



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**ESTUDIO CLASTOGÉNICO MEDIANTE LA TÉCNICA
DE MICRONÚCLEOS Y TOXICIDAD SUBCRÓNICA DE
LOS COMPUESTOS LQM 700's EN RATONES DE LA
CEPA CD1.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

P R E S E N T A:

MARÍA GUTIÉRREZ SÁNCHEZ

ASESORA: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2015



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES**

U.N.A.M.
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

**M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE**

**ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.**

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Estudio clastogénico mediante la técnica de micronúcleos y toxicidad subcrónica de los compuestos LQM 700's en ratones de la cepa CD1.

Que presenta la pasante: María Gutiérrez Sánchez
Con número de cuenta: 411010524 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el **EXAMEN PROFESIONAL** correspondiente, otorgamos nuestro **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cuautitlán Izcalli, Méx. a 06 de Abril de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	Q.F.B. Brígida del Carmen Camacho Enriquez	
1er. SUPLENTE	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Sara Hernández Matilde	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

IHM/mmgm*

El presente trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto PAPIIT IT202512 titulado: *“Estudio antigenotóxico, antiproliferativo e inhibidor de lesiones precancerosas de un grupo de análogos del éster feniletílico del ácido caféico (CAPE) desarrollados en la FES-Cuautitlán”*. La investigación se realiza a cargo de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo.

CRÉDITOS

- ✓ La fase experimental del presente trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Citogenética L-521 y en el Laboratorio 9 de Toxicología y Genética de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES-Cuautitlán bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo con la colaboración de la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la FES-Cuautitlán a cargo del M. en C. Crisóforo Mercado Márquez.

- ✓ Los compuestos LQM 731, 738 y 755, objetos del presente trabajo, fueron desarrollados por el equipo del Laboratorio de Química Medicinal de la FES-Cuautitlán, a cargo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano.

DEDICATORIAS

A mi mamá, no hay palabras adecuadas o quizás aún no las encuentro. Sólo sé que soy afortunada al tener una mamá como tú. No hizo falta nada ni nadie. Gracias por ser el mejor ejemplo a seguir, por el valor y el coraje que siempre has tenido para sacarme adelante, porque gracias a ti llegué hasta aquí y soy quien soy. Nunca he sabido cómo gritarlo más fuerte.

A Papá y Mamá Silvia, por cuidarme siempre, son simplemente los mejores.

A José Luis Meza, por siempre estar al pendiente, por apoyarme en todo momento, por ser un gran amigo y por haber aportado siempre algo, para que hoy sea quien soy.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por ser la meta que siempre me propuse cumplir y por permitirme lograrlo.

A la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo, por brindarme su apoyo, tiempo y conocimientos en la realización de este trabajo.

A Manuel Sandoval, por ser el cómplice que me apoya en todo momento.

A José Meneses, por todas las aventuras que hemos tenido, che! Vos sos una persona que no necesita de palabras para entender lo que significa para mí, siempre.

A Rebeca Montero, por todas las tonterías y las risas, por compartir tantas desveladas, por todos esos exámenes en los que sacábamos la misma calificación, por ser la mejor compañía y el mejor equipo, por todos los trabajos hechos en el último momento, porque juntas aprendimos que todo, al final, siempre sale.

A Ana Guerra, porque para sentirte a gusto en cualquier lugar, hay que encontrar personas a quienes puedas considerar tu familia, gracias por serlo durante dos años.

A Ivan Salgado, por ser la persona más difícil de entender pero la más fácil de querer.

A mis sinodales, por brindarme su tiempo y consejos para la mejora de este trabajo.

La ciencia es una sola luz, e iluminar con ella cualquier parte, es iluminar con ella el mundo entero.

Isaac Asimov

ÍNDICE

TABLA DE ABREVIATURAS	vi
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABLAS	viii
RESUMEN	1
MARCO TEÓRICO	3
1. Cáncer.....	3
1.1 Ciclo celular y origen del cáncer	3
1.2 El cáncer como enfermedad genética	9
1.3 Carcinogénesis.....	13
1.4 Epidemiología del cáncer	16
2. Terapia farmacológica contra el cáncer	20
2.1 Clasificación según su actividad en el ciclo celular.....	20
2.2 Clasificación de antitumorales por mecanismo de acción	21
2.3 Quimioprevención	27
3. Éster feniletílico del ácido cafeico (CAPE)	28
3.1 Propóleo	28
3.2 CAPE y estudios realizados	29
3.3 Análogos estructurales del CAPE.....	32
3.4 Compuestos de la serie LQM 700's	34
4. La técnica de Micronúcleos.....	36
4.1 Antecedentes de la técnica de micronúcleos.....	37
4.2 Fundamento de la técnica de micronúcleos en sangre periférica	38
4.3 Ventajas y desventajas de la técnica de micronúcleos	40
JUSTIFICACIÓN.....	41
OBJETIVOS	42
1. Objetivo General	42
2. Objetivos Particulares	42
DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL	43
MATERIALES Y MÉTODO.....	44
RESULTADOS	47
DISCUSIÓN.....	54
CONCLUSIONES	61
PROSPECTIVAS.....	62
REFERENCIAS.....	63

TABLA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
CAK	Cinasas activadoras de CDKs
CAPA	Amida feniletílica del ácido caféico
CAPE	Éster feniletílico del ácido caféico
CDK	Cinasas dependientes de ciclinas
CKI	Inhibidores de CDKs
DMSO	Dimetil sulfóxido
ENC	Eritrocito normocrómico
ENCMN	Eritrocito normocrómico micronucleado
EPC	Eritrocito policromático
EPCMN	Eritrocito policromático micronucleado
kg	kilogramo
LQM	Laboratorio de Química Medicinal
M	Mitosis
mg	miligramo
MMC	Mitomicina C
MN	Micronúcleo
PEB	Proeritroblasto

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Las etapas del ciclo celular
- Figura 2. Esquema de los pasos esenciales en la regulación del ciclo celular
- Figura 3. Evolución clonal de células tumorales
- Figura 4. Mutación en oncogenes
- Figura 5. Mutación en genes supresores de tumor
- Figura 6. Generalidades de los cambios en células que causan cáncer
- Figura 7. Fases de la carcinogénesis
- Figura 8. Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población menor de 20 años, por principales tumores malignos según sexo en 2011
- Figura 9. Tasa de letalidad hospitalaria de tumores malignos en población menor de 20 años, por grupo de edad según sexo, por cada 100 egresos hospitalarios para cada grupo de edad, en 2011
- Figura 10. Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población de 20 años y más, por principales tumores malignos según sexo en 2011
- Figura 11. Tasa de letalidad hospitalaria de tumores malignos en población de 20 años y más, por cada 100 egresos hospitalarios para cada grupo de edad, en 2011
- Figura 12. Ciclo celular y fase de acción de los citostáticos
- Figura 13. Estructura química de algunos agentes alquilantes
- Figura 14. Estructura química de algunos antimetabolitos
- Figura 15. Estructura química de algunos antibióticos citotóxicos
- Figura 16. Estructura química de agentes antitubulina
- Figura 17. Estructura química de agentes derivados del platino
- Figura 18. Estructura química de algunos agentes inhibidores de topoisomerasa
- Figura 19. Estructuras del ácido caféico (CA) y su éster feniletílico (CAPE)
- Figura 20. Reacción general para la síntesis de CAPE
- Figura 21. Derivados fluorados del CAPE
- Figura 22. Amida feniletílica del ácido caféico (CAPA)
- Figura 23. Reacción de síntesis de amidas a partir de derivados del ácido cinámico
- Figura 24. Micronúcleos en frotis sanguíneo
- Figura 25. Mecanismo de formación de un micronúcleo en EPCs y ENCs
- Figura 26. Promedio de porcentajes de EPCs y su error estándar en un total de 2000 células contadas por ratón, obtenidos en los diferentes tiempos de evaluación aguda
- Figura 27. Promedio de porcentajes de EPCs y su error estándar en un total de 2000 células contadas por ratón, obtenidos en las diferentes semanas de evaluación subcrónica
- Figura 28. Promedio del número de EPCMN y su error estándar en un total de 2000 EPC's contados por ratón, obtenidos en las diferentes horas de evaluación aguda
- Figura 29. Promedio del número de EPCMN y su error estándar en un total de 2000 EPC's contados por ratón, obtenidos en las diferentes semanas de evaluación subcrónica
- Figura 30. Promedio del número de ENCMN y su error estándar en un total de 2000 ENC's contados por ratón, obtenidos en las diferentes semanas de evaluación subcrónica

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Complejos de Ciclina-CDK activados en puntos específicos del ciclo celular

Tabla 2. Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKI)

Tabla 3. Algunos oncogenes bien caracterizados y sus funciones

Tabla 4. Algunos genes supresores de tumores y sus funciones

Tabla 5. Composición promedio del propóleo

Tabla 6. Distribución de lotes

Tabla 7. Promedio de porcentajes de EPCs y su error estándar en un total de 2000 células contadas por ratón, obtenidos en los diferentes tiempos de evaluación aguda

Tabla 8. Promedio de porcentajes de EPCs y su error estándar en un total de 2000 células contadas por ratón, obtenidos en las diferentes semanas de evaluación crónica

Tabla 9. Promedio del número de EPCMN y su error estándar en un total de 2000 EPCs contados por ratón, obtenidos en las diferentes horas de evaluación aguda

Tabla 10. Promedio del número de EPCMN y su error estándar en un total de 2000 EPCs contados por ratón, obtenidos en las diferentes semanas de evaluación subcrónica

Tabla 11. Promedio del número de ENCMN y su error estándar en un total de 2000 ENCs contados por ratón, obtenidos en las diferentes semanas de evaluación subcrónica

Tabla 12. Observaciones en el lote de ratones al que se administró LQM 731 y Control 1 y 2

Tabla 13. Observaciones en el lote de ratones al que se administró LQM 738 y Control 3 y 4

Tabla 14. Observaciones en el lote de ratones al que se administró LQM 755 y Control 7 y 8

RESUMEN

El cáncer no es una enfermedad única; más bien es un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por la presencia de células que no responden a los controles normales de la división. Las células cancerosas se dividen rápida y continuamente, por lo que crean tumores que desplazan a las células normales y finalmente privan a los tejidos sanos de sus nutrientes.

Los compuestos del Laboratorio de Química Medicinal, serie 700's (LQM 700's), pertenecen a los compuestos CAPA, que son análogos amídicos del éster feniletílico del ácido caféico (CAPE). Se han utilizado líneas celulares de cáncer de mama, cérvix y próstata para evaluar la citotoxicidad de dichos compuestos, así como estudios de genotoxicidad en linfocitos humanos y en un modelo modificado de hepatocito se ha demostrado que poseen actividad quimioprotectora.

Como parte de los estudios preclínicos que permiten perfilar a los compuestos de la serie LQM 700's, en estudios previos se evaluó su capacidad antigenotóxica en un modelo *in vivo* utilizando el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa), obteniendo como resultado que dichos compuestos ejercen su efecto antigenotóxico en una dosis de 20 mg/kg y por el comportamiento observado en dichos estudios, es posible perfilarlos como fármacos quimioprotectores.

Con los estudios mencionados, se despertó el interés por realizar otros ensayos que caractericen mejor su actividad quimioprotectora, así como la evaluación de parámetros de toxicidad en un período subcrónico de exposición en modelos animales de experimentación *in vivo*, como la actividad genotóxica y citotóxica que pudieran provocar, ya que de esto dependerá el posible uso de los compuestos de la serie LQM 700's como anticancerígenos. Una evaluación toxicológica completa significa que la toxicidad del compuesto debe ser probada mediante diversos ensayos: unos cortos, para detectar la toxicidad general sobre el animal de experimentación; y otros prolongados, para comprobar toxicidades específicas después de una exposición continuada durante un largo periodo de vida de los animales.

Para evaluar la actividad genotóxica y citotóxica de LQM 731, 738 y 755 se utilizó el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratones cepa CD1. El roedor es la especie más utilizada para los estudios preclínicos de cualquier compuesto de nueva síntesis al que se le realizará la determinación de toxicidad o efecto tóxico sobre el material hereditario.

El ensayo de micronúcleos es simple y de análisis rápido, además de que los micronúcleos pueden ser observados durante todo el ciclo celular y el número de células contables es relativamente ilimitado. Los micronúcleos son fragmentos intracitoplasmáticos de cromatina que se encuentran separados del núcleo principal y que se forma a partir de la ruptura de fragmentos cromosómicos acéntricos o por aquellos cromosomas que sufren un rezago anafásico, lo cual se traduce en la

aparición de un pequeño núcleo en células anucleadas como los eritrocitos o bien, en el citoplasma de nucleadas como linfocitos o espermatogonias. El ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos está indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para profundizar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro*.

El ensayo de micronúcleos se llevó a cabo durante 6 semanas, administrando los compuestos en una dosis de 15 mg/kg de peso una vez por semana. Los ratones se distribuyeron en 4 lotes, un lote control al que se le administró sólo el vehículo y los tres restantes para cada compuesto a evaluar. Se tomó muestra de sangre periférica de la cola de los ratones 24, 48 y 72 hrs. después de la primera administración y 48 hrs. después de las administraciones restantes. El efecto genotóxico se obtuvo del promedio del conteo de 2000 EPCs por ratón, identificando cuántos de estos poseían MN. El efecto citotóxico se obtuvo del promedio de la relación EPC/ENC en un total de 2000 células contadas por ratón. El análisis estadístico de los resultados se realizó con las pruebas de ANOVA y las de comparaciones múltiples de Tukey con un $p < 0.05$ en el programa *GraphPad InStat versión 3.1*.

Con los resultados de este estudio a través del ensayo de micronúcleos se concluyó que los tres compuestos evaluados no presentan actividad citotóxica tanto en el estudio de tiempo agudo como de tiempo subcrónico. El compuesto LQM 731 fue el que más actividad genotóxica presentó durante las 6 semanas de administración. El compuesto LQM 738 fue el que menos actividad genotóxica presentó de los tres compuestos evaluados. El compuesto LQM 755 sólo presentó actividad genotóxica en el tiempo subcrónico de administración después de la tercera semana. La actividad genotóxica que presentaron los tres compuestos es menor a la que presenta un agente clastógeno como MMC. De los tres compuestos el que podría perfilarse como mejor fármaco quimioprotector es el LQM 738 por presentar la menor genotoxicidad.

MARCO TEÓRICO

1. Cáncer

Cáncer es un término que se usa para enfermedades en las que células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos. Las células cancerosas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y por el sistema linfático (Instituto Nacional del Cáncer EE. UU., 2014).

El cáncer no es una enfermedad única, más bien es un grupo heterogéneo de trastornos caracterizados por la presencia de células que no responden a los controles normales de la división. Las células cancerosas se dividen rápida y continuamente, por lo que crean tumores que desplazan a las células normales y finalmente privan a los tejidos sanos de sus nutrientes (Pierce, 2009).

El cáncer es una enfermedad multifactorial que puede aparecer en diversos órganos, pero con una característica común, la mayoría de los tumores surgen debido a que las células que les dan origen albergan una o más mutaciones genéticas que les permiten proliferar fuera de su crecimiento normal y sin las restricciones que obedecen células normales (Garrett, 2001).

1.1 Ciclo celular y origen del cáncer

El cáncer es considerado frecuentemente como una enfermedad del ciclo celular. La pérdida de regulación del ciclo celular es una de las alteraciones más frecuentes durante el desarrollo de un tumor. La progresión del ciclo celular es un proceso altamente ordenado y regulado que envuelve múltiples puntos de control (checkpoints) que evalúan las señales de crecimiento, el tamaño de la célula y la integridad del ADN. Cinasas dependientes de ciclinas (CDKs) y ciclinas, son reguladores positivos o aceleradores que inducen la progresión del ciclo celular; por otra parte, inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKIs) actúan para detener la progresión del ciclo celular en respuesta a señales regulatorias como importantes reguladores negativos. El cáncer se origina por la expresión anormal o activación de reguladores positivos y la supresión de la función de reguladores negativos (Park & Lee, 2002).

1.1.1 Estrategia general del ciclo celular

La división celular consiste en dos procesos consecutivos, principalmente caracterizados por la replicación del ADN y la segregación de cromosomas replicados en células separadas. La división celular está dividida en dos etapas: mitosis (M), el proceso de división nuclear; e interfase, el interludio entre dos fases M. Las etapas de la mitosis son: profase, metafase, anafase y telofase. Bajo el microscopio, la célula en

interfase simplemente tiene un aumento en su tamaño, pero diferentes técnicas han revelado que en la interfase se tienen tres etapas: G₁, S y G₂. La replicación del ADN ocurre en la fase S, la cual es precedida por una etapa llamada G₁ en la cual la célula se prepara para la síntesis de ADN y a la que le sigue una etapa llamada G₂, en la que la célula se prepara para la mitosis. Células en G₁ pueden entrar en una etapa de quiescencia llamada G₀ antes de la replicación del ADN. Las células en G₀ no crecen ni proliferan (Vermeulen *et al.*, 2003).

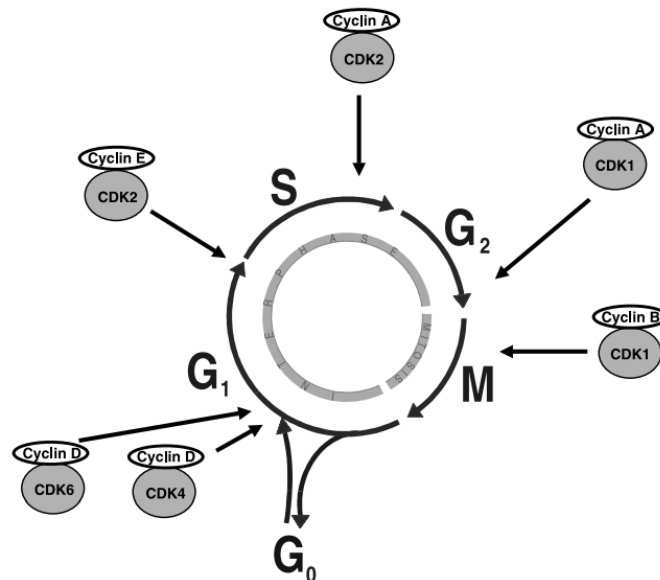


Figura 1. Las etapas del ciclo celular
Fuente: Vermeulen *et al.*, 2003

1.1.2 Control de la progresión del ciclo celular

El corazón del aparato regulador durante la progresión del ciclo celular es una familia de enzimas llamadas cinasas dependientes de ciclinas (CDKs). Las formas activas de las CDKs son un complejo de al menos dos proteínas, una cinasa y una ciclina (Tabla 1). El ciclo celular se determina por la activación o inactivación a través de la fosforilación de proteínas, que resulta en la activación de CDKs en la primera etapa (Figura 1) (Park & Lee, 2002). Los niveles de las CDKs permanecen estables durante el ciclo celular, en contraste con sus proteínas activadoras. La concentración de ciclinas aumenta y disminuye durante el ciclo celular y así es como activan periódicamente a sus CDKs. Los tres tipos de ciclina D (1, 2 y 3) se unen a CDK4 y CDK6, formando complejos que son esenciales para iniciar la fase G₁. La ciclina D no es expresada periódicamente, sino que es sintetizada cuando existe estimulación por factores de crecimiento. La ciclina E asociada con CDK2 regula la progresión de fase G₁ a S. La ciclina A se une a CDK2 y su complejo es requerido durante la fase S. Al final de la fase G₂ e inicio de la mitosis, el complejo de ciclina A con CDK1 promueve el inicio de la mitosis. Más adelante, la mitosis será regulada por el complejo ciclina B-CDK1 (Vermeulen *et al.*, 2003).

Tabla 1. Complejos de Ciclina-CDK activados en puntos específicos del ciclo celular

CDK	Ciclina	Fase de actividad en el ciclo celular
CDK4	Ciclina D1, D2, D3	Fase G ₁
CDK6	Ciclina D1, D2, D3	Fase G ₁
CDK2	Ciclina E	Transición G ₁ /S
CDK2	Ciclina A	Fase S
CDK1	Ciclina A	Transición G ₂ /M
CDK1	Ciclina B	Mitosis
CDK7	Ciclina H	CAK, todas las fases

Fuente: Vermeulen, *et al.* (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif. Jun*;36(3):131-49. Review.

La transición de las células de una etapa del ciclo celular a otra es altamente regulada por controles que actúan en la transcripción de genes de ciclinas, la degradación de ciclinas y la modificación de subunidades de cinasas por fosforilación. Circuitos de retroalimentación positivos y negativos también contribuyen a la progresión del ciclo celular. La actividad de CDKs es regulada positivamente por la asociación con ciclinas y por su fosforilación a través de cinasas activadoras de CDKs (CAK). La inhibición de la fosforilación de CDK1 está mediada por dos cinasas específicas: Weel y MYT1. Esta inhibición se suspende con CDC25, lo cual provoca el inicio de la mitosis. Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKIs) regulan negativamente la actividad de las CDKs. Existen dos tipos de CKIs como se muestra en la Tabla 2. Los cuatro miembros de la familia INK4: INK4 (p16), INK4B (p15), INK4C (p18) y INK4D (p19); que ejercen su actividad inhibitoria a través de su unión con CDK4 y CDK6, y previniendo su asociación con ciclinas tipo D. Los tres miembros de la familia CIP/KIP, CIP1 (p21), KIP1 (p27) y KIP2 (p57), forman complejos heterodiméricos con CDKs de la transición G₁/S. CIP1 es uno de los efectores de p53, un supresor de tumores que es importante en el punto de control de daño a ADN (Park & Lee, 2002).

Tabla 2. Inhibidores de cinasas dependientes de ciclinas (CKI)

Familia CKI	Función	Miembros
Familia INK4	Inactivación de CDKs de G ₁ (CDK4, CDK6)	p15 (INK4b) p16 (INK4a) p18 (INK4c) p19 (INK4d)
Familia CIP/KIP	Inactivación de complejos ciclina-CDK en G ₁ y de complejo ciclina B-CDK1	p21 (Waf1, Cip1) p27 (Cip2) p57 (Kip2)

Fuente: Vermeulen, *et al.* (2003) The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell Prolif. Jun*;36(3):131-49. Review.

1.1.3 Checkpoints del ciclo celular

Anteriormente, se describió la maquinaria molecular que maneja la progresión del ciclo celular a través de los CDKs, así es posible entender cómo funcionan los checkpoints del ciclo celular y su relación con el cáncer. De esta manera, se vuelve claro que existen genes que participan en dichos puntos de control, que son blancos frecuentes de alteraciones genéticas en el cáncer.

Fase G₁. Fase crítica donde las señales extracelulares positivas y negativas están integradas en la regulación de la progresión del ciclo. Si la célula no recibe las señales correctas, no puede pasar el punto de restricción y se quedará en estado quiescente de G₀. A nivel molecular, las cinasas dependientes de ciclina D actúan como integradores de señales extracelulares (Garrett, 2001). Algunas alteraciones genéticas en esta fase, que tienen la habilidad de causar la activación de las cinasas dependientes de ciclina D provocando la inapropiada fosforilación de pRb, perdiendo la regulación del punto de restricción son las siguientes:

- La expresión de la ciclina D1 puede estar inducida por la señalización de Ras y PI3 cinasa, promoviendo la progresión de G₁. Por tanto, la cinasa dependiente de ciclina D, sus reguladores y pRb son puntos de control para la progresión de G₁ y se encuentran sumamente ligados con el cáncer. Los genes Ras, el gen PIK3CA que codifica para la subunidad p110 α de la PI3 cinasa y el gen supresor de tumores PTEN que actúa como una lípido fosfatasa que revierte la reacción de la PI3 cinasa, han mostrado mutaciones en el cáncer.
- Cinasas dependientes de ciclina D, sus reguladores, así como el gen que codifica a pRb (RB) son blancos del cáncer, muchos tumores contienen alteraciones genéticas en algunos de estos genes.
- Al gen BCL1 que codifica para la ciclina D1, se le halló una translocación t(11:14) en células de linfoma. Amplificación en el locus 11q13 también ha sido identificada en numerosos tipos de cáncer.
- El gen supresor de tumores CDKN2 que codifica para la proteína p16 ha tenido delección, mutación o se ha visto silenciada su expresión en múltiples tipos de cáncer.
- Amplificación de CDK4, con bajos niveles de la proteína p27 se han encontrado en cáncer de colon y de mama (Garrett, 2001).

Transición G₁/S. La respuesta de una célula normal a un daño en el ADN es la activación de vías celulares que inducen al arresto del ciclo celular en la transición G₁/S. Dos eventos celulares han sido identificados como puntos de control, uno de ellos es la degradación de la ciclina D1. Esto lleva a la liberación de p21 para inhibir a CDK2; el otro, es el incremento de la inhibición en la fosforilación de CDK2 que lleva a la degradación de la fosfatasa Cdc25A, la cual es inducida por una cinasa conocida como Chk1. El mantenimiento del control en la transición G₁/S depende del producto de un gen supresor de tumor llamado TP53. Este gen se encuentra mutado o borrado en más de la mitad de los casos de cáncer. El producto de este gen es conocido como p53 o "Guardián del Genoma". Su función es recibir señales de estrés (incluyendo daño al

ADN) que causan la activación y acumulación de la proteína p53 en la célula, lo cual induce la expresión de genes que pueden arrestar el ciclo celular y llevar a la apoptosis. Un miembro de la familia CIP/KIP, p21, es inducido, éste se une al complejo CDK2-ciclina E causando el arresto de la transición de G₁/S (Garrett, 2001).

Fase S. Tras la exposición a agentes que dañan el ADN el rango de síntesis de ADN disminuye pero no lo detiene, para poder completar la reparación a éste. Cinco proteínas han sido relacionadas con este punto de control: la protein cinasa ATM, NBS1, una proteína reparadora de ruptura de doble cadena de ADN que se encuentra mutada en el síndrome de Nijmegen (NBS), Mre11 que se encuentra mutada en el desorden AT y Rad50. Éstas se encuentran en un complejo que puede acarrear ADN dependiente de ATP desenrollado, proceso requerido para su reparación (Garett, 2001).

Transición G₂/M. Los puntos de control que actúan en la transición G₁/S también actúan aquí pero ahora tienen como objetivo el complejo CDK1/ciclina B, que es requerido para la transición de G₂ a mitosis. El punto de control consiste en mantener al complejo en estado inactivo. La ruta por la que esto se obtiene es inhibiendo la fosforilación de la CDK1. Esto se logra por el bloqueo de la función de la fosfatasa Cdc25C. ATM tiene un rol, mediar la fosforilación y activación de Chk1 y Chk2. Estas cinasas pueden fosforilar a Cdc25 y promover su asociación con proteínas 14-3-3. Esto lleva al secuestro de Cdc25 en el citoplasma, donde no puede desfosforilar al complejo CDK1/ciclina B. De igual manera, p53 regula el punto de control al inducir p21, que se une al complejo y lo inhibe en el núcleo (Garrett, 2001).

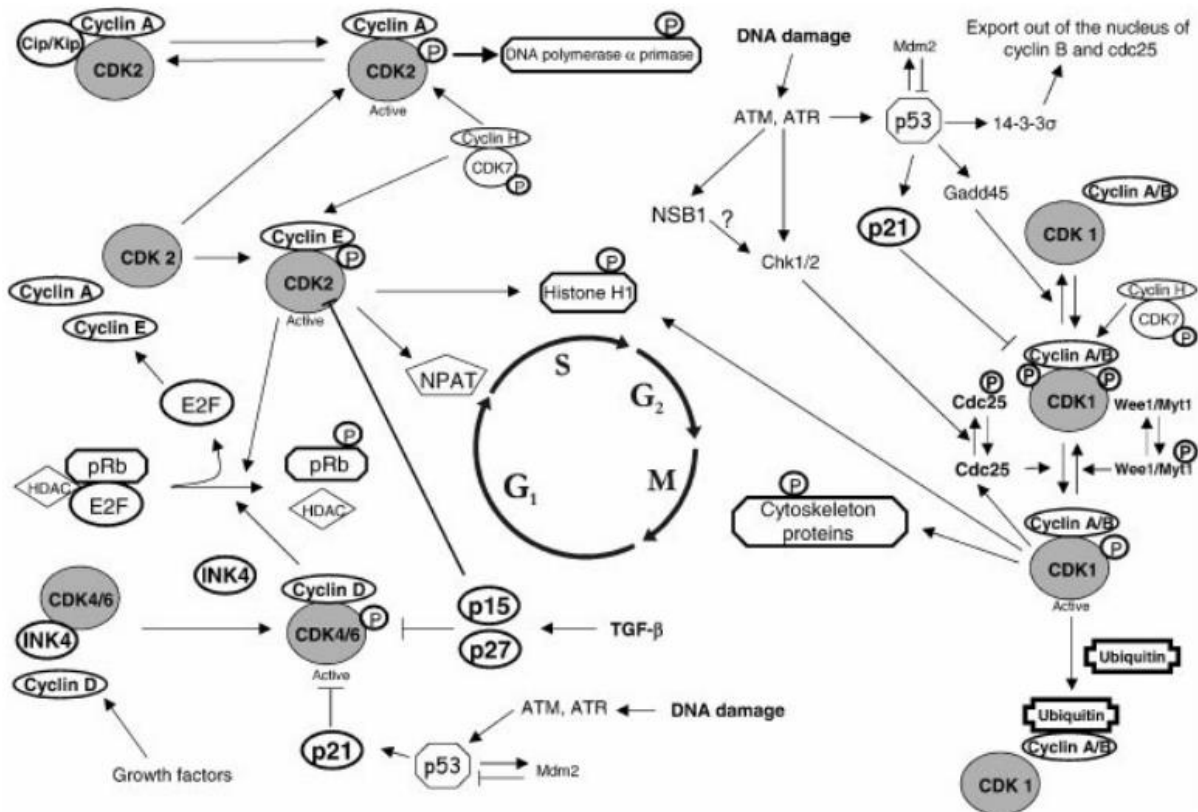


Figura 2. Esquema de los pasos esenciales en la regulación del ciclo celular
Fuente: Vermeulen *et al.*, 2003

1.1.4 Muerte celular programada

La muerte celular programada incluye la apoptosis, autofagia y necrosis programada y se distinguen por sus diferencias morfológicas. En sus tres formas la muerte celular programada es capaz de modificar el destino de células de tumores malignos, permitiendo o no la iniciación y/o progresión del cáncer (Ouyang *et al.*, 2012).

La apoptosis es el mecanismo de muerte celular tipo I y es el principal tipo de muerte celular que se produce cuando el daño del ADN es irreparable y es considerado el más importante. La autofagia, tipo II, es un proceso catabólico evolutivamente conservado que comienza con la formación de autofagosomas, estructuras de doble membrana que rodean macromoléculas y orgánulos citoplasmáticos, destinados al reciclaje, siendo éste un mecanismo en pro de la supervivencia, crucial en la homeostasis celular, requerida durante periodos de inanición o estrés por privación del factor de crecimiento. La necrosis programada, tipo III, consiste en la inflamación de células, la disfunción de organelos y la lisis celular (Ouyang *et al.*, 2012).

La apoptosis es el mecanismo mediante el cual las células son eliminadas de los tejidos de manera ordenada como parte del mantenimiento normal o durante el desarrollo. Este proceso muestra características morfológicas y bioquímica específicas: las células tienen la cromatina condensada, el núcleo en fragmentación y la membrana plasmática vesiculosa, formación de ampollas en la membrana dinámica y la pérdida de adhesión a las células vecinas o a la matriz extracelular, la célula se contrae y se rompe en fragmentos delimitados por la membrana denominados cuerpos apoptóticos. Los cambios bioquímicos incluyen escisión de ADN cromosómico en fragmentos internucleosomales, externalización de fosfatidilserina y un número de divisiones de sustrato intercelulares por proteólisis específica (Martínez, 2014).

Una vía apoptótica conservada consta de tres componentes principales: proteínas reguladoras, proteínas adaptadoras y proteínas efectoras denominadas caspasas. Las dos rutas principales para la apoptosis son la vía extrínseca (vía del receptor de muerte) y la vía intrínseca (mitocondrial). Ambas implican la activación de caspasas que conduce a la escisión de múltiples sustratos intercelulares (Lodish, 2005; Martínez, 2014).

Las proteínas reguladoras proapoptóticas estimulan la activación de las caspasas y los reguladores antiapoptóticos suprimen la activación. Las interacciones directas entre las proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas conducen a la muerte celular en ausencia de factores tróficos. La unión de factores tróficos extracelulares puede desencadenar cambios en estas interacciones, lo que da como resultado la supervivencia celular. La familia Bcl-2 contiene proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas, ambas son proteínas de membrana de paso único y están involucradas en las interacciones entre proteínas, estas pueden controlar la liberación del citocromo c de las mitocondrias y desencadenar la muerte celular. La unión de señales extracelulares o de muerte, como el factor de necrosis tumoral y el Fas ligando a sus receptores, activa una proteína asociada FADD que desencadena la cascada de caspasas que conducen a la muerte celular (Lodish, 2005).

1.2 El cáncer como enfermedad genética

El origen del cáncer es clonal, es decir, una célula de un tejido presenta cambios que conducen a la inmortalización y transformación (Domínguez, 2008).

El cáncer comienza cuando una sola célula sufre una mutación que la hace dividirse a una velocidad anormalmente elevada. La célula prolifera y origina un clon de células, cada una de las cuales porta la misma mutación. Como las células del clon se dividen más rápidamente que las normales, pronto las sobrepasan en número. Una mutación adicional que surja en algunas de las células del clon puede aumentar más su capacidad de proliferar, y las células que porten las dos mutaciones pronto serán las dominantes del clon. Finalmente, podrían ser superadas por células que contienen aún más mutaciones que aumentan la proliferación. En este proceso, llamado evolución clonal, las células tumorales adquieren más mutaciones que les permiten hacerse cada vez más agresivas en sus propiedades proliferativas (Pierce, 2009).

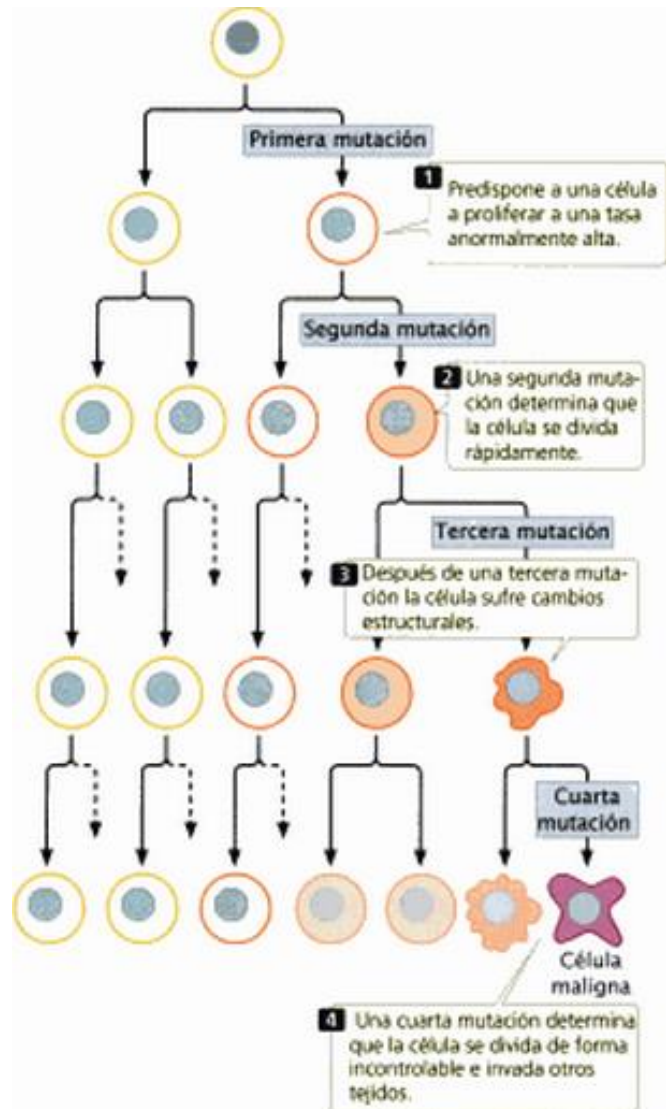


Figura 3. Evolución clonal de células tumorales
Fuente: Pierce, 2009

Dentro de los cambios genéticos que se presentan en el cáncer, en las células tumorales existen dos tipos de inestabilidad genética en distintos niveles: la inestabilidad observada a nivel de nucleótido que resulta en sustituciones, deleciones o inserciones de pocos nucleótidos y la inestabilidad observada a nivel cromosómico que resulta en pérdida o ganancia de un cromosoma completo o sólo de sus brazos largos (Lengauer, 1998).

La incidencia de ciertos tumores se incrementa con la edad, lo cual indica la existencia de eventos a nivel molecular que son irreversibles. Estos eventos están constituidos por mutaciones somáticas que se acumulan a un ritmo mayor que en células sanas, es decir, presentan un "fenotipo mutador". La acumulación de las mutaciones son el origen del desarrollo del cáncer, ya que el fenotipo mutador puede alterar los mecanismos de

control del ciclo celular, resistencia a apoptosis, reparación del ADN, o aumento en las frecuencias de errores en la replicación atribuibles a la ADN polimerasa. En promedio, se requieren entre 5 y 7 mutaciones en diferentes genes para que se desarrolle un tumor invasivo capaz de formar metástasis (Paniagua, 2010).

Los genes que se han identificado hasta hoy han sido ordenados en dos amplias categorías, dependiendo de sus funciones normales en las células (Martínez, 2014). Las alteraciones en protooncogenes y genes supresores de tumores son el origen de la mayoría de los tumores que afectan a los humanos (Paniagua, 2010).

Aunque los oncogenes, los genes supresores de tumores, o ambos son necesarios para producir el cáncer, las mutaciones de los genes reparadores del ADN pueden aumentar las probabilidades de adquirir mutaciones en ellos (Pierce, 2009).

1.2.1 Protooncogenes

Un gen estimulador del ciclo celular puede transformarse en hiperactivo o activarse en un momento inadecuado; en general, las mutaciones de los genes estimuladores son dominantes porque suele ser suficiente una mutación en una sola copia del gen para producir su efecto (Figura 4). Los genes estimuladores de acción dominante que causan cáncer se denominan oncogenes (Pierce, 2009). Dichos genes, en su forma normal, no mutada son llamados protooncogenes, los cuales codifican para proteínas normales que actúan sólo cuando reciben señales moléculas, generalmente están relacionadas con la proliferación (comúnmente receptores o reguladores de la transcripción) celular o con la apoptosis. La forma mutada u oncogen puede sobre expresar la proteína normal, o bien, expresar una proteína anormal que se mantiene activa independientemente de las señales reguladoras, por lo que el resultado neto es una ganancia de función (Domínguez, 2008).

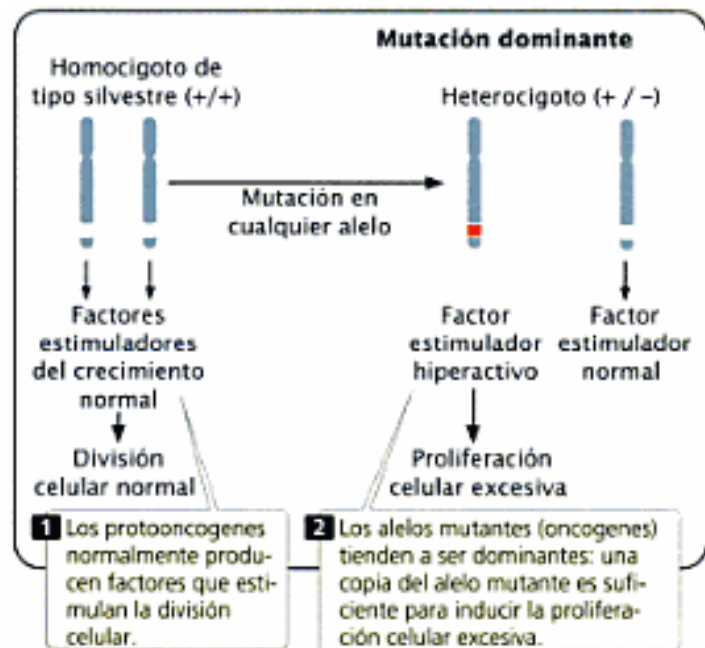


Figura 4. Mutación en oncogenes

Fuente: Pierce, 2009

Al menos cuatro mecanismos pueden producir oncogenes:

- Mutaciones puntuales (es decir, cambio en un único par de bases) en un protooncogen que deriva en un producto proteico activo en forma constitutiva.

- Translocación cromosómica que fusiona dos genes juntos para producir un gen híbrido que codifica una proteína quimérica cuya actividad, a diferencia de las de las proteínas progenitoras, a menudo es constitutiva.
- Translocación cromosómica que ubica un gen regulador del crecimiento bajo el control de un promotor diferente que causa la expresión inadecuada del gen.
- Amplificación (es decir, la replicación anormal de ADN) de un segmento de ADN que incluye un protooncogen, de manera que existan numerosas copias, lo que conduce a una sobreproducción de la proteína codificada (Lodish, 2005).

Un oncogen formado por cualquiera de los primeros dos mecanismos codifica una oncoproteína que difiere de la proteína normal codificada por el protooncogen correspondiente. Los otros dos mecanismos generan oncogenes cuyos productos proteicos son idénticos a las proteínas normales; su efecto oncogénico se debe a la producción en niveles superiores a los normales o en células donde normalmente no se producen (Lodish, 2005).

Se han identificado protooncogenes que codifican proteínas muy diversas (Tabla 3):

- Factores estimuladores del crecimiento celular
- Receptores de factores de crecimiento de hormonas
- Proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales
- Factores de transcripción que controlan la expresión de genes que codifican a su vez proteínas implicadas en la señalización, el control del ciclo celular o la apoptosis
- Proteínas responsables de la activación directa del ciclo celular o de la inhibición de apoptosis (Domínguez, 2008).

Tabla 3. Algunos oncogenes bien caracterizados y sus funciones

Oncogen	Localización	Función
Reguladores de transcripción nuclear		
jun	Núcleo	Factor de transcripción
fos	Núcleo	Factor de transcripción
erbA	Núcleo	Miembro familia de receptores de esteroides
Transductores de señales intracelulares		
abl	Citoplasma	Proteína tirosin cinasa
raf	Citoplasma	Proteína tirosin cinasa
gsp	Citoplasma	Subunidad alfa de proteína G
ras	Citoplasma	Proteína de unión GTP/GDP
Mitógeno		
sis	Extracelular	Factor de crecimiento
Receptores mitogénicos		
erbB	Membrana celular	Receptor tirosin cinasa
fms	Membrana celular	Receptor tirosin cinasa
Inhibidor de apoptosis		
bcl2	Citoplasma	Inhibidor de la cascada de caspasas

Fuente: Griffiths, A. (2005) *Introduction to genetic analysis*. New York, U.S.A.: Freeman and Company.

1.2.2 Genes supresores de tumores

La división celular también puede ser estimulada cuando los genes inhibitorios se inactivan. Los genes inhibidores mutados generalmente tienen efectos recesivos porque ambas copias deben estar mutadas para impedir toda inhibición (Figura 5). Los genes inhibidores en el cáncer se denominan genes supresores de tumores (Pierce, 2009). Los genes de supresión tumoral codifican proteínas que regulan el ciclo celular, paralizando o inhibiendo la proliferación celular. La pérdida de la función de estos genes afecta el control del crecimiento y el subsecuente desarrollo del tumor (Domínguez, 2008).

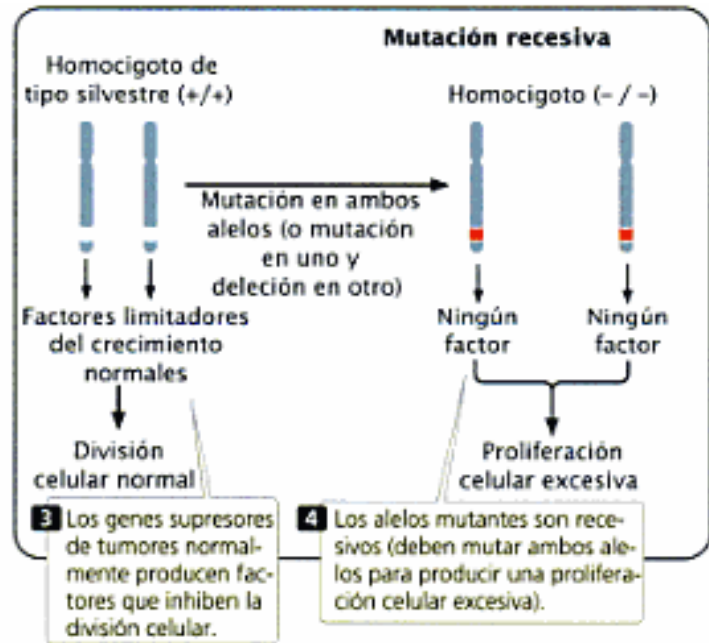


Figura 5. Mutación en genes supresores de tumor
Fuente: Pierce, 2009

Se reconocen cinco clases amplias de proteínas codificadas por genes supresores de tumores:

- Proteínas intracelulares que regulan o inhiben la progresión a través de un estadio específico del ciclo celular, por ejemplo, p16 y Rb.
- Receptores o transductores de señales para hormonas secretadas o señales de desarrollo que inhiben la proliferación celular, por ejemplo, TGFB y receptor hedgehog.
- Proteínas de control de puntos clave que detienen el ciclo celular si el ADN está dañado o los cromosomas son anómales, por ejemplo, p53.
- Proteínas que estimulan la apoptosis.
- Enzimas que participan en la reparación del ADN (Lodish, 2005).

Tabla 4. Algunos genes supresores de tumores y sus funciones

Gen	Localización celular	Función
NF1	Citoplasma	Activado de GTPasa
p53	Núcleo	Factor de transcripción, regulador de apoptosis
Rb	Núcleo	Factor de transcripción
WT-1	Núcleo	Factor de transcripción

Fuente: Paniagua, L. (2010) *Evaluación de la capacidad genotóxica del compuesto NA01 polifenólico derivado del CAPE mediante el ensayo de SCGE in vitro*. Tesis de licenciatura QFB, FES Cuautitlán-UNAM.

1.3 Carcinogénesis

La carcinogénesis se define como el proceso por el cual las células que poseen una ventaja de crecimiento sobre otras se transforman, por mutaciones en los genes que controlan la división celular, en células que ya no responden a las señales de regulación. Dicho proceso consta de múltiples etapas que llevan al desarrollo de un neoplasma maligno. Una neoplasia es un desorden en el crecimiento celular caracterizado por una proliferación excesiva, alterada e incontrolada de las células que no guarda relación alguna con las demandas fisiológicas del órgano implicado, dando como resultado una masa anormal (tumor) de los tejidos originales. El proceso canceroso pasa por una serie de fases: iniciación, promoción y progresión. (Hernández, 2013)

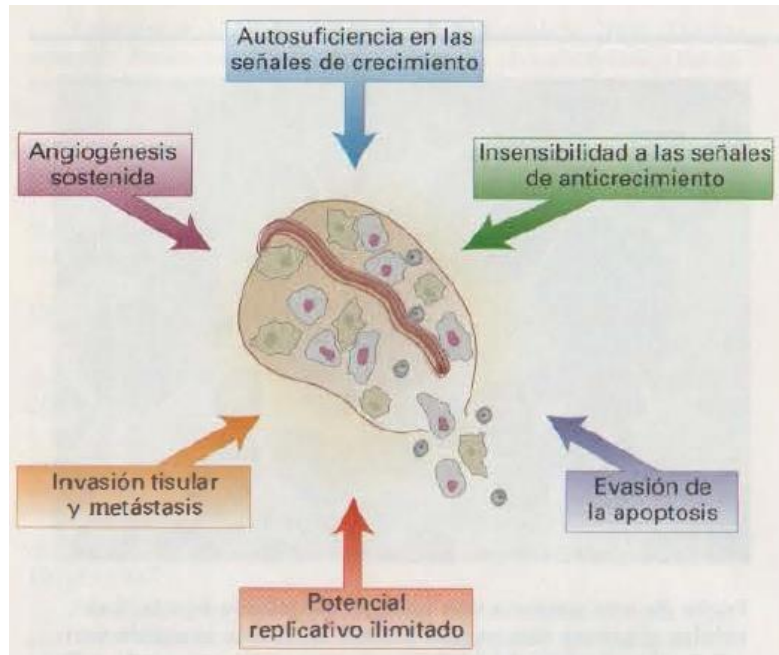


Figura 6. Generalidades de los cambios en células que causan cáncer
Fuente: Lodish, 2005; Hanahan & Weinberg, 2000

1.3.1 Iniciación

La iniciación de una neoplasia se refiere a cambios irreversibles en células somáticas apropiadas. La iniciación envuelve uno o más cambios estables que surgen espontáneamente o son inducidos por exposición a carcinógenos. Esto se considera el primer paso en la carcinogénesis, donde el genoma celular posee mutaciones, en protooncogenes o en genes supresores de tumores, creando el potencial para desarrollar neoplasias (Devi, 2005).

Las células iniciadas pueden permanecer latentes por meses o años, o pueden crecer de manera autónoma y clonal. La expansión clonal de células iniciadas resulta en el proceso mitogénico causado por un incremento de células nuevas y de inhibición de la apoptosis, que previene la muerte de las células iniciadas. La proliferación celular es esencial para esta etapa, si la división celular ocurre antes de la reparación del ADN, éste permanece permanente e irreversible (Oliveira, 2007).

La iniciación espontánea de células puede darse por: mutaciones espontáneas, depuración o desaminación normal en ADN o errores en la replicación. Aunque la iniciación espontánea es menos común que la iniciación inducida por agentes carcinogénicos, su existencia se ha confirmado (Oliveira, 2007).

1.3.2 Promoción

La promoción de un tumor comprende la selectiva expansión clonal de células iniciadas. La acumulación de mutaciones debe ser proporcional a la velocidad de división celular, o al menos a la velocidad a la cual las células madre son reemplazadas; la expansión clonal de células iniciadas produce una gran población de células que se tienen el riesgo de sufrir más cambios genéticos y, por lo tanto, de convertirse en células malignas (Kufe *et al.*, 2003).

La célula iniciada puede permanecer inofensiva hasta que es estimulada para comenzar su proliferación, perturbando el balance celular. Los cambios subsecuentes de una célula iniciada llevan a una transformación neoplásica que envuelve más de un paso y requiere la exposición repetida y prolongada de un estímulo promotor (Devi, 2005).

Para que una célula preneoplásica se transforme en un fenotipo maligno, que induzca tumores, se requiere de cambios genéticos adicionales. La dosis total de un promotor de tumores es menos importante que la frecuencia con que se administra, y si dicho promotor desaparece antes de que la conversión maligna haya ocurrido, ésta retrocede. En la promoción, la expansión de una población de células iniciadas, se encuentran en riesgo de una conversión neoplásica. La conversión de una fracción de estas células en malignas, acelerarán la velocidad de división celular en la lesión preneoplásica (Kufe *et al.*, 2003).

1.3.3 Progresión

La progresión es la transformación de las células iniciadas y en progresión en lesiones malignas. Es la última y más larga etapa de la carcinogénesis. Un fenotipo neoplásico es adquirido a través de cambios genéticos y mecanismos epigenéticos. Durante la progresión, la proliferación celular es independiente de la presencia de un estímulo (Oliveira, 2007).

En la primera fase de la progresión, también llamada conversión neoplásica, las células preneoplásicas son transformadas a un estado en el que son más propensas al desarrollo maligno. Esto provocará más mutaciones que se acumularán en las clonas celulares posteriores. Varios tipos de tumores poseen secuencias de ADN que se transforman durante la progresión que termina en un estado de cáncer. Una velocidad de mutación elevada que se establezca en el inicio del desarrollo del tumor, aumentará la generación de células que produzcan poblaciones malignas de clonas (Devi, 2005).

La progresión se caracteriza por ser irreversible, genéticamente inestable, tener un crecimiento más rápido, invasivo, capacidad de metástasis y tener cambios bioquímicos, metabólicos y morfológicos en las células. La angiogénesis, como un incidente epigenético, es esencial para la progresión de una neoplasia (Oliveira, 2007).

1.3.4 Metástasis y Angiogénesis

Mientras la progresión del tumor avanza, las células pierden capacidad de adherencia, se despegan de la masa tumoral e invaden tejidos vecinos. Las células libres también pueden entrar en la sangre y la linfa para ser transportadas a otros órganos/tejidos lejos del sitio de crecimiento primario y desarrollar tumores secundarios en nuevos sitios. Así, la metástasis resulta en un cáncer diseminado. El proceso metastásico y la diseminación del tumor son los principales responsables de los efectos letales de los cánceres humanos. La metástasis comprende interacciones célula-célula y célula-matriz extracelular, junto con moléculas de la superficie celular. El comportamiento de un tumor está influenciado por moléculas de adhesión, una de las más importantes es la caderina (Devi, 2005).

El crecimiento de un tumor depende de factores de crecimiento y de la eliminación de moléculas tóxicas que provee de un suministro de sangre adecuado. En tumores sólidos, la difusión eficiente de oxígeno desde los capilares ocurre en un radio de 150-200 μm , más allá, las células sufren anoxia y mueren. Por tanto, un incremento en la masa tumoral dependerá del adecuado suministro de sangre, el cual se dará a través del desarrollo de nuevos vasos capilares, a este proceso se le conoce como angiogénesis. Un gran número de factores tisulares han sido identificados como estimuladores endoteliales de proliferación celular. Entre estos se incluyen: factor de angiogénesis (TAF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), angioproteínas (ang1 y ang2), factores de crecimiento transformante (TGFs), interleucina 1 (IL-1), y factor de crecimiento endotelial de plaquetas (PD-ECGF) (Devi, 2005).

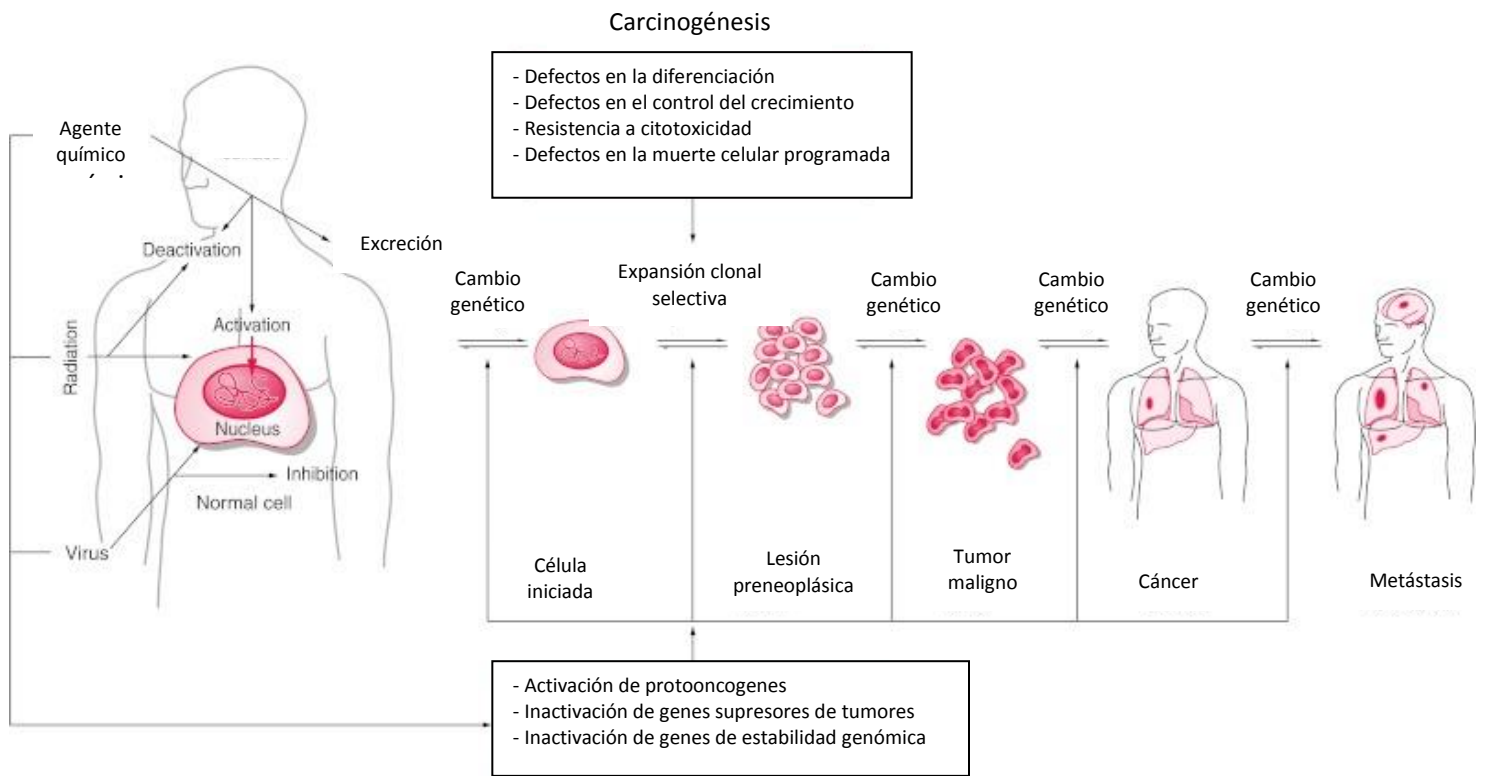


Figura 7. Fases de la carcinogénesis
Fuente: Modificada de Kufe *et al.*, 2003

1.4 Epidemiología del cáncer

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, en 2012 causó 8.2 millones de defunciones. Se prevé que los casos anuales aumenten a 22 millones en las próximas dos décadas (OMS, 2014).

Los cánceres que más muertes causan cada año son: cáncer de pulmón, de hígado, de estómago, de colon y de mama. Los tipos de cáncer más frecuentes son diferentes en el hombre y en la mujer (OMS, 2014).

Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos: índice de masa corporal elevado, ingesta reducida de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante y es la causa de más del 20% de las muertes mundiales por cáncer en general, y alrededor del 70% de las muertes mundiales por cáncer de pulmón (OMS, 2014).

Los cánceres causados por infecciones víricas, como infecciones por virus de la hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por virus del papiloma humano (VPH), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios (OMS, 2014).

Más del 60% de los nuevos casos anuales totales del mundo se producen en África, Asia, América Central y Sudamérica. Estas regiones representan el 70% de las muertes por cáncer en el mundo (OMS, 2014).

1.4.1 Epidemiología del cáncer en México

En México, según la Unión Internacional Contra el Cáncer (UICC), el cáncer es la tercera causa de muerte y estima que cada año se detectan 128 mil casos nuevos (SSA; SPPS, 2013).

Durante 2011 del total de egresos hospitalarios por tumores, 55.6% son por tumores malignos; en la población infantil y joven (menores de 20 años), la proporción de egresos hospitalarios por neoplasias malignas en relación con los tumores en general es más alta que en la población adulta (70.6 y 53.2%, respectivamente) (Figura 8) (INEGI, 2014).

Durante la infancia, predominan las neoplasias no epiteliales como la leucemia, los linfomas que afectan el sistema inmunológico y el sarcoma (neoplasias en tejido conjuntivo como el de los músculos o huesos); cuyos factores de aparición pueden iniciar en etapas muy tempranas, incluso antes del nacimiento (Mejía *et al.*, 2005; INEGI, 2014).

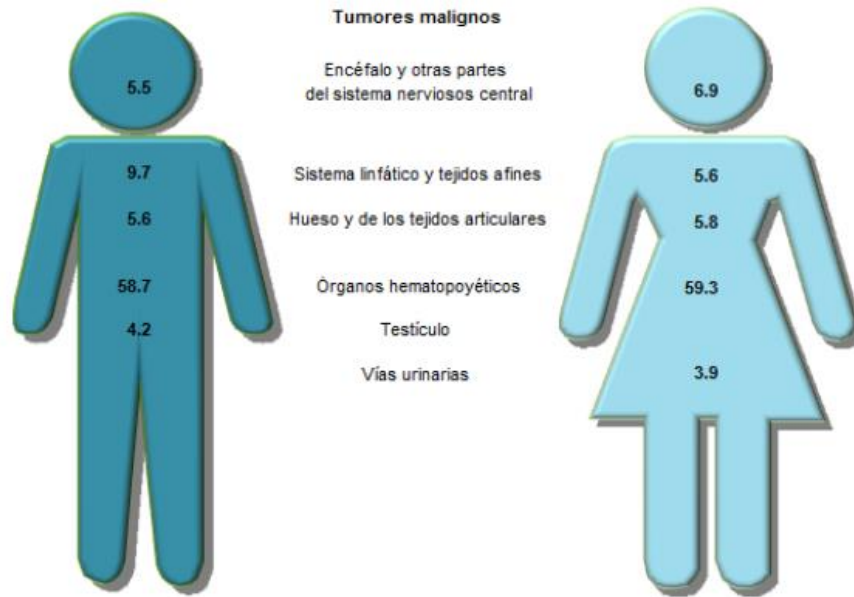


Figura 8. Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población menor de 20 años, por principales tumores malignos según sexo en 2011
Fuente: SSA, 2012; INEGI, 2014

Del total de jóvenes con neoplasias en órganos hematopoyéticos, 99.8% son por leucemia. Este cáncer puede ser agudo o crónico, siendo más frecuente el primero en niños y adolescentes (uno de cada tres casos) por leucemia linfocítica aguda (LLA) y en menor proporción la mieloides aguda; las leucemias linfoblásticas agudas generalmente se presentan después del primer año de vida hacia la adolescencia (Mejía, 2010).

Para la población menor de 20 años, la tasa de letalidad hospitalaria por tumores malignos más alta se ubica en los jóvenes de 15 a 19 años; para todos los grupos quinquenales de edad, las mujeres superan ligeramente a los varones (INEGI, 2014).

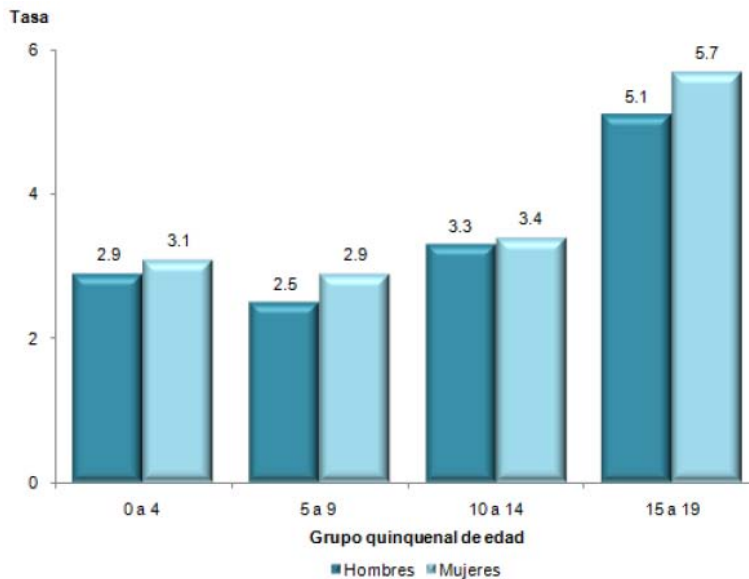


Figura 9. Tasa de letalidad hospitalaria de tumores malignos en población menor de 20 años, por grupo de edad según sexo, por cada 100 egresos hospitalarios para cada grupo de edad, en 2011
Fuente: SSA, 2012

Entre los jóvenes menores de 20 años, se observa que 5.1% fallecieron por algún tumor, ya sea maligno o benigno, de los cuales 86% eran cancerosos, principalmente en órganos hematopoyéticos con una tasa de mortalidad de 2.53 defunciones por cada 100 mil personas en esa edad, siendo más alta en hombres que en mujeres (2.91 y 2.14 por cada 100 mil personas de cada sexo, respectivamente); la segunda causa de muerte en esta población es por cáncer de encéfalo y otras partes del sistema nervioso central (uno de cada 100 mil personas menores de 20 años) (INEGI, 2014).

Las neoplasias del epitelio afectan principalmente a la población adulta (de 20 años y más); estos tumores están en las células que recubren los órganos huecos y las glándulas, al igual que aquellos que forman la superficie externa del cuerpo, carcinomas que se asocian a factores de riesgo por estilos de vida poco saludables o ambientales (Mejía *et al.*, 2005).

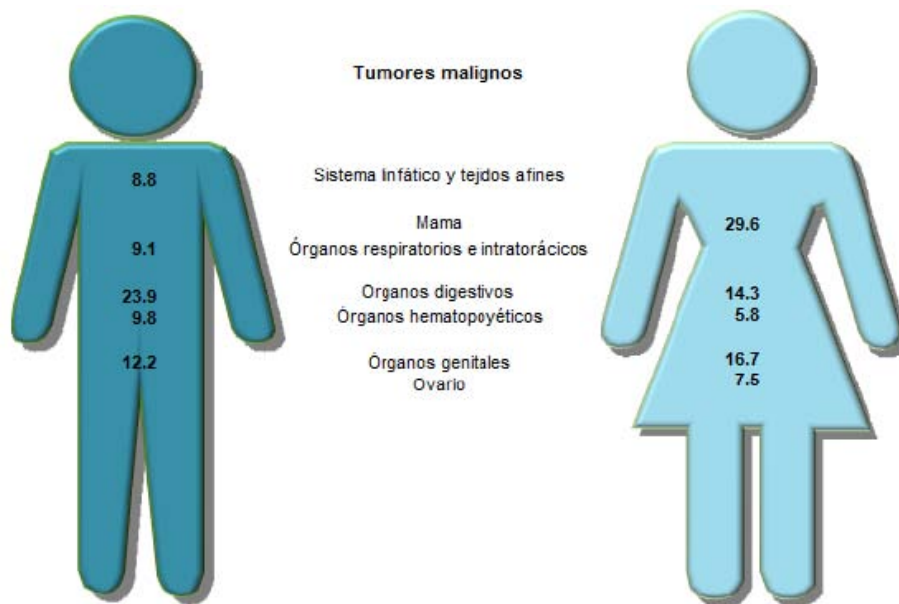


Figura 10. Porcentaje de morbilidad hospitalaria de la población de 20 años y más, por principales tumores malignos según sexo en 2011

Fuente: SSA, 2012; INEGI, 2014

Entre los varones de más de 20 años, la morbilidad hospitalaria por cáncer en órganos digestivos afecta principalmente a la población de 65 a 74 años (24.1%) y a la de 50 a 59 años (22 de cada 100 hombres). Para el caso de los tumores malignos en los órganos genitales, los grupos de edad de mayor concentración son los de 65 a 74 años (35%) y 80 años y más (17.9%); las neoplasias de órganos hematopoyéticos (principalmente leucemia linfocítica y mielocítica), 20 de cada 100 se ubican en los varones de 20 a 29 años y 18, entre 50 y 59 años (INEGI, 2014).

Para las mujeres, el cáncer de mama es la primera causa de morbilidad hospitalaria, 57 de cada 100 casos se ubican en las mujeres de 40 a 59 años; para el cáncer de órganos genitales, 48.8% ocurren en el mismo rango de edad. Respecto al cáncer de órganos digestivos, son las mujeres de 50 a 59 años y de 65 a 74 años quienes lo presentan con mayor frecuencia (23.5 y 22.1. respectivamente) (INEGI, 2014).

La tasa de letalidad hospitalaria por tumores malignos en población de 20 años y más, se incrementa con la edad y es más alta en hombres que en mujeres. En los varones se observa un incremento constante de egresos hospitalarios por muerte causada por cáncer, al pasar de 6.7 de cada 100 egresos hospitalarios entre los 20 y 29 años a 21.9 en los 80 años y más; para las mujeres, la tasa más baja se observa en la población de 30 a 39 años (5.5 de cada 100 egresos de mujeres), hasta incrementarse a 20.3 de cada 100 de 80 años y más (INEGI, 2014).

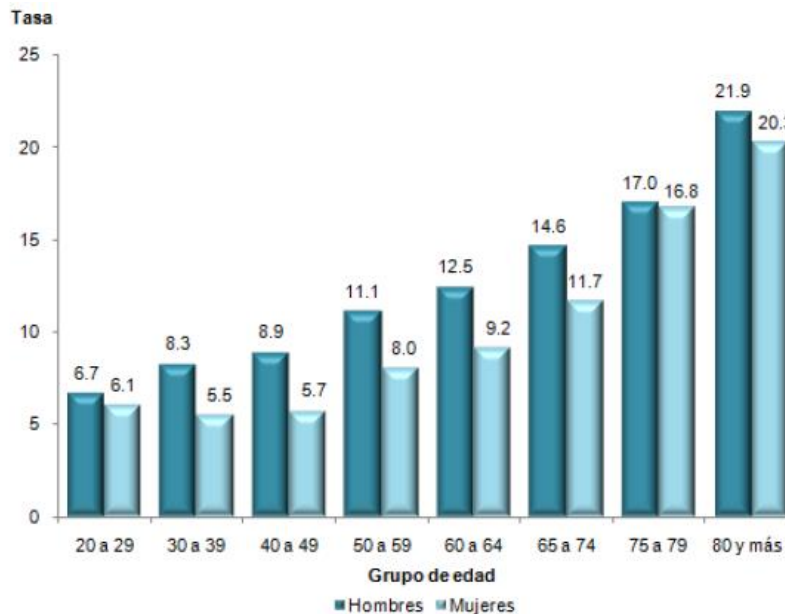


Figura 11. Tasa de letalidad hospitalaria de tumores malignos en población de 20 años y más, por cada 100 egresos hospitalarios para cada grupo de edad, en 2011

Fuente: SSA, 2012; INEGI, 2014

Las causas de mortalidad por cáncer en la población de 20 años y más varían en comparación con las mencionadas en la población menor de 20 años, esto se debe a que existen factores relacionados con estilos de vida en la población adulta que favorecen la aparición de ciertos tumores malignos (INEGI, 2014).

En 2012, la principal causa de defunciones por tumores malignos se dio en órganos digestivos (33.18 por cada 100 mil habitantes de 20 años y más); seguida de las neoplasias en órganos genitales (15.08 por cada 100 mil); de órganos respiratorios e intratorácicos (10.72); y de mama (8.13 defunciones por cada 100 mil). Por sexo, el comportamiento es diferente, ya que en las mujeres el cáncer de mama es la segunda causa de muerte, fallecen 12.38 de cada 100 mil (INEGI, 2014).

2. Terapia farmacológica contra el cáncer

Los términos terapia antineoplásica y terapia citotóxica, junto con la palabra quimioterapia, son diferentes maneras de llamar al uso de cualquier medicamento para el tratamiento del cáncer (American Cancer Society, 2013), del cual ya se habló en el capítulo anterior.

Los tratamientos como la radiación (radioterapia) y la cirugía, se consideran tratamientos locales que sólo actúan en un área del cuerpo. La quimioterapia, en cambio, se utiliza como tratamiento sistémico, ya que los medicamentos se transportan a través de todo el cuerpo hasta llegar al lugar donde se encuentran las células del cáncer (American Cancer Society, 2013).

Los citostáticos clásicos son fármacos con diferentes mecanismos de actuación, que tienen en común la capacidad de ocasionar una alteración del ciclo celular, que provoca la muerte celular por disminuir la capacidad de proliferación. Este efecto no es selectivo sobre la célula tumoral; se producirá toxicidad sobre los tejidos del organismo que se encuentran en rápido crecimiento (Velázquez, 2008).

2.1 Clasificación según su actividad en el ciclo celular

Las drogas citotóxicas pueden ser clasificadas por su afinidad con una fase en particular del ciclo celular, proceso que fue descrito en el capítulo anterior. También se pueden clasificar por su toxicidad en células que se encuentran en proliferación o en reposo (Payne & Miles, 2008), como se muestra en la Figura 12.

2.1.1 Agentes fase específicos

Son fármacos ciclo y fase dependientes. Estos fármacos, como el metotrexato y los alcaloides de la vinca, matan células en proliferación sólo durante una parte o partes específicas del ciclo celular. Antimetabolitos, como el metotrexato, son más activos contra las células en fase S (a través de la inhibición de la síntesis del ADN), mientras que los alcaloides de la vinca son más específicos para la fase M (inhibiendo la formación y alineación de los cromosomas (Payne & Miles, 2008).

2.1.2 Agentes ciclo específicos

Son agentes ciclo dependientes pero fase independientes. La mayoría de agentes quimioterapéuticos son agentes ciclo específicos, esto significa que actúan predominantemente en células que se encuentran dividiéndose. Tienen una capacidad de matar células que no depende de la dosis porque solo una parte de las células proliferantes son sensibles a su citotoxicidad en cualquier momento. La manera de

incrementar el número de células por matar es incrementando el tiempo de exposición al agente quimioterapéutico (Payne & Miles, 2008).

2.1.3 Agentes no específicos de ciclo celular

Son agentes ciclo y fase inespecíficos. Efectivos tanto para las células en fase de división como en fase de reposo. Como ejemplo tenemos a los agentes alquilantes o a los derivados del platino, que tienen un efecto igual en un tumor o en células normales, aún si están en proliferación o en fase de reposo (Payne & Miles, 2008).

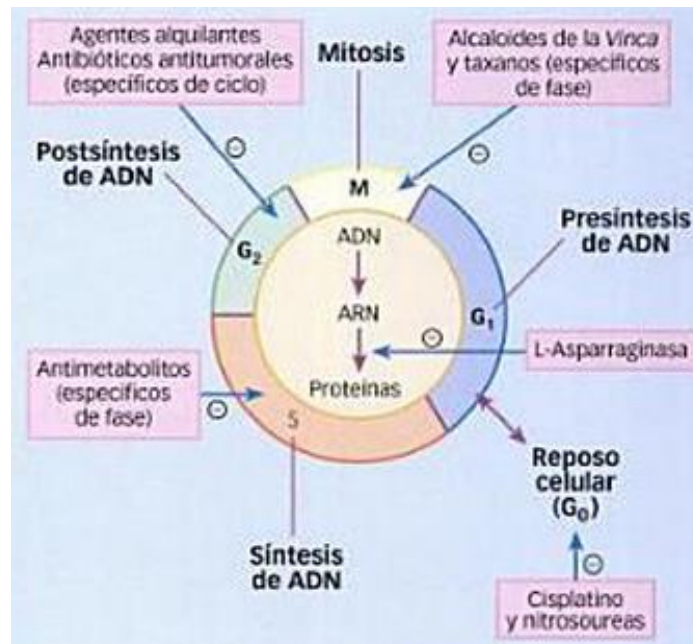


Figura 12. Ciclo celular y fase de acción de los citostáticos
Fuente: Velázquez, 2008

2.2 Clasificación de antitumorales por mecanismo de acción

Los fármacos antineoplásicos presentan diferentes mecanismos de acción sobre la célula tumoral; un mismo fármaco puede tener más de un modo de acción, aunque habitualmente predomina uno de ellos. Para su estudio, los fármacos citostáticos pueden agruparse de diferente manera: según su origen o por su mecanismo de acción (Velázquez, 2008).

2.2.1 Agentes alquilantes

Son agentes ciclo específicos, pero fase inespecíficos. Estos compuestos altamente reactivos producen sus efectos al formar enlaces covalentes con un grupo alquilo (R-CH₂) y un ácido nucleico o a una proteína (Payne & Miles, 2008). Sustituyen un

hidrógeno del ADN (con mayor afinidad en la posición N7 de la guanina) y originan puentes de unión intracatenarios o intercatenarios en el ADN. Así, bloquean la replicación del ADN celular y la transcripción del ARN, bloqueando así la síntesis de proteínas y la mitosis (Velázquez, 2008).

Algunos ejemplos de agentes alquilantes: mostazas nitrogenadas (melfalán, clorambucilo); oxazofosforinas (ciclofosfamida, ifosfamida); sulfonatos de alquilo (busulfán); nitrosoureas (carmustina, lomustina); tetracinas (decarbazina, temozolomida); aziridinas (mitomicina C); procarbazinas (Payne & Miles, 2008), sus estructuras se muestran en la Figura 13.

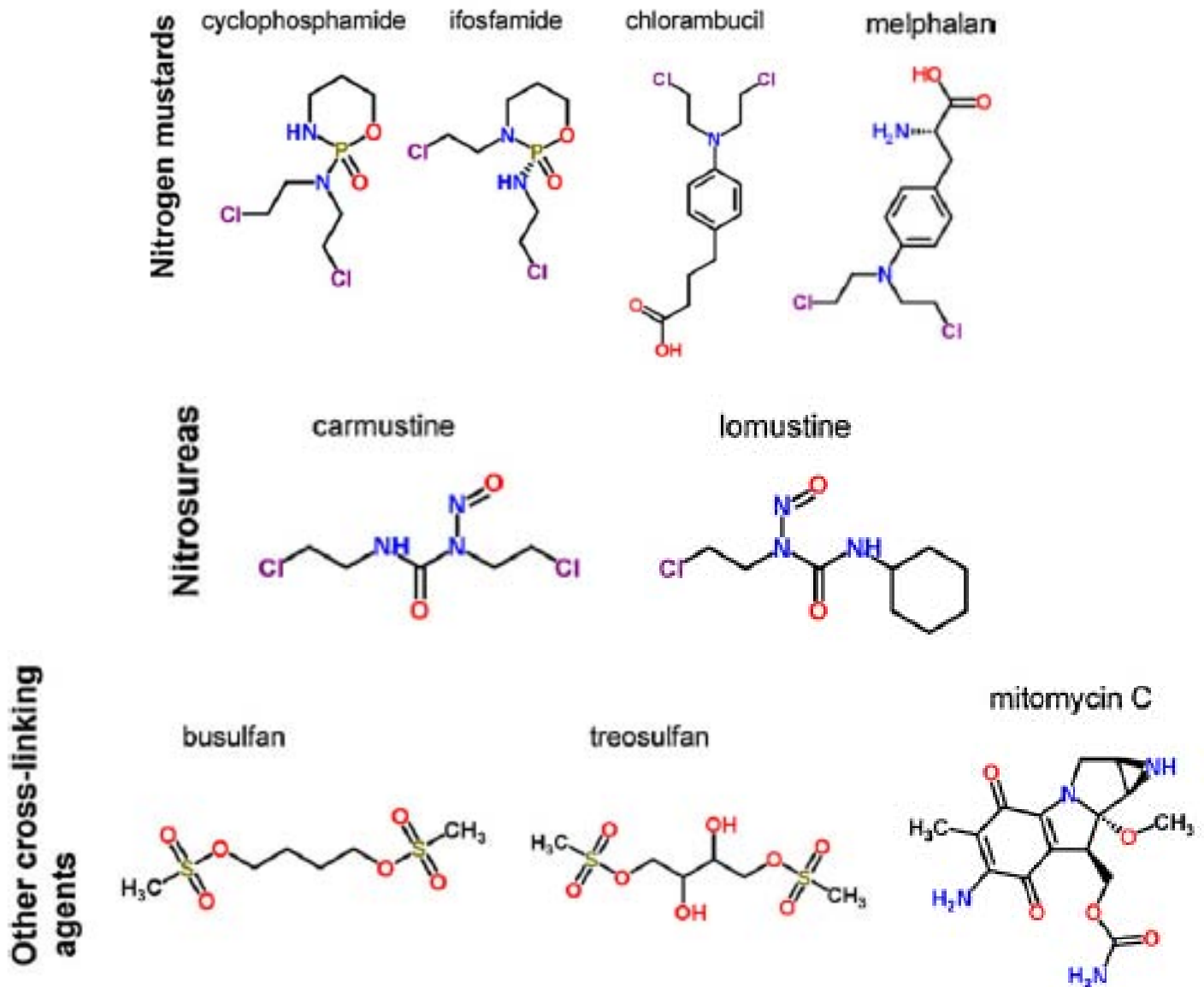


Figura 13. Estructura química de algunos agentes alquilantes
Fuente: Nussbaumer, 2011

2.2.2 Antimetabolitos

Son compuestos que poseen una estructura similar a los componentes del metabolismo intermediario celular y su utilización por la célula produce alteraciones metabólicas en la síntesis de ácidos nucleicos (Figura 14). Compiten por el sustrato con las moléculas endógenas, como enzimas o receptores; algunas se incorporan directamente al ADN o ARN. Ejercen su acción sobre la fase S y, especialmente, sobre tumores en rápido crecimiento (Velázquez, 2008;). Su eficacia es mayor si se utiliza por un tiempo prolongado. Existen tres tipos:

Antagonistas del ácido fólico. El metotrexato inhibe a la dehidrofolato reductasa, la cual es responsable de la formación de tetrahidrofolato desde dihidrofolato, que es esencial para la generación de una variedad de coenzimas que están relacionadas con la síntesis de purinas, metionina, glicina, y ácido fólico (Payne & Miles, 2008).

Análogos de pirimidinas. Estos fármacos se parecen a moléculas de pirimidina. Pueden inhibir la síntesis de ácidos nucleicos por medio de la inhibición de enzimas que intervienen en la síntesis de ADN (como el fluorouracil) o pueden ser incorporadas al ADN interfiriendo con su síntesis (como la gemcitabina) resultando en la muerte celular (Payne & Miles, 2008).

Análogos de purinas. Son análogos de bases púricas. La 6-mercaptopurina y la tioguanina son derivados de adenina y guanina, respectivamente. Un grupo sulfuro reemplaza el grupo ceto en el carbono 6 de estos compuestos. Es común que este tipo de fármacos requieran de activación inicial. También son capaces de inhibir la biosíntesis de nucleótidos por la incorporación directa en el ADN (Payne & Miles, 2008).

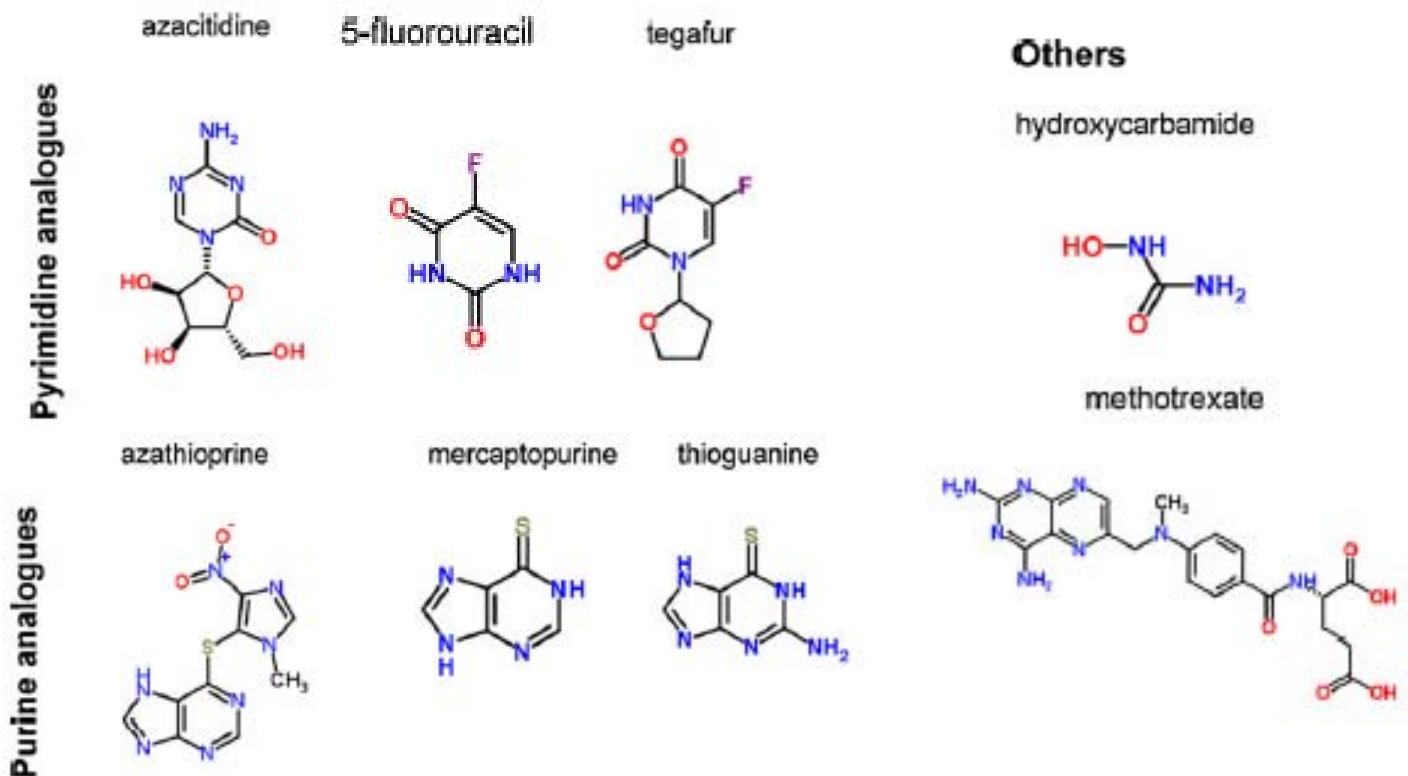


Figura 14. Estructura química de algunos antimetabolitos

Fuente: Nussbaumer, 2011

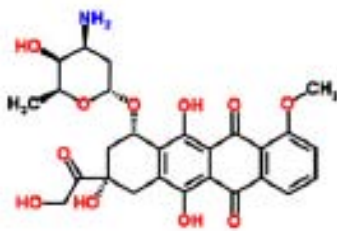
2.2.3 Antibióticos citotóxicos

La mayoría de los antibióticos antitumorales han sido producidos en cultivos fúngicos y bacterianos (comúnmente de especies *Streptomyces*). Éstos afectan la función y la síntesis de los ácidos nucleicos de diferentes maneras (Payne & Miles, 2008).

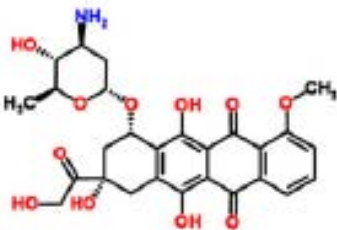
Las antraciclinas (doxorubicina, daunorubicina, epirubicina) se intercalan con el ADN y afecta la enzima topoisomerasa II. La actinomicina D se intercala entre guaninas y citosinas, lo que interfiere con la transcripción del ADN en dosis altas; en dosis bajas, la bloquea la síntesis directa de ARN. La bleomicina consiste en una mezcla de glicopéptidos que causan la fragmentación del ADN. La mitomicina C inhibe la síntesis de ADN actuando como agente alquilante (Payne & Miles, 2008).

Anthracyclines

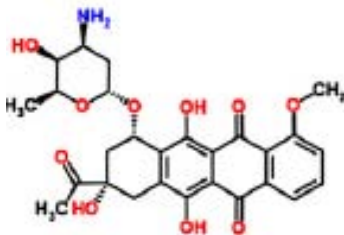
doxorubicin



epirubicin



daunorubicin



bleomycin

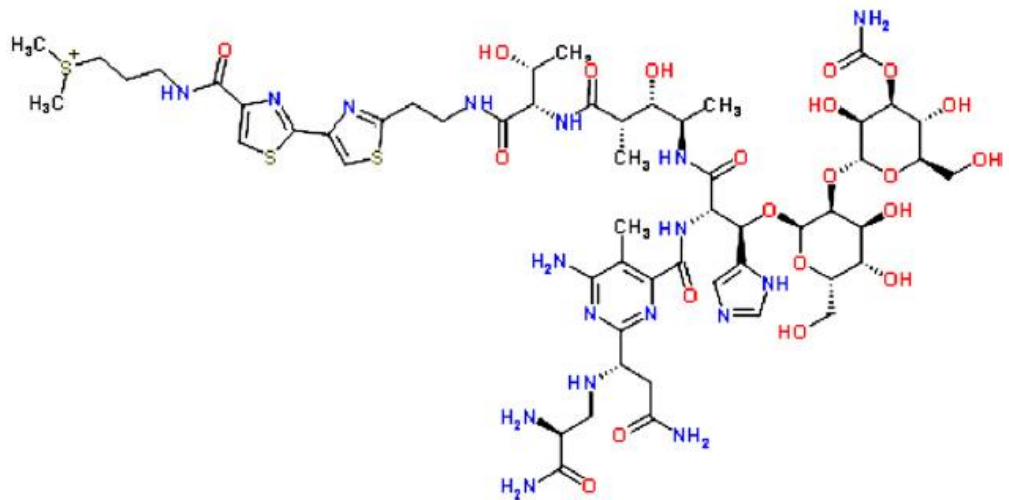


Figura 15. Estructura química de algunos antibióticos citotóxicos
Fuente: Nussbaumer, 2011

2.2.4 Derivados de las plantas

Tienen como blanco de acción a las moléculas de tubulina que participan en la mefase de la mitosis, sus estructuras se muestran en la Figura 16.

Alcaloides de la Vinca. Alcaloides derivados de la planta *Vinca rosea*. Existen cuatro fármacos con actividad reconocida: vincristina, vindesina, vinblastina y vinorelbina. Son agentes ciclo específicos que actúan durante la metafase de la mitosis. Se unen específicamente con la proteína que forma el huso mitótico, denominada tubulina, y alteran el movimiento del huso celular ocasionando destrucción y la dispersión de los cromosomas impidiendo la mitosis (Velázquez, 2008).

Alcaloides del tejo. Dos fármacos componen este grupo: el paclitaxel, derivado del árbol *Taxus brevifolia* y el docetaxel, derivado semisintético. Estos fármacos actúan uniéndose a la fracción beta de los microtúbulos e impidiendo su despolimerización, originando enlaces estables y túbulos no funcionales. Esto interfiere en la división celular y produce la destrucción de la célula (Velázquez, 2008).

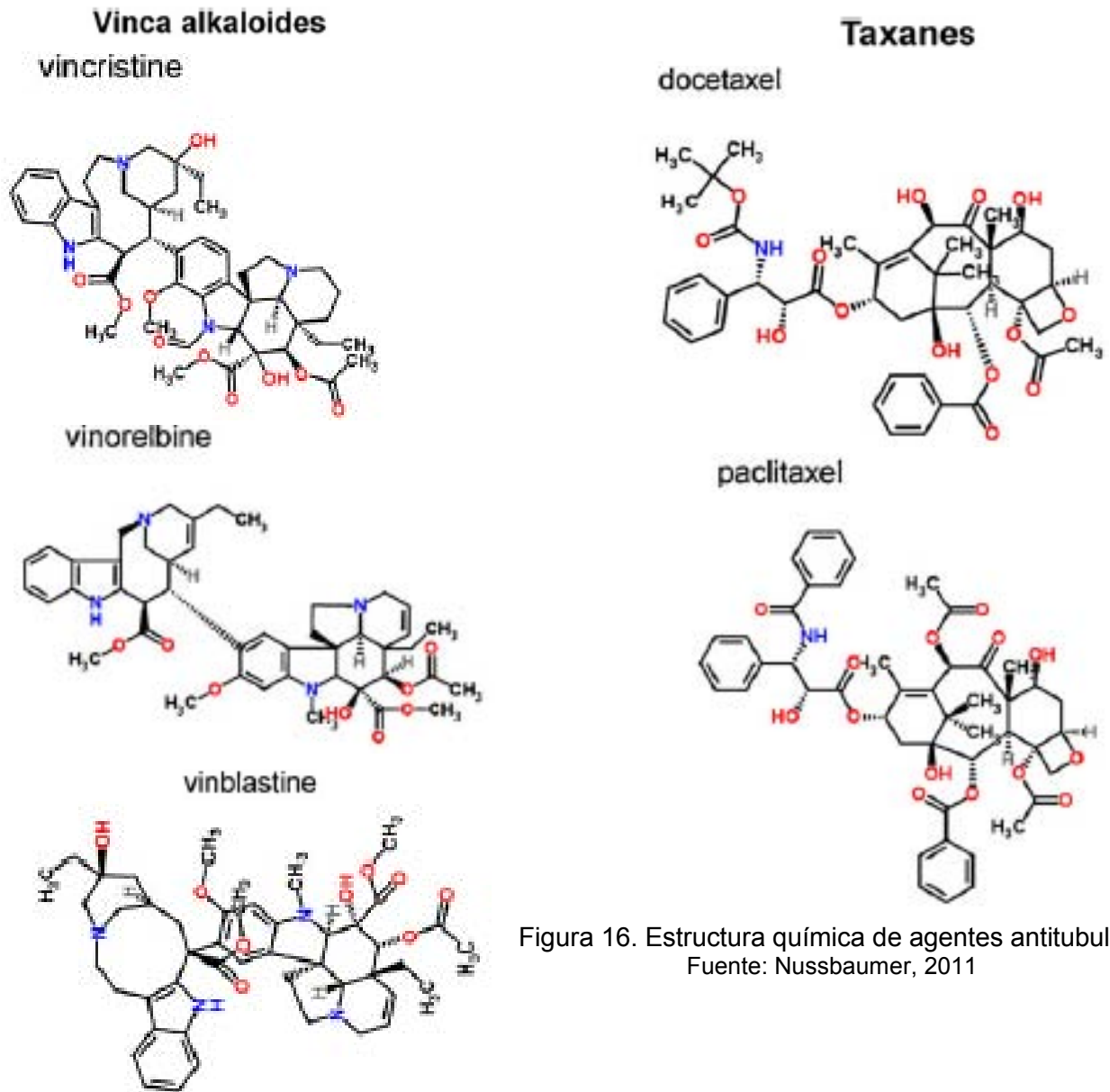


Figura 16. Estructura química de agentes antitubulina
Fuente: Nussbaumer, 2011

2.2.5 Derivados del platino

Entre estos agentes se incluyen al carboplatino, cisplatino y oxaliplatino (Figura 17). El cisplatino es un complejo orgánico con un metal pesado. Iones cloruro se pierden de la molécula después de que se difunde dentro de la célula permitiendo al compuesto formar entrecruzamientos en las cadenas de ADN, en su mayoría en las guaninas. Esto inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas (Payne & Miles, 2008).

El carboplatino es un complejo de platino con un grupo carboxilo, el grupo funcional incrementa su solubilidad en agua y hace que sufra una menor hidrólisis, lo cual disminuye su perfil tóxico. Este complejo es menos nefrotóxico y neurotóxico, pero causa una marcada mielosupresión (Payne & Miles, 2008).

El oxiplatino pertenece a una nueva clase de agentes del platino. Contiene un átomo de platino en complejo con un grupo oxalato y un diaminociclohexano (DACH). Así, forma un complejo reactivo de platino que inhibe la síntesis de ADN porque forma aductos inter e intracatenarios (Payne & Miles, 2008).

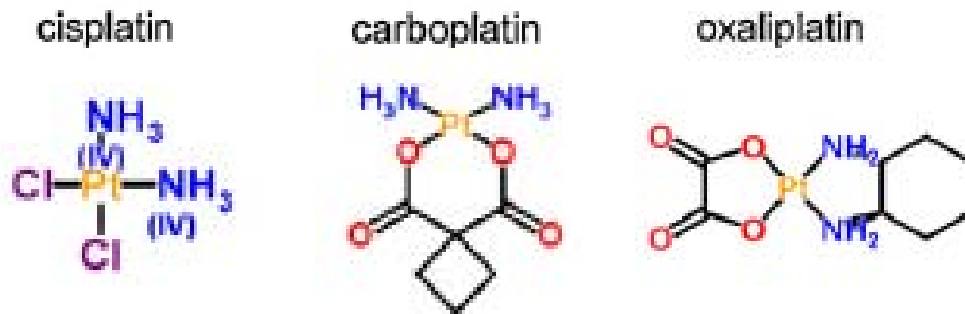


Figura 17. Estructura química de agentes derivados del platino

Fuente: Nussbaumer, 2011

2.2.6 Inhibidores de la topoisomerasa

La topoisomerasa es la responsable de la alteración de la estructura 3D del ADN por medio de una reacción de escisión/desenrollamiento/reincorporación. Se encuentra envuelta en la replicación del ADN, segregación de cromátidas y transcripción. Se ha considerado que la eficacia de los inhibidores de la topoisomerasa en el tratamiento del cáncer está basada en su habilidad de inhibir la replicación del ADN. También se ha dicho que su eficacia depende de la manipulación simultánea de otras vías celulares. Estos fármacos son fase específicos y previenen a las células de entrar a mitosis estando en G2 (Payne & Miles, 2008). Existen dos clases:

Inhibidores de la topoisomerasa I. La camptotecina, derivada de *Camptotheca acuminata* (un árbol chino), se une al complejo topoisomerasa I-ADN, previniendo la replicación del ADN. Irinotecan y topotecan han sido derivados de ésta (Payne & Miles, 2008).

Inhibidores de la topoisomerasa II. Derivados semisintéticos de las epipodofilotoxinas (etopósido y tenipósido) provienen de *Podophyllum peltatum*, la mandrágora americana. Éstos estabilizan el complejo de topoisomerasa II con ADN y causan la ruptura de las hebras hasta inhibir la replicación (Payne & Miles, 2008).

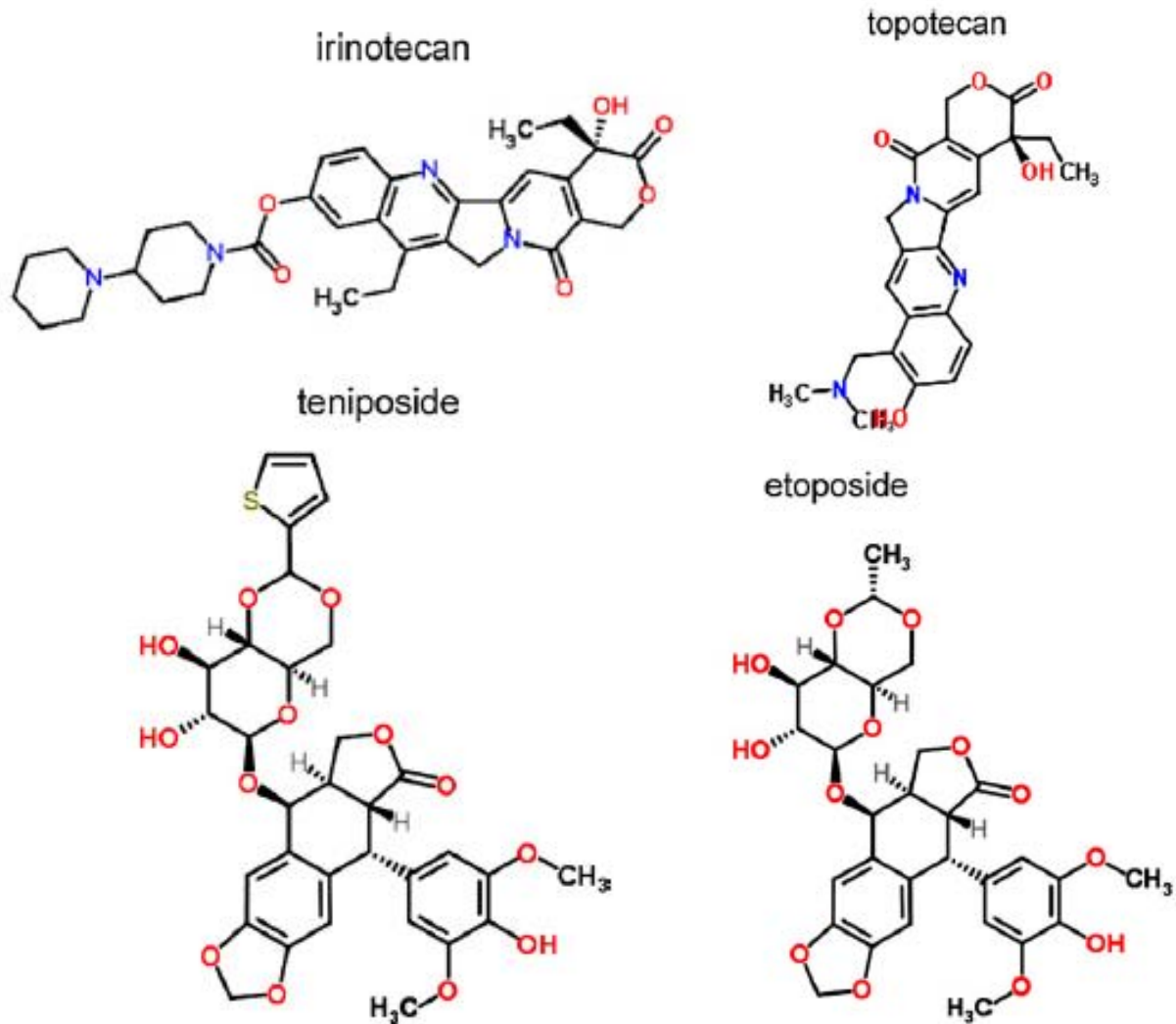


Figura 18. Estructura química de algunos agentes inhibidores de topoisomerasa
Fuente: Nussbaumer, 2011

2.3 Quimioprevención

El término quimioprevención se acuñó para describir una nueva disciplina en oncología, que consiste en el uso de compuestos sintéticos o naturales para inhibir, retardar o revertir la carcinogénesis. La quimioprevención se basa en la hipótesis de que la interrupción de los eventos biológicos involucrados en la carcinogénesis inhibirá este proceso y reducirá la incidencia del cáncer (Beltrán, 2005).

Muchos constituyentes químicos vegetales o fitoquímicos han sido asociados con propiedades protectoras. Las hierbas medicinales constituyen una fuente de muchos de esos compuestos químicos (Chehin, 2014). Existe una lista enorme de quimioprotectores entre los que podemos mencionar a los flavonoides, vitaminas C y E, componentes del ajo, chile, brócoli, cúrcuma, té verde, café y propóleo, entre otros, la mayoría de ellos, presentes en nuestras dietas y estilos de vida (Beltrán, 2011).

3. Éster fenilético del ácido cafeico (CAPE)

Los quimioprotectores se han detectado frecuentemente cuando se estudia el efecto de sustancias purificadas de extractos de productos naturales a los cuales la medicina alternativa ha atribuido propiedades terapéuticas. Este es el caso del propóleo y de sus componentes (Beltrán, 2005).

3.1 Propóleo

El propóleo es una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa, que las abejas (*Apis mellifera*) elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales (olmo, álamo, sauce, abedul, castaño de Indias, pino, abeto, roble y alguna herbáceas) y que utilizan en la construcción, reparación y protección de sus colmenas. En el propóleo se han aislado más de 180 compuestos. Sus principales componentes se encuentran en la siguiente tabla (Farré, 2004):

Tabla 5. Composición promedio del propóleo

Composición	(%)	Compuestos, características y observaciones
Resinas	45 - 55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres
Ceras	7.55 -35	Cera de abeja de origen vegetal
Aceites esenciales	5 - 10	Volátiles
Ácidos grasos	5	Proceden de la cera o son de origen botánico
Polen	5	Proteínas del polen y aminoácidos como arginina y prolina
Otros compuestos orgánicos y minerales	5	14 oligoelementos, Fe y Zn son los más abundantes, otros: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb Cetonas; Lactonas; Quinonas; Esteroides; Ácido benzoico y ésteres; Vitaminas B1, B2, B3, B6; Azúcares

Fuente: Farré R. (2004) *El própolis y la salud*. Ars Pharmaceutica, 45:1; 21-43

El propóleo es un producto de extraordinario interés para la medicina e industria farmacéutica, al que se atribuyen efectos antiinflamatorios, inmunoestimulantes, hepatoprotectores, carcinoestáticos, antimicrobianos, antivirales, antifúngicos, antiprotozoarios, anestésicos y de regeneración tisular (Farré, 2004).

Se ha demostrado que el propóleo coreano induce apoptosis en líneas celulares de hepatoma humano, que el extracto etanólico del propóleo es un buen inhibidor de la mutagenicidad y que el metanólico presenta citotoxicidad frente al carcinoma colónico y al fibrosarcoma. Además, varios componentes aislados han mostrado actividad anticancerígena, asociada a la inhibición del ciclo celular y la inducción de la apoptosis, como en el caso del ácido 3-(2-(2-dimetil 8,3-metil 2 butenil) benzopirano-6-propenoico o induciendo la apoptosis sin afectar al ciclo celular de las células cancerosas, como la prenilflavanona propolina A, que también muestra actividad antioxidante. El propóleo brasileño ha mostrado tener derivados carbono prenilados de ácidos p-cumarínicos que actúan contra el hepatocarcinoma, que el éster feniletílico del ácido cafeico y el metil cafeato inhiben el cáncer de mama y el melanoma y que, en ensayos *in vitro*, la artepilina C muestra actividad antibacteriana y causa daños sobre tumores sólidos y células leucémicas (Farré, 2004).

Ensayos *in vitro* han demostrado la acción citotóxica del propóleo y sus compuestos aislados en varias celular cancerosas. El gran número de publicaciones de su acción antitumorigénica revela su potencial para desarrollar nuevos agentes anticancerígenos. Además, su administración tanto en humanos como en ratas no ha demostrado tener efectos secundarios y por ellos puede ser un tratamiento barato contra el cáncer. Esta capacidad antitumorigénica se ha demostrado tanto en extractos del propóleo como en sus flavonoides, terpenos y en el éster feniletílico del ácido caféico (CAPE) (Watanabe *et al.*, 2011).

3.2 CAPE y estudios realizados

El éster feniletílico del ácido caféico (CAPE), es un compuesto polifenólico derivado del ácido caféico (CA) (Figura 19), clasificado como ácido hidroxicinámico, de apariencia sólida, color blanco, con fórmula molecular $C_{17}H_{16}O_4$ y un peso molecular de 284.3 g/mol (Hernández, 2013).

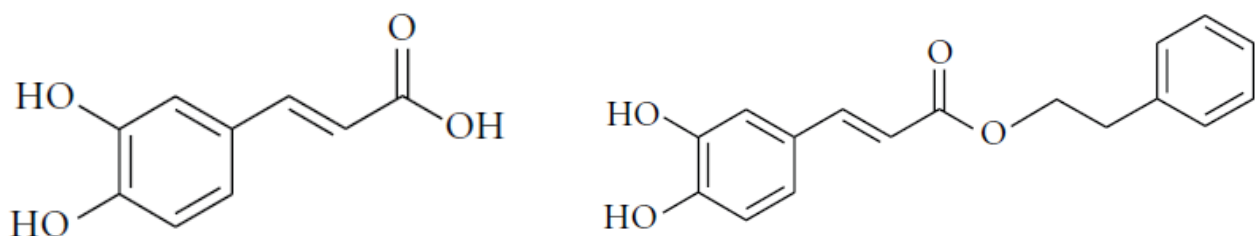


Figura 19. Estructuras del ácido caféico (CA) y su éster feniletílico (CAPE)

Fuente: Saravana, 2009

El aislamiento del CAPE del propóleo podría llevar mucho tiempo por la gran variedad de impurezas presentes, además, su extracción a partir de productos naturales es complejo y con rendimientos muy bajos (Gerónimo, 2011). Por ello, sintetizar CAPE a través de ácido caféico y alcohol fenilético resulta una buena alternativa, tal como lo realizaron Grunenberger *et al.* en 1988 (Figura 20).

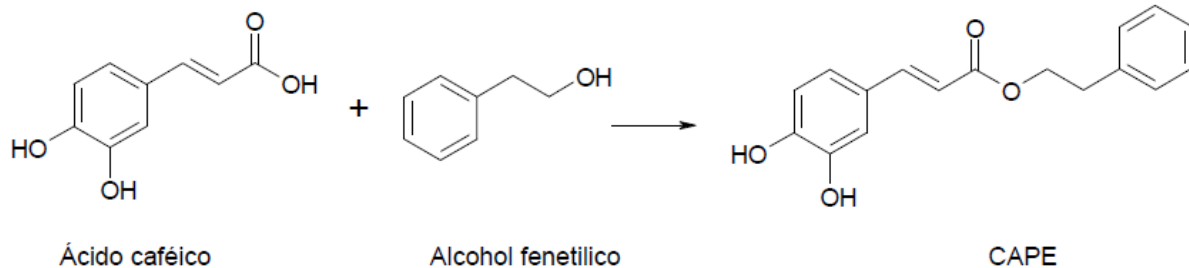


Figura 20. Reacción general para la síntesis de CAPE

Fuente: Gerónimo, 2011

El CAPE, un componente fenólico del propóleo, ha sido ampliamente estudiado. Este compuesto posee diversas propiedades biológicas como antioxidantes, antiinflamatorios, antivirales, inmunomoduladores, antiangiogénicos, antiinvasivos, antimetastásicos y actividad carcinoestática (Watanabe *et al.*, 2011). La acción citotóxica del CAPE en células cancerosas pero no en células normales ha sido reportado por Grunenberger *et al.* en 1988.

El estrés oxidativo es la causa mayor de lesiones celulares en gran variedad de problemas crónicos de salud, como la carcinogénesis y desórdenes neurodegenerativos. Se cree que el CAPE es un potente citoprotector exógeno y agente antigenotóxico contra el daño oxidativo celular y puede ser utilizado para el diseño de nuevos fármacos que combatan enfermedades causadas por estrés oxidativos, como los son varios tipos de cáncer (Watanabe *et al.*, 2011). El estudio de la relación entre la estructura y la actividad del CAPE ha demostrado que el número y la posición de sus grupos hidroxilos son determinantes en su efecto de inhibición del crecimiento de células transformadas (Hernández, 2007).

Frenkel *et al.* en 1993, indujeron carcinogénesis química con 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) y aplicaron tratamientos tópicos de CAPE en ratones. A bajas dosis, inhibieron el proceso oxidativo mediado por TPA, considerado esencial para la promoción del tumor. A una concentración de 0.5 nmol suprimió la explosión metabólica oxidativa de los leucocitos polimorfonucleares en un 50%. A altas dosis, inhibió la actividad enzimática de la ornitinoscarboxilasa (ODC). Esto demostró que el CAPE es un potente agente quimioprotector.

Su *et al.* en 1994, investigaron de igual manera el efecto tóxico diferencial del CAPE, por el cual éste es citotóxico al tumor y no a las células normales, a través de la transformación de fibroblastos embrionarios (CREF) mediante adenovirus tipo 5 (Ad5). Los resultados que obtuvieron indican que la sensibilidad adquirida de CREF a CAPE puede ser debida a la transcripción en las células transformadas por el adenovirus, de una proteína de 289 aminoácidos. La acción del CAPE no suprime el

crecimiento/toxicidad de las células transformadas como simple expresión génica de Ad5 E1A (gen transformador del adenovirus), sino que la sensibilidad al CAPE está directamente determinada por el grado de expresión fenotípica. Esto aporta evidencia adicional de que CAPE puede representar un compuesto que se fija específicamente en células en transformación o transformadas, suprimiendo el crecimiento tumoral.

Una vez establecido que CAPE reconoce más el fenotipo que una determinada proteína en células transformadas, se realizaron estudios sobre su efecto en dos líneas celulares: melanoma humano (HO-1) y glioblastoma multiforme humano (GMB-18), estableciéndose que inhibe el crecimiento de ambas líneas (Saiz, 2001).

Chiao *et al.* en 1995, demuestran que el CAPE induce apoptosis y esta toxicidad es influenciada por el estado redox de las células. El CAPE puede modular el estado redox de las células. La sensibilidad de las células a CAPE puede ser determinada por la pérdida de la regulación del estado redox normal en las células transformadas.

La base molecular de la acción del CAPE fue elucidada por Natarajan *et al.* en 1996. El CAPE tiene efecto en la transcripción del factor NF- κ B. Trataron células U937 de leucemia humana con diferentes concentraciones de CAPE, quien inhibió la activación del factor NF- κ B dependiente de TNF. La activación del factor NF- κ B por PMA, ceramida, ácido akadaico y por peróxido de hidrógeno fue inhibida también. Impidió la traslocación de la subunidad p-65 del NF- κ B del núcleo sin afectar la degradación de I κ B- α inducido por TNF. Esto no mostró efecto inhibitorios en la transcripción de otros factores como AP-1, TFIID y oct-1. Con sus descubrimientos concluyeron que el CAPE es un inhibidor potente y específico de la activación de NF- κ B y esto es la base para sus múltiples actividades inmunomoduladoras y antiinflamatorias.

Huang *et al.* en 1996, utilizaron tratamientos tópicos de CAPE en diferentes concentraciones en ratones que fueron sometidos a carcinogénesis química con DMBA/TPA, resultando que el CAPE inhibe el número de papilomas formados, así como que decrece el nivel de residuos HmdU en ADN epidérmico. De igual manera, el CAPE inhibe la incorporación de la [3H]-timidina en el ADN de cultivos celulares HeLa, la incorporación de la [3H]-uridina en ARN y la incorporación de [3H]-leucina en proteínas, lo que indica que el CAPE es un potente inhibidor de la síntesis de ADN, un poco menos efectivo en la inhibición de la síntesis de ARN y aún menos efectivo en la inhibición de la síntesis de proteínas.

Chung *et al.* en 2004, demostraron que el CAPE ejerce una acción antimetastásica por medio de la inhibición de la expresión de las metaloproteinasas 2 y 9 en la matriz extracelular, actuando sobre el factor nuclear κ B en el carcinoma hepatocelular. El efecto protector del CAPE fue investigado en hepatotoxicidad inducida con t-BHP en la línea celular HepG2 de hígado de rata. El CAPE redujo significativamente el daño oxidativo inducido con t-BHP en las células HepG2, según lo determinado por citotoxicidad celular, lipoperoxidación y niveles de especies reactivas de oxígeno en una manera dosis dependiente. Estudios *in vivo* desmostraron que el pretratamiento con CAPE, antes de la administración de t-BHP, incrementa los niveles séricos de las enzimas hepáticas alanino aminotransferasa y aspartato aminotransferasa y reducen la peroxidación de lípidos en el hígado de rata. Los efector protectores del CAPE contra la

hepatotoxicidad inducida con t-BHP pueden ser dadas sus habilidades de eliminar especies reactivas de oxígeno y proteger del daño al ADN inducido por el estrés oxidativo.

En otro estudio realizado por Lee *et al.* en 2008, se investigó el potencial citotóxico del CAPE y su mecanismo molecular en su actividad con las células C6 del glioma. Las células de glioma C6 sufrieron fragmentación del ADN internucleosomal. Dichas células demostraron un incremento en núcleos polidiploides. CAPE indujo la liberación de citocromo C de la mitocondria al citosol después de 3 horas de tratamiento y la activación de la caspasa 3 (CPP32), además de la escisión de PARP (sustrato de CPP32). Incrementó la fosforilación de serina de p53 y el nivel de la proteína se incrementó. El tratamiento con CAPE también incrementó la expresión de Bax y Bak y la reducción del nivel de Bcl2. Además, reportaron que la aplicación de CAPE activa la señalización extracelular regulada por cinasas (ERKs) y a la proteína cinasa p38 (p38 MAPK) que a su vez modula la apoptosis por p53.

Jung *et al.* en 2010, identificaron las propiedades estrogénicas del propóleo y verificaron que el CAPE muestra una afinidad selectiva en su unión al receptor de estrógenos humano B(hERB), mayor que al receptor hERalfa. También reduce la expresión de ERalfa en células MCF-7 y MDA 231. Estos resultados indican que el CAPE, que es un agonista selectivo de hERB, no muestra efecto estrogénico en el receptor positivo de células del cáncer de mama y en un tejido uterino inmaduro de rata, es un potencial modulador selectivo de receptores de estrógeno.

El efecto del CAPE fue investigado por Beltrán *et al.* en 2005, en el citocromo P450 (CYP450), que se encuentra relacionado con el metabolismo de la dietilnitrosamina (DEN) durante la fase de iniciación de hepatocarcinogénesis química. El CAPE modifica la actividad enzimática de las isoformas del CYP envueltas en la activación del DEN, como CYP1A1/2 y CYP2B1/2, sugiriendo un mecanismo alternativo del efecto protector del CAPE contra la hepatocarcinogénesis química.

Domínguez *et al.* en 2008, determinaron el comportamiento de la proliferación celular en las líneas HeLa, Vero, Jurkat y K562 mediante ensayos de MTT, observando una marcada disminución de la proliferación celular dependiendo de la concentración de CAPE, de la línea celular y del tiempo de incubación. El CAPE demostró su capacidad de inducir apoptosis en las líneas celulares tratadas y un efecto genotóxico menor al control positivo (ifosfamida).

3.3 Análogos estructurales del CAPE

Los antioxidantes derivados del ácido caféico y análogos de los polifenoles presentan actividad quimioprotectora, por lo que son candidatos para ser utilizados como fármacos; sin embargo, se encuentran comprometidos por la baja estabilidad metabólica que tienen los ésteres, pues el grupo éster es metabólicamente muy lábil.

La introducción de un halógeno en el anillo de catecol ejerce un efecto inductivo negativo, incrementa la densidad electrónica en el sistema conjugado, fortalece el enlace éster y disminuye las interacciones con la catecol metiltransferasa. Así mismo, el número de grupos hidroxilo puede tener un papel importante en la actividad antioxidante (Hernández, 2013).

Wang *et al.* en 2010, evaluaron la relación entre las modificaciones del anillo de catecol y la actividad del CAPE como agente citoprotector, empleando el modelo de HUVEC-menadiona. La sustitución del flúor en el diseño y síntesis de pequeñas moléculas para potenciar su efecto terapéutico ha sido muy común. El reemplazo de un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo por un átomo de flúor en un anillo retarda la degradación metabólica, incrementa la lipofilicidad y ejerce un profundo impacto en la unión al receptor o a la selectividad, dependiendo de la posición en que se encuentre el flúor. En este estudio se investigó el efecto de sustituir un grupo hidroxilo con un átomo de flúor o una metilación en uno o ambos grupos hidroxilos del anillo de catecol. Los resultados del estudio de citoprotección sugieren que la metilación de compuestos polifenólicos puede derivar en la pérdida de la capacidad de neutralizar radicales libres.

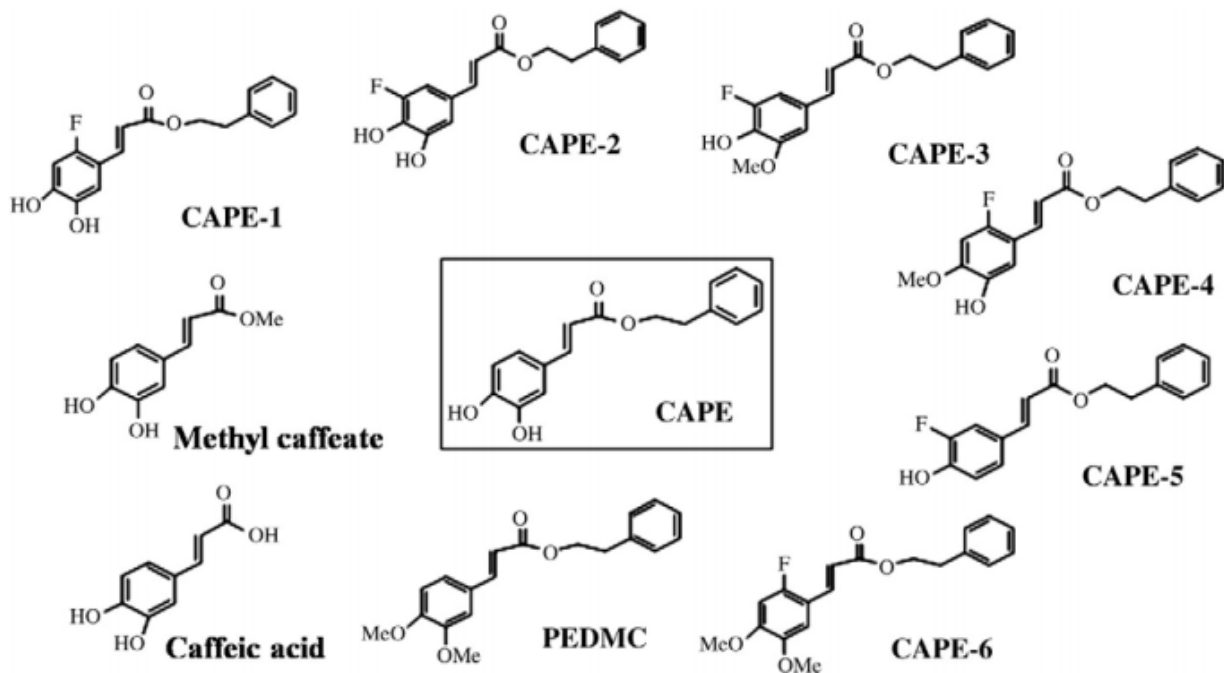


Figura 21. Derivados fluorados del CAPE

Fuente: Wang, *et al.*, 2010

Para mejorar la estabilidad del CAPE tanto en plasma como en circulación, se realizó entonces la síntesis de la amida fenilética del ácido caféico (CAPA) (Figura 22) y de fluorados derivados de ésta y se determinó que poseen una capacidad citoprotectora similar a la del CAPE en contra del estrés oxidativo inducido por peróxido de hidrógeno en células HUVEC (Yang *et al.*, 2010). Las amidas poseen generalmente una energía hidrolítica de activación mayor y son capaces de evitar su hidrólisis en plasma por

esterasas, siendo así más estables que el CAPE en el plasma, lo que prologa su tiempo de vida media *in vivo*, permitiendo al compuesto permanecer en circulación y llevar a cabo sus efectos (Yang et al., 2011).

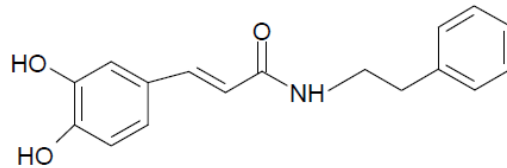


Figura 22. Amida feniletílica del ácido caféico (CAPA)
Fuente: Gerónimo, 2011

3.4 Compuestos de la serie LQM 700's

El CAPE ha llamado la atención por ser una molécula con múltiples acciones biológicas, sin embargo, los derivados de dicha molécula se postulan como mejores opciones por su mayor estabilidad y eficacia, además de poder obtenerlos fácilmente de manera sintética. Además, en comparación con los compuestos mencionados en el capítulo anterior que se utilizan en la terapia farmacológica convencional contra el cáncer, estos compuestos han resultado tener una citotoxicidad dirigida al tumor y no a células sanas, razón principal por la cual se preferiría, en un futuro, cuando se les hayan realizado las pruebas preclínicas suficientes, utilizar como principal tratamiento de una neoplasia.

Por lo anterior, el equipo del Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, encabezado por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano se ha dedicado a sintetizar una amplia gama de derivados amídicos del CAPE, conocidos como CAPA, que conforman la serie LQM 700's, la cual contiene al menos 30 compuestos. En 2011, se llevó a cabo la síntesis de ciertos derivados mediante la reacción de Knoevenagel-Doebner, partiendo de aldehídos aromáticos y ácido malónico, de donde se generaron 3 derivados del ácido cinámico (LQM 711, 713 y 747). Para obtener las amidas correspondientes derivadas de los ácidos cinámicos se llevó a cabo la reacción de condensación directa y como producto final se obtuvieron 5 derivados del CAPE (LQM 716, 725, 749, 739 y 748), que posteriormente se purificaron (Gerónimo, 2011).

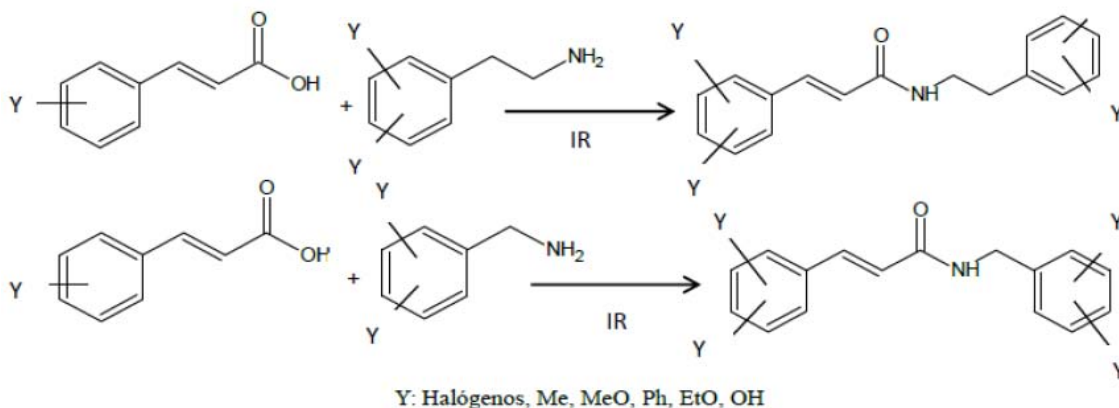


Figura 23. Reacción de síntesis de amidas a partir de derivados del ácido cinámico
Fuente: Ruíz, 2012

Macías *et al.* en 2013, presentaron los efectos quimioprotectores de otras dos moléculas derivadas del CAPE de la misma serie, LQM 717 y LQM 706, en el modelo modificado del hepatocito resistente. Ambos compuestos ejercieron efectos protectores en la peroxidación de lípidos, necrosis, proliferación celular, activación de la subunidad p65 de NF- κ β y en lesiones preneoplásicas.

En 2012, se evaluó la actividad citotóxica de 30 compuestos de la serie LQM 700's a una concentración de 100 μ M en tres líneas celulares neoplásicas, las cuales fueron MDA-MB 231 (cáncer de mama), HeLa (cáncer de cérvix) y PC-3 (cáncer de próstata), además de emplear un cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica (linfocitos) y células de tejido sano (fibroblastos). La citotoxicidad fue probada mediante las técnicas MTT y Cristal Violeta (CV) (Ruíz, 2012).

Se seleccionaron los tres compuestos más citotóxicos para las líneas celulares neoplásicas y fueron evaluados nuevamente a diferentes concentraciones, menores a 100 μ M, en las mismas líneas celulares, con los mismos métodos (Ruíz, 2012).

Con los datos obtenidos del porcentaje de viabilidad se calculó el valor de la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀). Los compuestos que obtuvieron la mejor IC₅₀ para ambas técnicas fueron el LQM 755 y el LQM 738. Los compuestos que no presentaron toxicidad a las células mononucleares de sangre periférica (linfocitos) para la técnica de MTT fueron el LQM 755 y el LQM 738. Para el ensayo de CV fue el LQM 731, seguido del LQM 738 (Ruíz, 2012).

A partir de estos resultados, se han realizado más pruebas con los compuestos LQM 731, LQM 738 y LQM 755 para poder perfilarlos como fármacos quimioprotectores, algunos de los estudios realizados se comentan a continuación.

A través de un ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa) en un modelo in vivo se evaluó el efecto antígenotóxico del compuesto LQM 731. Se utilizaron dos dosis del compuesto LQM 731 (20 y 40 mg/kg de peso), demostrando que ambas dosis causan un daño mínimo al ADN si el compuesto es administrado solo. También se demostró su actividad antígenotóxica al disminuir el daño al ADN inducido por MMC en células de hígado y de riñón con ambas dosis, pero en un porcentaje mayor con la dosis de 20 mg/kg (Hernández, 2013).

La acción anticancerígena del compuesto LQM 731 se evaluó en un modelo de lesiones preneoplásicas en ratones CD1. La inducción de las lesiones se llevó a cabo con 2,4-dinitrofenilhidrazina y posteriormente fueron tratados con dos diferentes dosis del compuesto LQM 731. A través de un estudio anatomopatológico el agente se perfila como quimioprotector por la regeneración en tumefacción turbia hepática y por demostrar ser proapoptótico, además de mostrar una respuesta inmunomoduladora en bazo e intestinos, principalmente, a una dosis terapéutica de 20 mg/kg (Martínez, 2014).

La evaluación de la capacidad genotóxica y antígenotóxica del compuesto LQM 738 se llevó a cabo mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa) en ratones CD1, concluyendo que a una dosis de 20 mg/kg el compuesto no presenta significativa genotoxicidad tanto en hígado como en riñón, además de poseer actividad

antigenotóxica al reducir el daño al ADN provocado por MMC hasta en un 88.42% en células hepáticas y en un 57.6% en células renales a la misma dosis (Cruz, 2014).

De igual manera, se evaluó el efecto antigenotóxico del LQM 755 a través del ensayo cometa en células de hígado y riñón de ratones CD1, demostrando que a una dosis de 20 mg/kg presenta un efecto antigenotóxico, disminuyendo el daño inducido al ADN por MMC, por lo que puede perfilarse como un compuesto quimioprotector (Aguilar, 2014).

4. La técnica de Micronúcleos

En sentido amplio, un biomarcador se refiere a una alteración, inducida por la presencia de un xenobiótico en un organismo, sobre sus componentes celulares o bioquímicos o sobre sus procesos, estructuras o funciones, y dichas alteraciones son cuantificables en una muestra (Gil, 2011).

Las pruebas de evaluación genotóxica son diversas y cada una de ellas se enfoca en distintos tipos de daños al ADN, que puede o no estar relacionado con la citotoxicidad y podría ser causada por los compuestos en cuestión de la serie LQM 700's, entre estas pruebas se encuentra la identificación de micronúcleos, fragmentos de cromatina separados del núcleo principal (Paniagua, 2010).

Durante la división celular el material genético contenido en el núcleo celular se replica y divide equitativamente dando lugar a dos células hijas idénticas; este proceso puede producirse de manera errónea debido a errores durante la replicación y posterior división del ADN, a roturas cromosómicas y al efecto de la radiación y de sustancias genotóxicas, produciéndose pérdida cromosómica y haciendo que el reparto del material genético no sea equitativo. Cuando esto ocurre, el material genético que se desprende y que, por tanto, queda excluido y no se incorpora correctamente al núcleo de la célula hija, origina un nuevo núcleo de menor tamaño que el primario denominado "micronúcleo" (MN), lo cual se traduce en la aparición de un pequeño núcleo en células anucleadas como los eritrocitos o bien, en el citoplasma de nucleadas como linfocitos o espermatogonias, visible fácilmente al microscopio óptico. El material genético desprendido puede derivar de cromosomas enteros o, más frecuentemente, de fragmentos cromosómicos acéntricos que quedan excluidos de los núcleos de las nuevas células durante la anafase mitótica (Zalacain, 2005).

Debido a que el daño genético resulta en roturas cromosómicas, cromosomas estructuralmente anormales o anomalías en la formación del huso mitótico, la incidencia de micronúcleos sirve como un índice de este tipo de daño. Se ha establecido que esencialmente todos los agentes que causan rupturas de doble cadena en los cromosomas (clastógenos) inducen micronúcleos. El análisis de micronúcleos es más rápido y menos exigente técnicamente que analizar aberraciones cromosómicas y

además indica dos importantes tipos de daño genético, clastogénesis y aneugénesis, razón por la que este ensayo ha sido ampliamente utilizado para la detección de sustancias químicas que provocan este tipo de daños (FDA, 2013).

4.1 Antecedentes de la técnica de micronúcleos

La genética toxicológica estudia los efectos adversos en el proceso de la herencia. Los estudios de genética toxicológica han dado lugar a un gran número de procedimientos de pruebas, tanto *in vitro* como *in vivo*, diseñadas para evaluar los efectos de agentes químicos en los mecanismos genéticos y su consecuente riesgo en los organismos, incluyendo al humano. Así, se tiene clara que la información de una mutación se da en tres niveles: en los genes, en los cromosomas y en el aparato celular necesario para la segregación de cromosomas. A este respecto, la técnica de micronúcleos ha sido ampliamente utilizada para medir la genotoxicidad tanto *in vitro* como *in vivo*. La prueba *in vivo* es especialmente relevante para evaluar el peligro de genotoxicidad donde se consideran los factores del metabolismo, la farmacocinética y el proceso de reparación del ADN (Krishna, 2000).

El primero en encontrar un MN fue Howell en 1891 en un frotis sanguíneo que posteriormente fue descrito por Jolly, por lo que actualmente en hematología se conocen como cuerpos de Howell-Jolly, descritos como pequeños restos nucleares con forma generalmente redonda o almendrada con un diámetro entre $0.4\mu - 1.6\mu$, de apariencia picnótica igual a la del núcleo al ser teñidos en forma diferencial con el colorante de Giemsa como se observan en la Figura 24 (Rocha, 2008).

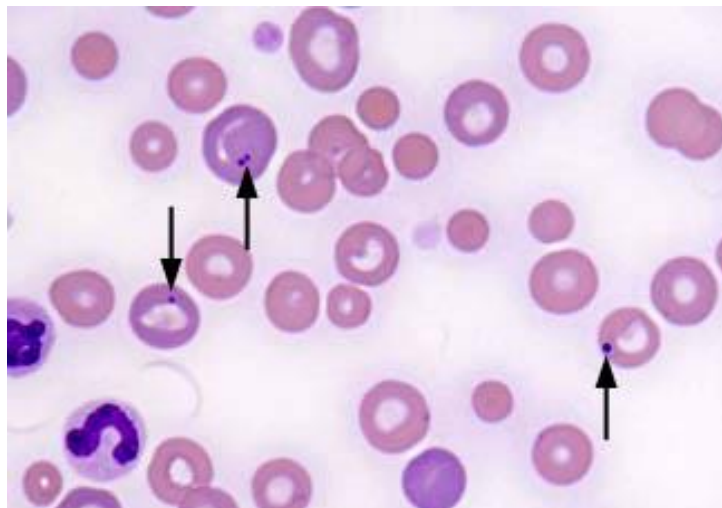


Figura 24. Micronúcleos en frotis sanguíneo
Fuente: Bishop, 2006

El primer intento serio del uso de la frecuencia de micronúcleos como monitor de daño citogenético aparece reportado por Evans en 1959, donde utilizó la frecuencia de micronúcleos como una medida de daño citogenético inducido en la punta de la raíz de

las habas por neutrones rápidos y rayos gamma en presencia y ausencia de oxígeno, encontrando que las cromátides, cromosomas e isocromátides rotas, dan origen a la aparición de fragmentos acéntricos en la mitosis y éstos son excluidos del núcleo principal, apareciendo en la siguiente interfase como micronúcleos (Domínguez, 2005).

Fue en 1975 y 1976 cuando Schmid y Heddle, respectivamente, iniciaron estudios para determinar qué parámetros podían servir como los más útiles indicadores de daño citogenético en médula ósea, eritrocitos en general y eritrocitos policromáticos o en células con gran actividad mitótica (Zalacain, 2005; Schmid, 1975).

En el año de 1980, McGregor y cols., realizaron experimentos para observar la frecuencia de micronúcleos en sangre periférica y probar que ésta podría ser utilizada como un indicador de daño citogenético en eritroblastos (Domínguez, 2005).

4.2 Fundamento de la técnica de micronúcleos en sangre periférica

El análisis de eritrocitos inmaduros tanto en médula ósea como en sangre periférica es aceptable en aquellas especies en las que el bazo no elimina eritrocitos micronucleados. En ratones, los eritrocitos maduros son poblaciones celulares aceptadas para un análisis de micronúcleos cuando la exposición al agente ha durado 4 semanas o más (Hayashi, 1994). La visualización del micronúcleo se ve facilitada en este tipo de células porque carecen de núcleo (Krishna, 2000).

En el estudio agudo se monitorea la presencia de micronúcleos en eritrocitos inmaduros o policromáticos (EPC), esto se debe a que son células jóvenes (reticulocitos) recientemente liberadas a la circulación y presentan una coloración mezclada de basofilia y eosinofilia, presentando una coloración azul-violeta que se debe a la presencia de ácido ribonucleico en el momento de su diapédesis hacia la circulación y por la falta de aproximadamente 20% del contenido final de hemoglobina, por lo que aún conservan parte del aparato ribosómico para terminar la síntesis y construir a una célula madura; generalmente poseen un tamaño un poco mayor que los eritrocitos maduros o normocrómicos (ENC), que presentan una coloración rosada, y proceden de normoblastos que pierden su núcleo antes de que la hemoglobinización del protoplasma sea completa. Generalmente, un aumento en el número de EPCs con respecto a los valores normales, indica una eritropoyesis aumentada. Debido a que son células producidas y liberadas durante el tiempo de estudio, constituyen la manera más eficaz de evaluar con ellas la afección de la actividad medular, así como la capacidad clastógena de los compuestos en corto tiempo (Domínguez, 2005).

La presencia de MN en EPC se basa en lo siguiente: en la anafase del ciclo celular, cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas; sin embargo, los elementos rezagados que pueden ser fragmentados (por un agente clastógeno) o cromosomas completos (por un agente anéugeno) quedan incluidos en el citoplasma de

las células hijas y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios conocidos como micronúcleos (Rocha, 2008).

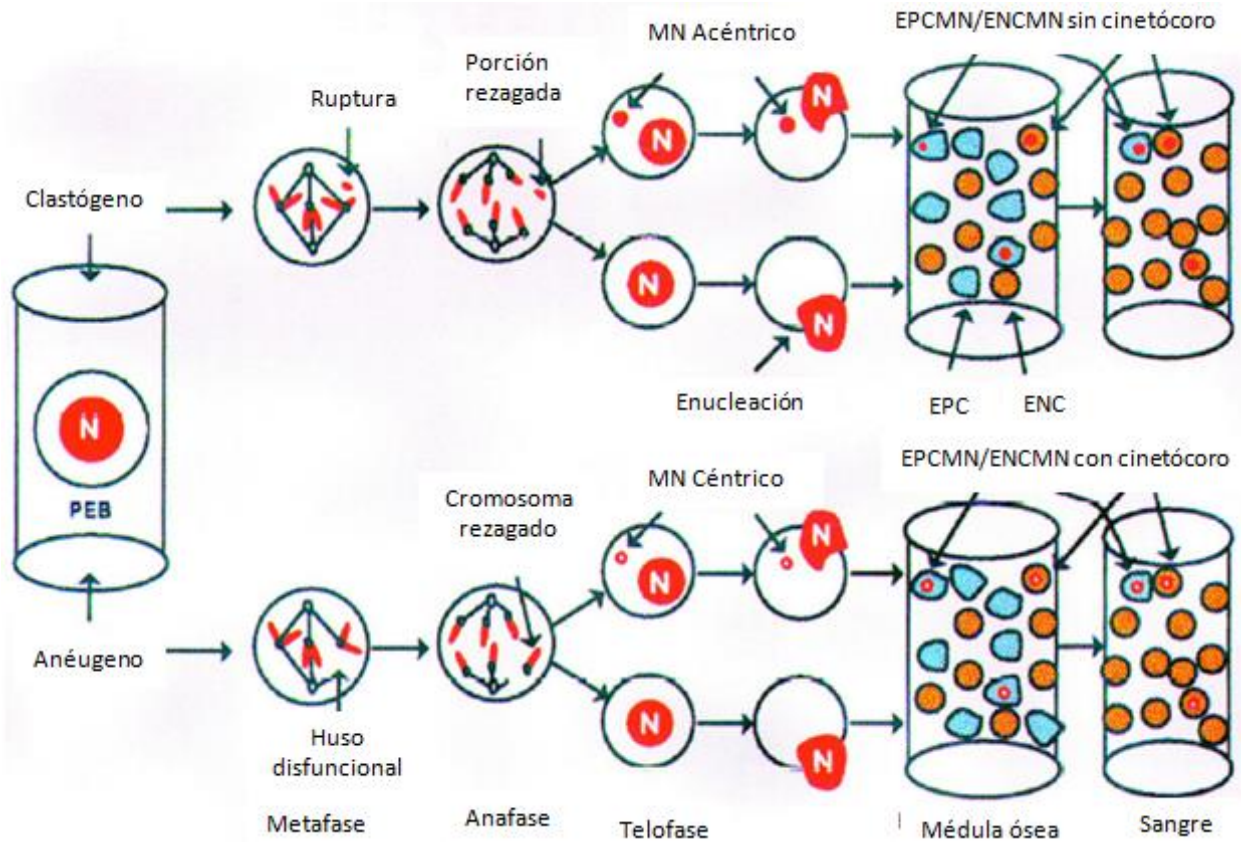


Figura 25. Mecanismo de formación de un micronúcleo en EPCs y ENC
Fuente: Modificada de Krishna, 2000

De acuerdo con Mac Gregor, el tiempo de vida de un eritrocito en ratón es de 30 días y considera que el ciclo celular es de 10 a 20 horas. El lapso que transcurre de la división a la enucleación es de 6 horas y el tiempo de los EPCs en médula ósea es de 24 horas (Domínguez, 2005). Entonces, para sangre periférica, se utilizan al menos dos muestras (48 y 72 h) después de una administración única. Para el estudio de un tratamiento más largo, una muestra después de 48 h de la administración es aceptable (Hayashi, 2000).

La sangre periférica de ratón es obtenida de la vena de la cola o de otro vaso sanguíneo apropiado. Las células hemáticas se someten inmediatamente a una tinción supravital o se extienden en frotis y posteriormente se tiñen con colorantes específicos de ADN o con colorantes convencionales como Giemsa (FDA, 2013).

Para cada animal se determina la relación entre los eritrocitos inmaduros y el total de eritrocitos (inmaduros + maduros), en un recuento de al menos 2000 eritrocitos si se trata de médula ósea y de 1000 si se trata de sangre periférica. Antes de analizarlos al microscopio, se identifican independientemente todos los portaobjetos. Se determinará

la cantidad de eritrocitos policromáticos micronucleados (EPCMN) en un mínimo de 2000 EPCs por animal, para obtener más información, se contarán los eritrocitos normocrómicos micronucleados (ENCMN) en un mínimo de 2000 ENCs por animal, después de la cuarta semana de tratamiento (FDA, 2013).

4.3 Ventajas y desventajas de la técnica de micronúcleos

Los micronúcleos pueden ser observados durante todo el ciclo celular y el número de células contables es relativamente ilimitado; el parámetro contado es reconocido fácilmente hasta por personal con poca experiencia en citogenética; no se requiere un cariotipo favorable; el micronúcleo formado durante la división celular persiste al menos a través de la siguiente interfase, de modo que el tiempo de muestreo es menos crítico; no se requiere el uso de algún otro agente químico además de aquel que está bajo prueba (Domínguez, 2005).

La prueba de micronúcleos en sangre periférica tiene mayores ventajas que la realizada en médula ósea, ya que una pequeña gota de sangre proporciona miles de células contables, se pueden obtener muestras repetidas fácilmente de un animal, evitando la necesidad de sacrificarlo. La única preparación necesaria consiste en un frotis directamente de sangre. El conteo en preparaciones de sangre periférica también es más fácil que en las de médula ósea. Los micronúcleos son de fácil distinción porque son los únicos teñidos dentro de una célula anucleada como el eritrocito (Domínguez, 2005).

La principal limitación del uso de la prueba de micronúcleos para identificar daño citogenético es que no detecta la diferencia entre los agentes aneugénicos y clastogénicos.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una de las principales causas de muerte en todo el mundo, en 2012 causó 8.2 millones de defunciones. Se prevé que los casos anuales aumenten a 22 millones en las próximas dos décadas. El término quimioprevención se acuñó para describir una nueva disciplina en oncología, que consiste en el uso de compuestos sintéticos o naturales para inhibir, retardar o revertir la carcinogénesis.

Los compuestos de la serie LQM 700's pertenecen a los compuestos CAPA, que son análogos amídicos del ácido caféico (CAPE). Se han utilizado líneas celulares de cáncer de mama, cérvix y próstata para evaluar la citotoxicidad de dichos compuestos, así como estudios de genotoxicidad en linfocitos humanos y en un modelo modificado de hepatocito se ha demostrado que poseen actividad quimioprotectora.

Como parte de los estudios preclínicos que permiten perfilar a los compuestos LQM 731, 738 y 755 en un estudio previo se evaluó su capacidad antígeno tóxica en un modelo *in vivo* utilizando el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa), obteniendo como resultado que dichos compuestos ejercen su efecto antígeno tóxico en una dosis de 20 mg/kg y por el comportamiento observado en dichos estudios, es posible perfilarlos como fármacos quimioprotectores.

Con los estudios mencionados, se despertó el interés de realizar otros ensayos que evalúen parámetros de toxicidad tanto en un período agudo como subcrónico, de exposición en modelos animales de experimentación *in vivo*, como la actividad genotóxica y citotóxica que pudieran provocar, ya que de esto dependerá el posible uso de los compuestos de la serie LQM 700's como anticancerígenos.

Para evaluar los parámetros mencionados se utilizó el ensayo de micronúcleos en sangre periférica de ratones de cepa CD1. El roedor es la especie más utilizada para los estudios preclínicos de cualquier compuesto de nueva síntesis al que se le realizará la determinación de toxicidad o efecto tóxico sobre el material hereditario; de todos los roedores el ratón CD1 es una cepa de fácil manejo y en el bioterio de FES-I se reproduce para estos fines de investigación. A su vez, el ensayo de micronúcleos es simple y de análisis rápido, además de que los micronúcleos pueden ser observados durante todo el ciclo celular y el número de células contables es relativamente ilimitado.

OBJETIVOS

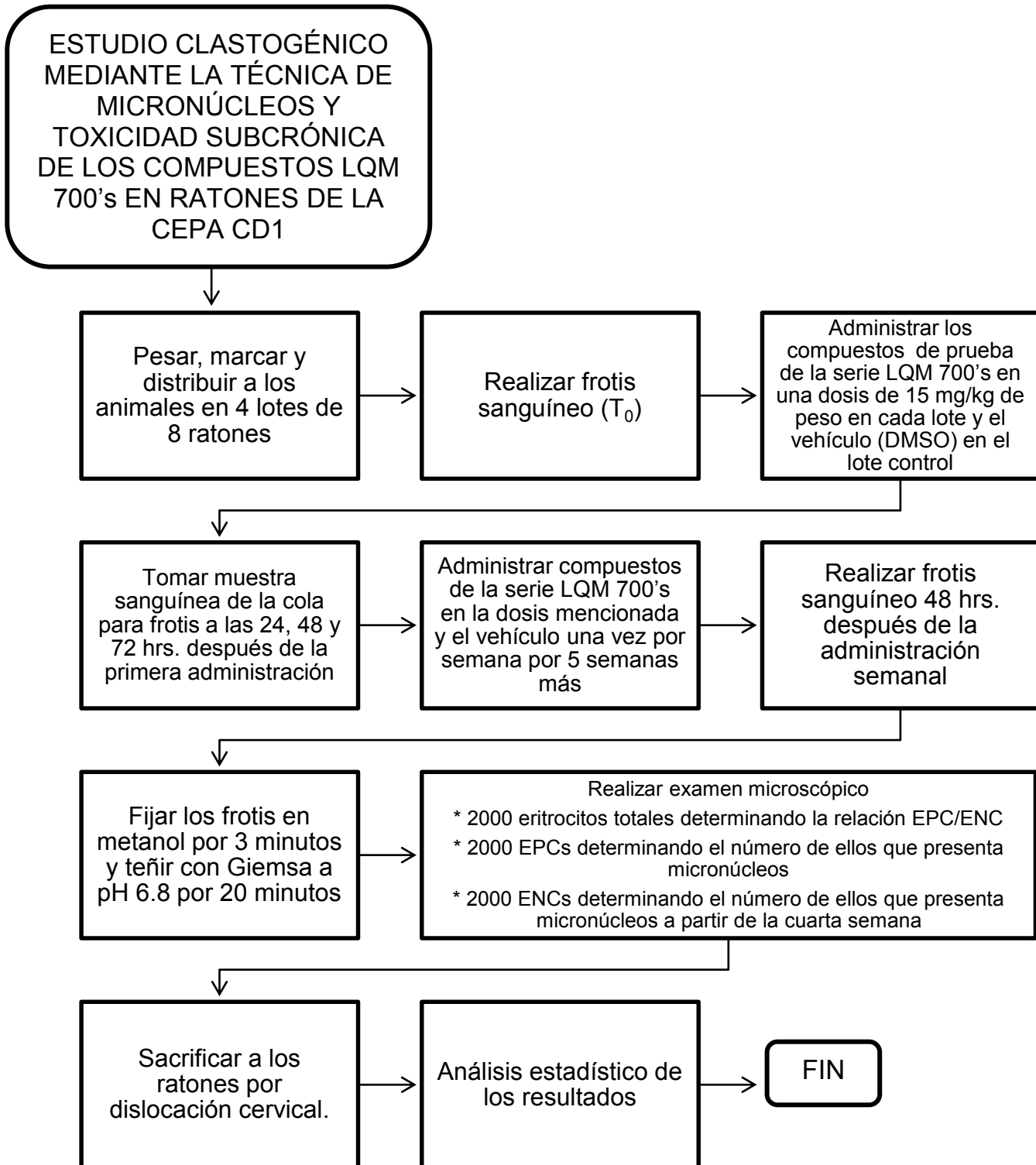
1. Objetivo General

Determinar la toxicidad subcrónica de 3 compuestos serie LQM 700's con la prueba de micronúcleos, utilizando como organismo al ratón CD1.

2. Objetivos Particulares

- Administrar una dosis de 15 mg/kg de peso de tres diferentes compuestos que son análogos amídicos del CAPE (LQM 731, LQM 738 y LQM 755), a lotes de 8 ratones macho cepa CD1
- Determinar la capacidad genotóxica de los compuestos LQM 700's mediante la frecuencia de eritrocitos policromáticos y normocrómicos micronucleados.
- Determinar la capacidad citotóxica de los compuestos LQM 700's mediante el índice de EPC/ENC.

DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL



MATERIALES Y MÉTODO

Material Biológico

- ✓ 32 ratones macho del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de 25 ± 5 g de peso de la cepa CD1, que se mantuvieron en la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en campo 4. Los animales permanecieron en cajas de plástico con cama sanitaria estéril, tapa de acero inoxidable, con agua y alimento (Purina fórmula 5001) *ad libitum*, temperatura controlada (24°) e iluminación 12x12 horas.

Material químico

- ✓ Compuestos CAPA de la serie LQM 700's: LQM 731, LQM 738 y LQM 755, sintetizados en el Laboratorio de Química Medicinal de la FES- Cuautitlán por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano y su equipo de trabajo
- ✓ Dimetil sulfóxido (DMSO) grado biología molecular
- ✓ Xilocaína en gel al 10%
- ✓ Violeta de genciana
- ✓ Metanol absoluto
- ✓ Buffer de fosfatos pH= 6.8
- ✓ Solución de Giemsa 1:10
- ✓ Aceite de inmersión
- ✓ Formalina bufferada

Equipo e instrumental de laboratorio

- ✓ Balanza analítica
- ✓ Espátula
- ✓ Tubos Falcon de 15 mL
- ✓ Pipetas graduadas de diversos volúmenes
- ✓ Jeringas de insulina
- ✓ Portaobjetos de 76 x 26 mm
- ✓ Vasos Coplin
- ✓ Microscopio óptico
- ✓ Estuche de disección
- ✓ Recipientes

Métodos

- ✓ Procedimientos para el estudio de micronúcleos en eritrocitos policromáticos y normocrómicos de sangre periférica

Se utilizaron 32 ratones machos CD1, que fueron pesados, marcados y separados en 4 lotes de 8 ratones.

Tabla 6. Distribución de lotes

Lote	Solución administrada
1	Vehículo de los compuestos LQM 700's
2	Solución de LQM 731 en dosis de 15 mg/kg de peso
3	Solución de LQM 738 en dosis de 15 mg/kg de peso
4	Solución de LQM 755 en dosis de 15 mg/kg de peso

Nota: La dosis administrada se eligió con base en los resultados del ensayo cometa *in vivo*, realizado en investigaciones anteriores.

Una vez distribuidos los lotes, se les tomó a todos los animales una muestra de sangre para obtener frotis de tiempo cero (T_0), que corresponde a la muestra basal de micronúcleos.

Se aplicó tópicamente xilocaína en la porción terminal de la cola de los animales 5 minutos antes del procedimiento siguiente para evitar cualquier dolor. Se cortó una pequeña porción de cola (2 mm) de la parte terminal del ratón y se obtuvo una gota de sangre colocándola en un portaobjetos limpio y desengrasado para realizar un frotis sanguíneo. Se aplicó violeta de genciana con una torunda de algodón después de realizar la acción anterior en la cola del ratón para detener el sangrado y prevenir infecciones.

La extensión de la gota se realizó con ayuda de otro portaobjetos colocado en un ángulo de 45° del primero. Con un solo movimiento se corre la gota, para que el extendido sea uniforme. La preparación se seca al aire. Las laminillas obtenidas se fijaron con metanol absoluto durante 3 minutos y se secaron al aire. Una vez secas, se realizó la tinción utilizando colorante de Giemsa en buffer de fosfatos de pH 6.8 en un vaso Copplin por 15 minutos y se enjuagaron con agua de la llave.

Los compuestos CAPA de la serie LQM 700's que se utilizaron fueron: 731, 738 y 755. Dichos compuestos fueron administrados vía intraperitoneal en forma de solución en la que el vehículo fue dimetil sulfóxido de grado biología molecular. Se realizaron los cálculos necesarios para administrar un volumen menor a 0.3 mL de la solución en una dosis de 15 mg/kg.

Durante las administraciones que se llevaron a cabo, el ratón se sujetó enredando la cola en el dedo menique de la mano derecha y sujetando con índice y pulgar de la misma mano la cabeza del ratón para inmovilizarlo.

Se colocó el ratón inmovilizado en un ángulo de 45° boca arriba para poder introducir la aguja con la cual se administró la dosis de 15 mg/kg de peso en un volumen no mayor a 0.3 mL.

La primera semana de administración se tomó muestra a las 24, 48 y 72 horas después de la administración, realizando frotis y tratamiento de los mismos como ya se explicó anteriormente.

Se administró el compuesto vía intraperitoneal una vez por semana, durante 6 semanas, en cada lote y la toma de muestra se realizó 48 hrs. después de dicha administración. Por lo tanto cada ratón recibió un total de seis inyecciones y el número total de tomas de muestra fueron nueve.

Las laminillas obtenidas se analizaron primero a 40X en regiones donde las células se observaron separadas, intactas y bien teñidas. En estas regiones se utilizó el objetivo de 100X con aceite de inmersión. El color de las células debe ser de rojo a rosa en eritrocitos maduros o normocrómicos (ENC) y azulado para las formas inmaduras o policromáticos (EPC). Los micronúcleos en los EPCs se presentan como cuerpos de inclusión de color azul-violeta; son redondos, con un diámetro aproximado de 1/20 a 1/15 del eritrocitos y no son refringentes.

✓ Análisis estadístico

Consiste en la evaluación de dos parámetros:

- Efecto genotóxico: Cuantificación de 2000 eritrocitos policromáticos por ratón, observando cuántos de ellos contienen micronúcleos (EPCMN)

$$Frecuencia\ EPCMN = \frac{\# EPCMN}{EPC\ contados}$$

- Efecto citotóxico: Cuantificar la relación de eritrocitos policromáticos y eritrocitos normocrómicos (EPC/ENC) en 2000 eritrocitos por ratón.

$$\% EPC's = \frac{\# EPC}{EPC + ENC} \times 100$$

El análisis estadístico de los resultados se realizó con las pruebas de ANOVA y las de comparaciones múltiples de Tukey con un $P < 0.05$ en el programa GraphPad Instat versión 3.1

✓ Toxicidad subcrónica

Se observó cualquier cambio visible que sufrieron los animales de experimentación durante las seis semanas de administración.

RESULTADOS

Para corroborar que se tuviera una población con características homogéneas que no alteraran los resultados, se analizó el porcentaje de EPC/ENC en un tiempo 0, es decir, antes de la primera administración en todos los lotes trabajados. A través de las comparaciones múltiples con las pruebas ANOVA/Tukey no se obtuvo diferencia significativa entre los valores obtenidos.

De igual manera, se analizaron los porcentajes EPC/ENC obtenidos en todos los tiempos del control negativo, es decir, desde el tiempo 0 hasta la sexta semana de administración, para corroborar que el vehículo (DMSO) no tiene capacidad citotóxica que altere los resultados de los compuestos de la serie LQM 700's. A través del análisis con las pruebas ANOVA/Tukey, no se obtuvo ninguna diferencia significativa en los resultados obtenidos del lote control durante las 6 semanas de administración.

a. Efecto citotóxico agudo

Tabla No 7. Promedio de porcentajes de EPCs y su error estándar en un total de 2000 células contadas por ratón, obtenidos en los diferentes tiempos de evaluación aguda

	T0	T24	T48	T72
Control (-)	4.68 ± 0.33	4.99 ± 0.58	4.77 ± 0.66	4.74 ± 0.67
LQM 731	-	4.05 ± 0.24	4.19 ± 0.17	4.25 ± 0.17
LQM 738	5.67 ± 0.28	5.19 ± 0.25	6.58 ± 0.33	7.33 ± 0.66
LQM 755	5.26 ± 0.32	5.18 ± 0.25	5.11 ± 0.23	3.74 ± 0.36

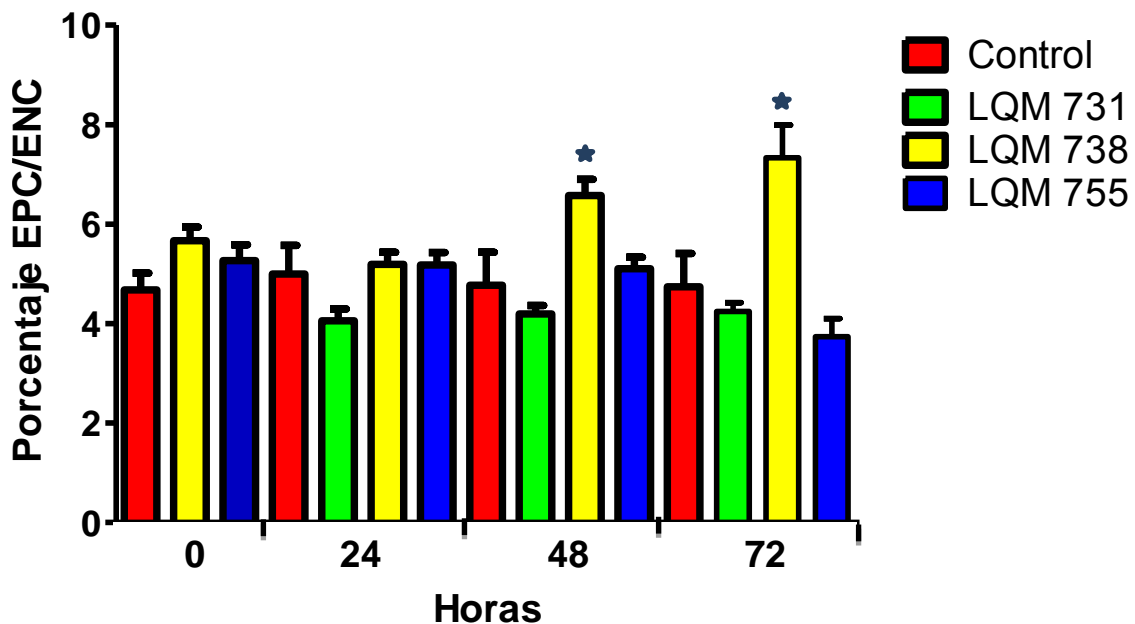


Figura 26. Promedio de porcentajes de EPCs y su error estándar en un total de 2000 células contadas por ratón, obtenidos en los diferentes tiempos de evaluación aguda

★ Diferencias estadísticamente significativas en el análisis de ANOVA/Tukey *p<0.05

b. Efecto citotóxico subcrónico

Tabla 8. Promedio de porcentajes de EPCs y su error estándar en un total de 2000 células contadas por ratón, obtenidos en las diferentes semanas de evaluación crónica

	2° Semana	3° Semana	4° Semana	5° Semana	6° Semana
Control (-)	4.10 ± 0.22	3.79 ± 0.27	4.22 ± 0.64	4.80 ± 1.16	4.51 ± 0.50
LQM 731	4.93 ± 0.19	3.68 ± 0.16	3.69 ± 0.26	6.95 ± 1.70	6.40 ± 1.50
LQM 738	4.71 ± 0.29	4.32 ± 0.22	5.38 ± 1.04	4.47 ± 0.19	7.40 ± 2.43
LQM 755	6.20 ± 1.15	8.86 ± 2.45	4.05 ± 0.70	5.00 ± 1.03	5.51 ± 1.84

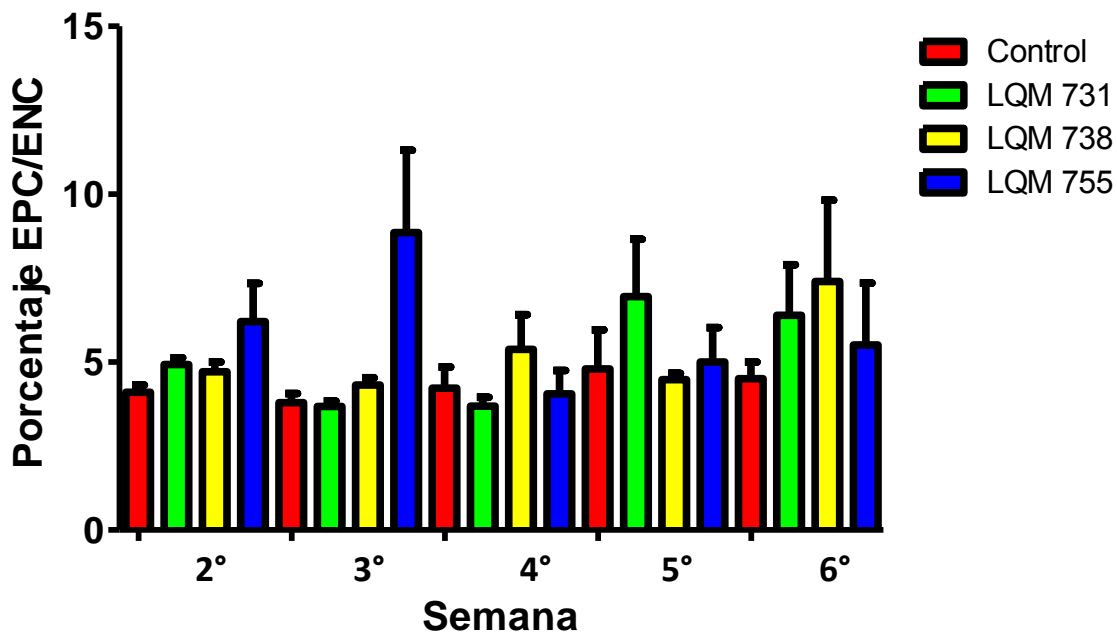


Figura 27. Promedio de porcentajes de EPCs y su error estándar en un total de 2000 células contadas por ratón, obtenidos en las diferentes semanas de evaluación subcrónica

Para corroborar que se tuviera una población con características homogéneas que no alteraran los resultados, se analizó el número de EPCMN en un tiempo 0, es decir, antes de la primera administración en todos los lotes trabajados. A través de las comparaciones múltiples con la prueba Tukey no se obtuvo diferencia significativa entre los valores obtenidos.

De igual manera, se analizó el número de EPCMN obtenidos en todos los tiempos del control negativo, es decir, desde el tiempo 0 hasta la sexta semana de administración, para corroborar que el vehículo (DMSO) no tiene capacidad clastogénica que altere los resultados de los compuestos de la serie LQM 700's. A través del análisis con las pruebas ANOVA/Tukey, no se obtuvo ninguna diferencia significativa en los resultados obtenidos de lote control durante las 6 semanas de administración.

c. Efecto genotóxico agudo

Tabla 9. Promedio del número de EPCMN y su error estándar en un total de 2000 EPCs contados por ratón, obtenidos en las diferentes horas de evaluación aguda

	T0	T24	T48	T72
Control (-)	1.50 ± 0.22	2.29 ± 0.36	2.57 ± 0.29	2.43 ± 0.29
LQM 731	-	6.88 ± 0.95	5.12 ± 0.72	4.12 ± 0.40
LQM 738	1.25 ± 0.16	3.38 ± 0.26	6.12 ± 0.81	4.25 ± 0.41
LQM 755	1.75 ± 0.25	1.75 ± 0.36	3.62 ± 0.62	2.62 ± 0.56

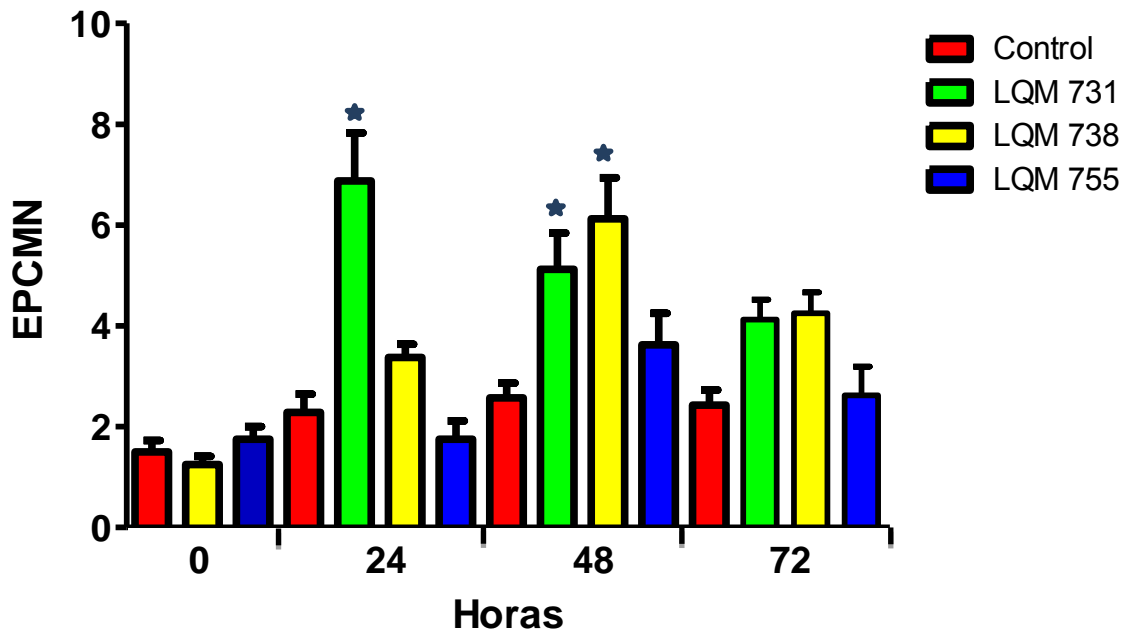


Figura 28. Promedio del número de EPCMN y su error estándar en un total de 2000 EPCs contados por ratón, obtenidos en las diferentes horas de evaluación aguda

★ Diferencias estadísticamente significativas en el análisis de ANOVA/Tukey *p<0.05

d. Efecto genotóxico subcrónico

Tabla 10. Promedio del número de EPCMN y su error estándar en un total de 2000 EPCs contados por ratón, obtenidos en las diferentes semanas de evaluación subcrónica

	2° Semana	3° Semana	4° Semana	5° Semana	6° Semana
Control (-)	3.00 ± 0.25	3.00 ± 0.36	2.5 ± 0.43	2.33 ± 0.42	2.17 ± 0.31
LQM 731	7.12 ± 0.77	4.29 ± 0.56	4.25 ± 1.03	4.00 ± 0.41	4.25 ± 0.48
LQM 738	3.75 ± 0.53	3.62 ± 0.26	3.25 ± 0.49	3.62 ± 0.26	5.12 ± 0.83
LQM 755	2.87 ± 0.55	5.33 ± 1.08	5.00 ± 0.95	5.60 ± 1.03	5.60 ± 0.87

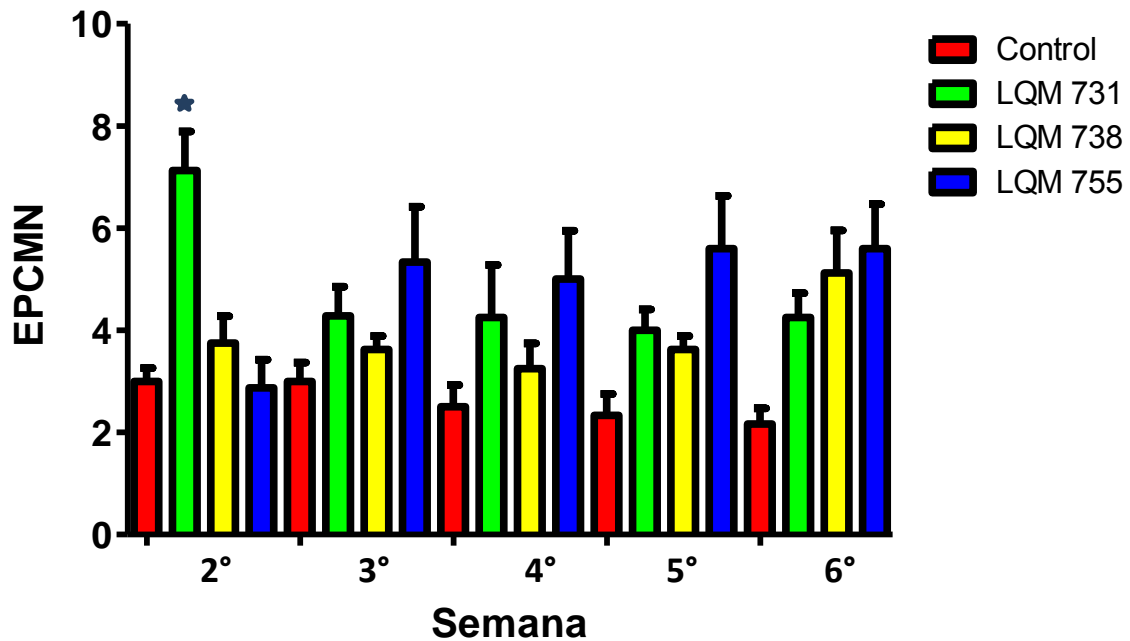


Figura 29. Promedio del número de EPCMN y su error estándar en un total de 2000 EPCs contados por ratón, obtenidos en las diferentes semanas de evaluación subcrónica

★ Diferencias estadísticamente significativas en el análisis de ANOVA/Tukey *p<0.05

e. Efecto genotóxico subcrónico en ENCs

De acuerdo a la FDA, después de la cuarta semana de administración continua de un agente xenobiótico en un organismo en el estudio de micronúcleos, debe realizarse el conteo de dichas estructuras en eritrocitos normocrómicos.

Tabla 11. Promedio del número de ENCMN y su error estándar en un total de 2000 ENCs contados por ratón, obtenidos en las diferentes semanas de evaluación subcrónica

	4° Semana	5° Semana	6° Semana
Control (-)	1.83 ± 0.30	2.33 ± 0.49	2.83 ± 0.40
LQM 731	1.75 ± 0.25	2.50 ± 1.19	2.50 ± 0.64
LQM 738	2.12 ± 0.48	4.00 ± 0.38	3.62 ± 0.65
LQM 755	2.80 ± 0.66	2.20 ± 0.73	3.40 ± 0.93

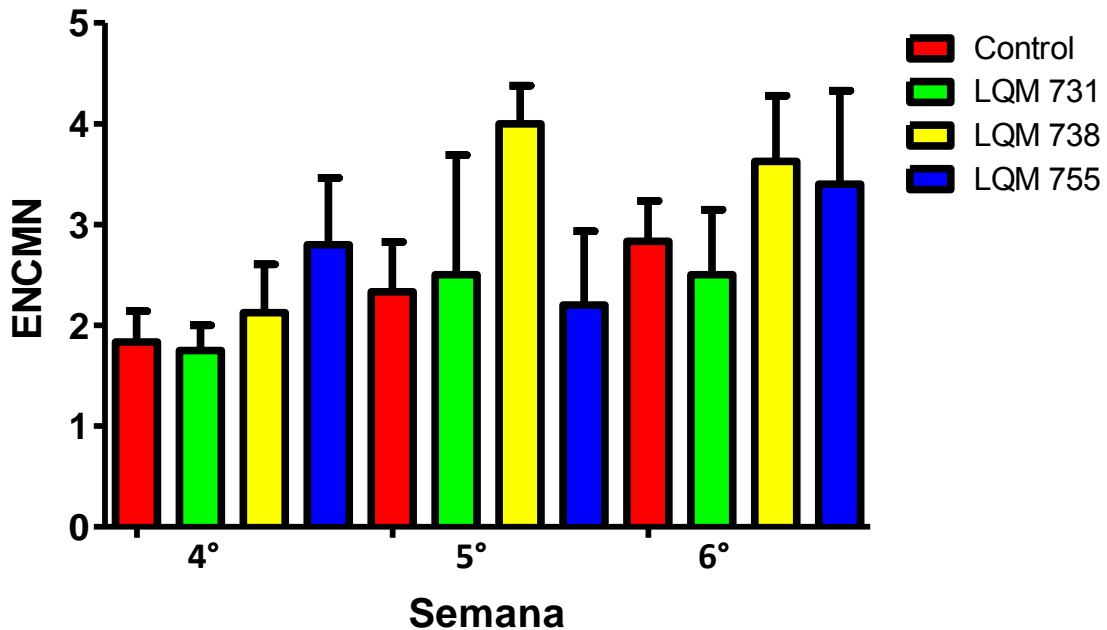


Figura 30. Promedio del número de ENCMN y su error estándar en un total de 2000 ENC's contados por ratón, obtenidos en las diferentes semanas de evaluación subcrónica

d. Observaciones de toxicidad subcrónica

Tabla 12. Observaciones en el lote de ratones al que se administró LQM 731 y Control 1 y 2

Fecha (2014)	Actividades	Observaciones
2 de junio	- Toma de muestra de tiempo 0 - 1° admón. con dosis de 15 mg/kg	
3 de junio	- Tomar muestra de 24 horas	- Muere ratón control 2
4 de junio	- Tomar muestra de 48 horas	
5 de junio	- Tomar muestra de 72 horas	
11 de junio	- 2° admón. con misma dosis	
13 de junio	- Toma de muestra de 48 hrs. de 2° admón.	
18 de junio	- 3° admón. con misma dosis	
20 de junio	- Toma de muestra de 48 hrs. de 3° admón.	- Muere ratón 5 - Ratón 3 y 4 se notan débiles
23 de junio		- Muere ratón 4 - Ratones se tornan agresivos y matan a ratón 8
25 de junio	- 4° admón. con misma dosis	- Ratón 3 se nota débil
26 de junio		- Ratón 3 muere
27 de junio	- Toma de muestra de 48 hrs. de 4° admón.	
2 de julio	- 5° admón. con misma dosis	
4 de julio	- Toma de muestra de 48 hrs. de 5° admón.	
9 de julio	- 6° admón. con misma dosis	
11 de julio	- Toma de muestra de 48 hrs. de 6° admón.	

Nota: Se obtuvo un total de 5 muertes, que corresponden a un sujeto control y 4 sujetos con administración de LQM 731

Tabla 13. Observaciones en el lote de ratones al que se administró LQM 738 y Control 3 y 4

Fecha (2014)	Actividades	Observaciones
9 de junio	- Tomar muestra de sangre de tiempo 0 - 1° admón. con dosis de 15 mg/kg	
10 de junio	- Tomar muestra de 24 horas	
11 de junio	- Tomar muestra de 48 horas	
12 de junio	- Tomar muestra de 72 horas	
16 de junio	- 2° admón. con misma dosis	
18 de junio	- Toma de muestra de 48 hrs. de 2° admón.	Muere ratón control 4
23 de junio	- 3° admón. con misma dosis	
25 de junio	- Toma de muestra de 48 hrs. de 3° admón.	
30 de junio	- 4° admón. con misma dosis	
2 de julio	- Toma de muestra de 48 hrs. de 4° admón.	
7 de julio	- 5° admón. con misma dosis	
9 de julio	- Toma de muestra de 48 hrs. de 5° admón.	
14 de julio	- 6° admón. con misma dosis	
16 de julio	- Toma de muestra de 48 hrs. de 6° admón.	

Nota: Se obtuvo un total de una muerte, que correspondió al sujeto control 4, no murió ningún ratón del lote al que se le administró LQM 738

Tabla 14. Observaciones en el lote de ratones al que se administró LQM 755 y Control 7 y 8

Fecha (2014)	Actividades	Observaciones
11 de agosto	- Tomar muestra de sangre de tiempo 0 - 1° admón. con dosis de 15 mg/kg	
12 de agosto	- Tomar muestra de 24 horas	
13 de agosto	- Tomar muestra de 48 horas	
14 de agosto	- Tomar muestra de 72 horas	
19 de agosto	- 2° admón. con misma dosis	
21 de agosto	- Toma de muestra de 48 hrs. de 2° admón.	- R1 y C7 presentan diarrea - R4 se nota débil
22 de agosto		- R1 muere - R4 se nota débil
25 de agosto		- R4 muere
26 de agosto	- 3° admón. con misma dosis	
28 de agosto	- Toma de muestra de 48 hrs. de 3° admón.	- R7 se nota débil
1 de septiembre		- R7 muere
2 de septiembre	- 4° admón. con misma dosis	
4 de septiembre	- Toma de muestra de 48 hrs. de 4° admón.	
9 de septiembre	- 5° admón. con misma dosis	
11 de septiembre	- Toma de muestra de 48 hrs. de 5° admón.	
17 de septiembre	- 6° admón. con misma dosis	
19 de septiembre	- Toma de muestra de 48 hrs. de 6° admón.	

Nota: Se obtuvo un total de 3 muertes, que corresponden a 3 sujetos con administración de LQM 755

Se adquirieron dos ratones cepa CD1 más, para trabajarlos dentro del grupo control debido a dos decesos obtenidos que se muestran en las tablas anteriores, para poder tener un lote que fuera estadísticamente significativo. La primera administración con DMSO (vehículo de los LQM 700's) a estos dos ratones se realizó el 23 de junio, siguiendo el patrón de administración que se observa en las Tablas 12, 13 y 14, siendo la sexta y última administración el 1° de agosto. Durante las 6 semanas de administración no se observó ningún cambio de comportamiento ni enfermedad.

DISCUSIÓN

El estudio de nuevos compuestos que puedan desarrollarse como agentes quimioprotectores es de suma importancia en la actualidad debido a la alta incidencia del cáncer en la población mundial. Se ha descubierto que una gran variedad de compuestos presentes en la naturaleza poseen la capacidad de inhibir, retardar o revertir la carcinogénesis, tal es el caso del propóleo y sus componentes, principalmente el éster feniletílico del ácido caféico (CAPE). Durante las dos últimas décadas se han investigado los múltiples efectos que posee el CAPE, entre ellos, su efecto antineoplásico como supresor tumoral, agente quimiopreventivo y quimioprotector. Al descubrir su baja estabilidad en plasma, se le han realizado modificaciones estructurales que puedan aumentar su estabilidad y le permitan realizar un efecto terapéutico más amplio.

El Laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, encabezado por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano se ha dedicado, entre otras cosas, a desarrollar compuestos derivados del CAPE que posean mayor estabilidad. Inicialmente fueron sintetizados 30 compuestos de la serie LQM 700's, a los cuales se les evaluó su capacidad citotóxica tanto en células neoplásicas como en células sanas, siendo los mejores candidatos para perfilarse como agentes quimioprotectores los compuestos LQM 731, LQM 738 y LQM 755 por presentar mayor citotoxicidad en células neoplásicas.

Posteriormente, se realizaron estudios de la actividad genotóxica y antigenotóxica de estos tres compuestos a través del ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa), obteniendo como resultado que la dosis efectiva a la que dichos compuestos ejercen su efecto antigenotóxico es a 20 mg/kg de peso ya que reparan considerablemente el daño provocado por mitomicina C (MMC) en células de hígado y riñón, y además, a dicha concentración los compuestos no poseen actividad genotóxica sobre el organismo (Hernández, 2013; Cruz, 2014; Aguilar, 2014).

Los compuestos estudiados son análogos amídicos halogenados del CAPE. Yang *et al.* en 2011, fueron los primeros en diseñar una molécula análoga de CAPE con un enlace amídico en lugar de enlace éster, dando lugar a la amida feniletílica del ácido caféico (CAPA), que le confiere una mayor estabilidad, ya que este enlace tiene la capacidad de evitar la hidrólisis por esterasas en el plasma al tener una energía hidrolítica de activación mayor que el enlace éster. De esta manera, se prolonga el tiempo de vida media in vivo de la molécula en circulación y así puede llevar a cabo con mayor eficacia sus efectos.

La serie de compuestos LQM 700's son análogos del CAPE con diferentes modificaciones en su estructura que potencializan su efecto. Poseen sustituyentes como los halógenos que ejercen un efecto inductivo en el anillo del catecol, disminuyendo la densidad electrónica en el sistema conjugado de la molécula; sustituyentes como el grupo hidroxilo presentes en el anillo de catecol tienen una importante actividad antioxidante y de su posición en el anillo depende el grado de citotoxicidad que posea la molécula.

Al compuesto LQM 731 se le han retirado los sustituyentes hidroxilo del anillo del catecol, su fórmula condensada es $C_{16}H_{12}ONCl_4$ y presenta un peso molecular de 375.08 g/mol. El compuesto LQM 738 tiene un peso molecular de 432.72 g/mol y tiene como fórmula condensada $C_{22}H_{16}O_2NCl_3$. El compuesto LQM 755 tiene un peso molecular de 398.28 g/mol y como fórmula condensada $C_{22}H_{17}O_2NCl_2$; la estructura que poseen los compuestos no se encuentran en el presente trabajo por el proceso de patente en el que se encuentra. Dichos compuestos fueron desarrollados con técnicas de química computacional empleando métodos que relacionan la estructura con su actividad biológica como lo hace el programa QSAR (Quantitative Structure Activity) y con métodos de modelación molecular.

En el presente trabajo se realizó una prueba de toxicidad subcrónica para evaluar la capacidad genotóxica y citotóxica que pudieran provocar los tres compuestos de la serie LQM 700's ya mencionados, a través de la prueba de micronúcleos en sangre periférica de ratones cepa CD1 como parte de la batería de pruebas preclínicas que deben realizarse para poder perfilarlos como fármacos quimioprotectores.

El roedor es la especie más utilizada para los estudios preclínicos de cualquier compuesto de nueva síntesis al que se le realizará la determinación de toxicidad o efecto tóxico sobre el material hereditario. El ensayo *in vivo* de micronúcleos en mamíferos está indicado para evaluar el riesgo mutagénico, ya que permite tomar en consideración factores del metabolismo, de la farmacocinética y de los procesos de reparación del ADN. Los ensayos *in vivo* también resultan útiles para profundizar en el estudio de los efectos mutagénicos detectados en ensayos *in vitro*.

La dosis única a la que se expuso a los animales de experimentación fue designada con base en los resultados obtenidos en el ensayo cometa. A la dosis de 20 mg/kg de peso no se obtuvo efecto genotóxico significativo en células sanas y se obtuvo el mejor efecto antígenotóxico en células afectadas con MMC en una emisión aguda. Por ello, al ser un estudio subcrónico que duraría 6 semanas, se redujo dicha dosis a 15 mg/kg de peso. Los estudios de toxicidad a largo plazo se realizan con el objetivo de visualizar los efectos tóxicos que aparecen como consecuencia de la administración prolongada de un compuesto químico en dosis reducidas.

En las Tablas 12, 13 y 14 se encuentran las observaciones realizadas a los lotes de trabajo durante las 6 semanas de administración de los compuestos de la serie LQM 700's, donde se obtuvo como resultado que el compuesto que más decesos causó en el tiempo de administración fue el LQM 731, seguido por el LQM 755, con 4 y 3 decesos, respectivamente. El compuesto LQM 738 no causó ningún deceso en los animales de experimentación. Dentro del grupo control, se encontraron dos decesos en las primeras semanas de administración del vehículo, de esta manera, se puede excluir al vehículo de ser la causa de la muerte.

Los resultados obtenidos del número de EPCMN y porcentaje de EPCs leídos en los frotis de todos los ratones de experimentación antes de administrar la primera dosis, es decir a tiempo 0, se encontraron en condiciones normales, con un número de EPCMN entre 1 y 3 y un porcentaje de EPCs de 3.3 a 13.3, confirmando de esta forma que los organismos con los que se trabajó poseían características sanas y uniformes que no alterarían los resultados a obtener tras las 6 semanas de administración tanto de los diferentes compuestos de la serie LQM 700's, como del vehículo de los mismos (DMSO).

La solubilidad de los compuestos en agua es bastante reducida, por ello se seleccionó al DMSO como vehículo, ya que presenta excelentes propiedades de solvatación, además de poseer un perfil de toxicidad bajo y favorable. Esto se confirmó a través de su evaluación como control negativo en la prueba, ya que no causó efecto genotóxico al no presentar diferencias estadísticamente significativas del número de MN basales tanto en EPCs como en ENC's que va de 1 a 3 MN. Tampoco presentó efecto citotóxico, manteniendo el porcentaje de EPCs normales en sangre periférica, que va de 3.3 a 13.3%, esto tanto en la emisión aguda como subcrónica.

El efecto citotóxico agudo fue evaluado a través del promedio de porcentajes de EPCs en un total de 2000 células contadas por ratón. Un aumento en el número de EPCs con respecto a los valores normales (3.3-13.3%) reportados en la literatura, evidenciaría una eritropoyesis aumentada provocada por el intento del organismo de mantener en equilibrio el número de células circulantes, de esta manera se observa el incremento de células inmaduras. Los resultados obtenidos experimentalmente, a través del análisis estadístico con las pruebas de ANOVA/Tukey de comparación múltiple de columnas, indican que el compuesto LQM 738 a las 48 y 72 hrs. presenta una diferencia estadísticamente significativa cuando $p < 0.05$, al tener porcentajes de 6.58 y 7.33, respectivamente. Sin embargo, estos resultados aún se encuentran dentro del parámetro normal de EPCs en sangre periférica de ratón que se encuentra reportada en la literatura.

En cuanto al efecto citotóxico subcrónico de los compuestos, el análisis estadístico con las pruebas ANOVA/Tukey cuando $p < 0.05$ no evidenció la presencia de diferencias

estadísticamente significativas entre los resultados durante las 6 semanas de administración de los compuestos. En la Figura 27 se observan 2 valores que pudiesen evidenciar la presencia de una diferencia estadísticamente significativa, correspondientes a la 3° semana de administración del LQM 755 (8.86) y a la 6° semana de administración del LQM 738 (7.40), sin embargo, la desviación estándar de dichos valores es de 2.45 y 2.43, respectivamente, siendo éstos, valores muy grandes que justifican la ausencia de una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los demás valores obtenidos, además de que ambos valores se encuentran dentro del rango normal de EPCs en sangre periférica de ratón. Los valores medios de los porcentajes de EPCs en 2000 células contadas por ratón se mantuvieron dentro de los valores normales reportados por la literatura.

Sin embargo, dentro de los resultados del efecto genotóxico en un tiempo agudo sí se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas a las 24 y 48 hrs. después de la administración del compuesto LQM 731 presentando un promedio de 6.88 y 5.12 EPCMN, respectivamente, en un total de 2000 EPCs contados por ratón; así como a las 48 hrs. post administración del compuesto LQM 738, donde se presentó un promedio de 6.12 EPCMN. Dichos valores, además de presentar una diferencia significativa en comparación con todos los demás valores obtenidos en la emisión aguda, son mayores al número normal de EPCMN que va de 1 a 3. Además, los compuestos LQM 731 y 738 presentaron un promedio de EPCMN por encima de los valores normales (1-3) a las 72 hrs., de 4.12 y 4.25 respectivamente, después de la administración, y aunque no representen una diferencia estadísticamente significativa con respecto a los demás valores obtenidos, sí indican un leve efecto genotóxico.

El efecto genotóxico en un tiempo de administración subcrónica, en cambio, sólo obtuvo un valor con diferencias estadísticamente significativas, éste valor corresponde a la segunda semana de administración del compuesto LQM 731, con un promedio de 7.12 EPCMN por cada 2000 células contadas. Dicho compuesto presentó también dos resultados con diferencias estadísticamente significativas en la administración aguda del compuesto a las 24 y 48 hrs. y además, a pesar de no representar diferencias significativas, el número de EPCMN a las 72 hrs. también resultó por encima de los valores normales. Adicionalmente, la administración del compuesto LQM 731 provocó la presencia de en promedio más de 4 EPCMN en las siguientes semanas de administración, siendo éste un valor mayor a los valores de referencia ya mencionados.

Asímismo, el compuesto LQM 738 a la sexta semana de administración y el LQM 755 de la tercera a la sexta semana de administración presentaron un promedio de EPCMN alrededor de 5, siendo también valores mayores a las referenciadas en la bibliografía.

Según la FDA en un estudio subcrónico, el efecto genotóxico de un compuesto también puede ser evidenciado por el número de ENCMN después de la cuarta semana de

administración. No se obtuvo un resultado que presentara una diferencia estadísticamente significativa con las pruebas ANOVA/Tukey cuando $p < 0.05$, no obstante, el valor del promedio de ENCMN fue de 4 en la quinta semana de administración del compuesto LQM 738, valor que es un poco mayor que el valor referencial normal. Los demás promedios de ENCMN obtenidos después de la cuarta semana de administración de los compuestos de la serie LQM 700's, así como del control negativo (DMSO), se encuentran dentro de los límites normales.

Los resultados obtenidos demuestran que los compuestos LQM 731, 738 y 755 no poseen actividad citotóxica en el modelo utilizado (ratón cepa CD1) al no presentar un incremento en el porcentaje de EPCs circulantes en sangre periférica; sin embargo, sí presentan cierta capacidad genotóxica al incrementar el número de EPCMN en distintos tiempos analizados.

De acuerdo con Ruíz (2012), a través de la prueba de MTT fueron los compuestos LQM 738 y 755 los que presentaron el menor daño a las células sanas; el resultado obtenido en el presente trabajo concuerda con el obtenido por Ruíz en la prueba *in vitro*, ya que el compuesto LQM 731 resultó presentar mayor genotoxicidad en EPCs al inducir un incremento variable de MN en todos los tiempos de administración analizados. El compuesto LQM 738 sólo indujo incremento de EPCMN a las 48 y 72 hrs después de la primera administración y a la sexta semana. El LQM 755 produjo genotoxicidad en el tiempo de estudio subcrónico al incrementar el número de EPCMN después de la tercera semana de administración. Los incrementos mencionados son significativos tomando en cuenta que el número de EPCMN normales en sangre periférica de ratón va de 1 a 3 MN.

Sin embargo, incluso el número mayor de EPCMN inducidos tras la administración de los compuestos de la serie LQM 700's (7.12 en la segunda semana de administración del LQM 731), son menores a los que induce un agente con capacidad clastogénica estudiada y confirmada como lo hace Mitomicina C (MMC), fármaco utilizado en el tratamiento contra el cáncer cuya activación comienza con la reducción de su estructura quinona y se metaboliza a un número de formas activas por reducción enzimática que ejercen actividad antineoplásica a través de la formación de enlaces cruzados con el ADN, alquilación y ruptura de la cadena de ADN con formación de radicales libres (Hernández, 2013). MMC induce un promedio de 20.8 EPCMN después de las 48 hrs. de administración y aún después de 72 hrs., se encuentran un promedio de 11.8 EPCMN en sangre periférica de ratón cepa CD1 (Hernández, 2012).

En 2012, Sulaiman realizó un estudio del papel que posee el CAPE sobre la clastogenicidad inducida por MMC. En dicho estudio se abordó el análisis de aberraciones cromosómicas, el índice mitótico, la actividad de adenosina desaminasa y el test de micronúcleos en médula ósea. El resultado de administrar 5 y 10 mg/kg de

peso de CAPE en ratones Balb/c indicó que el compuesto no es citotóxico o genotóxico en comparación con el grupo control que se trabajó, pues se encontró un promedio de 1 a 2 MN para cada dosis, respectivamente, sin aumento o disminución en el porcentaje de EPCs. En dicho estudio también se realizó el análisis de la capacidad antigenotóxica en pre y postratamiento del CAPE, es decir, se administró primero al CAPE y después a MMC por una parte, y por otra, se administró primero a MMC y después a CAPE para identificar cómo el compuesto puede llevar a cabo su mejor actividad quimioprotectora, resultando como mejor alternativa el pretratamiento, pues de esta manera se observó una mayor disminución en el número de MN que puede causar la MMC *per se*.

Los suplementos alimenticios, principalmente antioxidantes como el CAPE, son ampliamente utilizados por una gran parte de la población para mantener la salud, y últimamente han sido recomendados a individuos a quienes se le ha diagnosticado cáncer. Poseen la capacidad de destoxificar radicales libres o inactivar radicales intermediarios generados por fármacos antineoplásicos. Además, se ha dilucidado que son capaces de incrementar la actividad citotóxica y de reducir los efectos perjudiciales de los fármacos quimioterapéuticos sin dañar a las células normales. La actividad antioxidante del CAPE se debe principalmente a que posee dos grupos hidroxilos en su estructura que pueden unirse a radicales libres y así proteger macromoléculas celulares como lo son el ADN y las proteínas del daño oxidativo que inducen gran variedad de agentes (Sulaiman, 2012).

Con la información anterior podemos intentar explicarnos por qué los compuestos de la serie LQM 700's produjeron la inducción de un número promedio de EPCMN mayor a lo normal, ya que es el efecto antioxidante que le proporcionan sus dos grupos hidroxilos en el anillo de catecol en la estructura del CAPE los que le otorgan la capacidad de no causar daño a las células normales y en los compuestos LQM 731, 738 y 755 estos grupos hidroxilo han sido removidos y sustituidos por átomos de halógenos como lo es el cloro. Sin embargo, este reemplazo retarda la degradación metabólica, incrementa la lipofilidad y ejerce un profundo impacto en la unión al receptor o a la selectividad, dependiendo de su posición.

Entonces, con el estudio realizado podemos decir que el LQM 731 es el compuesto que más capacidad genotóxica presenta, resultado que concuerda con las observaciones de toxicidad subcrónica, en donde se encontró que los sujetos de experimentación sufrían debilitamiento y posteriormente morían, obteniendo un total de 4 decesos.

El LQM 755 sólo presentó genotoxicidad en el periodo subcrónico de administración y como resultados de la toxicidad subcrónica también provocaban el debilitamiento de los sujetos de experimentación, con su posterior muerte, al igual que los sujetos administrados con LQM 731, obteniendo un total de 3 decesos.

LQM 738 es el compuesto que menos capacidad genotóxica presentó y por ello podría ser perfilado como el mejor agente quimioprotector de los tres compuestos estudiados, además de que en las observaciones de toxicidad subcrónica realizadas fue el compuesto que menos efectos adversos observables tuvo y no provocó el deceso de ningún sujeto de experimentación.

La genotoxicidad presentada por los tres compuestos es menor a la que provoca un agente clastógeno como MMC y esto resulta sumamente importante porque pone de manifiesto que los compuestos son sustancias de muy bajo potencial genotóxico y citotóxico.

CONCLUSIONES

- ✓ Se evaluó la actividad genotóxica y citotóxica tanto en un tiempo agudo como subcrónico de tres compuestos de la serie LQM 700's (LQM 731, 738 y 755) a través de la prueba de micronúcleos en ratones cepa CD1 con una dosis de 15 mg/kg de peso.
- ✓ Los tres compuestos evaluados no presentan actividad citotóxica tanto en el estudio de tiempo agudo como de tiempo subcrónico.
- ✓ El compuesto LQM 731 fue el que más actividad genotóxica presentó durante las 6 semanas de administración.
- ✓ El compuesto LQM 738 fue el que menos actividad genotóxica presentó de los tres compuestos evaluados.
- ✓ El compuesto LQM 755 sólo presentó actividad genotóxica en el periodo subcrónico de administración después de la tercera semana.
- ✓ Los resultados de actividad genotóxica obtenidos concuerdan con los resultados observados de toxicidad subcrónica.
- ✓ La actividad genotóxica que presentaron los tres compuestos es menor a la que presenta un agente clastógeno como MMC.
- ✓ De los tres compuestos el que podría perfilarse como mejor fármaco quimioprotector es el LQM 738 por presentar la menor genotoxicidad y por presentar menor toxicidad en un período subcrónico.

PROSPECTIVAS

- ✓ Realizar pruebas de farmacocinética y farmacodinamia de los compuestos LQM 731, 738 y 755.

- ✓ Determinar los posibles metabolitos genotóxicos resultantes del metabolismo de los compuestos.

- ✓ Evaluar el daño histopatológico que los compuestos de la serie LQM 700's puedan causar en diferentes órganos implicados en el metabolismo de los fármacos, como son hígado y riñón, así como en otros órganos que pudieran tener afecciones como corazón, bazo y cerebro.

REFERENCIAS

1. Aguilar K. (2014) *Evaluación del efecto genotóxico y antigenotóxico del análogo del éster feniletílico derivado del ácido caféico LQM 755 mediante electroforesis unicelular en ratones CD1*. Tesis de licenciatura BQD. FES Cuautitlán-UNAM.
2. American Cancer Society (2013). *Principios de la quimioterapia*. [En línea] Disponible en: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002996-pdf.pdf>
3. Bello, J. (2001) *Fundamentos de Ciencia Toxicológica*. España: Ediciones Díaz de Santos.
4. Beltrán, O. et al. (2005) *Mecanismo de quimiopreención del éster feniletílico del ácido caféico (CAPE) en la iniciación de un modelo de hepatocarcinogénesis: alteración de los CYP450*. 2° Congreso Nacional de Química Médica. México, DF.
5. Beltrán, O. et al. (2011) *Efecto preventivo del CAPE en el desarrollo de carcinoma hepatocelular en ratas*. Revista Hospital Juárez México. 78 (4): 219-224
6. Bishop V., Brown H., Latimer K. (2006) *Babesiosis*. Department of Pathology. College of Veterinary Medicine, University of Georgia, Athens. [En línea] Disponible en: <http://www.berkanocattery.es/salud/babesia.html>
7. Chehin, C. (2014) *Estudio del efecto del compuesto LQM 731 sobre la inducción de células binucleadas micronucleadas en cultivo de linfocitos humanos*. Tesis de licenciatura QFB. FES Cuautitlán-UNAM.
8. Chiao C, Carothers AM, Grunberger D, Solomon G, Preston GA, Barrett JC. (1995) *Apoptosis and altered redox state induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells*. Cancer Res. Aug 15;55(16):3576-83.
9. Chung TW, Moon SK, Chang YC, Ko JH, Lee YC, Cho G, Kim SH, Kim JG, Kim CH. (2004) *Novel and therapeutic effect of caffeic acid and caffeic acid phenyl ester on hepatocarcinoma cells: complete regression of hepatoma growth and metastasis by dual mechanism*. FASEB J. Nov;18(14):1670-81.
10. Cruz L. (2014) *Evaluación de la capacidad genotóxica y antigenotóxica del compuesto LQM 738 análogo del CAPE mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel, en ratones CD1*. Tesis de licenciatura QFB. FES Cuautitlán-UNAM.
11. Devi, P. U. (2005) *Basics of carcinogenesis*. Health Administrator. Vol: XVII, No. 1, 16-24
12. Domínguez, M. (2005) *Actividad genotóxica del ácido 6-nonadecil salicílico aislado de la corteza de cuachalate y de su éster metílico evaluada en sangre periférica de ratones CD1 con la prueba de micronúcleos*. Tesis de Licenciatura QFB, FES Cuautitlán-UNAM.
13. Domínguez, M. (2008) *Efecto del éster feniletílico del ácido caféico (CAPE) sobre la proliferación y apoptosis en varias líneas celulares in vitro*. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. IPN.
14. Farré R. (2004) *El própolis y la salud*. Ars Pharmaceutica, 45:1; 21-43
15. Food and Drug Administration (FDA). (2013) *Mammalian erythrocyte micronucleus test*. [En línea] Disponible en:

<http://www.fda.gov/Food/GuidanceRegulation/GuidanceDocumentsRegulatoryInformation/IngredientsAdditivesGRASPackaging/ucm078338.htm>

16. Frenkel K, Wei H, Bhimani R, Ye J, Zadunaisky JA, Huang MT, Ferraro T, Conney AH, Grunberger D. (1993) *Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester*. *Cancer Res.* Mar 15;53(6):1255-61.
17. Garrett, M. (2001) *Cell cycle control and cancer*. *Current Science.* 81:515-522.
18. Gerónimo K. (2011) *Síntesis orgánica de compuestos derivados del éster fenilético del ácido caféico pertenecientes a la serie LQM700 con posible actividad biológica*. Tesis de licenciatura QI. FES Cuautitlán-UNAM.
19. Griffiths, A. (2005) *Introduction to genetic analysis*. New York, U.S.A.: Freeman and Company.
20. Grunberger D, Banerjee R, Eisinger K, Oltz EM, Efros L, Caldwell M, Estevez V, Nakanishi K. (1988) *Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis*. *Experientia.* Mar 15;44(3):230-2.
21. Hanahan D, Weinberg RA. (2000) *The hallmarks of cancer*. *Cell.* Jan 7;100(1):57-70. Review.
22. Hayashi M, Tice RR, MacGregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirsh-Volders M, Oleson FB Jr, Pacchierotti F, Romagna F, Shimada H, et al. (1994) *In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay*. *Mutat Res.* 1994 Jun;312(3):293-304. Review.
23. Hernández, C. (2012) *Evaluación del efecto genotóxico y citotóxico del compuesto coordinado de cobre LQM 402 mediante el ensayo de micronúcleos in vivo*. Tesis de licenciatura QFB, FES Cuautitlán-UNAM.
24. Hernandez J, Goycoolea FM, Quintero J, Acosta A, Castañeda M, Dominguez Z, Robles R, Vazquez-Moreno L, Velazquez EF, Astiazaran H, Lugo E, Velazquez C. (2007) *Sonoran propolis: chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines*. *Planta Med.* Nov;73(14):1469-74.
25. Hernández, M. (2013) *Evaluación del efecto antígenotóxico del compuesto LQM 731, análogo del éster fenilético del ácido caféico (CAPE), mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa)*. Tesis de Licenciatura QFB, FES-Cuautitlán-UNAM.
26. Huang MT, Ma W, Yen P, Xie JG, Han J, Frenkel K, Grunberger D, Conney AH. (1996) *Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells*. *Carcinogenesis.* Apr;17(4):761-5.
27. Instituto Nacional del Cáncer. EE.UU (2014) *¿Qué es el cáncer?* [En línea] Disponible en: <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>
28. Instituto Nacional de Estadística y Geografía [INEGI]. (2014) *ESTADÍSTICAS A PROPÓSITO DE... DÍA MUNDIAL CONTRA EL CÁNCER (4 DE FEBRERO)* [En línea] Disponible en: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/Contenidos/estadisticas/2014/cancer0.pdf>
29. Jung BI, Kim MS, Kim HA, Kim D, Yang J, Her S, Song YS. (2010) *Caffeic acid phenethyl ester, a component of beehive propolis, is a novel selective estrogen receptor modulator*. *Phytother Res.* Feb;24(2):295-300. doi: 10.1002/ptr.2966.

30. Krishna G, Hayashi M. (2000) *In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation*. Mutat Res. Nov 20;455(1-2):155-66.
31. Kufe DW, Pollock RE, Weichselbaum RR, et al., (2003) *Cancer Medicine*. Hamilton (ON): BC Decker.
32. Lee KW, Kang NJ, Kim JH, Lee KM, Lee DE, Hur HJ, Lee HJ. (2008) *Caffeic acid phenethyl ester inhibits invasion and expression of matrix metalloproteinase in SK-Hep1 human hepatocellular carcinoma cells by targeting nuclear factor kappa B*. Genes Nutr. Feb;2(4):319-22.
33. Lengauer, C. (1998) *Genetic instabilities in human cancers*. Nature. 17; 396 (6712):643-9
34. Lodish, H. (2005) *Biología celular y molecular*. Buenos Aires: Médica Panamericana. Pag. 930, 935-939, 943, 951.
35. Macías-Pérez JR, Beltrán-Ramírez O, Vásquez-Garzón VR, Salcido-Neyoy ME, Martínez-Soriano PA, Ruiz-Sánchez MB, Angeles E, Villa-Treviño S. (2013) *The effect of caffeic acid phenethyl ester analogues in a modified resistant hepatocyte model*. Anticancer Drugs. Apr;24(4):394-405.
36. Martínez, M. (2014) *Estudio anatomopatológico del efecto de LQM 731 (derivado de CAPE) en un modelo de lesiones preneoplásicas*. Tesis de licenciatura BQD, FES Cuautitlán-UNAM
37. Mejía, J. (2010). *Epidemiología de la leucemia linfoblástica aguda infantil*. Revista de Hematología, 11 (Supl.1), 35.
38. Mejía, J., Flores, H., Juárez, I., Vásquez, J., Games, J., Pérez, M. et.al. (2005). *Edad de aparición de los diferentes tumores malignos de la infancia*. Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social, 43 (1), 25-37.
39. Natarajan K, Singh S, Burke TR Jr, Grunberger D, Aggarwal BB. (1996) *Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa B*. Proc Natl Acad Sci U S A. Aug 20;93(17):9090-5.
40. Nussbaumer S, Bonnabry P, Veuthey JL, Fleury-Souverain S. (2011) *Analysis of anticancer drugs: a review*. Talanta. Oct 15;85(5):2265-89.
41. Oliveira PA, Colaço A, Chaves R, Guedes-Pinto H, De-La-Cruz P LF, Lopes C. (2007) *Chemical carcinogenesis*. An Acad Bras Cienc. Dec;79(4):593-616. Review.
42. Organización Mundial de la Salud (2014) *Cáncer*. [En línea] Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/>
43. Ouyang L, Shi Z, Zhao S, Wang FT, Zhou TT, Liu B, Bao JK. (2012) *Programmed cell death pathways in cancer: a review of apoptosis, autophagy and programmed necrosis*. Cell Prolif. 2012 Dec;45(6):487-98.
44. Paniagua, L. (2010) *Evaluación de la capacidad genotóxica del compuesto NA01 polifenólico derivado del CAPE mediante el ensayo de SCGE in vitro*. Tesis de licenciatura QFB, FES Cuautitlán-UNAM.
45. Park MT, Lee SJ. (2003) *Cell cycle and cancer*. J Biochem Mol Biol. Jan 31;36(1):60-5. Review.
46. Payne S., Miles D. (2008) *Mechanisms of anticancer drugs*. Atlas of Clinical Nuclear Medicine. Chapter 4.
47. Pierce, B. (2009) *Genética. Un enfoque conceptual*. Madrid: Médica Panamericana.

48. Rocha Y. (2008) *Estudio genotóxico mediante la prueba de micronúcleos del compuesto tiomorfilínico LQM 319*. Tesis de licenciatura QFB. FES Cuautitlán-UNAM.
49. Ruíz M. (2012) *Evaluación in vitro de la citotoxicidad de compuestos derivados del Éster Feniletílico del Ácido Caféico (CAPE), en diferentes líneas celulares de cáncer*. Tesis de licenciatura QI. FES Cuautitlán-UNAM.
50. Saiz M., Lobo C., Serrano J. (2001) *Conferencia Actividad Antitumoral del Propóleo*. Natura Medicatrix. No. 56-57.
51. Saravana, J. (2009) *Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review*. Journal of Biomedicine and Biotechnology.
52. Schmid W. (1975) *The micronucleus test*. Mutat Res. Feb;31(1):9-15.
53. Secretaría de Salud [SSA], Subsecretaría de Prevención y Promoción de la Salud [SPPS]. (2013). *Los 5 tipos de cáncer que más afectan a mexicanos*. [En línea] Disponible en: <http://www.spps.salud.gob.mx/noticias/1445-5-tipos-cancer-mas-afectan-mexicanos.html>
54. Su ZZ, Lin J, Grunberger D, Fisher PB. (1994) *Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression*. Cancer Res. Apr 1;54(7):1865-70.
55. Sulaiman GM. (2012) *Role of caffeic acid phenethyl ester on mitomycin C induced clastogenesis: analysis of chromosome aberrations, micronucleus, mitotic index and adenosine deaminase activity in vivo*. J Appl Genet. May;53(2):213-9.
56. Velázquez, L. (2008). *Farmacología básica y clínica*. Buenos Aires: Médica Panamericana. Pp. 973-975, 978, 981-983, 985.
57. Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. (2003) *The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer*. Cell Prolif. Jun;36(3):131-49. Review.
58. Wang, X. et. al. (2010) *Structure-activity relationships in the cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and fluorinated derivatives: Effects on heme oxygenase-1 induction and antioxidant activities*. European Journal of Pharmacology. 635. Pp. 16-22.
59. Watanabe MA, Amarante MK, Conti BJ, Sforcin JM. (2011) *Cytotoxic constituents of propolis inducing anticancer effects: a review*. J Pharm Pharmacol. Nov;63(11):1378-86.
60. Yang J, Marriner GA, Wang X, Bowman PD, Kerwin SM, Stavchansky S. (2010) *Synthesis of a series of caffeic acid phenethyl amide (CAPA) fluorinated derivatives: comparison of cytoprotective effects to caffeic acid phenethyl ester (CAPE)*. Bioorg Med Chem. Jul 15;18(14):5032-8.
61. Yang J, Kerwin SM, Bowman PD, Stavchansky S. (2011) *Stability of caffeic acid phenethyl amide (CAPA) in rat plasma*. Biomed Chromatogr. May;26(5):594-8.
62. Zalacain M, Sierrasesúmaga L, Patiño A. (2005) *The cytogenetic assay as a measure of genetic instability induced by genotoxic agents*. An Sist Sanit Navar. May-Aug;28(2):227-36.