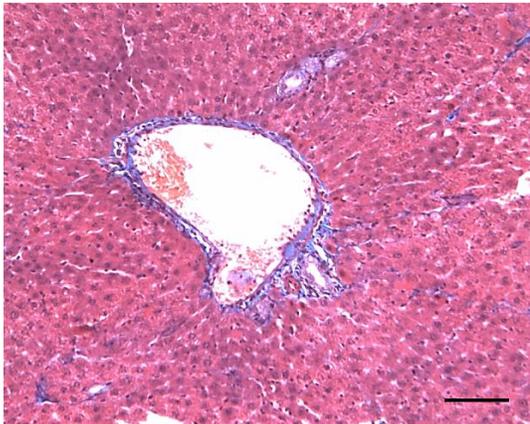


C) ÁCIDO PERYODICO DE SHIFF (PAS)

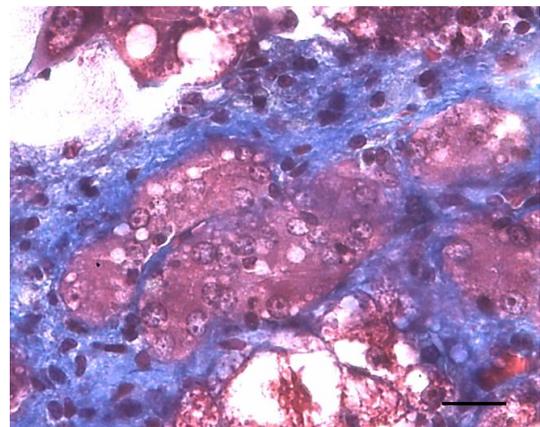
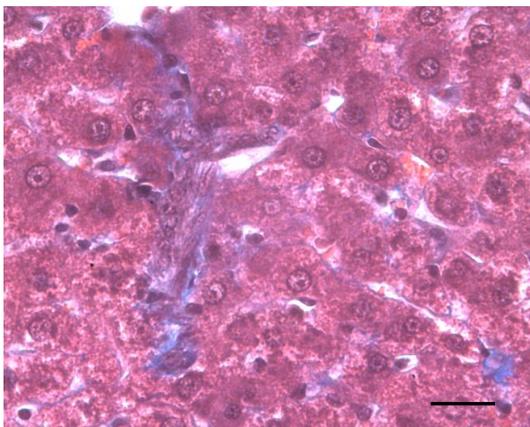
5X



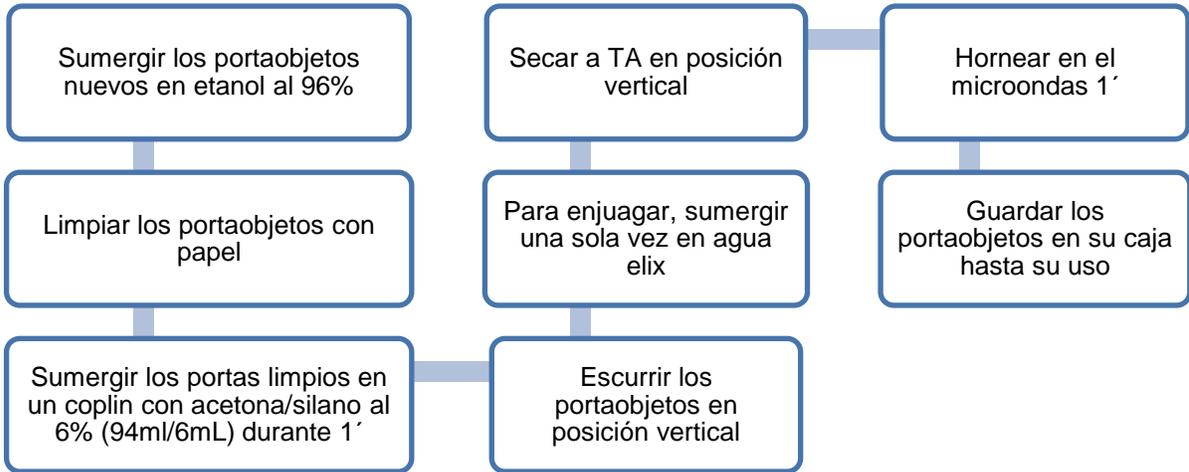
10X



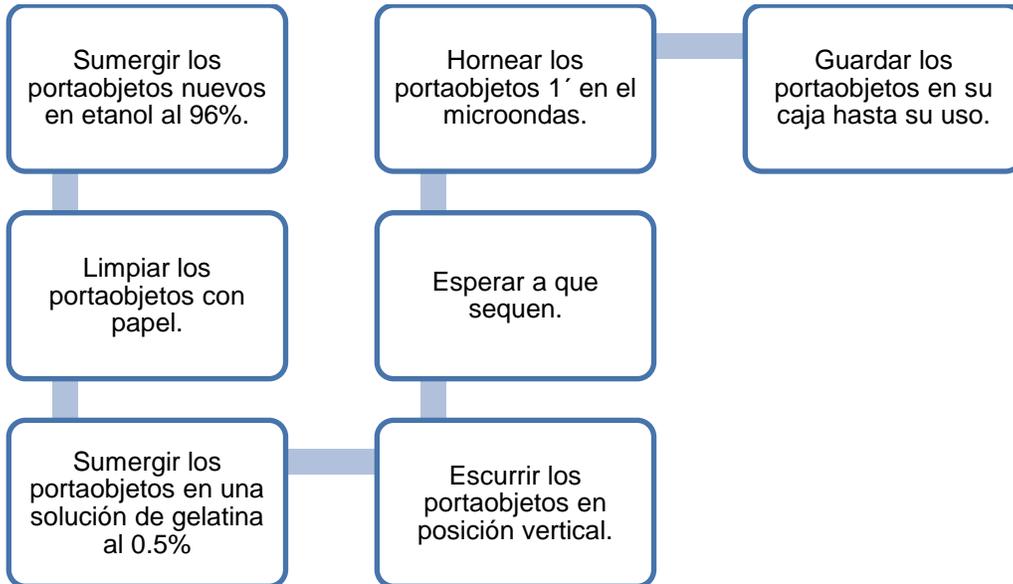
40X



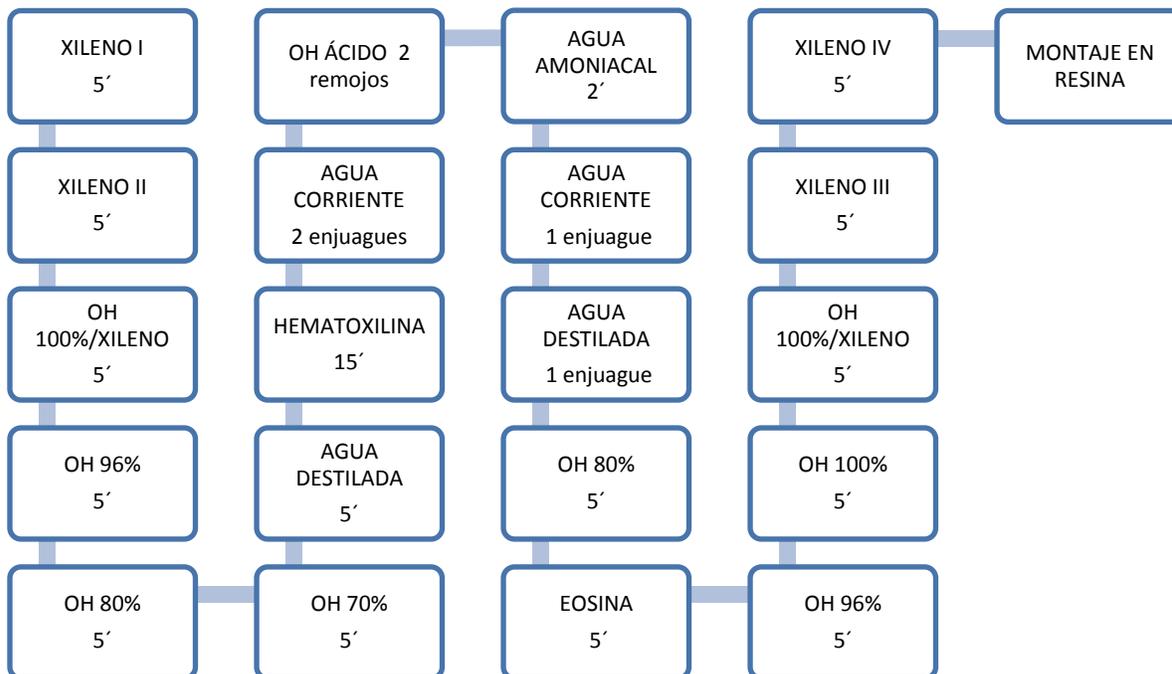
D. PORTAOBJETOS SILANIZADOS



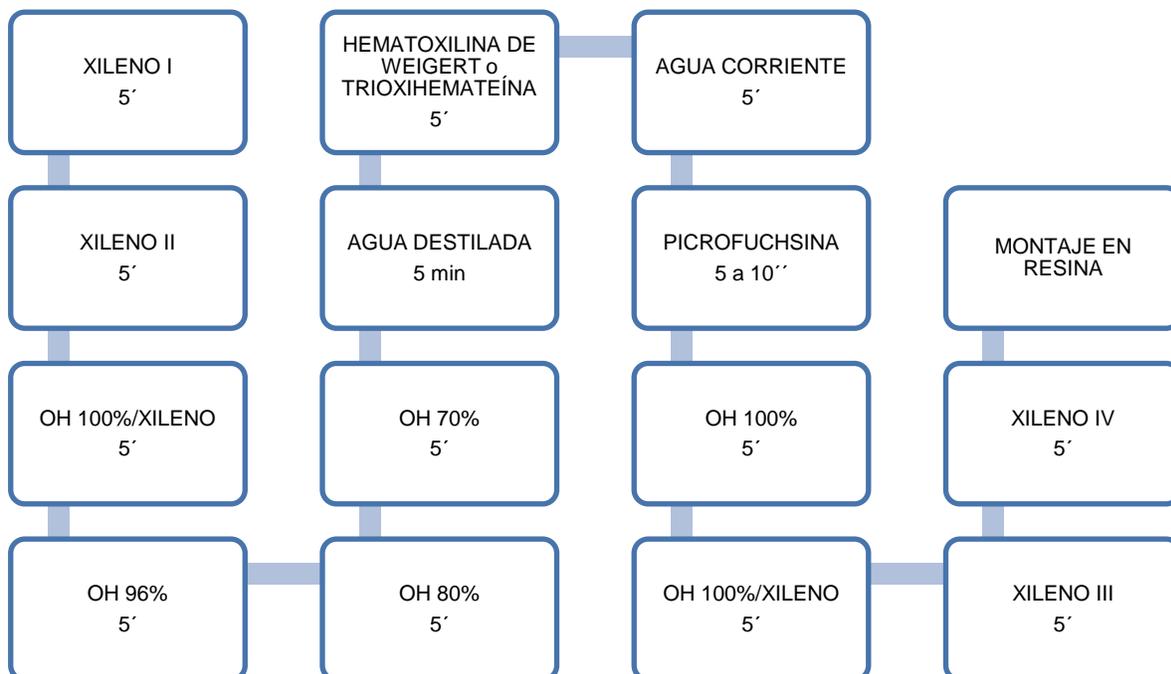
E. PORTAOBJETOS GELATINIZADOS



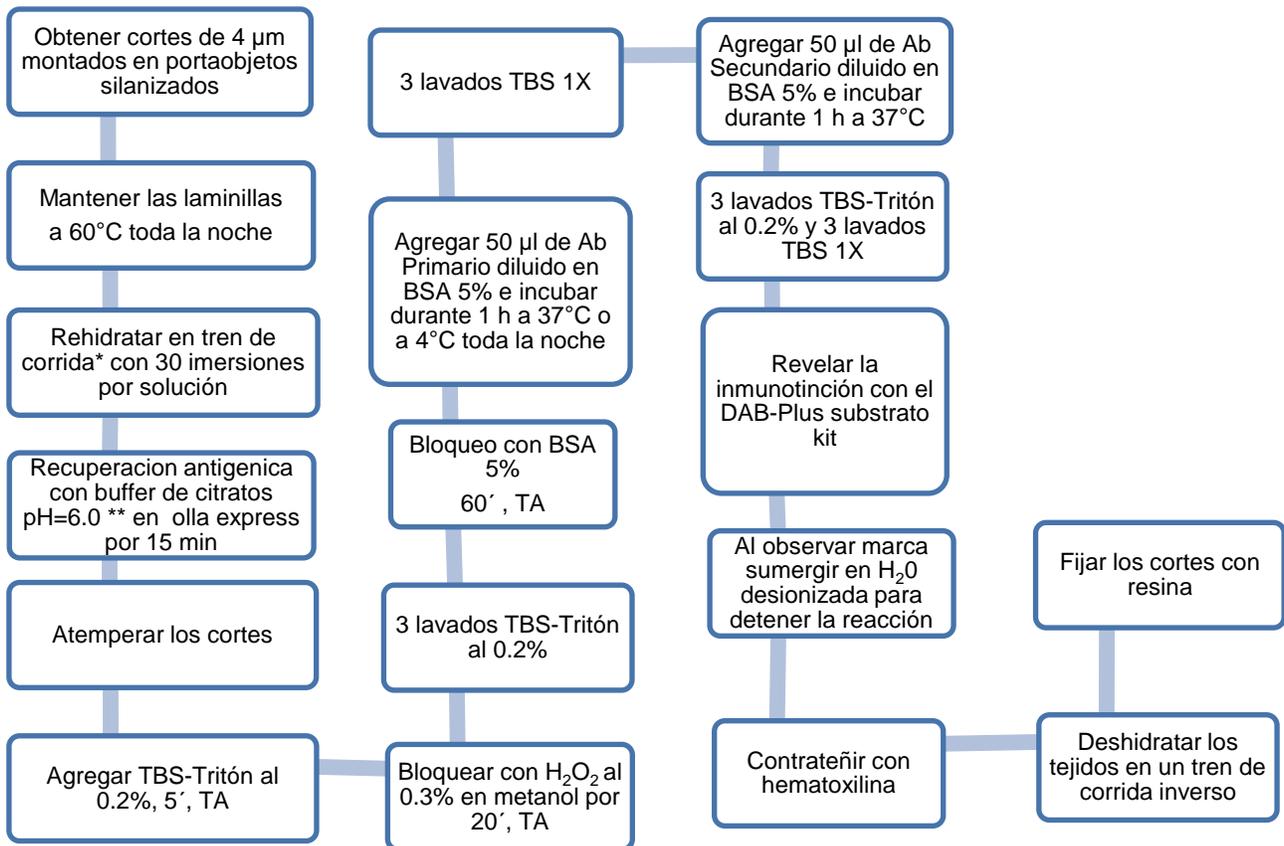
F. TINCIÓN HEMATOXILINA Y EOSINA



G. TRICRÓMICA DE VAN GIESON



H. INMUNOHISTOQUÍMICA



* Tren de Corrida

Se empleó para rehidratar tejidos fijados y procesados por el método de inclusión en parafina, en sentido inverso para deshidratar tejidos para el montaje de preparados permanentes.

El orden de las soluciones empleado es el siguiente: Xileno I, Xileno II, Alcohol/Xileno, OH 96%, OH 80%, OH 70%, OH60% y H₂O destilada. En tiempos de 3 minutos por solución.

****Buffer de citratos 10 Mm pH 6.0**

18 mL de solución stock A + 82 mL de solución stock B. Aforar a 1 L con H₂O des ionizada, ajustar a pH 6.0 y esterilizar.

Stock A: Aforar 4.2 g de ácido cítrico a 20 mL con H₂O des ionizada (0.71 M). Esterilizar.

Stock B: 14.7 g de citrato sodio y aforar a 500 mL con H₂O des ionizada (0.1M). Esterilizar.

I. REACTIVO DE BRADFORD

100 mL Ácido ortofosfórico (85%) MERK

50 mL Alcohol etílico 100%

100 mg Azul de coomasíe G250

La preparación se lleva a cabo en un matraz de bola, colocando el azul de coomasie G250 y el alcohol, disolver totalmente el colorante mediante agitación manual en forma circular. Posteriormente agregar el ácido orto fosfórico y mezclar. Almacenar un frasco ámbar a 4 °C.