



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

**Estudio de la toxicidad hepática y renal de los  
compuestos capa serie LQM 700'S  
(731, 738 y 755) por evaluación de cortes  
histológicos en ratones CD 1 administrados por  
seis semanas**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
LICENCIADO EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA**

**PASCUAL MARIO ALEJANDRO DOMÍNGUEZ PÉREZ**

**ASESORA: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO**

**COASESOR: DR. GERMAN ISAURO GARRIDO FARIÑA**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2020



Universidad Nacional  
Autónoma de México



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA GENERAL  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

CUAUTITLÁN

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DEPARTAMENTO DE:

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

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTAZAR FIGUEROA  
Jefa 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 de la toxicidad hepática y renal de los compuestos capa serie LQM 700'S (731,738 y 755) por evaluación de cortes histológicos en ratones CD 1 administrados por seis semanas.

Que presenta el pasante: Pascual Mario Alejandro Domínguez Pérez

Con número de cuenta: 306211070 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 08 de Octubre de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Q.F.B. Amparo Ramos Aguilar	
SECRETARIO	M. en C. Judith García Arellanes	
1er. SUPLENTE	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. María Liasbeth Hernández Calderón	

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

LMCF/javg

El presente trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto PAPPIT IT202512 titulado: "Estudio antígenotóxico, 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 se llevó a cabo 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 y en el laboratorio de apoyo a Histología y Biología de la FES-Cuautitlán bajo la dirección del Dr. German Isauro Garrido Fariña 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.

## DEDICATORIA

A mi padre **Pascual Domínguez Morales**, a mi madre **Martha Pérez Núñez** y a mi hermano **Miguel Ángel Domínguez Pérez** con mucho amor y cariño les dedico todo mi esfuerzo y trabajo puesto para la realización de esta tesis.

## **AGRADECIMIENTOS**

### **A MIS PROFESORES:**

Por el tiempo y esfuerzo que dedicaron a compartir sus conocimientos, sin su instrucción profesional no habría llegado hasta aquí, en especial a la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo por la confianza y paciencia que siempre me brindó y al Dr. German Isauro Garrido Fariña por las lecciones y ayuda en este trabajo, sé que sencillo no ha sido el proceso, pero gracias a su apoyo y dedicación, he logrado culminar el desarrollo de mi tesis con éxito.

### **A MIS PADRES:**

Gracias a mis padres por ser los principales promotores de mis sueños, gracias a mi padre por siempre desear y anhelar lo mejor para mí, gracias por cada consejo y por cada una de sus palabras que me guiaron en mi vida, gracias a mi madre por cada día confiar y creer en mí y en mis expectativas, gracias porque sin importar la situación siempre tienes una sonrisa que ofrecerme, sus esfuerzos son impresionantes y su amor es para mí invaluable.

### **A MÍ ABUELITA:**

Por ser cómo mi segunda madre, gracias por ser luz en el camino, alegría en mi vida y transmitirnos tanto amor, gracias porque siempre fuiste muy motivadora y esperanzadora, a ti que siempre me decías que lo lograría, mil gracias porque me ayudaste hasta donde te fue posible, incluso más que eso, siempre te llevaré en mi corazón.

Los planes mejor trazados de los ratones y de las personas, a menudo se tuercen  
ROBERT BURNS, 1759-1796

## ÍNDICE

TABLA DE ABREVIATURAS.....	III
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IV
INDICE DE TABLAS .....	VI
RESUMEN .....	1
MARCO TEÓRICO .....	3
1. Propóleo .....	3
1.1 Ácido Cafeico y sus Derivados Tipo Éster.....	4
1.2 Éster feniletílico del ácido cafeico (CAPE) .....	7
1.3 Análogos amídicos del ácido cafeico (CAPA) .....	8
2. Estudios realizados a partir de los compuestos CAPA .....	10
3. Cáncer y su relación con los compuestos CAPA .....	13
3.1 Cáncer.....	13
3.2 Epidemiología.....	14
3.3 Quimioterapia .....	16
3.4 Quimio-Prevención.....	17
4. Estudio toxicológico .....	18
4.1 Estudio subcrónico.....	20



4.2 Niveles de respuesta .....	21
5. Histología .....	22
5.1 Célula cómo unidad funcional básica.....	22
5.2 Tejidos cómo organizaciones funcionales de células.....	23
5.3 Relación anatomía e histología.....	24
5.4 Técnica histológica.....	24
5.5 Tinción Hematoxilina - Eosina (HE) .....	26
6. Anatomía e histología de los órganos de estudios .....	27
6.1 Hígado.....	27
6.2 Riñón .....	30
JUSTIFICACIÓN .....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	36
DISCUSIÓN.....	61
CONCLUSIONES.....	69
PROSPECTIVAS .....	70
REFERENCIAS .....	71

## TABLA DE ABREVIATURAS

---

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
CAPA	Amida fenilética del ácido cafeico (capa)
CAPE	Ester fenilético del ácido cafeico
CV	Cervicouterino
DL50	Dosis letal media
DMSO	Dimetil sulfóxido
EPC	Eritrocito policromático
HE	Hematoxilina y Eosina
kg	Kilogramo
LOAEL	Nivel mínimo de efecto adverso observable
LOEL	Nivel mínimo de efecto observable
LQM	Laboratorio de Química Medicinal
mg	Miligramo
MMC	Mitomicina C
NOAEL	Nivel de efecto adverso no observable
NOEL	Nivel de efecto no observable
PMN	Polimorfonucleares

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructura del CAPE	4
Figura 2. Estructura del ácido cafeico	4
<i>Figura 3. Principales ésteres del ácido cafeico</i>	6
Figura 4. Reacción de síntesis de amidas a partir de derivados del ácido cinámico	9
Figura 5. Dosis umbral para los niveles de respuesta toxicológicos	22
Figura 6. Esquema de un proceso histológico general	25
Figura 7. Sección de un glomérulo en un riñón de mamífero obtenida a partir de una inclusión en parafina y teñido con HE. Los núcleos aparecen de color azul (hematoxilina) y el citoplasma de color rosado (eosina)	26
Figura 8. Histología del hígado, Especie: <i>Rattus norvegicus</i> , Técnica: HE en cortes de 8 micrómetros	30
Figura 9. Histología de riñón, Especie: <i>Rattus norvegicus</i> , Técnica: HE en cortes de 8 micrómetros	33
Figura 10. Caracterización del epitelio de transición de la pelvis del riñón a medida que se convierte en uréter	33
Figura 11. Pasos seguidos durante la preparación de laminillas, Tinción de HE	40
Figura 12. Congestión de vasos sanguíneos con diferentes calibres en hígado de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's	50
Figura 13. Congestión total en hígado de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's	50
Figura 14. Infiltración en diferentes áreas del hígado de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's	54

Figura 15. Infiltración total en hígado de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's 54

Figura 16. Comparación de la congestión observada en vasos sanguíneos de la corteza renal de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's 57

Figura 17. Comparación de la infiltración observada en la corteza perivascular renal de ratón inducido por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's 59

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Incidencia de cáncer en adultos en Estados Unidos, España y México	15
Tabla 2. Distribución de lotes de trabajo	37
Tabla 3. Evaluación de lesiones renales	41
Tabla 4. Evaluación de lesiones hepáticas	42
Tabla 5. Observaciones en el lote de ratones al que se administró LQM 731 y dos ratones control	45
Tabla 6. Observaciones en el lote de ratones al que se administró LQM 738 y dos ratones control	46
Tabla 7. Observaciones en el lote de ratones al que se administró LQM 755 y dos ratones control	46
Tabla 8. Observaciones en el último lote dispuesto con dos ratones control extras	47
Tabla 9. Número de decesos y órganos obtenidos por lote que se tuvo durante el tratamiento subcrónico de 6 semanas	47
Tabla 10. Disposición de los órganos en las laminillas	48
Tabla 11. Evaluación de histopatología hepática (congestión)	49
Tabla 12. Prueba de hipótesis con desviación estándar conocida (de 2 colas) para descartar diferencias significativas entre la congestión total en hígado de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's y el control	51
Tabla 13. Prueba de chi cuadrada de homogeneidad, comparación de frecuencias obtenidas de la "Evaluación de histopatología hepática, tabla 11" para descartar si el daño causado en hígado (congestión) depende del compuesto o no, debido a que no el 100 % de hígados presenta congestión	52

Tabla 14. Evaluación de histopatología hepática (infiltración)	53
Tabla 15. Prueba de hipótesis con desviación estándar conocida (de 2 colas) para descartar diferencias significativas entre el número de filtraciones total en hígado de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's y el control	55
Tabla 16. Prueba de Chi cuadrada de homogeneidad, comparación de frecuencias obtenidas de la "Evaluación de histopatología hepática, Tabla 14" para descartar si el daño causado en hígado (infiltración) depende del compuesto o no, debido a que no el 100 % de hígados presenta infiltración	56
Tabla 17. Evaluación de histopatología renal (congestión)	57
Tabla 18. Prueba de hipótesis con desviación estándar conocida (de 2 colas) para descartar diferencias significativas entre la congestión de vasos sanguíneos de la corteza renal de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's y el control	58
Tabla 19. Evaluación de histopatología renal (infiltración)	59
Tabla 20. Prueba de hipótesis con desviación estándar conocida (de 2 colas) para descartar diferencias significativas entre la infiltración en corteza perivascular en riñón de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's y el control	60

## RESUMEN

En el Laboratorio de Química Medicinal se han desarrollado los compuestos denominados CAPA los cuales son compuestos análogos del CAPE compuestos que en cuyas modificaciones se busca mejorar las propiedades biológicas que este posee, específicamente las Antigenotóxica y quimio-protectoras.

Los compuestos de la serie LQM 700's que se trabajaron en esta tesis pertenecen a los compuestos CAPA, con los cuales se realizó un estudio de toxicidad subcrónica para evaluar los daños que pudieran provocar los compuestos LQM 755, 733 Y 731 a través de la evaluación histológica de células no tumorales en hígado y riñón de ratones CD 1 cómo parte de la batería de pruebas preclínicas que deben realizarse para poder perfilarlos como fármacos inocuos para la salud. El objetivo de elegir hígado y riñón es debido a que el hígado es el órgano más importante con respecto a la actividad metabólica y es un órgano glandular con función desintoxicante por lo que es responsable de eliminar de la sangre las sustancias que puedan resultar nocivas para el organismo, convirtiéndolas en inocuas (Molist G y Pombal D, 2013a). El riñón es un órgano excretor de los desechos del metabolismo mediante la orina, por lo que evaluar estos órganos nos permite seguir de cerca el curso metabólico de estos compuestos en el organismo del ratón (Molist G y Pombal D, 2013b). La dosis única que se utilizó en el tratamiento subcrónico fue designada con base en los resultados obtenidos en otros ensayos, ya que a la dosis de 20 mg/kg de peso no se obtuvo efecto genotóxico significativo en células sanas y se obtuvo el mejor efecto antigenotóxico en células afectadas con MMC en una administración aguda (Hernández M, 2013), además de que en el ensayo de

micronúcleos con una dosis de 15 mg/kg ningún compuesto presento actividad citotóxica en leucocitos (Gutiérrez S, 2015), por lo que al ser un estudio de seis semanas se mantuvo la dosis de 15 mg/kg pensando así en no causar un daño subtóxico en las células sanas. Con los resultados de este estudio a través de la evaluación histológica se determinó que los tres compuestos inducen lesiones en hígado y riñón, y que se es posible postular a los compuestos con una actividad citotóxica.



## MARCO TEÓRICO

### 1. Propóleo

El propóleo es una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena. Ha sido ampliamente utilizado desde la antigüedad con diversas finalidades, actualmente se investigan las acciones, efectos y posibles usos del propóleo en biología y medicina, destacando como suplemento dietético y aplicado en la industria farmacéutica. Uno de los componentes del propóleo más estudiados en los últimos 20 años es el éster fenilético del ácido cafeico (CAPE) (Figura 1), compuesto fenólico que posee un amplio espectro de actividades biológicas. Algunas de las actividades biológicas descritas para este compuesto son las siguientes (Beltrán R. et al, 2011):

- Efecto antiviral, antibacteriano, antifúngico y antiprotzoario
- Antiinflamatorio y analgésico
- Inmunoestimulante
- Tóxico para célula cancerosa e inocua para células no cancerosas. (Actividad anti proliferativa en una gran variedad de líneas celulares cancerígenas) (Hernández J. et al, 2007)
- Antioxidante
- Suprime la producción de eicosanoides (COX-2)
- Induce apoptosis en células transformadas e inhibe la síntesis de DNA
- Regenera las uniones GAP entre células transformadas
- Disminuye la actividad enzimática de los citocromos P450 (CYP)

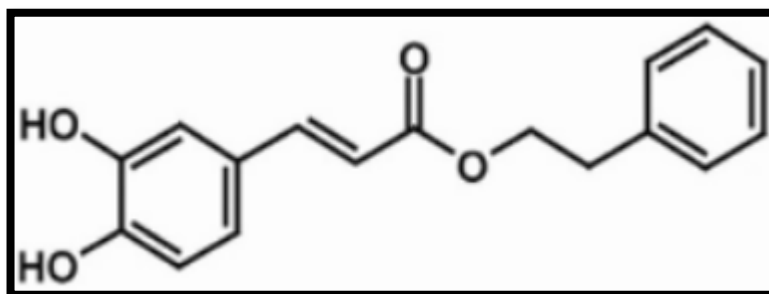


Figura 1. Estructura del CAPE (Beltrán R. et al, 2011)

### 1.1 Ácido Cafeico y sus Derivados Tipo Éster

El ácido cafeico es un compuesto orgánico que es clasificado como un ácido hidroxicinámico. Este sólido amarillo contiene grupos funcionales fenólico y acrílico (el nombre dado por la IUPAC para el grupo acrílico es prop-2-enoyl). Se encuentra en todas las plantas debido a que es un intermediario clave en la biosíntesis de la lignina, una de las principales formas de biomasa y de interés en la estructura base del CAPE (Boerjan W. et al, 2003).

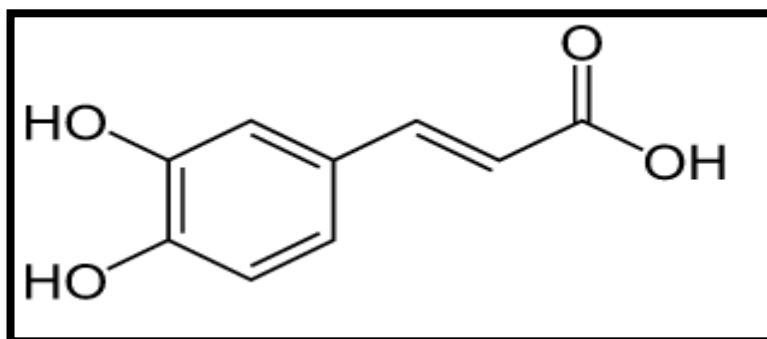


Figura 2. Estructura del ácido cafeico (Pubchem, 2015a)

El ácido cafeico tiene una variedad de efectos farmacológicos potenciales en estudios *in vitro* y en modelos animales, pero no han sido demostrados efectos clínicos en humanos. En el estudio realizado por Bruce C y Jong H el ácido cafeico superó a otros antioxidantes, reduciendo la producción de aflatoxinas en más del 95 %. Estos estudios son los primeros

en mostrar que el estrés oxidativo que de otra manera habría provocado un aumento en la producción de aflatoxinas del *Aspergillus flavus*, puede ser obstaculizado por el ácido cafeico. Esto abre la puerta para utilizar métodos fungicidas naturales mediante la suplementación de árboles con antioxidantes lo que pone en manifiesto su actividad como un compuesto con actividad anticitotóxica (Bruce C y Jong H, 2006). En otros estudios ha demostrado ser un antioxidante *in vitro* y también *in vivo* el cual muestra actividad inmunomoduladora y antiinflamatoria (Boerjan W. et al, 2003).

Estudios de la carcinogenicidad del ácido cafeico tienen resultados mixtos. Algunos estudios han mostrado que inhibe la carcinogénesis, y otros experimentos muestran efectos carcinogénicos. La administración oral de altas dosis de ácido cafeico en ratas ha causado papilomas estomacales. En el mismo estudio, altas dosis de antioxidantes combinados, incluyendo al ácido cafeico, mostraron una disminución significativa en el crecimiento de tumores del colon en esas mismas ratas. Ningún efecto significativo fue notado aparte de eso (Hirose M. et al, 1998). El ácido cafeico está listado en algunas hojas de datos de riesgo como carcinógenos potenciales, tal como ha sido listado por la Agencia Internacional de Investigación del Cáncer (IARC) como carcinógeno del Grupo 2B, "posiblemente carcinógeno para los humanos" (IARC, 2015). Datos más recientes muestran que las bacterias en los intestinos de ratas pueden alterar la formación de metabolitos del ácido cafeico (Peppercorn M y Goldman P, 2003; Gonthier M. et al, 2003). No ha habido efectos nocivos conocidos del ácido cafeico en humanos.

El ácido cafeico es el ácido hidroxicinámico de mayor distribución en la naturaleza, se encuentra principalmente en forma esterificada, aunque se ha encontrado libremente en plantas como *Zea mays*, *Vaccinium bracteatum*, *Canavalia ensiformes* y en el peridermo

de la raíz de *Ipomea batatas*. El ácido cafeico se conjuga con el ácido quínico para formar mono-, di-, tri- y tetra-ésteres. Dentro de las variantes del ácido cafeico tenemos, el ácido 5-O-cafeoilquínico o ácido clorogénico (Figura 3), es el éster de ácido quínico y ácido cafeico más conocido, el principal compuesto hidroxicinámico en la dieta humana y el compuesto fenólico más abundante en el café, el ácido rosmarínico es un éster de ácido cafeico con el ácido 3,4-dihidroxifenil láctico (Figura 3) y es el principal compuesto fenólico encontrado en plantas de la familia *Lamiaceae* como *Rosmarinus officinalis*, *Origanum* spp. y *Prunella vulgaris* y finalmente la variante éster feniletílico del ácido cafeico (CAPE) (Figura 3) es el compuesto bioactivo más importante aislado del propóleo (Martínez M, 2013).

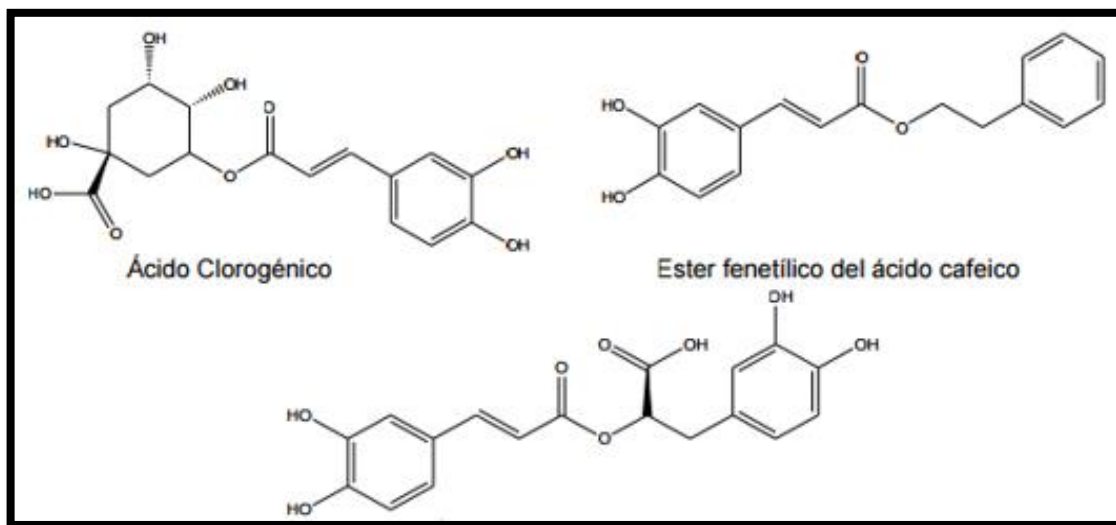


Figura 3. Principales ésteres del ácido cafeico (Martínez M, 2013)

## 1.2 Éster fenilético del ácido cafeico (CAPE)

La capacidad antioxidante del ácido cafeico y sus derivados tipo éster es el principal objetivo en el que se centran la mayoría de las investigaciones sobre estos compuestos. Esta propiedad ya ha sido ampliamente demostrada por varios grupos de investigación que se han valido de una amplia gama de técnicas para tal efecto, entre las que destacan, el ensayo de la actividad atrapadora de radicales libres DPPH (2,2- difenil-1-picrilhidrazilo) o ABTS (ácido 2,2-azino-bis-[3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico]) o el ensayo de capacidad antioxidante mediante la reducción del ion férrico (FRAP). (Roleira F. et al, 2010; Menezes J. et al, 2011; Garrido J. et al, 2012; Lv J. et al, 2013). Estas investigaciones demuestran que la actividad antioxidante del ácido cafeico y sus ésteres es mayor que la de compuestos antioxidantes comerciales sintéticos como el butilhidroxitolueno (BHT) o el Trolox, así como de derivados de otros ácidos hidroxicinámicos (Chen J y Chi-Tang Ho, 1997; Amorati R. et al, 2006), además, estos estudios sugieren que la mayor capacidad antioxidante de los derivados de ácido cafeico con respecto a sus análogos hidroxicinámicos se debe a la presencia de más grupos hidroxilo de tipo fenólico en su estructura, ya que esta propiedad se incrementa al aumentar el número de estos. En un estudio realizado por Chen y Ho, con varios derivados naturales de ácido cafeico y antioxidantes comerciales, se demostró que el ácido rosmarínico presenta una mayor capacidad antioxidante *in vitro* respecto a la mayoría de las moléculas de estudio, y esto se atribuye a la presencia de cuatro hidroxilos fenólicos en su estructura que le confiere una mayor capacidad antioxidante (Chen J y Chi-Tang Ho, 1997).

Otras investigaciones se han encaminado a relacionar la capacidad antioxidante de estas moléculas con la prevención de daños por enfermedades donde el proceso oxidativo es muy marcado. Altuğ y colaboradores, realizaron un estudio en el que proponen que el efecto protector del CAPE en la isquemia cerebral inducida en conejos, se debe principalmente a la acción antioxidante de este compuesto (Altuğ M.E. et al, 2008). Sato y colaboradores, también relacionaron el efecto protector del ácido cafeico y el ácido clorogénico en el daño por isquemia en ratas con la capacidad antioxidante de estas moléculas (Sato Y. et al 2011).

Se ha demostrado que puede inhibir el proceso de la hepatocarcinogénesis química con tres dosis en la etapa de promoción, lo cual resulta en una disminución de las lesiones preneoplásicas en ratas. Este compuesto quimio-protector es un excelente candidato para administrarlo en personas de alto riesgo de desarrollar cáncer lo que da pauta a que estudios posteriores determinen si es posible su uso en los seres humanos, ya sea para inhibir, prevenir o revertir la carcinogénesis (Beltrán R. et al, 2011).

### **1.3 Análogos amídicos del ácido cafeico (CAPA)**

Los análogos del CAPE están ampliamente distribuidos en plantas, como en el café, oliva, propóleo y algunas frutas pero un impedimento para el uso de CAPE extraído de productos naturales como el propóleo es los bajos rendimientos que se obtienen, pues esta molécula se encuentra de 2 - 5 % en estos productos; de forma similar por síntesis química el proceso sintético y los métodos de purificación requieren un largo procedimiento obteniendo del 35 % al 50 % que resultan en un elevado costo de producción. Sin embargo, se han sintetizado moléculas con estructuras similares al CAPE

estas han sido estudiadas observándose que conservan la actividad biológica, además que resultan menos caras y de una obtención más rápida (Macías P. et al, 2013).

Existen reportados 85 compuestos considerados bioactivos y un aproximado de 89 patentes de compuestos relacionados (Pubchem, 2015b). Por lo anterior el grupo de química medicinal en la FESC encabezados por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano tomó la decisión de sintetizar una amplia gama de derivados Amídicos de CAPE nombrados CAPA (análogos amídicos del ácido cafeico) como lo son la serie LQM 700 que contiene al menos 30 compuestos (Hernández M, 2013), 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 tres derivados del ácido cinámico (LQM 711, 713 y 747)(Figura 4). 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 (Gutiérrez S, 2015).

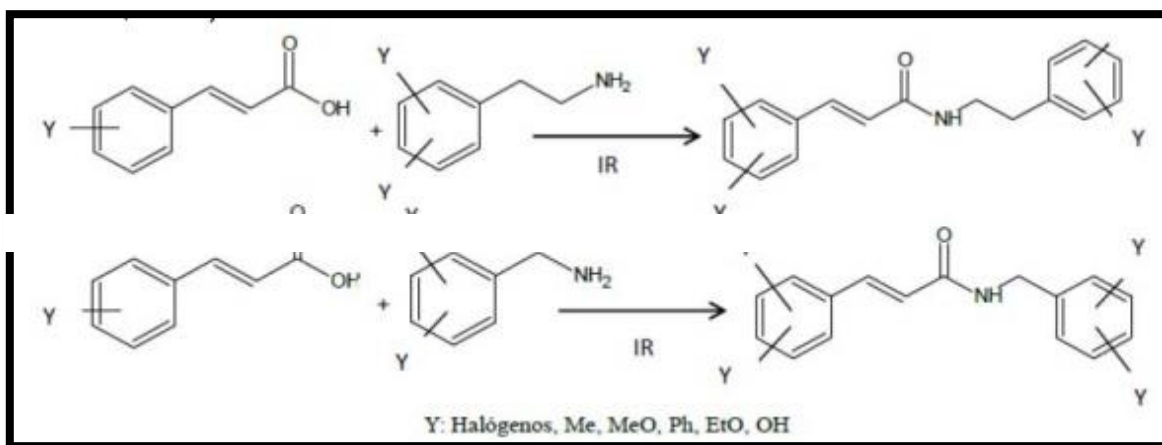


Figura 4. Reacción de síntesis de amidas a partir de derivados del ácido cinámico (Gutiérrez S, 2015)

## 2. Estudios realizados a partir de los compuestos CAPA

Los compuestos CAPA se han evaluado con el ensayo cometa para el estudio de genotoxicidad en linfocitos humanos (Paniagua L, 2010) presentaron los efectos quimio-protectores de otras dos moléculas derivadas del CAPE de la serie LQM 717 y 706, en el modelo modificado del hepatocito resistente en ratón. Ambos compuestos ejercieron efectos protectores en la peroxidación de lípidos, necrosis, proliferación celular, activación de la subunidad P56 de NF –  $\kappa\beta$  y en lesiones preneoplásicas (Macías P. et al, 2013).

En 2012 se evaluó la actividad citotóxica de 30 compuestos de la serie LQM 700 a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  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 CV (Ruiz M, 2012).

Se seleccionaron los tres compuestos más citotóxicos para las líneas celulares neoplásicas y fueron evaluados nuevamente a diferentes concentraciones (sin tomar en cuenta la concentración de 100  $\mu\text{M}$  en las mismas líneas celulares, con los mismos métodos, con los datos obtenidos del porcentaje de viabilidad, se calculó el valor de la concentración inhibitoria al 50 % (IC 50). Los compuestos que obtuvieron la mejor IC50 por ambas técnicas fueron los LQM 738 y 755. Los compuestos que no presentaron toxicidad a las células mononucleares de sangre periférica (linfocitos) por la técnica MTT fueron el LQM 755 y el 738. Para el ensayo de CV el LQM 731 seguido del 738 fueron los compuestos que presentaron menor actividad citotóxica (Ruiz M, 2012), debido a



estos resultados, se han realizado más pruebas con los compuestos LQM 731, 738 y 755 para poder perfilarlos como fármacos quimio-protectores.

En 2013 en el trabajo evaluación del efecto antigenotóxico del compuesto LQM 731 mediante ensayo cometa se reportó una viabilidad celular arriba de 90 % a dos distintas dosis del compuesto LQM 731 (20 y 40 mg/kg de peso), se observó que el porcentaje de viabilidad celular a la dosis de 20 mg/kg tiende a disminuir en riñón en un 92 % sin llegar a ser un cambio significativo con respecto al hígado que exhibe 95 %, demostrando que ambas dosis causan un daño mínimo al DNA si el compuesto es administrado solo. Cuando el LQM 731 se administró luego de tres horas el daño es mínimo a la dosis de 20 mg/kg; sin embargo, a la dosis de 40 mg/kg se encontró un daño mayor solo hasta 18 horas después el tratamiento. Por lo que se demostró su actividad antigenotóxica al disminuir el daño al DNA inducido por MMC en células del hígado y de riñón con ambas dosis, pero en un porcentaje mayor con la dosis de 20 mg/kg de peso (Hernández M, 2013).

La acción anticancerígena del compuesto LQM 731 se evaluó en un modelo de lesiones preneoplásicas en ratón 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 quimio-protector 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 R, 2014).

La evaluación de la capacidad genotóxica y antigenotóxica 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 genotoxicidad significativa tanto en hígado como en riñón, además de poseer actividad antigenotóxica al reducir el daño a ADN provocado por MMC hasta en un 88.42 % en células hepáticas en un 57.6 % en células renales a la misma dosis (Cruz L, 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 quimio-protector (Aguilar R, 2014).

En otro ensayo, se evaluó la actividad genotóxica y citotóxica el cual fue realizado a través de la prueba de micronúcleos en ratones CD1 con una dosis de 15 mg/kg de peso de LQM 731, 738 y 755, en el cual se midió su potencial genotóxico y citotóxico en un tiempo de respuesta agudo y subcrónico; donde se concluyó que ninguno de los tres compuestos presenta actividad citotóxica en PMN de ratón y que la actividad genotóxica presentada por los tres compuestos es menor a la que provoca un agente clastógeno como la MMC, siendo el LQM 731 el que presentó mayor actividad genotóxica durante las seis semana de administración, el compuesto LQM 738 fue el que menos actividad genotóxica presentó de los tres compuestos y el compuesto LQM 755 solo mostró actividad genotóxica en el periodo subcrónico de administración después de la tercer semana, esto resulta sumamente importante porque pone de manifiesto que los compuestos son sustancias de muy bajo potencial genotóxico y citotóxico (Gutiérrez S, 2015).

Con los estudios mencionados, se despierta el interés de realizar otros ensayos que caractericen mejor su actividad quimio-protectora, así como de evaluar parámetros de toxicidad en un tiempo de respuesta subcrónico de exposición en modelos animales de

experimentación *in vivo*, como la actividad genotóxica y citotóxica que pudieran inducir, ya que de esto dependerá el posible uso de los compuestos de la serie LQM 700's como anticancerígenos y quimio-protectores.

### **3. Cáncer y su relación con los compuestos CAPA**

#### **3.1 Cáncer**

El termino cáncer puede definirse como aquella situación patológica cuya principal característica es la proliferación celular incontrolada, en la que las células se encuentran comprometidas en sufrir la mitosis indefinidamente. Se han emitido teorías para explicar el mecanismo implicado en la pérdida de control de la proliferación. La teoría genética propone que las alteraciones adquiridas en el genoma celular, es decir las mutaciones somáticas, son las que dan origen al cáncer, mientras que la teoría epigenética sugiere que las alteraciones metabólicas pueden inducir la expresión de genes que originan cáncer. En los últimos años se ha aceptado que el cáncer es una enfermedad en la que mutaciones en el material genético hacen que se activen genes dominantes o se inactiven genes recesivos, que ejercen una función reguladora del ciclo celular (Muñoz A. et al, 2004).

La malignidad del cáncer es variable, según la agresividad de sus células y demás características biológicas de cada tipo tumoral. En general, el comportamiento de las células cancerosas se caracteriza por carecer del control reproductivo que requiere su función original, perdiendo sus características primitivas y adquiriendo otras que no les corresponden, como la capacidad de invadir de forma progresiva y por distintas vías órganos próximos, o incluso diseminándose a distancia (metástasis), con crecimiento y división más allá de los límites normales del órgano al que pertenecían primitivamente,

diseminándose por el organismo fundamentalmente a través del sistema linfático o el sistema circulatorio, y ocasionando el crecimiento de nuevos tumores en otras partes del cuerpo alejadas de la localización original (Camargo B. et al, 2004). Las anomalías genéticas encontradas en las células cancerosas pueden consistir en una mutación puntual, translocación, amplificación, deleción, y ganancia o pérdida de un cromosoma completo (Fernández P, 2008). Existen genes que son más susceptibles a sufrir mutaciones que desencadenen cáncer. Esos genes, cuando están en su estado normal, se llaman proto-oncogenes, y cuando están mutados se llaman oncogenes. Lo que esos genes codifican suelen ser receptores de factores de crecimiento, de manera que la mutación genética hace que los receptores producidos estén permanentemente activados, o bien codifican los factores de crecimiento en sí, y la mutación puede hacer que se produzcan factores de crecimiento en exceso y sin control (Hernández M y Hernández R, 1999).

### **3.2 Epidemiología**

El cáncer es la segunda causa de muerte, las muertes por cáncer están aumentando. Se estima que a lo largo del siglo XXI el cáncer será la principal causa de muerte en los países desarrollados. A pesar de esto, se ha producido un aumento en la supervivencia media de los pacientes diagnosticados de cáncer (Bray F. et al, 2012). La frecuencia relativa de cada tipo de cáncer varía según el sexo y la región geográfica, el cáncer de pulmón es el más frecuente en el mundo para el total de los dos sexos especialmente en los varones, mientras que en las mujeres es el de mama. En Estados Unidos, excluyendo el cáncer de piel, los más frecuentes en varones son el de pulmón, próstata y colorrectal, mientras que en mujeres el primero es el de pulmón, seguido por el cáncer de mama y el

colorrectal. En Europa, en varones, el cáncer de próstata es el más frecuente, seguido del cáncer de pulmón y el de colon y recto. En mujeres, el más frecuente es el cáncer de mama, seguido del colorrectal y el de pulmón (López A. et al, 2004), mientras que en México el cáncer de próstata es el más frecuente en hombres y el de mama en mujeres (Aldaco F. et al, 2012).

Para conocer los casos nuevos de cáncer que se diagnostican en una población a lo largo de un periodo de tiempo, se utilizan los denominados registros poblacionales de cáncer, los cuales se ocupan de recoger de una forma sistemática, continuada y estandarizada la información necesaria para obtener datos de incidencia de cáncer y estudiar su distribución por edad, sexo, características tumorales, así como su evolución a lo largo del tiempo (Tabla 1) (López A. et al, 2004; Massagué J, 2008).

**Tabla 1. Incidencia de cáncer en adultos en Estados Unidos, España y México**

Datos que corresponden a Estados Unidos (American cancer society), España (Centro nacional de epidemiología) y México (Gaceta mexicana de oncología)

	<b>Estados Unidos</b>	<b>España</b>	<b>México</b>
<b>Hombre</b>	pulmón (31%) próstata (10%) colorrectal (8%) páncreas(6%)	pulmón (28%) colorrectal (12%) próstata (8%) páncreas(6%)	Próstata (15%) pulmón (12%) estómago (8%) hígado (7%)
<b>Mujeres</b>	pulmón (26%) mama (15%) colorrectal (9%) páncreas (6%)	mama (19%) colorrectal (15%) pulmón (8%) páncreas (6%)	mama (13%) cv (10%) hígado (7%) estómago (7%)

Las cifras entre paréntesis representan el porcentaje total de muertes por ese tipo concreto de cáncer (Massagué J, 2008 y Aldaco F. et al, 2012)

No se debe pensar en el cáncer como una enfermedad de causa única, sino más bien como el resultado final de una interacción de múltiples factores de riesgo. La gran mayoría de los cánceres, aproximadamente el 90-95 % de los casos, tiene como causa factores ambientales, el 5-10 % restante se debe a factores genéticos (Anand P. et al, 2008).

"Factores ambientales" se refiere no sólo a la contaminación, sino a cualquier causa que no se hereda genéticamente, como el estilo de vida, los factores económicos y de comportamiento (Anand P. et al, 2008). Alrededor de un tercio de las muertes por cáncer se debe a los cinco principales riesgos conductuales y dietéticos: índice de masa corporal alto, baja ingesta de frutas y verduras, falta de actividad física, consumo de tabaco y consumo de alcohol. El consumo de tabaco es la causa de alrededor del 20 % de las muertes por cáncer. Ciertas infecciones virales (como la hepatitis B, la hepatitis C y el virus del papiloma humano) son responsables de hasta el 20 % de las muertes por cáncer en los países en vías de desarrollo (WHO, 2015).

### **3.3 Quimioterapia**

Consiste en la utilización de una serie de medicamentos que se llaman citostáticos, son sustancias que tienen la capacidad de inhibir la evolución de los tumores malignos restringiendo ciertos mecanismos bioquímicos específicos de la multiplicación de sus células dificultando el proceso de división (carcinogénesis). Estos medicamentos constituyen un grupo heterogéneo de diversas sustancias que se utilizan de forma preferente, aunque no exclusiva, en el tratamiento del cáncer. Algunas de las más empleadas son la ciclofosfamida, el 5-fluorouracilo y el metotrexato (Comisión de salud pública, 2003; Camargo B. et al, 2004).

### 3.4 Quimio-Prevención

El término de quimio-prevención 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 quimio-prevención se basa en la hipótesis de que la interrupción de los eventos biológicos involucrados en la carcinogénesis inhibirá este proceso y reducirá la incidencia de cáncer (Beltrán R. et al, 2006). Esta hipótesis provee un punto de partida para el diseño y evaluación de esquemas de quimio-prevención, incluyendo la selección de los agentes para inhibir el proceso biológico, los cuales pueden aplicarse en cualquiera de las tres etapas del proceso de carcinogénesis:

- **Iniciación.** Cuando las células reciben los primeros daños y se forman células iniciadas
- **Promoción.** Donde las células iniciadas sufren una expansión clonal, formando lesiones preneoplásicas
- **Progresión.** Donde se acumulan más alteraciones que llevan a las células a adquirir un fenotipo maligno

A los compuestos utilizados en la quimio-prevención se les denomina quimio-protectores y estos se han identificado en algunos fármacos de uso común como los antiinflamatorios no esteroideos y otros se han encontrado frecuentemente cuando se estudia el efecto de sustancias purificadas de extractos de productos naturales a los cuales la medicina ha atribuido propiedades terapéuticas, este es el caso del propóleo y de sus derivados CAPE y CAPA (Beltrán R. et al, 2011).

#### 4. Estudio toxicológico

En los animales se realizan diversos tipos de estudios toxicológicos, los cuales tienen como finalidad general identificar los tipos de efectos adversos en la salud causados por una sustancia química y la variedad de dosis sobre las cuales se producen los efectos (Biblioteca Virtual, 2015). El animal de experimentación constituye la unidad experimental en los estudios toxicológicos *in vivo*, y su empleo está regido por regulaciones con vistas a un adecuado uso, según los requerimientos del estudio y tomando en cuenta principios éticos. El empleo de animales de experimentación ha de estar respaldado por un protocolo de ensayo, que debe confeccionarse cumplimentando las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) no clínicas y los protocolos específicos del estudio (NOM-062-ZOO-1999 ,2001).

La selección de los diferentes ensayos toxicológicos a emplear, especies, tiempo y vía de exposición, así como de los niveles de dosis a emplear en los mismos, estarán en dependencia de las características propias de la sustancia a ensayar, así como de los objetivos de su posible uso en humanos (Gámez R y Más R, 2007). Estos ensayos pueden agruparse en cuatro categorías principales y cada una tiene usos específicos diferentes (Biblioteca Virtual, 2015).

- De corto plazo
- Subcrónicos
- Crónicos
- Especiales

Dado que el desarrollo de nuevos medicamentos impone la necesidad de evaluar su potencial tóxico en modelos experimentales. Esto es posible a través de la realización de



un conjunto de estudios toxicológicos en diferentes especies de animales que permiten identificar la toxicidad intrínseca, así como los órganos y tejidos diana de la toxicidad relacionada con el compuesto en evaluación. El tipo y diseño de estos estudios estará en dependencia de las características y destino final del producto, pero en la generalidad de los casos, el objetivo debe ser la demostración de las potencialidades tóxicas por administración única (toxicología aguda), administraciones repetidas (subcrónica y crónica) y estudios especiales de genotoxicidad, toxicología de la reproducción y la fertilidad, llegando incluso en muchos casos a ser necesario la evaluación de su potencial carcinogénico. Esta evaluación constituye un aspecto esencial de la valoración de la razón riesgo/beneficio que la entidad reguladora de medicamentos tiene en cuenta antes de autorizar el desarrollo de estudios clínicos en humanos, y posteriormente para la aprobación de su uso en el mercado, en función de la indicación propuesta. En general, solo la interpretación de los resultados de los estudios realizados integrados armónicamente, permite llegar a conclusiones más generales sobre el potencial tóxico de la sustancia evaluada (Gámez R y Más R, 2007). Por lo que una evaluación toxicológica completa significa que la toxicidad del compuesto debe ser probada mediante diversos ensayos: unos cortos, para detectar la toxicidad general y aguda 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. El compuesto se administra en varias tomas de forma regular, o bien de manera irregular con la alimentación. Permittiéndonos poner de manifiesto posibles acumulaciones del agente tóxico, como así daños a los tejidos expuestos mediante la observación histológica (Bello J, 2001).

#### **4.1 Estudio subcrónico**

Los estudios toxicológicos subcrónicos de las sustancias permiten evaluar el potencial toxicológico y obtener información sobre la toxicidad acumulativa de una sustancia en los órganos diana, así como la tolerancia fisiológica y metabólica de un compuesto a la exposición prolongada a dosis bajas (Tillan C. et al, 2008), generalmente implican la dosificación diaria o intermitente durante varios días, semanas o meses. Este tipo de pruebas puede ayudar a identificar los órganos o tejidos diana que, de manera específica, sufren efectos perjudiciales por la exposición a una sustancia particular. También ofrecen una oportunidad para observar cómo afecta a la respuesta tóxica el periodo de exposición. Para los agentes no carcinogénicos, los estudios subcrónicos suelen ser suficientes para precisar el valor umbral, dosis bajo la cual no se observan efectos adversos significativos en la salud (Biblioteca Virtual, 2015).

Por lo que la toxicidad subcrónica, se define como los efectos adversos por toxicidad acumulativa de la sustancia administrada o sus metabolitos, los cuales ocurren por la administración del agente durante un período de tiempo que representa de 1 mes a 1 año de la vida del participante (Bello J, 2001) .Esto propicia la detección de los efectos aditivos debido a la administración del producto, y permite definir la máxima dosis con la que no se aprecia toxicidad relacionada con la droga (NOEL), así como la dosis máxima tolerada (DMT). El estudio subcrónico no es capaz de detectar aquellos efectos que se manifiestan tras un mayor período de latencia, sin embargo, brinda una valiosa información sobre los órganos dianas, y constituye la base para la selección de las dosis a evaluar en los estudios crónicos (Gámez R y Más R, 2007).

## 4.2 Niveles de respuesta

Los estudios toxicológicos en animales y otros experimentos controlados procuran establecer diversas dosis críticas de sustancias. Para los no carcinógenos, esta dosis incluye las siguientes:

- Valor umbral: la dosis mínimamente efectiva de cualquier producto químico que provoca una respuesta
- DL50: dosis letal media
- NOEL: nivel de efecto no observable
- NOAEL: nivel de efecto adverso no observable
- LOEL: nivel mínimo de efecto observable
- LOAEL: nivel mínimo de efecto adverso observable

La dosis crítica comúnmente usada para los principios activos es el valor umbral, un punto teórico por encima del cual se observan efectos mientras que por debajo no los hay. Comúnmente se considera al umbral como el valor intermedio entre el NOEL y el LOEL. A veces, para ahorrar tiempo y por precaución, se usa el NOEL como una aproximación conservadora al umbral para determinar los niveles seguros de exposición (Biblioteca Virtual, 2015).

El valor umbral es el punto de concentración por encima del cual se observan efectos y por debajo del cual no se advierte efecto alguno; el valor umbral a menudo se calcula como el valor intermedio entre el NOEL y el LOEL y en el caso de esta investigación se utilizó un valor por debajo del LOEL debido a no tener valores de NOEL establecidos (Figura 5) (Biblioteca Virtual, 2015).

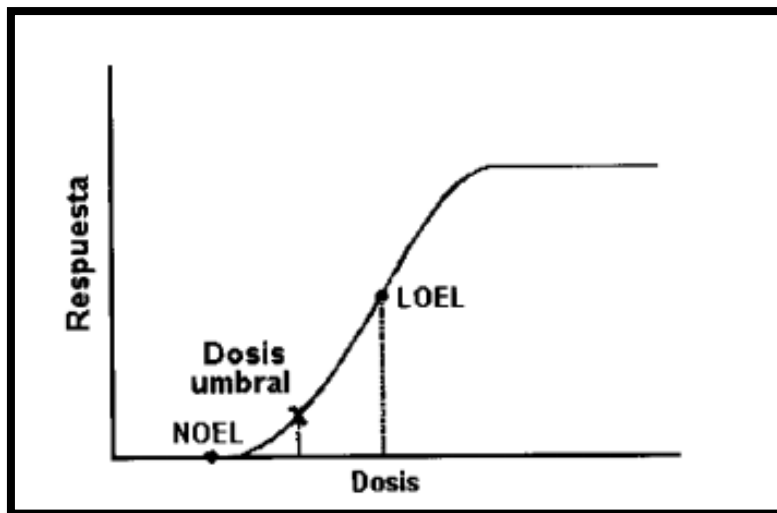


Figura 5. Dosis umbral para los niveles de respuesta toxicológicos (Biblioteca Virtual, 2015)

## 5. Histología

### 5.1 Célula cómo unidad funcional básica

Los conocimientos modernos confirman la teoría de Rudolf Virchow que describía a la célula como la unidad básica estructural de los organismos vivos. Las células son muy variadas, aunque todas las células del cuerpo humano derivan en última instancia de un único huevo fertilizado, cada célula desarrolla atributos estructurales para adecuarse a su función gracias a un proceso de diferenciación y es una unidad considerablemente más compleja y sofisticada de lo que se creía al principio, ya que la biología molecular ha demostrado que células de diferentes aspectos morfológicos se pueden agrupar porque tienen atributos o interacciones funcionales comunes (Stevens A y lowe J, 2006).

Se ha demostrado que en adultos hay poblaciones de células no comprometidas muy adaptables, que pueden modificar tanto su estructura como su actividad funcional con el fin de adaptarse a las demandas provocadas por los cambios ambientales. Esta

capacidad cobra gran importancia en la adaptación al estrés interno o externo y se observa a menudo en las enfermedades, un ejemplo de ello es el remplazamiento de musculo cardiaco lesionado por tejido fibroso resistente después de un ataque cardiaco (Stevens A, lowe J, 2006). Debido a esto posible clasificar las células en grupos ateniéndose a su función principal, dividiéndose principalmente en células epiteliales, células de sostén, células contráctiles, células nerviosas, células germinales, células sanguíneas, células inmunitarias y células secretoras de hormonas, sin embargo es importante reconocer que una célula puede desempeñar varias funciones y puede formar parte de más de un grupo de células, como lo son muchas células productoras de hormonas que son parte del tejido epitelial las cuales se unen íntimamente gracias a uniones especializadas para formar una glándula, o el caso de células inmunitarias que también son células sanguíneas (Stevens A, lowe J, 2006).

## **5.2 Tejidos cómo organizaciones funcionales de células**

Un tejido es una agrupación de células dispuestas en una organización específica. En algunos casos las células tienen la misma estructura y forman tejidos simples, como el tejido adiposo, sin embargo la mayoría de tejidos contienen una mezcla de células con diferentes funciones, que se pueden denominar tejidos complejos, un ejemplo de esto es el tejido nervioso que contiene células nerviosas denominadas neuronas, células de sostén (astrocitos), células inmunitarias (microglia) y células epiteliales (epéndimo). El concepto de tejido simple y complejo es útil en la histología descriptiva, pero por simplificar se emplea el término sin calificar de “tejido” para ambos tipos (Stevens A y Lowe J, 2006).

### **5.3 Relación anatomía e histología**

La histología nos da una visión de la estructura y función de los diferentes tejidos en relación al órgano al que pertenecen, este tipo de estudio es una extensión de la anatomía y se suele denominar frecuentemente anatomía microscópica por esta misma razón. El estudio de la histología es un componente importante dentro de la biología humana y en la mayor parte de los planes de estudio se incluye dentro de la anatomía normal cómo es el caso de Bioquímica Diagnostica (Stevens A y lowe J, 2006; UNAM, 2019).

La patología (estudio de las enfermedades) llega a representar cerca de la mitad de todos los estudios que necesitan los especialistas en salud independientemente de su especialidad, y desde sus comienzos se ha ligado íntimamente al estudio de la histología. Sin embargo, en la mayor parte de los planes de estudio la patología se enseña en cursos posteriores a los que se enseña la histología, esto es una pena, ya que la mayoría de las enfermedades se asocian a alteraciones histológicas. Por eso comprender el diagnóstico histopatológico es fundamental en la medicina moderna, ya sea para encontrar la raíz de una enfermedad o realizar estudios de toxicidad por medio de las lesiones causadas por diferentes compuestos (Stevens A y lowe J, 2006).

### **5.4 Técnica histológica**

Denominamos proceso histológico a una serie de métodos y técnicas utilizados para poder estudiar las características morfológicas y moleculares de los tejidos. En el siguiente esquema se muestran los métodos y técnicas comúnmente empleados para el procesamiento de los tejidos para su observación con los microscopios óptico o electrónico (Figura 6). Sin embargo, hay que tener en cuenta que existen muchas variantes a estos "camino" y su elección dependerá del resultado final que queramos

obtener (Molist G y Pombal D, 2011). En el caso de la presente investigación, utilizamos la técnica de inclusión en parafina de rutina y la tinción HE para evaluar las diferentes lesiones que los compuestos de interés podrían inducir sobre dos tejidos de gran importancia en el metabolismo y eliminación de los compuestos exógenos o xenobióticos (Figura 11).

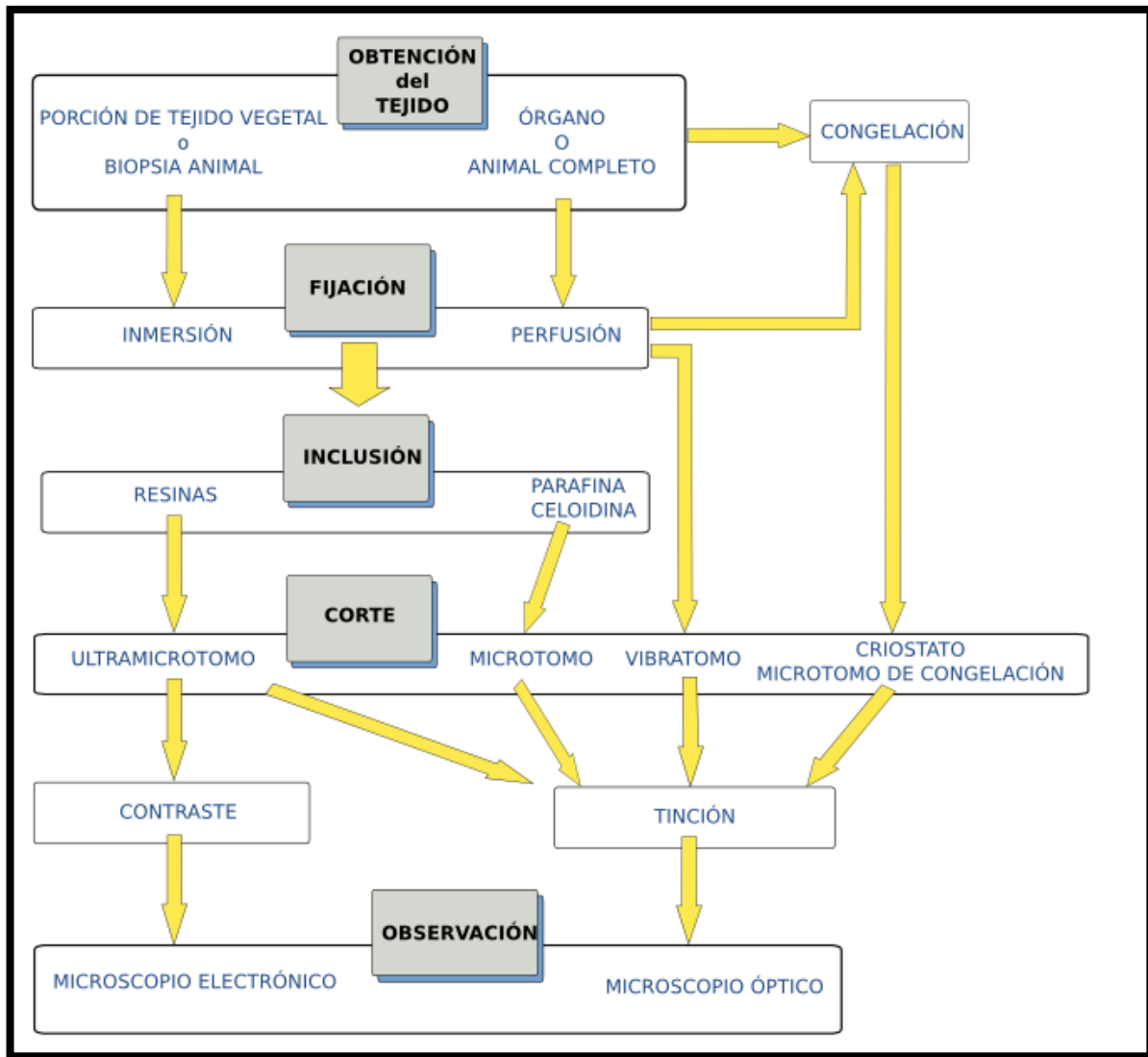


Figura 6. Esquema de un proceso histológico general (Molist G y Pombal D, 2011)

### 5.5 Tinción Hematoxilina - Eosina (HE)

Una de las tinciones más comúnmente usada en histología es la hematoxilina-eosina sobre cortes de parafina. Se usa un colorante básico y otro ácido para teñir de diferente color a las estructuras ácidas y básicas de la célula (Figura 7). Antes de proceder a la tinción, si partimos de cortes de parafina, tenemos que llevar a cabo unos tratamientos previos sobre las secciones como es el desparafinado, y la hidratación puesto que estos colorantes son hidrosolubles. Si partimos de cortes de criostato la tinción es directa (Molist G y Pombal D, 2015).

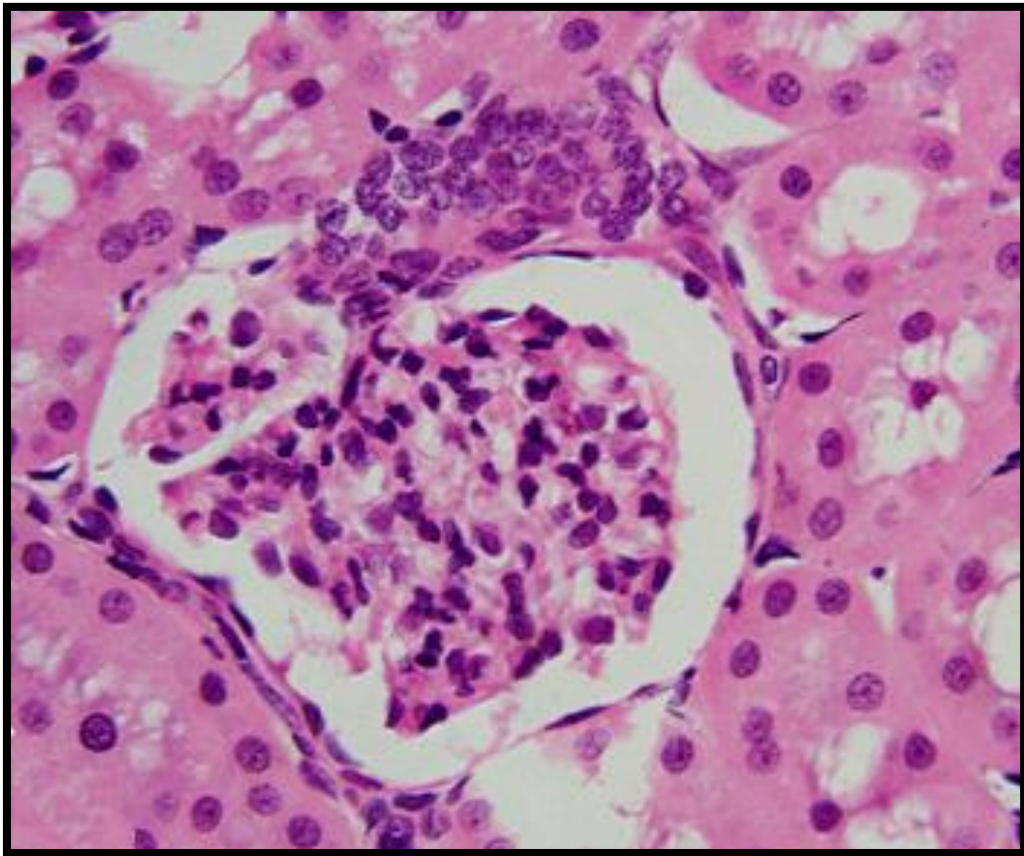


Figura 7. Sección de un glomérulo en un riñón de mamífero obtenida a partir de una inclusión en parafina y teñido con HE. Los núcleos aparecen de color azul (hematoxilina) y el citoplasma de color rosado (eosina) (Molist G y Pombal D, 2015)



## **6. Anatomía e histología de los órganos de estudios**

### **6.1 Hígado**

El hígado es la glándula más grande del cuerpo. Está situado bajo el diafragma y protegido por las costillas, y lo recubre una cápsula de tejido conectivo fibroso que penetra en el órgano para formar tabiques que lo dividen en lóbulos y lobulillos. La formación del hígado es a partir de una invaginación del tubo digestivo que se produce durante el desarrollo embrionario, por tanto tiene un origen ectodérmico. Los hepatocitos son las células que forman la mayor parte del hígado y son las principales responsables de su función. Una gran parte de la sangre que llega al hígado proviene de la vena porta que recoge los productos de la digestión que han sido absorbidos. Esta fuerte irrigación sanguínea es lo que hace que tengan un color rojizo (Jiang Y. et al, 2014).

La organización celular del hígado es relativamente sencilla puesto que es la repetición de una estructura básica denominada lobulillo hepático. Los lobulillos suelen estar separados entre sí por tejido conectivo, aunque no en todas las especies es claramente visible. Tienen forma de prisma poligonal que mide de 1 a 2 mm de diámetro. En secciones transversales tiene una forma aproximada de hexágono con una vena central o centrolobulillar de gran diámetro. En los vértices del hexágono, entre lobulillos contiguos, se encuentran los espacios portales formados por tejido conectivo y por las denominadas triadas portales compuestas por una rama de la vena porta, una rama de la arteria hepática y un conductillo biliar. La vena porta hepática trae el 70-75 % del flujo sanguíneo (15 ml/min) y contiene sangre poco oxigenada y rica en nutrientes proveniente del sistema digestivo y del bazo, mientras que la arteria hepática contiene sangre oxigenada. La sangre llega a los vasos sanguíneos portales de los vértices, los cuales

traen las sustancias desde el sistema digestivo, mientras que la arteria central drena el resultado de la actividad de los hepatocitos. Los vasos portales y la vena central se comunican gracias a capilares que discurren entre los hepatocitos denominados capilares sinusoidales, cuya pared está compuesta por una capa discontinua de células endoteliales fenestradas que carecen de membrana basal. Estos capilares discurren de forma radial, recogen el fluido de las venas portas y arterias de los vértices, además de la secreción endocrina de los hepatocitos, y confluyen en el centro del lobulillo para liberar su contenido en la vena centrolobulillar. La confluencia de las venas centrolobulillares da lugar a las venas hepáticas que finalmente drenan en la vena cava inferior (Molist G y Pombal D 2013a). Los conductos biliares, que forman parte de la tríada, recogerán el contenido exocrino de los hepatocitos que se denomina bilis. Esta excreción irá en sentido contrario a la corriente que discurre por los capilares sinusoidales, es decir, se dirige desde los hepatocitos hasta los conductos biliares de la periferia del lobulillo hepático. Esto es posible porque las membranas plasmáticas de hepatocitos continuos crean unos espacios interconectados que forman los denominados canaliculos biliares, los cuales se organizan en una red anastomosada que termina por fusionarse con los canales biliares (Molist G y Pombal D, 2013a). Los hepatocitos suponen más del 75 % del hígado y se organizan en láminas o trabéculas con perforaciones, frecuentemente de una célula de espesor, que se fusionan entre sí para formar un entramado complejo de forma parecida a una esponja (Figura 8). Entre las láminas circulan los capilares sinusoidales que poseen un pequeño calibre, y entre el endotelio de éstos y los hepatocitos existen unos espacios acelulares denominados espacios perisinuosidales o espacios de Disse. Los hepatocitos liberan dos tipos de sustancias: endocrinas hacia los capilares sinusoidales y exocrinas

hacia los canalículos biliares. Son células relativamente grandes, unas 20 a 30  $\mu\text{m}$ , con núcleos redondeados, algunas son binucleadas, y la mayoría son tetraploides (Molist G y Pombal D, 2013a).

Los hepatocitos son los responsables de la secreción endocrina de una gran cantidad de proteínas plasmáticas como albúminas, lipoproteínas (transportan colesterol), glucoproteínas como la transferrina, protrombina y fibrinógenos (responsables de la coagulación sanguínea). También almacenan y modifican vitaminas tales como la A, la D o la K, y hormonas tales como hormona del crecimiento. La insulina y el glucagón son hormonas degradadas principalmente en el hígado. Son centros de detoxificación de primer orden, participando en el catabolismo de toxinas y moléculas externas al organismo (como la mayoría de los fármacos). Son importantes en el metabolismo de carbohidratos (gluconeogénesis, glucogenólisis y glucogenogénesis) y lípidos (síntesis de triglicéridos y colesterol). Además, sintetizan, a partir de amonio, la mayor cantidad de la urea que se produce en el organismo, y que posteriormente será excretada en los riñones. En el hígado también se elimina por fagocitosis un 20 % de los glóbulos rojos envejecidos (el 80 % restante se elimina en el bazo) por medio de macrófagos hepáticos denominados células de Kupffer (Molist G y Pombal D, 2013a).

Los hepatocitos producen la bilis, es recogida en los conductos que salen de los lóbulos hepáticos y convergen en un sólo conducto denominado conducto hepático común, al cual está conectado el almacén temporal de la bilis que es la vesícula biliar. Desde ahí se conduce hasta el duodeno. Es una solución acuosa que contiene productos de deshecho que son enviados al intestino y eliminados, pero la bilis también contiene componentes útiles que ayudan a la digestión como sales biliares, proteínas, colesterol y

hormonas. Las sales biliares ayudan en la digestión de las grasas (Molist G y Pombal D, 2013a).

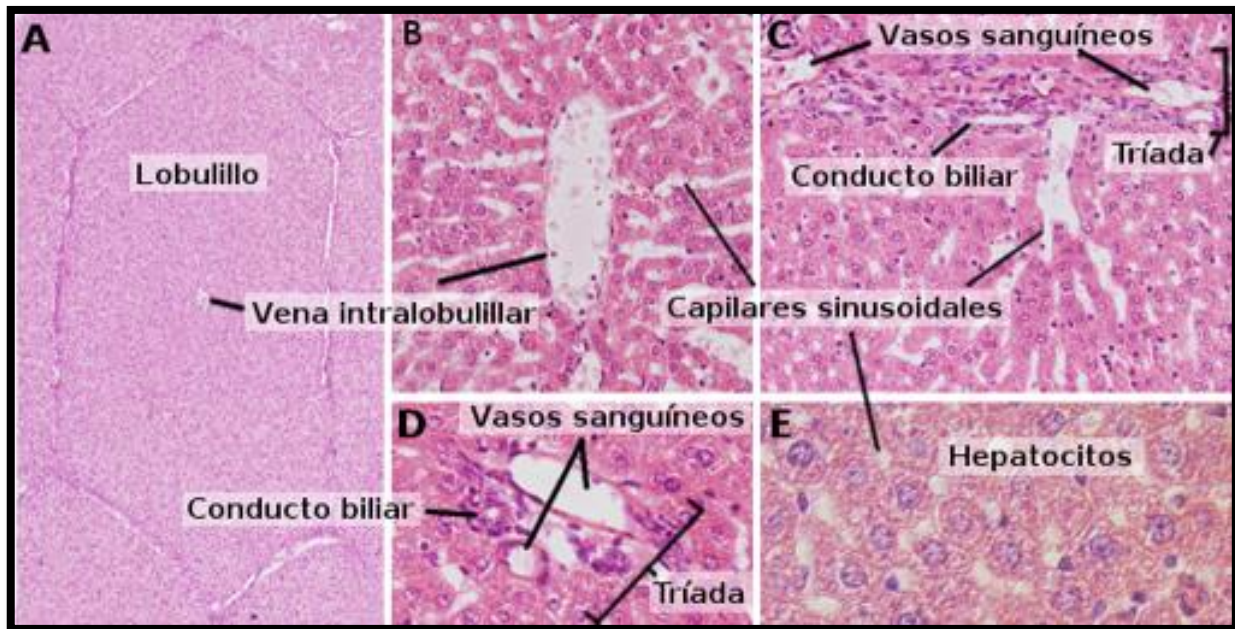


Figura 8. Histología del hígado, Especie: *Rattus norvegicus*, Técnica: HE en cortes de 8 micrómetros (Molist G y Pombal D, 2013a)

## 6.2 Riñón

Los riñones son órganos pares que se localizan en la parte posterior de la cavidad abdominal, en el retroperitoneo, en mamíferos a la altura de la octava vértebra dorsal. Tienen forma de alubia con la zona convexa orientada hacia la parte lateral del cuerpo y la cóncava hacia la zona medial. Es por esta última parte, en una zona denominada hilio, por donde las arterias renales suministran sangre a los riñones y las venas renales lo drenan. Por el hilio también salen los conductos (uréteres) que recogen la orina para llevarla de la pelvis hasta la vejiga urinaria (Molist G y Pombal D, 2013b).

El riñón está rodeado por gran cantidad de tejido adiposo. En la parte superior de cada riñón, encastradas en esta grasa, se encuentran las cápsulas suprarrenales, que son

glándulas endocrinas. La capa más externa del riñón se denomina cápsula, formada por tejido conectivo, en ratón es una fina capa de conectivo, pero en otras especies, como en humanos, se puede dividir en dos partes: externa e interna, a externa está formada por fibroblastos y fibras de colágeno, mientras que la interna contiene miofibroblastos, los cuales permiten resistir los aumentos de presión del riñón. En la zona del hilio la cápsula se continúa con el conjuntivo de los conductos y vasos sanguíneos (Molist G y Pombal D, 2013b).

Debajo de la cápsula está la corteza renal, de un color rojizo debido a la gran cantidad de vasos sanguíneos que contiene. En la corteza se encuentran los corpúsculos renales de las nefronas, así como los túbulos contorneados proximales y distales, que en su conjunto forman los laberintos corticales. Espaciadas más o menos regularmente se encuentran en la corteza unas líneas o estrías que se dirigen a las pirámides renales y que se denominan rayos o estrías medulares (aunque están en la corteza). Son las asociaciones de los túbulos rectos, proximales y distales de la nefrona, y los túbulos colectores (Rosenberg H, 2015).

Los túbulos contorneados y corpúsculos renales sólo están en la corteza, mientras que los túbulos rectos y los túbulos colectores se extienden hasta la capa más interna denominada médula. Sobre todo los túbulos colectores y los conductos colectores, éstos de mayor calibre, se disponen en haces grandes que conforman estructuras en forma de pirámide, con la punta señalando hacia el hilio y la base en contacto con la corteza. A cada una de estas pirámides se les llama pirámides renales o medulares. En humanos hay de 8 a 18 pirámides renales en cada riñón, mientras que en otras especies como en el ratón sólo hay una. En torno a las pirámides y en contacto con sus caras laterales, se

extiende parte de la corteza. En las pirámides renales se da un proceso de confluencia de túbulos colectores a conductos colectores, cada vez de mayor diámetro (Molist G y Pombal D, 2013b).

El vértice de la pirámide se denomina papila. Está perforada y a través de dichas aberturas se libera el filtrado renal en los cálices menores. Éstos últimos son prolongaciones de una estructura colectora denominada cáliz mayor, que a su vez es una ramificación de la pelvis renal, la cual finalmente se continúa con el uréter (Figura 9 y 10).

La función del riñón no es sólo eliminar productos de desecho presentes en la sangre, sino que también controla la concentración de electrolitos, la relación ácido-base y la presión sanguínea. Están inervados por el sistema nervioso periférico de manera que mediante vasoconstricción o vasodilatación pueden regular el flujo sanguíneo (Molist G y Pombal D, 2013b).

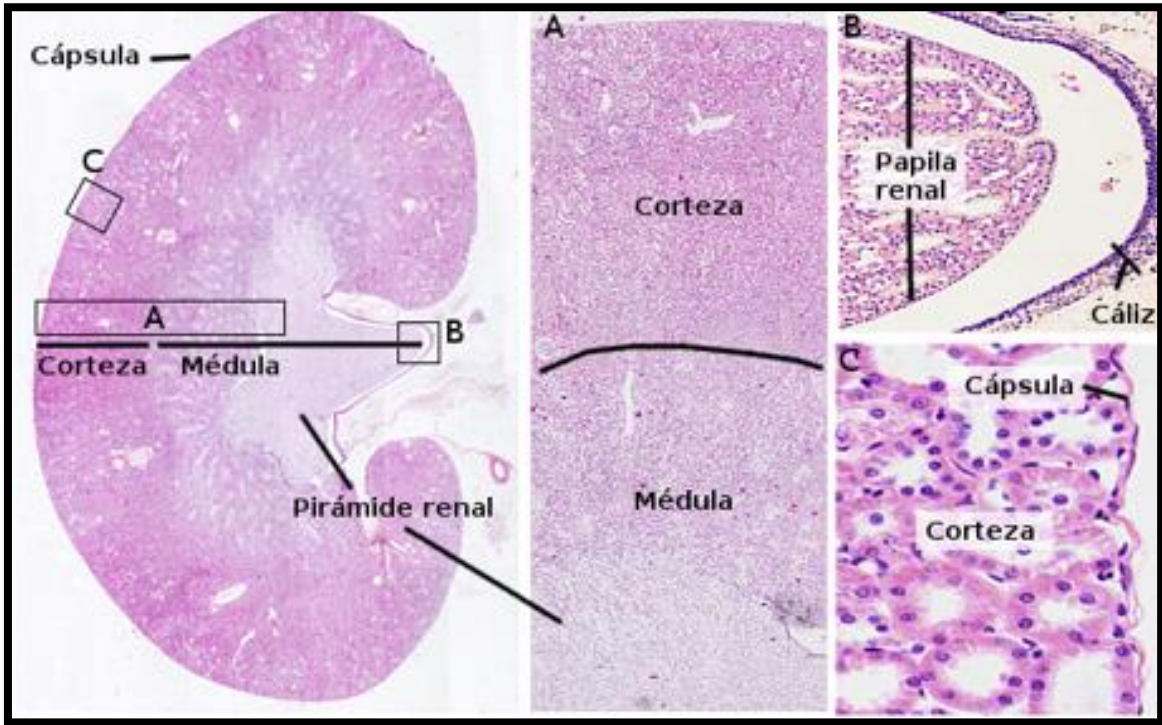


Figura 9. Histología de riñón, Especie: *Rattus norvegicus*, Técnica: HE en cortes de 8 micrómetros (Molist G y Pombal D, 2013b)

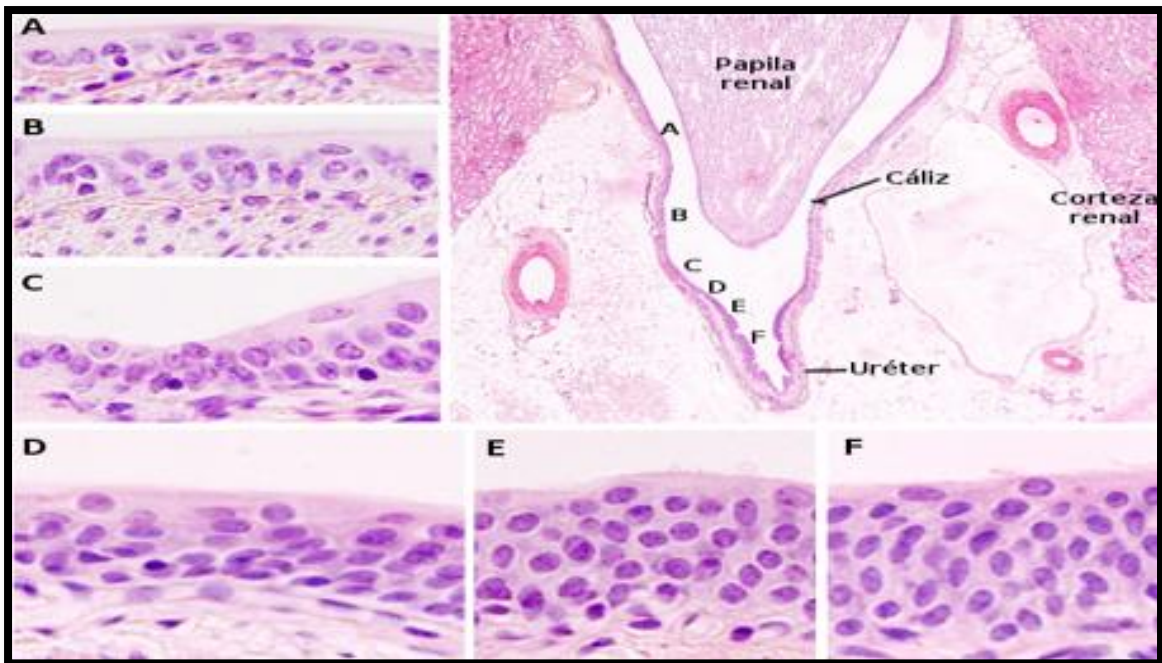


Figura 10. Caracterización del epitelio de transición de la pelvis del riñón a medida que se convierte en uréter (Molist G y Pombal D, 2013b)



## **JUSTIFICACIÓN**

Las amidas feniletílicas del ácido cafeico (CAPA) son compuestos que con sus modificaciones se busca mejorar las propiedades biológicas que compuestos relacionados como el CAPE poseen, específicamente las acciones antígenotóxica y la quimio-protectora. Ya que a estos compuestos se les han realizado varios estudios de su efecto farmacológico y su potencial de seguridad a través de evaluaciones de toxicidad aguda, encontrando en ellos excelentes características, surge la necesidad de evaluar mediante un estudio subcrónico y con técnicas histológicas su efecto sobre hígado y riñón, dos órganos de gran importancia en el metabolismo y eliminación de xenobióticos, para descartar que tengan efectos colaterales por su administración durante tiempos prolongados.

## **HIPÓTESIS**

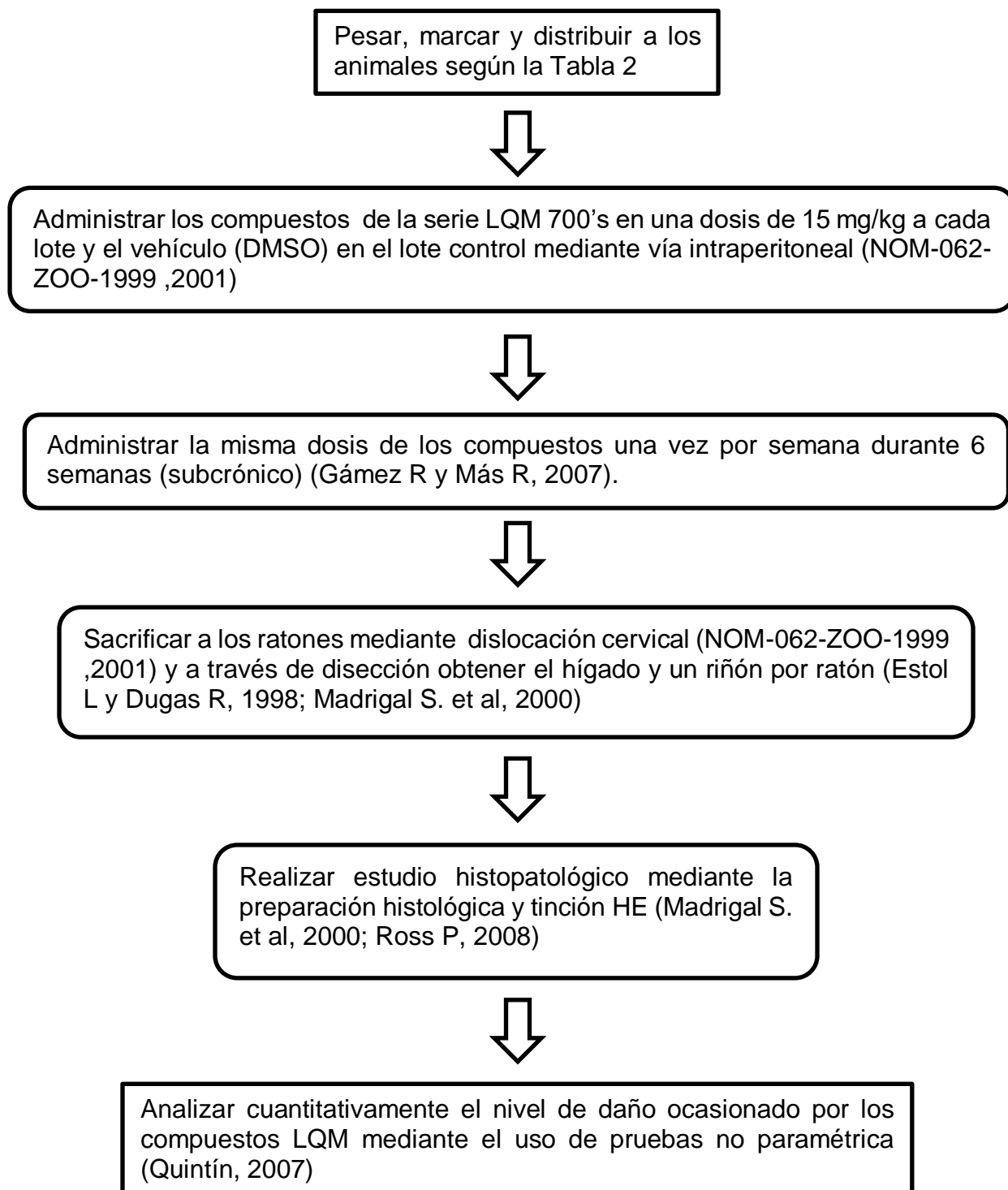
Los compuestos LQM 731, LQM 738 y LQM 755 a la dosis de 20 mg/Kg por vía intraperitoneal han demostrado en modelo murino una baja toxicidad evaluada en esquemas de una sola administración (dosis única), se espera que una dosis de 15 mg/kg administrada por un lapso de seis semanas (subcrónico) no presentará efecto nocivo sobre las células hepáticas o renales.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estimar mediante evaluación histológica el daño que los compuestos CAPA de la serie LQM 700's (731, 738 y 755) causan en hígado y riñón en un estudio subcrónico en ratones machos CD1, esto permitiría continuar con su perfilación como fármacos inocuos para la salud y quimio-protectores



## DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL



## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material Biológico

Hígado y un riñón indistinto de 32 ratones machos procedentes del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala de  $25 \pm 5$  g de peso de la cepa CD1, que se mantendrán en la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en campo 4. El protocolo se sometió al CICUAE - FESC (Comité Interdisciplinario para el Cuidado y Usos de los Animales de Experimentación). 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°C) e iluminación 12x12 horas.

### Material químico

- ✓ Albúmina de Mayer
- ✓ Colorantes hematoxilina-eosina (HE)
- ✓ 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
- ✓ Etanol al 70, 80, 90, 96 y 100 %
- ✓ Formalina bufferada
- ✓ Grenetina
- ✓ Parafina
- ✓ Resina sintética
- ✓ Xileno

### Equipo e instrumental de laboratorio

- ✓ Balanza analítica
- ✓ Baño de flotación
- ✓ Cubreobjetos
- ✓ Dispensador de parafina
- ✓ Espátula
- ✓ Estuche de disección
- ✓ Histocassetes
- ✓ Horno microondas
- ✓ Microscopio óptico
- ✓ Micrótopo
- ✓ Pipetas graduadas de diversos volúmenes
- ✓ Platina térmica
- ✓ Portaobjetos
- ✓ Recipientes
- ✓ Tubos Falcon de 15 ml

## Métodos

### Distribución de los lotes y administración de compuestos

**Tabla 2. Distribución de lotes de trabajo**

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD 1, pesados, marcados y separados por lotes

Lote	Solución administrada	Número de ratones
1	Agua y DMSO	8
2	Solución de LQM 731 en dosis de 15 mg/kg de peso	8
3	Solución de LQM 738 en dosis de 15 mg/kg de peso	8
4	Solución de LQM 755 en dosis de 15 mg/kg de peso	8

Los compuestos CAPA de la serie LQM 700's que se utilizaron son: LQM 731, LQM 738 y LQM 755, que son análogos amídicos del ácido cafeico (CAPE). Dichos compuestos se administraron vía intraperitoneal (IP) 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 mediante la técnica descrita en el manual de introducción al manejo de animales del laboratorio (Hernández G. et al, 2001) y se administró el compuesto vía intraperitoneal durante 6 semanas en cada lote por lo tanto recibieron un total de seis inyecciones lo que nos a un tiempo de respuesta subcrónico.

## **Obtención de órganos para estudio histopatológico**

El sacrificio se llevó a cabo por dislocación cervical; inmediatamente se procedió a la disección, la cual se realizó con tijeras, pinzas y un bisturí, cortando por la línea media del tórax hasta la sínfisis púbica, para obtener los órganos que se depositaron en recipientes con formalina bufferada para preservarlos.

## **Preparación histológica**

Para el estudio morfológico las muestras se colocaron en histocassetes, se deshidrataron y se les realizó una inclusión en parafina asistida por microondas, con inmersiones consecutivas en soluciones crecientes de etanol : R-OH al 70 % (dos cambios), R-OH al 80 % (dos cambios), R-OH al 90 % (dos cambios), R-OH al 96 % (dos cambios), R-OH al 100 % (dos cambios) y Xileno, en cada uno de los cambios las muestras se introdujeron en el microondas durante 2 min (potencia media-alta) y se mantuvieron en reposo durante 15 min antes de pasar al siguiente alcohol.

Se realizaron cortes del bloque de 4  $\mu\text{m}$  de espesor con el micrótopo, cada corte debió pasar por un baño de flotación a 37°C el cual tiene 1 g de Grenetina por cada litro de agua para adherir el corte, la disposición de órganos lo muestra la Tabla 10. Mientras el corte se encontraba flotando, con cuidado se introdujo un portaobjetos debajo del corte para extenderlo. Se colocó en la platina térmica para eliminar residuos de agua adquiridos durante el baño de flotación. Las laminillas se colocaron en la estufa a 60°C para terminar con la adhesión de los cortes. Las secciones de tejido embebido en parafina se sometieron al proceso de desparafinado y rehidratado para su posterior tinción con HE.

## **Tinción de HE**

Se llevó a cabo un proceso de desparafinado, hidratación, tinción y deshidratación el cual consistió en inmersiones consecutivas a través de una caja con Xileno 2 x 10 min, cámara con alcohol absoluto 2 x 10 min, cámara con alcohol al 96 % 2 x 10 min, cámara con alcohol al 80 % 2 x 10 min, cámara con alcohol al 70 % 10 min, lavado con agua destilada, cámara con hematoxilina 10 min, lavado con agua corriente inmediatamente seguido por alcohol ácido y agua destilada, cámara con carbonato de litio 1 min, cámara con eosina 10 min, lavado con agua destilada, cámara con alcohol al 96 % 2 x 10 min, cámara de alcohol absoluto 2 x 10 min y cámara con xileno 2 x 10 min.

Antes de que el xileno seacara de la laminilla, se agregó una gota de resina sintética cubriéndola con el cubreobjetos sin dejar burbujas de aire. Se dejó secar para finalmente observar las laminillas en un microscopio a 40x.

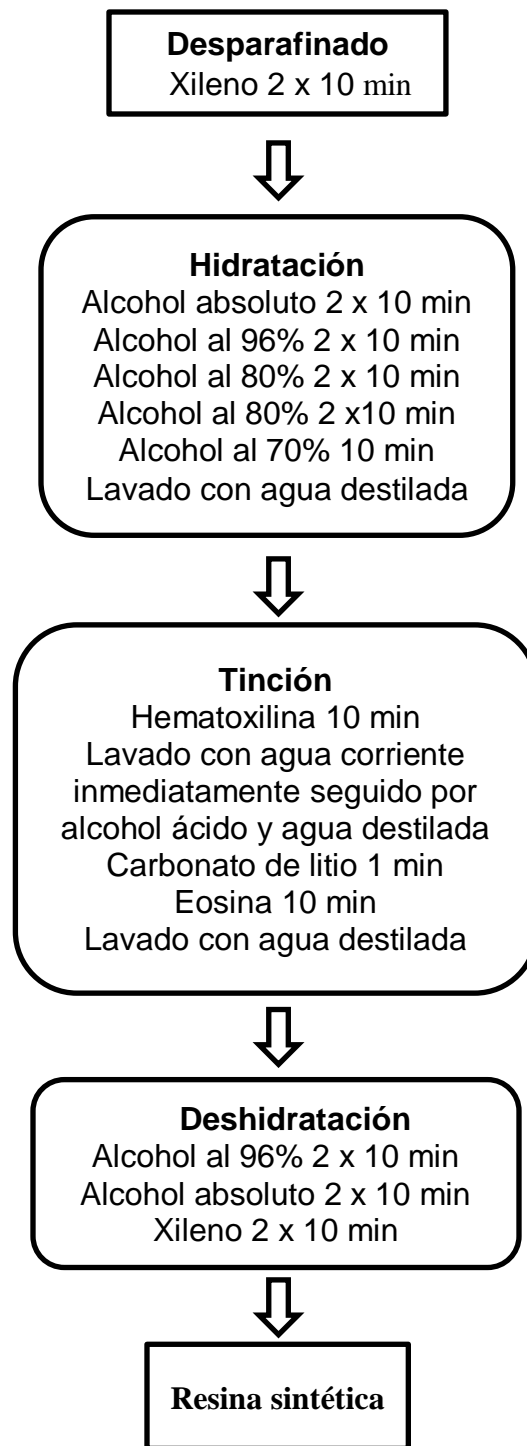


Figura 11. Pasos seguidos durante la preparación de laminillas, Tinción de HE

## Evaluación de lesiones y pruebas no paramétrica para histopatología

En la Tabla 3 y 4 se muestra los criterios que se evaluaron de cada muestra histológica mediante la observación de 10 campos no confluentes a 40x para cada parámetro y obtener una medición semicuantitativa. Criterios de evaluación sugeridos por el Dr. Germán Isauro Garrido Fariña (Madrigal S. et al, 2000; Padrón T, 2006).

**Tabla 3. Evaluación de lesiones renales**

---

<b>Criterios a evaluar en riñón</b>	<b>Observaciones a 40x</b>
Infiltración en corteza – glomérulo	PMN alrededor y dentro del glomérulo formando agregados
Infiltración en corteza – perivascular	PMN alrededor de vasos sanguíneos formando agregados
Infiltración en médula	PMN migrando hacia médula y en médula formando agregados
Congestión en vasos sanguíneos de la corteza renal	Localización de vasos sanguíneos con acumulación excesiva de eritrocitos
Hemorragia en médula	Localización de agregados de eritrocitos en médula o saliendo de vasos sanguíneos en médula
Hemorragia en corteza	Localización de agregados de eritrocitos en corteza o saliendo de vasos sanguíneos de la corteza
Glomérulos con alteraciones en el espacio glomerular	Localización de PMN, eritrocitos y/o sustancias que ocupen este espacio, como así localizar alteraciones morfológicas de este espacio
Túbulos con alteraciones de su morfología	Localizar sitios con alteraciones morfológicas de las células que forman parte de los túbulos renales

---

**Tabla 4. Evaluación de lesiones hepáticas**

---

<b>Criterios a evaluar en hígado</b>	<b>Observaciones a 40x</b>
Congestión en vasos de calibre grande	Localización de vasos sanguíneos con acumulación excesiva de eritrocitos
Congestión en vasos de calibre mediano	Localización de vasos sanguíneos con acumulación excesiva de eritrocitos
Congestión vasos de calibre pequeño	Localización de vasos sanguíneos con acumulación excesiva de eritrocitos
Infiltración en el parenquima	PMN formando agregados
Infiltración en espacio porta	PMN dentro del tejido conectivo del espacio porta (constituido por una triada que contienen una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conductillo biliar) formando agregados
Infiltración vena central	PMN dentro del tejido conectivo de la vena central hepática formando agregados
Hemorragia en parenquima	Localización de agregados de eritrocitos fuera de los sinusoides hepáticos
Hemorragia alrededor de espacio porta	Localización de agregados de eritrocitos alrededor del tejido conectivo del espacio porta
Hemorragia alrededor de vena central	Localización de agregados de eritrocitos alrededor del tejido conectivo de la vena central
Hepatocitos con alteraciones en su morfología	Localización de sitios en donde se encuentren hepatocitos con alteraciones morfológicas

---



### Área en la cual se realizó a lectura

$$\text{Área} = \pi \times r^2 \text{ (del objetivo 40x)}$$

$$\text{Área} = (3.1416) (70 \text{ micrómetros})^2 = 15393.84 \text{ micrómetros}$$

$$\text{Área de 10 campos confluentes} = \text{Área} \times 10 = \mathbf{153938.4 \text{ micrómetros}}$$

### Tratamiento estadístico

#### Prueba de hipótesis con desviación estándar conocida (de 2 colas)

Se buscó diferencia significativa entre parámetros con respecto al control para poder discernir el grado de daño inducido por los compuestos LQM's en la prueba de hipótesis con desviación estándar conocida (de 2 colas), los datos fueron analizados con un grado de significancia del 5 % (Quintín, 2007).

#### Se presentan dos hipótesis

**H0:** Se descarta diferencia significativa inducida por LQM's con respecto del control

**H1:** Se encuentra diferencia significativa inducida por LQM's con respecto del control

Se descarta H0 si Z calculada  $< -1.96$  ó  $> 1.96$

#### Cálculos

$$\dot{x} = \sum \frac{x}{n-1}$$

$$s = \sqrt{\frac{\sum (X - \dot{x})^2}{n-1}}$$

$$\mathbf{Z \text{ calculada}} = \frac{\dot{x} - M}{\frac{s}{\sqrt{n}}}$$

**Z crítica** fue calculada a partir de las tablas de área de la distribución normal estándar tomando como valor la división de los grados de significancia (Quintín, 2007).

$$0.05/2 = 0.025, 0.50 - 0.025 = 0.475 \text{ por lo tanto } = -1.96 \text{ y } 1.96$$

En donde “**M**: media poblacional, **x̄**: media muestral, **S**: desviación estándar, **n**: número de datos”

### **Prueba de chi cuadrada de homogeneidad**

Al no tener un mismo número de órganos analizados para cada compuesto se realizó la prueba de chi cuadrada de homogeneidad para la comparación de frecuencias entre lotes y así descartar si el daño analizado depende del número de órganos obtenidos o este depende de la capacidad citotóxica de los compuestos. Los datos fueron analizados con un grado de significancia del 5 % (Quintín, 2007).

### **Se presentan dos hipótesis**

**H0**: El número de lesiones encontradas no depende del número de órganos analizados

**H1**: El número de lesiones encontradas dependen del número de órganos analizados

Si el valor de  $x^2$  *calculada*  $\leq$  al valor de  $x^2$  *crítica* entonces se acepta la hipótesis H0

### **Cálculos**

$f_e = (100 \%) (\% \text{ de órganos analizados por compuesto}) / \text{Sumatoria total de órganos analizados}$

$$x^2 \text{ calculada} = \frac{\sum (f_o - f_e)^2}{f_e}$$

$$gl = (\text{Número de renglones} - 1) (\text{Número de columnas} - 1)$$

$$gl = (4 - 1) (2 - 1) = 3$$

$$p = 1 - \text{Nivel de significancia} = 1 - 0.05 = 0.95$$

$\chi^2$  crítica es calculada a partir de las tablas para valores de chi cuadrada con los valores  $gl$  y  $p = 7.815$  (Quintín, 2007)

En donde “ $fe$ : frecuencia esperada,  $fo$ : frecuencia obtenida,  $gl$ : grados de libertad,  $p$ : valor que corresponde a la significancia “

## RESULTADOS

### Observaciones del número de decesos por lote que se tuvo durante el tratamiento subcrónico de 6 semanas con LQM 700´s

Se utilizaron 32 ratones, la administración comenzó con 30 ratones por lo que sólo se tenían tres lotes de 8 ratones administrados con LQM y 2 controles pero al final se decidió agregar dos ratones control más para completar los 8 ratones y los resultados fueran estadísticamente significativos. La primera administración con DMSO (Vehículo de los LQM 700´s) a estos dos ratones se realizaron el 23 de junio siguiendo el patrón de administración que se observan en las tablas siguientes, siendo la sexta y última administración el 1 de agosto.

**Tabla 5. Observaciones en el lote de ratones al que se administró LQM 731 y dos ratones control**

Fecha (2014)	Actividades	Observaciones
2 de junio	1° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
3 de junio	No se administro	Muere ratón control
11 de junio	2° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
18 de junio	3° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
20 de junio	No se administro	Muere ratón 5 LQM 731 y dos ratones (3 y 4) se torna débil
23 de junio	No se administro	Muere ratón 4 Ratones se tornan agresivos y matan al ratón 8
25 de junio	4° Admón. dosis 15 mg/Kg	Ratón 3 se torna débil
26 de junio	No se administro	Ratón 3 muere
2 de julio	5° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
9 de julio	6° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay

11 de julio      Sacrificio de los animales      No hay

Nota: se obtuvo un total de 5 muertes que corresponden a 1 sujeto control y 4 sujetos con administración de LQM 731

---

**Tabla 6. Observaciones en el lote de ratones al que se administró LQM 738 y dos ratones control**

---

<b>Fecha (2014)</b>	<b>Actividades</b>	<b>Observaciones</b>
9 de junio	1° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
16 de junio	2° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
18 de junio	No se administro	Muere ratón control 4
23 de junio	3° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
30 de junio	4° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
7 de julio	5° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
14 de julio	6° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
16 de julio	Sacrificio de los animales	No hay

Nota: se obtuvo un total de 1 muerte que corresponden a 1 sujeto control

---

**Tabla 7. Observaciones en el lote de ratones al que se administró LQM 755 y dos ratones control**

---

<b>Fecha (2014)</b>	<b>Actividades</b>	<b>Observaciones</b>
11 de agosto	1° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
19 de agosto	2° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
21 de agosto	No se administro	Ratón 1 y control presentan diarrea Ratón 4 se nota débil
22 de agosto	No se administro	Ratón 1 muere Ratón 4 se nota débil
25 de agosto	No se administro	Ratón 4 muere
26 de agosto	3° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
28 de agosto	No se administro	Ratón 7 se nota débil
1 de septiembre	No se administro	Ratón 7 se muere
2 de septiembre	4° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
9 de septiembre	5° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
17 de septiembre	6° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay

19 de septiembre    Sacrificio de los animales    No hay

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

---

**Tabla 8. Observaciones en el último lote dispuesto con dos ratones control extras**

---

<b>Fecha (2014)</b>	<b>Actividades</b>	<b>Observaciones</b>
23 de junio	1° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
7 de julio	2° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
14 de julio	3° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
21 de julio	4° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
28 de julio	5° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
1 de agosto	6° Admón. dosis 15 mg/Kg	No hay
4 de agosto	Sacrificio de los animales	No hay

Nota: no se obtuvo ninguna muerte.

---

**Tabla 9. Número de decesos y órganos obtenidos por lote que se tuvo durante el tratamiento subcrónico de 6 semanas**

---

<b>LQM</b>	<b>Número de ratones</b>	<b>Número de decesos</b>	<b>Número de riñones</b>	<b>Número de hígados</b>
731	8	4	4	4
738	8	0	8	8
755	8	3	5	5
Control (DMSO)	8	2	6	6

---

## Disposición de los órganos en las laminillas

En la Tabla 10 se muestra la disposición de cada órgano en las laminillas. Se realizaron dos cortes por órgano los cuales se colocaron en laminillas diferentes, dejando en una sola laminilla los cortes de todos los órganos según el LQM administrado, se etiquetó cada laminilla con un número de identificación para poder hacer la lectura con un doble ciego. Doble ciego: Consistió en que al revisar cada laminilla no se supiera de qué compuesto se trataba hasta revisar el número de identificación y así poder homogenizar todas las muestras tratadas para hacer la lectura de las laminillas basándose en el área de 10 campos confluentes; Se decidió esta forma de trabajar debido a los órganos que se obtuvieron después de seis semanas de administración

**Tabla 10. Disposición de los órganos en las laminillas**

Número de identificación	Órganos	Número de órganos por laminilla	LQM	Número de laminillas
235	Riñón	5	755	2
236	Hígado	5	755	2
238	Hígado	4	731	2
240	Riñón	4	731	2
241	Hígado	8	738	2
242	Riñón	8	738	2
244	Hígado	6	Control	2
245	Riñón	6	Control	2

Nota: el número de órganos no es el mismo debido a las muertes ocurridas en la administración

## Observaciones histológicas en hígado y riñón de ratón CD1 inducidas por LQM's

Se presentaron dos tipos de lesiones, congestión e infiltración para hígado y riñón. Cada lesión se presenta con el número total de hallazgos, graficas de barras para una representación más visual y tabla de valores obtenidos para descartar diferencias significativas con respecto al lote control.

**Tabla 11. Evaluación de histopatología hepática (congestión)**

<b>LQM</b>	<b>Número de órganos analizados en 153938.4 micrómetros/ Frecuencia (%)</b>	<b>Congestión en vasos de calibre grande</b>	<b>Congestión en vasos de calibre mediano</b>	<b>Congestión en vasos de calibre pequeño</b>	<b>Congestiones totales por LQM</b>
<b>731</b>	4 hígados/ 4 presentaron congestión/100 %	7	28	4	39*
<b>738</b>	8 hígados/ 8 presentaron congestión/100 %	10	24	12	46*
<b>755</b>	5 hígados/ 5 presentaron congestión/100 %	2	33	7	42*
<b>Control (DMSO)</b>	6 hígados/ 4 presentaron congestión/67 %	0	5	0	5

\*Valor analizado con diferencia estadística significativa con respecto al lote control

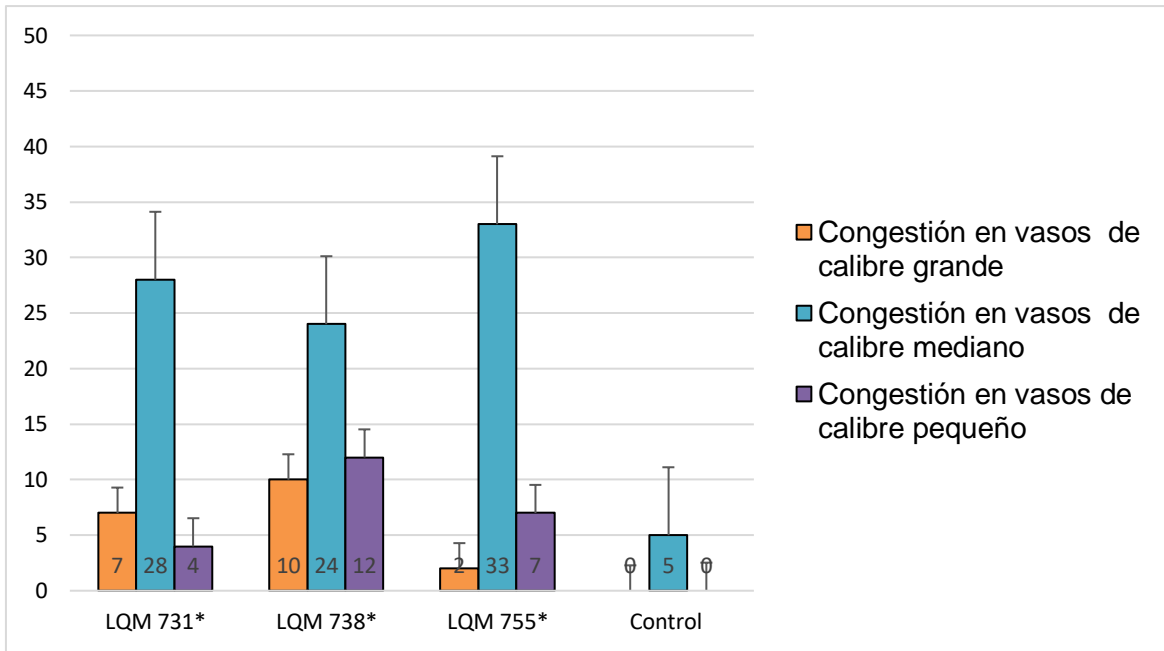


Figura 12. Congestión de vasos sanguíneos con diferentes calibres en hígado de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's

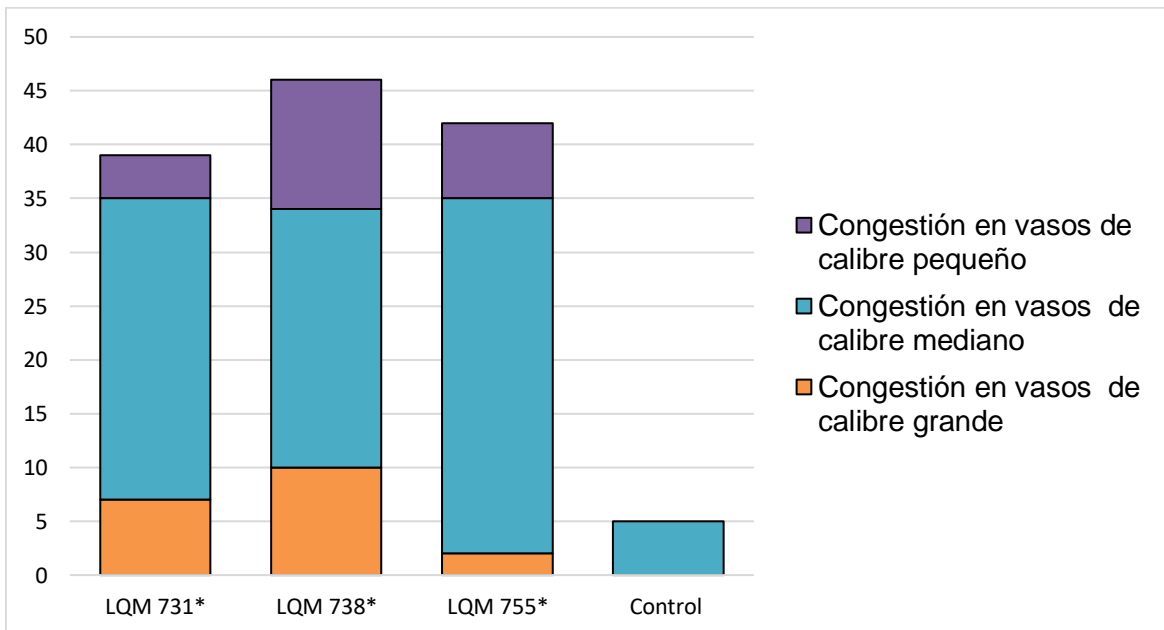


Figura 13. Congestión total en hígado de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's



**Tabla 12. Prueba de hipótesis con desviación estándar conocida (de 2 colas) para descartar diferencias significativas entre la congestión total en hígado de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's y el control**

LQM	Número de congestiones totales por LQM	M: 5	$\alpha$ : 0.05
731	39*	$\bar{x}$ : 42.5	gl: 2
738	46*	S: 3.51	Z calculada: 14.05
755	42*	n: 3	Z critica: -1.96 y 1.96
Control (DMSO)	5		

H0: Se descarta diferencia significativa entre la congestión total inducida por LQM's y el control

H1: Se encuentra diferencia significativa entre la congestión total inducida por LQM's y el control

Se descarta H0 si Z calculada < -1.96 o Z calculada > 1.96

Nota: en donde "M: media poblacional,  $\bar{x}$ : media muestral, S: desviación estándar, n: número de datos,  $\alpha$ : grado de significancia, gl: grados de libertad"

\*Valor analizado con diferencia estadística significativa con respecto al lote control

**Tabla 13. Prueba de chi cuadrada de homogeneidad, comparación de frecuencias obtenidas de la “Evaluación de histopatología hepática, tabla 11” para descartar si el daño causado en hígado (congestión) depende del compuesto o no, debido a que no el 100 % de hígados presenta congestión**

LQM	Frecuencias de la tabla 10	# de Hígados que contienen congestión ( <i>f<sub>o</sub></i> )	# de Hígados que no contienen congestión ( <i>f<sub>o</sub></i> )	Total	% de hígados analizados	Valores esperados con infiltración ( <i>f<sub>e</sub></i> )	Valores esperados sin infiltración ( <i>f<sub>e</sub></i> )
731	100 %	4	0	4	17 %	3.57	0.34
738	100 %	8	0	8	35 %	7.35	0.70
755	100 %	5	0	5	22 %	4.62	0.44
Control	67 %	4	2	6	26 %	5.46	0.52
<b>Total</b>		21	2	23	100 %	21	2

$x^2$  calculada: 6.222     $x^2$  crítica: 7.815    gl: 3    Valor P: 0.95

H0: El número de infiltraciones encontradas no dependen del número de hígados analizados

H1: El número de infiltraciones encontradas dependen del número de hígados analizados

Si el valor de chi cuadrada calculado  $\leq$  Valor de chi cuadrada crítica entonces se acepta la hipótesis nula

---

No hay valores con diferencia estadística significativa con respecto al control

---

**Tabla 14. Evaluación de histopatología hepática (infiltración)**

<b>LQM</b>	<b>Número de órganos analizados en 153938.4 micrómetros/ Frecuencia (%)</b>	<b>Infiltración en el parenquima</b>	<b>Infiltración en espacio porta</b>	<b>Infiltración vena central</b>	<b>Infiltraciones totales por LQM</b>
<b>731</b>	4 hígados/ 2 presentaron infiltración/50 %	0	3	0	3
<b>738</b>	8 hígados/ 6 presentaron infiltración/67 %	2	6	0	8
<b>755</b>	5 hígados/ 3 presentaron infiltración/60 %	0	4	0	4
<b>Control (DMSO)</b>	6 hígados/ 2 presentaron infiltración/33 %	0	2	1	3

---

No hay valores con diferencia estadística significativa con respecto al control

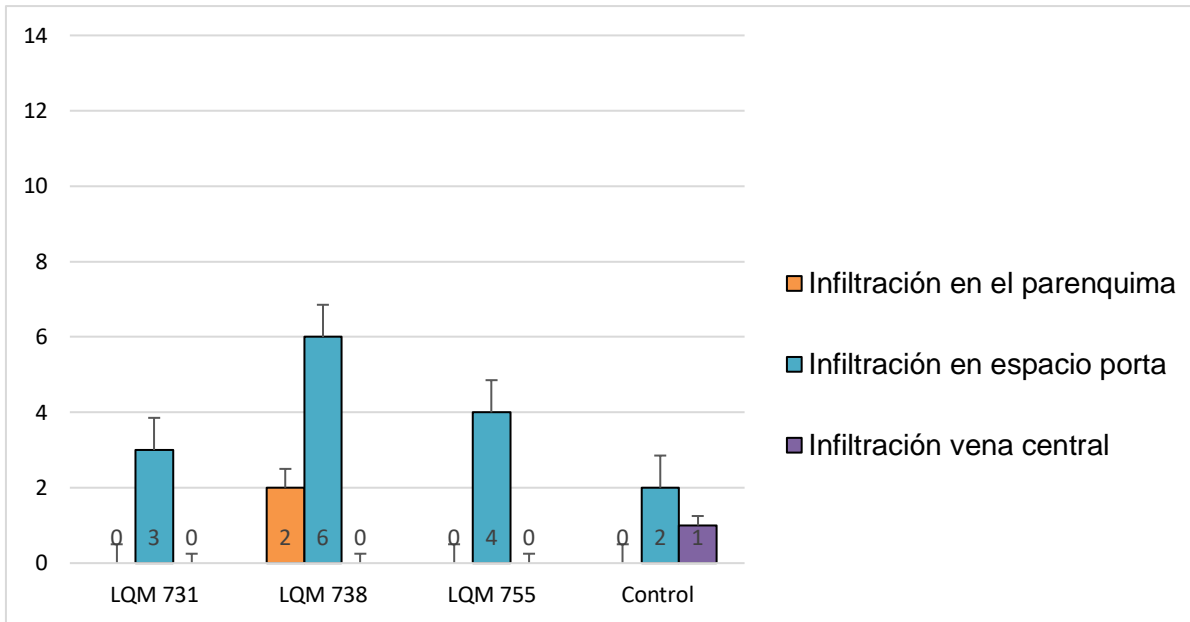


Figura 14. Infiltración en diferentes áreas del hígado de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's

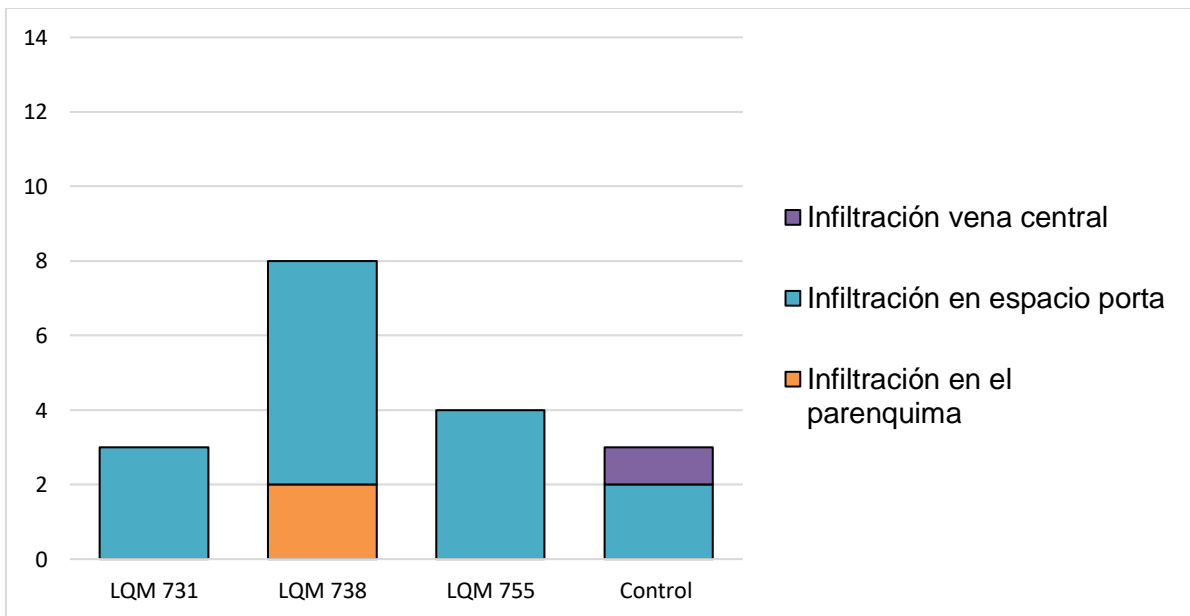


Figura 15. Infiltración total en hígado de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's

**Tabla 15. Prueba de hipótesis con desviación estándar conocida (de 2 colas) para descartar diferencias significativas entre el número de filtraciones total en hígado de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's y el control**

LQM	Número de infiltraciones totales por LQM	M: 3	$\alpha$ : 0.05
731	3	$\bar{x}$ : 5	gl: 2
738	8	S: 2.6	Z calculada: 1.33
755	4	n: 3	Z critica: -1.96 y 1.96
Control (DMSO)	3		

H0: Se descarta diferencia significativa entre el número de infiltraciones inducidas por LQM's y el control

H1: Se encuentra diferencia significativa entre el número de infiltraciones inducidas por LQM's y el control

Se descarta H0 si Z calculada < -1.96 o Z calculada > 1.96

Nota: en donde "M: media poblacional,  $\bar{x}$ : media muestral, S: desviación estándar, n: número de datos,  $\alpha$ : grado de significancia, gl: grados de libertad"

No hay valores con diferencia estadística significativa con respecto al control

**Tabla 16. Prueba de Chi cuadrada de homogeneidad, comparación de frecuencias obtenidas de la “Evaluación de histopatología hepática, Tabla 14” para descartar si el daño causado en hígado (infiltración) depende del compuesto o no, debido a que no el 100 % de hígados presenta infiltración**

LQM	Frecuencias de la tabla 13	# de Hígados que contiene n Infiltración ( <i>fo</i> )	# de Hígados que no contiene n Infiltración ( <i>fo</i> )	Total	% de hígados analizados	Valores esperados con infiltración ( <i>fe</i> )	Valores esperados sin infiltración ( <i>fe</i> )
731	50 %	2	2	4	17 %	2.21	1.7
738	67 %	6	2	8	35 %	4.55	3.5
755	60 %	3	2	5	22 %	2.86	2.2
Control	33 %	2	4	6	26 %	3.38	2.6
<b>Total</b>		13	10	23	100 %	13	10

*x*<sup>2</sup>calculada: 2.50    *x*<sup>2</sup>critica: 7.815    gl: 3    Valor P: 0.95

H0: El número de infiltraciones encontradas no dependen del número de hígados analizados

H1: El número de infiltraciones encontradas dependen del número de hígados analizados

Si el valor de chi cuadrada calculado ≤ Valor de chi cuadrada critica entonces se acepta la hipótesis nula

---

No hay valores con diferencia estadística significativa con respecto al control

---

**Tabla 17. Evaluación de histopatología renal (congestión)**

<b>LQM</b>	<b>Número de órganos analizados en 153938.4 micrómetros/Frecuencias (%)</b>	<b>Congestión en vasos sanguíneos de la corteza renal</b>
<b>731</b>	4 Riñones/4 con congestión/100 %	17
<b>738</b>	8 Riñones/8 con congestión/100 %	20
<b>755</b>	5 Riñones/5 con congestión/100 %	17
<b>Control (DMSO)</b>	6 Riñones/6 con congestión/100 %	19

No hay valores con diferencia estadística significativa con respecto al control

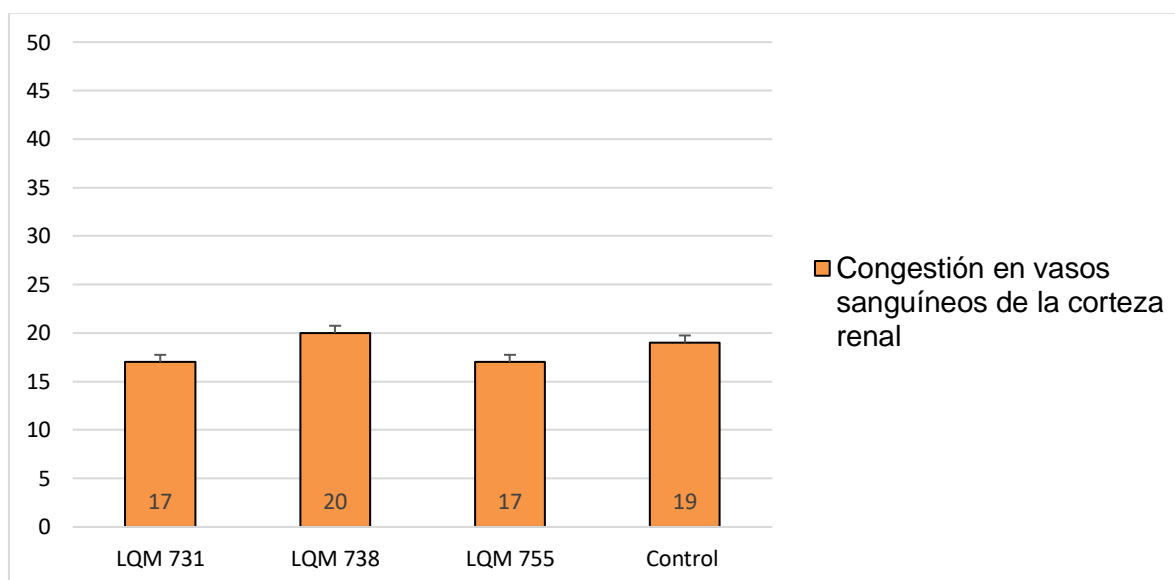


Figura 16. Comparación de la congestión observada en vasos sanguíneos de la corteza renal de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's

**Tabla 18. Prueba de hipótesis con desviación estándar conocida (de 2 colas) para descartar diferencias significativas entre la congestión de vasos sanguíneos de la corteza renal de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's y el control**

<b>LQM</b>	<b>Número de congestiones totales por LQM</b>	<b>M: 19</b>	<b><math>\alpha</math>: 0.05</b>
<b>731</b>	17	<b><math>\bar{x}</math>: 18</b>	<b>gl: 2</b>
<b>738</b>	20	<b>S: 1.73</b>	<b>Z calculada: -1</b>
<b>755</b>	17	<b>n: 3</b>	<b>Z critica: -1.96 y 1.96</b>
<b>Control</b>	19		

H0: Se descarta diferencia significativa entre la congestión total inducida por LQM's y el control

H1: Se encuentra diferencia significativa entre la congestión total inducida por LQM's y el control

Se descarta H0 si  $Z$  calculada  $< -1.96$  o  $Z$  calculada  $> 1.96$

Nota: en donde "M: media poblacional,  $\bar{x}$ : media muestral, S: desviación estándar, n: número de datos,  $\alpha$ : grado de significancia, gl: grados de libertad"

No hay valores con diferencia estadística significativa con respecto al control



**Tabla 19. Evaluación de histopatología renal (infiltración)**

LQM	Número de órganos analizados en 153938.4 micrómetros/Frecuencia (%)	Infiltración en corteza perivascular
<b>731</b>	4 Riñones/4 con congestión/100 %	10*
<b>738</b>	8 Riñones/8 con congestión/100 %	12*
<b>755</b>	5 Riñones/5 con congestión/100 %	10*
<b>Control (DMSO)</b>	6 Riñones/6 con congestión/100 %	9

\*Valor analizado con diferencia estadística significativa con respecto al lote control

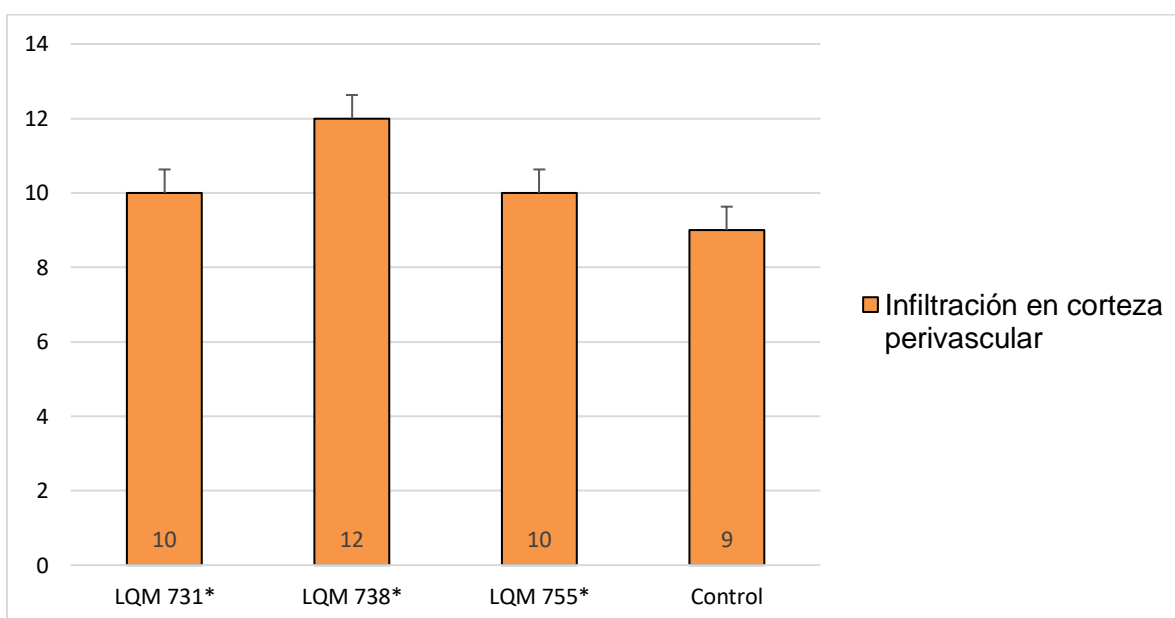


Figura 17. Comparación de la infiltración observada en la corteza perivascular renal de ratón inducido por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's

**Tabla 20. Prueba de hipótesis con desviación estándar conocida (de 2 colas) para descartar diferencias significativas entre la infiltración en corteza perivascular en riñón de ratón inducida por el tratamiento subcrónico con LQM's 700's y el control**

LQM	Número de infiltraciones totales por LQM	M: 9	$\alpha$ : 0.05
731	10*	$\bar{x}$ : 10.6	gl: 2
738	12*	S: 1.15	Z calculada: 2.4
755	10*	n: 3	Z critica: -1.96 y 1.96
Control	9		

H0: Se descarta diferencia significativa entre el número de infiltraciones inducidas por LQM's y el control

H1: Se encuentra diferencia significativa entre el número de infiltraciones inducidas por LQM's y el control

Se descarta H0 si Z calculada < -1.96 o Z calculada > 1.96

Nota: en donde "M: media poblacional,  $\bar{x}$ : media muestral, S: desviación estándar, n: número de datos,  $\alpha$ : grado de significancia, gl: grados de libertad"

\*Valor analizado con diferencia estadística significativa con respecto al lote control

## DISCUSIÓN

Este estudio permite poner en manifiesto las lesiones a los tejidos expuestos mediante la observación histológica. El estudio histológico estaba planeado para realizar múltiples observaciones por órgano obtenido, obteniendo así un riñón y el hígado por sujeto de experimentación, dentro de las seis semanas de administración de los compuestos LQM's se obtuvieron varias muertes, por lo que al ser un estudio subcrónico se decidió solo evaluar aquellos sujetos de prueba que llegaron a las seis semanas de administración. Se obtuvieron diferentes números de hígados y riñones para analizar cada compuesto administrado (Tabla 9), los cuales se separaron por grupos a la hora de la preparación histológica, teniendo todos los hígados tratados con el compuesto 731 en una sola laminilla, 738 en una sola laminilla y 755 en una sola laminilla, además de una copia de los cortes obtenidos en otra laminilla, de esta manera se trabajó para los distintos compuestos y los tipos de órganos (riñón e hígado), es decir, se realizaron dos cortes por órgano los cuales se colocaron en laminillas diferentes (Tabla 10). Esta disposición permito una evaluación histológica haciendo un doble ciego, el primero de ellos permitió evaluar cada laminilla sin saber de qué compuesto se trataba hasta terminar la evaluación histológica y comparar el número de identificación de la laminilla con la lista de cotejo. El segundo ciego consistió en homogenizar todas las muestras (órganos) que se les administró el mismo compuesto en una sola laminilla, debido a que todos los órganos tienen los mismos componentes estructurales pero diferente número de ellos, dicho de otra manera, no todos los hígados tienen el mismo número de espacios porta. De esta forma la histología se evaluó contando 10 campos confluentes cubriendo un área de 153938.4 micrómetros por laminilla (Tablas 11, 14, 17 y 19).

De los parámetros que se tenían previsto evaluar sólo fue posible evaluar congestión y filtración debido a que no se encontraron hallazgos para evaluar todos los parámetros.

En la Tabla 11 se observa el número de congestiones halladas en vasos de diferente calibre dentro del hígado, al comparar la respuesta que tiene en diferentes tipos de calibres de venas se observa que el LQM 755 presenta mayor actividad en venas de calibre mediano y el LQM 738 en venas de calibre pequeño dejando ver que el LQM 731 es el que presenta menor actividad provocando una congestión total menor (Figura 12), se observa que el número de congestiones totales es mayor para el compuesto 738, las congestiones provocadas puede ser debido a que estos compuestos debilitan las paredes de las venas y dañan las válvulas lo que provoca que las venas permanezcan llenas de sangre (Madrigal S. et al, 2000), En contraste con el lote control se observa que la actividad es menor y que esta diferencia es más marcada al graficar la sumatoria total de congestiones en hígado por cada compuesto administrado (Figura 13). Para descartar la diferencia estadística significativa de la congestión total inducida por los LQM's con respecto al control a estos datos se les realizó la prueba de hipótesis con desviación estándar conocida de dos colas, en donde se demostró que sí hay una diferencia estadística significativa para valores obtenidos de los LQM's con respecto al control (Tabla 12), al analizar las frecuencias de cada laminilla se observó que el número de órganos que presentaron congestión en la laminilla del control sólo representa un 67 % en contraste con el 100 % de frecuencia para los compuestos LQM's, quiere decir que si se analizaron 8 hígados para el compuesto 738, los 8 hígados presentaban congestión en contraste con el control, que se analizaron 6 hígados pero solo 4 tenían congestión, es por esta razón que se realizó una comparación de frecuencias por medio de la prueba

de chi cuadrada de homogeneidad para descartar si el daño total mostrado en cada laminilla depende del compuesto o depende del número de órganos analizados que es menor (Tabla 13). Por medio de esta prueba se demostró que el número de congestiones encontradas no dependen del número de hígados analizados, por lo que el número de congestiones encontradas sí dependen de la toxicidad del compuesto. Con resultado se perfila a los compuestos 731, 755 y 738 cómo compuestos que pueden provocar daño a nivel de vasos sanguíneos en células no tumorales de hígado con una administración subcrónica, teniendo mayor actividad citotóxica en vasos de calibre mediano.

En la Tabla 14 se presenta el número de infiltraciones halladas en diferentes estructuras del hígado, se observó que el número de infiltraciones totales es mayor en el compuesto 738 además de presentar un mayor número de infiltraciones en el espacio porta, es importante resaltar que los tres compuestos centran su actividad en este mismo espacio (Figura 14), esto puede ser debido a que los compuestos tiene mayor actividad dentro del tejido conectivo del espacio porta constituido por una triada que contienen una rama de la arteria hepática, una rama de la vena porta y un conductillo biliar (Molist G y Pombal D 2013a), formando agregados de PMN. Al comparar la actividad entre compuestos se observó que el compuesto 731 presenta una menor actividad. En contraste con el lote control se observa que la actividad es similar de los compuestos 731 y 755, siendo el compuesto 738 el único que tiene valores alejados del control (Figura 15). Para descartar la diferencia estadística significativa entre el número de infiltraciones totales inducida por los LQM's y el control a estos datos se les aplicó la prueba de hipótesis con desviación estándar conocida de dos colas, en donde se demostró que no hay una diferencia significativa entre los datos observado de los LQM's y el control (Tabla 15). Al analizar

las frecuencias de cada laminilla se encontró que todas eran diferentes, esto es debido a que no todos los órganos analizados para cada compuesto presentaban daño, por lo que los resultados del número de filtraciones totales puede depender del número de órganos con daño analizados, como ejemplo se tiene al compuesto 738 que de 8 hígados sólo 6 presentaban infiltración, y al control que de 6 hígados analizados sólo 2 presentaban infiltración. Es por esta razón que se realizó una prueba de comparación de frecuencias llamada prueba de chi cuadrada de homogeneidad para descartar si el daño total mostrado en cada laminilla depende del compuesto o no se observa daño debido a que el número de órganos analizados es diferente (Tabla 16). Por medio de esta prueba se demostró que el número de infiltraciones encontradas no dependen del número de hígados analizados, por lo que el número de infiltraciones encontradas sí dependen de la toxicidad del compuesto. A partir de estos datos se puede decir que los compuestos 731, 755 y 738 con respecto del control no presentan diferencia estadística significativa tomando en cuenta el número de infiltraciones totales, lo cual indica que la actividad encontrada es debido a procesos independientes de los compuestos o no es suficiente para nombrar una actividad citotóxica que provoque infiltración en hígado.

En la Tabla 17 se presenta el número de congestiones halladas en vasos sanguíneos de la corteza renal, al comparar la actividad entre compuestos se observa que el compuesto 738 presenta una mayor actividad, si se compara con el lote control se observa que la actividad es similar, además el compuesto 731 y 755 presentaron una actividad menor comparada con la actividad del control (Figura 16). Al obtener valores por debajo del control es necesario descartar diferencia estadística significativa entre el número de congestiones inducidas por los LQM's y el control ya que esto se puede relacionar a que

el compuesto DMSO esté presentando una actividad citotóxica mayor que los compuestos LQM's o se trate de un hallazgo no relacionado con la actividad citotóxica inducida. Se realizó la prueba de hipótesis con desviación estándar conocida de dos colas, en donde se demostró que no hay una diferencia estadística significativa entre los datos observados de los LQM's y el control (Tabla 18). Al analizar las frecuencias de las laminillas se encontró que todas tienen un 100% indicando que si hay cuatro riñones para analizar los cuatro presentan congestión por lo que no fue necesario realizar la prueba de chi cuadrada de homogeneidad. Estos resultados indican que la acumulación excesiva de eritrocitos en esos vasos sanguíneos no depende de la actividad citotóxica de los compuestos.

En la Tabla 19 se presenta el número de infiltraciones halladas en la corteza perivascular de riñón de ratón. Al comparar la actividad entre compuestos se observa que el 738 presenta una mayor actividad en contraste con los otros lotes, siendo el lote control el que menor actividad presenta (Figura 17). Para descartar la diferencia estadística significativa entre el número de infiltraciones inducida por los LQM's y el control a estos datos se les realizó la prueba de hipótesis con desviación estándar conocida de dos colas, en donde se demostró que sí hay una diferencia significativa en relación al lote control (Tabla 20). Se perfila a los compuestos 731, 755 y 738 cómo compuestos que pueden provocar agregados de PMN en corteza perivascular de células no tumorales de riñón con una administración subcrónica de seis semanas, destacando, que los valores observados de los LQM no se alejan del valor observado del control, teniendo en conjunto una Z calculada que sobresale de los valores de Z crítica por muy poco pero lo suficiente para nombrar una actividad citotóxica que induce infiltración en células renales, esto

posiblemente ocurrió debido a que la administración subcrónica de seis semanas no fue tiempo suficiente para que los compuestos presentaran mayor actividad o simplemente su capacidad de provocar agregados de PMN no dista de la capacidad del DMSO (control) para provocar estos mismos.

Entonces, con el estudio realizado y la información de los estudios anteriores a este, podemos decir que el LQM 738 se presenta como un compuesto con actividad citotóxica cuando se administra en un tiempo de seis semanas a una dosis de 15 mg/kg, provocando ruptura de los vasos sanguíneos de calibre mediano en hígado de ratón además de provocar agregados de PMN en corteza perivascular de riñón de ratón. Teniendo en cuenta los resultados del ensayo cometa (Cruz L, 2014) y la técnica de micronúcleos (Gutiérrez S, 2015), podemos decir que este compuesto no tiene actividad genotóxica a una dosis de 20 mg/kg, presenta una actividad genotóxica menor comparada con los otros dos compuestos a una dosis de 15 mg/kg (Gutiérrez S, 2015), presenta cualidades de quimio-protector reduciendo el daño por MMC en un 88 % en hígado de ratón y 57 % en riñón a una dosis de 20 mg/kg (Cruz L, 2014). En relación con en el presente trabajo el compuesto tiene mayor actividad citotóxica comparada con el LQM 731 Y 755 a una dosis de 15 mg/kg induciendo congestión en vasos de calibre mediano del hígado de ratón e infiltración en corteza perivascular de riñón de ratón en contraste con el trabajo de micronúcleos en donde no presenta actividad citotóxica en leucocitos de ratón (Gutiérrez S, 2015). Tomando en cuenta todos los estudios anteriores se postula como el compuesto con mayor actividad citotóxica pero menor actividad genotóxica y mejor compuesto quimio-protector.



El compuesto 731 se presenta como un compuesto con actividad citotóxica que provoca menor congestión (hígado) en comparación con los otros dos compuestos y agregados de PMN (riñón) en menor cantidad que el 738 pero igual al 755. Tomando en cuenta los estudios relacionados a este compuesto cómo el ensayo cometa el cual demostró que tiene un efecto antígenotóxico en células de hígado y riñón de ratón a una dosis de 20 mg/kg, pero que en una dosis de 40 mg/kg reduce su potencial antígenotóxico a las 18 horas (Hernández M, 2013), el modelo de lesiones preneoplásicas en el cual se perfiló como un compuesto quimio-protector y proapoptótico a una concentración de 20 mg/kg (Martínez R, 2014) y el estudio de micronúcleos en donde se perfiló como el compuesto con mayor actividad genotóxica pero sin actividad citotóxica en leucocitos de ratón (Gutiérrez S, 2015), se puede decir que es el compuesto con mayor actividad genotóxica de los tres pero menor actividad citotóxica siendo esta observada por medio de las lesiones en venas de calibre mediano del hígado de ratón y agregados de PMN en la corteza perivascular del riñón en contraste con la actividad citotóxica en leucocitos.

El compuesto 755 se presenta como un compuesto con actividad citotóxica media entre los otros dos compuestos, induciendo el mismo número de infiltración en corteza perivascular que el compuesto 731 y mostrar un número medio de congestiones totales entre el compuesto 731 y 738 a una dosis de 15 mg/kg en contraste con el estudio de micronúcleos en donde no se encontró actividad citotóxica en leucocitos de ratón. Con lo que respecta a este compuesto los estudios relacionados han demostrado su actividad quimio-protectora a una dosis de 20 mg/kg (Aguilar R, 2014) y por medio de la prueba de micronúcleos su actividad genotóxica presente sólo hasta la tercer semana del estudio subcrónico a una concentración de 15 mg/kg (Gutiérrez S, 2015). Con estos datos este

compuesto se perfila como el que presenta una actividad citotóxica y genotóxica media comparada con los otros dos compuestos, además de resaltar que su actividad genotóxica es mayor que la del compuesto 738 pero sólo en estudios subcrónicos (Gutiérrez S, 2015).

## **CONCLUSIONES**

Se determinó mediante evaluación histológica que los compuestos LQM 731, LQM 738 y LQM 755 tienen actividad citotóxica induciendo congestión en venas de calibre pequeño, mediano y grande en hígado e induciendo infiltración de PMN en corteza perivascular de riñón mediante un estudio subcrónico en ratones machos CD 1 con una dosis de 15 mg/kg.

El compuesto 738 presenta mayor actividad citotóxica induciendo congestión en hígado e induciendo infiltración en riñón de ratón.

El compuesto 755 presenta mayor actividad citotóxica induciendo congestión en venas de calibre mediano de hígado de ratón.

El compuesto 731 presenta la menor actividad citotóxica induciendo congestión en hígado de ratón.

Los compuesto 755 y 731 presentan actividad citotóxica similar induciendo el mismo número de infiltración en corteza perivascular de riñón de ratón.

La actividad citotóxica en hígado y riñón es contrastada con la actividad citotóxica de la prueba de micronúcleos demostrando que los compuestos inducen lesiones en hígado y riñón pero no en leucocitos, estos resultados no establecen un daño significativo a las estructuras morfológicas de estos órganos debido a que los compuestos LQM solo inducen dos tipos de lesiones que son infiltración y congestión, esto permite continuar con su perfilación como fármacos inocuos para la salud y quimio-protectores.

## **PROSPECTIVAS**

Evaluar el daño histológico en un estudio crónico que los compuestos de la serie LQM 700's puedan causar en diferentes órganos incluyendo hígado y riñón de ratón para observar si el número y tipo de lesiones aumentan con esta misma dosis.

Realizar otras pruebas con la dosis de 15 mg/kg para determinar si es factible disminuir la dosis y asegurarnos que esa dosis siga teniendo un efecto terapéutico.

Determinar los posibles metabolitos citotóxicos resultantes del metabolismo de los compuestos en pruebas de citotoxicidad *in vivo*.

## REFERENCIAS

Aguilar Ramos Lizzeth (2014) Evaluación del efecto genotóxico y antigenotóxico del análogo del éster feniletílico derivado del ácido cafeico lqm 755 mediante electroforesis unicelular en ratones CD1. Tesis de Licenciatura BQD, FES-Cuautitlán-UNAM.

Aldaco Fernando, Pérez Perla, Cervantes Guadalupe, Torrecillas Laura, Erazo Aura (2012) Cancer mortality in Mexico 2000-2010: the counting of the damages, Gaceta Mexicana de Oncología, Vol. 11. Núm. 6. páginas 371-379

Altuğ M, Serarslan Y Bal R, Kontaş T, Ekici F, Melek IM, Aslan H, Duman T. (2008) Caffeic acid phenethyl ester protects rabbit brains against permanent focal ischemia by antioxidant action: A biochemical and planimetric study. Brain Res. 1201, 135 - 145.

Amorati R., Pedulli G, Cabrini L, Zambonin L, Landi L. (2006) Solvent and pH Effects on the Antioxidant Activity of Caffeic and Other Phenolic Acids. J. Agric. Food Chem. 54, 2932-2937

Anand P, Kunnumakkara AB, Sundaram C, Harikumar KB, Tharakan ST, Lai OS, Sung B, Aggarwal BB. (2008). Cancer is a preventable disease that requires major lifestyle changes. Pharm Res 25 (9): 209.

Bello José. (2001) Fundamentos de Ciencia Toxicológica. España: Ediciones Díaz de Santos, Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en: <https://www.editdiazdesantos.com/wwwdat/pdf/9788479784720.pdf>

Beltrán Ramírez Olga, Hernández Martínez Javier, Sierra Santoyo Adolfo, Villa Treviño Saúl (2006) Mecanismo de quimiopreención del éster feniletílico del ácido cafeico (CAPE) en la iniciación de un modelo de hepatocarcinogénesis: alteración de los cyp450, Departamento de Biología Celular, CINVESTAV-IPN, México, DF, 2° Congreso Nacional de Química Médica

Beltrán Ramírez Olga, Rivas Martínez María Isabel, Bruno Carrasco Gloria, Villa Treviño Saúl (2011) Efecto preventivo del CAPE en el desarrollo de carcinoma hepatocélular en ratas Rev Hosp Jua Oncología Mex; 78(4): 219-224

Biblioteca virtual de desarrollo sostenible y salud ambiental (2015), Medición y valoración de los efectos adversos a la salud, Organización panamericana de la salud, 4 -8, 4-11, Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en: <http://www.bvsde.paho.org/bvsacd/scan/037675/037675-05-B.pdf>

Boerjan Wout, Ralph John, Baucher Marie (2003). Ligninbiosynthesis. Annual Review of Plant Biology 54: 519–46

Bray F, Jemal A, Grey N, Ferlay J, Forman D (2012) Global cancer transitions according to the Human Development Index (2008-2030): a population-based study. *The Lancet*.

Bruce C. Campbell, Jong H. Kim (2006) Nuts'New Aflatoxin Fighter: Caffeic Acid Western Regional Research Center, *AgResearch Magazine*.

Caffeic Acid (1993) IARC Summary & Evaluation, Volume 56, Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
<http://www.inchem.org/documents/iarc/vol56/03-caff.html>

Camargo Bohorquez Constanza, Wiesner Ceballos Carolina, Díaz Cuspoca Martha, Tovar Murillo Sandra. (2004) *El Cáncer. Aspectos básicos sobre su biología, clínica, prevención, diagnóstico y tratamiento.*, Ministerio de Protección Social. Instituto Nacional de Cancerología. República de Colombia. Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
<https://www.minsalud.gov.co/salud/publica/PENT/Paginas/Prevenciondel-cancer.aspx>

Chen Jian Hong, Chi-Tang Ho (1997) Antioxidant activities of caffeic acid and its related hydroxycinnamic acid compounds. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2374-2378.

Comisión de Salud Pública de Consejo Interterritorial del Sistema Nacional de Salud España (2003) *Agentes citostáticos, Protocolos de vigilancia sanitaria específica.* Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
<http://www.msssi.gob.es/ciudadanos/saludAmbLaboral/docs/Agentescitostaticos.pdf>

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.

Estol L, Dugas R (1998) *Normas para la cirugía en animales de experimentación, CCPA, Manual vol 1, 2<sup>da</sup> edición,* Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
<http://www.fcv.unl.edu.ar/comite/ManualesobreeelcuidadoyusodeanimalesdeexperimentacionConsejo%20Canadiense.pdf>

Fernández Piqueras (2008) *Los microRNAs como genes de susceptibilidad en cáncer.* Curso de Genética Humana. Sociedad Española de Genética, Valencia 24-26, Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
[http://www.segenetica.es/curso\\_g\\_humana/FERNANDEZ\\_PIQUERAS\\_JOSE.PDF](http://www.segenetica.es/curso_g_humana/FERNANDEZ_PIQUERAS_JOSE.PDF)

Gámez Rafael, Más Rosa (2007) *Reseña analítica de "Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados"* *Revista CENIC. Ciencias Biológicas,* 38(3), pp. 204-208.

Garrido J, Gaspar A, Garrido EM, Miri R, Tavakkoli M, Pourali S, Saso L, Borges F, Firuzi O (2012) Alkyl esters of hydroxycinnamic acids with improved antioxidant activity and lipophilicity protect PC12 cells against oxidative stress. *Bichemie* 94 961-967.

Gonthier M, Verny M, Besson C, Rémésy C, Scalbert A (2003). Chlorogenic acid bioavailability largely depends on its metabolism by the gut microflora in rats. *Journal of Nutrition* 133 (6): 1853–1859.

Gutiérrez Sánchez María (2015) Estudio clastogénico mediante la técnica de micronúcleos y toxicidad subcrónica de los compuestos lqm 700s en ratones de la cepa cd. Tesis de licenciatura BQD, FES Cuautitlán-UNAM.

Hernández González Rafael, Tena Betancourt Carlos, Tena Betancourt Eduardo, García C. Ramón (2001) Manual de prácticas de: práctica de medicina y zootecnia de animales de laboratorio, anexo UNAM-INCMN-SZ-FMVZ Depto. Etología, Fauna Silvestre y Animales de Laboratorio (DEFSAL), Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en: <http://www.fmvz.unam.mx/fmvz/licenciatura/coepa/archivos/Manuales/>

Hernández J, Goycoolea F, Quintero J, Acosta A, Castañeda C, Domínguez Z, Robles R, Vazquez Moreno L, Velazquez F, Astiazaran H, Lugo E, Velazquez C (2007) Chemical composition and antiproliferative activity on cancer cell lines. *Planta Med.* 73:14 1469-1474.

Hernández Menéndez Maite, Hernández Ríos María de los Ángeles (1999) Oncogenes y cáncer. Instituto Nacional de Oncología y Radiobiología. *Rev Cubana Oncol*; 15(2):131-9, Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en: [http://bvs.sld.cu/revistas/onc/vol15\\_2\\_99/onc09299.pdf](http://bvs.sld.cu/revistas/onc/vol15_2_99/onc09299.pdf)

Hernández M. (2013) Evaluación del efecto antígenotóxico del compuesto LQM 731, análogo del éster feniletílico del ácido cafeico (CAPE), mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa). Tesis de Licenciatura QFB, FES-Cuautitlán-UNAM.

Hirose M, Takesada H, Tanaka H, Tamano S, Kato T, Shirai T. (1998). Carcinogenicity of antioxidants BHA, caffeic acid, sesamol, 4-methoxyphenol and catechol at low doses, either alone or in combination, and modulation of their effects in a rat medium-term multi-organ carcinogenesis model, 19(1), 207-12, Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9472713>

IARC, Agents Classified by the (Agencia Internacional de Investigación del Cáncer) (2015) Monographs Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsGroupOrder.pdf>

Jardon Xicotencatl Samantha. (2014) Estudio del efecto químico protector de la administración conjunta del CAPE y el análogo LQM 717 en un modelo de hepatocarcinogenesis química en rata, Tesis de maestría en Ciencias, FES Cuautitlán-UNAM.

Jiang Y, Xie M, Chen W, Talbot R, Maddox JF, Faraut T, Wu C, Muzny DM, Li Y, Zhang W, Stanton JA, Brauning R, Barris WC, Hourlier T, Aken BL, Searle SM, Adelson DL, Bian C, Cam GR, Chen Y, Cheng S, DeSilva U, Dixen K, Dong Y, Fan G, Franklin IR, Fu S, Fuentes Utrilla P, Guan R, Highland MA, Holder ME<sup>7</sup>, Huang G, Ingham AB, Jhangiani SN, Kalra D, Kovar CL, Lee SL, Liu W, Liu X, Lu C, Lv T, Mathew T, McWilliam S, Menzies M, Pan S, Robelin D, Servin B, Townley D, Wang W, Wei B, White SN, Yang X, Ye C, Yue Y, Zeng P, Zhou Q, Hansen JB, Kristiansen K, Gibbs RA, Flicek P, Warkup CC, Jones HE, Oddy VH, Nicholas FW, McEwan JC, Kijas JW, Wang J, Worley KC, Archibald AL, Cockett N, Xu X, Wang W, Dalrymple BP. (2014). The Sheep Genome Illuminates Biology of the Rumen and Lipid Metabolism. *Science*. 344(6188): 1168 –1173

López Abente G, Pollán M, Aragonés N, Pérez Gómez B, Hernández Barrera V, López V (2004) Situación del cáncer en España: incidencia. *Anales Sis San Navarra*, vol.27, n.2, pp. 165-173 Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en: [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S113766272004000300001&script=sci\\_abstract&lng=e](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S113766272004000300001&script=sci_abstract&lng=e)

Lv J, Duan J, Shen B, Yin Y. (2013) Caffeic Acid Esters from *Artemisia argyi* and their Antioxidant activities. *Chem. Nat. Compd.* 49:1 8-11.

Madrigal S, Rivero R, García B, Madrigal B (2000) Evaluación Histológica del Hígado de ratas tratadas con una combinación de metil-terbutil éter y acetato de plomo, *Bioquímica*, vol 25, num 3 , Sociedad Mexicana de Bioquímica A C, México D.F Pp 84-88

Macías Pérez JR, Beltrán Ramírez O, Vásquez Garzón VR, Salcido Neyoy ME, Martínez Soriano PA, Ruiz Sánchez MB, Ángeles E, Villa Treviño S. (2013) The effect of caffeic acid phenethyl ester analogues in modifies resistant hepatocyte model. *Anticancer Drugs*. Apr; 24(4):394-405

Martínez Mora Omar (2013): Síntesis de derivados tipo éster de ácido cafeico y estudio de su comportamiento electroquímico en medios apróticos, Laboratorio de Físicoquímica y Productos Naturales de la Unidad de Servicios de Apoyo en Resolución Analítica (SARA) de la Tesis de Licenciatura, Universidad Veracruzana Xalapa, Veracruz, 6-9.

Martínez R. Mariana Lucía (2014) Estudio anatomopatológico del efecto de LQM 731 (derivado de CAPE) en un modelo de lesiones preneoplásicas. Tesis de Licenciatura BQD, FES-Cuautitlán-UNAM.

Massagué Joan. (2008) Hacia una comprensión del cáncer. *Fronteras del conocimiento*. Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:



[https://www.bbvaopenmind.com/wp-content/uploads/static/pdf/203217\\_JOAN\\_MASSAGUE\\_ESP\\_R.pdf](https://www.bbvaopenmind.com/wp-content/uploads/static/pdf/203217_JOAN_MASSAGUE_ESP_R.pdf)

Massagué Joan. (2009) Evolución y metástasis del cáncer. SEBBM 160, Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
<http://www.sebbm.com/pdf/160/d05160.pdf>

Medline (2015) Cáncer, Biblioteca Nacional de Medicina de los EE.UU. Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
<https://www.nlm.nih.gov/medlineplus/spanish/ency/article/001289.htm>

Menezes J., Kamat S.P., Cavaleiro J.A.S., Gaspar A., Garrido J., Borges F. (2011) Synthesis and antioxidant activity of long chain alkyl hydroxycinnamates. Eur. J. Med. Chem. 46 773-777.

Molist García Pilar, Pombal Diego Manuel Ángel (2011) ATLAS de HISTOLOGIA VEGETAL y ANIMAL ORGANOS ANIMALES, Tinciones generales, Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología Universidad de Vigo España. Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
<http://mmegias.webs.uvigo.es/descargas/tecnicas-tincion.pdf>

Molist García Pilar, Pombal Diego Manuel Ángel (2013a) Atlas de histología vegetal y animal órganos animales ´ sistema digestivo, Hígado, Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología Universidad de Vigo España. Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
<http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/digestivo-higado.php>

Molist García Pilar, Pombal Diego Manuel Ángel (2013b) Atlas de histología vegetal y animal órganos animales ´ sistema excretor, Riñón, Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología Universidad de Vigo España. Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
<http://mmegias.webs.uvigo.es/2-organos-a/imagenes-grandes/excretor-rinon.php>

Molist García Pilar, Pombal Diego Manuel Ángel (2015) ATLAS de HISTOLOGIA VEGETAL y ANIMAL ORGANOS ANIMALES, Tinciones generales, Depto. de Biología Funcional y Ciencias de la Salud, Facultad de Biología Universidad de Vigo España. Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
<http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/5-general.php>

Muñoz Alberto, Barbacid Mariano, Rosell Rafael (2004). Cáncer: genes y nuevas terapias. España: Hélice. Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
<https://books.google.com.mx/books?id=BVp7tv6lvIC&pg=PR22&dq=protooncogenes&hl=es&sa=X&ved=0CDUQ6AEwA2oVChMlocHqnqv2yAIVQu8mCh16mwyW#v=onepage&q=protooncogenes&f=false>

NOM-062-ZOO-1999 (2001) Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio, Diario oficial de la federación, 2001. Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
[https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999\\_220801.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/203498/NOM-062-ZOO-1999_220801.pdf)

Padrón Tello Olivia (2006) Evaluación histológica de órganos parenquimatosos procedentes de ratones albino, Tesis para obtener el título de médico veterinario, Universidad Veracruzana, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia

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.

Peppercorn Ma, Goldman P. (2003). Caffeic acid metabolism by gnotobiotic rats and their intestinal bacteria». Proceedings of the National Academy of Sciences 69 (6): 1413–1415.

Pérez Merino, Noriega Borge J. (2005) Crecimiento y diferenciación celular. Fisiología Celular. Universidad de Cantabria., Online, Última revisión 20, 11, 2019 disponible en:  
<http://ocw.unican.es/ciencias-de-la-salud/fisiologia-general/materiales-de-clase-1/tema-1.-introduccion-al-estudio-de-la-fisiologia/Tema%209-Bloque%201-Crecimiento%20Diferenciacion%20Celular.pdf>

Pubchem (2015a) Caffeic acid CID 689403 Online, Última revisión en 22, 11, 2015, disponible en:  
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281787#section=Related-Compounds-with-Annotation>

Pubchem (2015b) Caffeic acid Phenethyl ester CID 5281787 Online, Última revisión en 22, 11, 2015 disponible en:  
<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281787#section=Related-Compounds-with-Annotation>

Quintín Martín (2007) Tratamiento de datos con SPSS, editorial parainfo, España pp 100-104, 406

Rodríguez F, Jurado L, Reyes E. (2000) La proteólisis en la invasión y metástasis de la célula tumoral. Revista del Instituto Nacional de Cancerología, Vol. 46, Núm. 1, Pp 33-46. Online, Última revisión 2, 01, 16, disponible en:  
<http://www.medigraphic.com/pdfs/cancer/ca-2000/ca001f.pdf>

Roleira F, Siquet C, Orrú E, Garrido Manuel, Garrido J, Milhazes Nuno (2010) Lipophilic phenolic antioxidants: Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties. Bioorg. Med. Chem. (18) 5816-5825.

Rosenberg H. (2015) Aparato urinario y genitales masculinos, Pontífice universidad católica de chile, Online última actualización 20,11, 2015 disponible en: [http://escuela.med.puc.cl/publ/anatomiapatologica/05Genital\\_masc/5nefropatias\\_pri1.html](http://escuela.med.puc.cl/publ/anatomiapatologica/05Genital_masc/5nefropatias_pri1.html)

Ross Pawlina (2008) Histología, texto y atlas color con Biología Celular y Molecular, 5ta edición editorial Medica Panamericana Pp. 1-3

Ruiz M. (2012) Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de compuestos derivados del Éster Fenilético del Ácido Cafeico (CAPE), en diferentes líneas celulares de cáncer. Tesis de Licenciatura Q.I, FES Cuautitlán-UNAM.

Sato Y, Itagaki S, Kurokawa T, Ogura J, Kobayashi M, Hirano T, Sugawara M, Iseki K. (2011) *In vitro* and *in vivo* antioxidant properties of chlorogenic acid and caffeic acid. Int. J. Pharm. 403, 136-138

Shchors Ksenya, Evan Gerard. (2007) Tumor Angiogenesis: Cause or Consequence of Cancer? Cancer Res 2007; 67: (15). Online, Última revisión 20,11, 2015 disponible en: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/67/15/7059.full.pdf>

Stevens A, lowe J (2006) Histología Humana, tercera edición, editorial ELSEVIER Pp 1,3,4,15.

Tillan Capo Juana, Bueno Pavón Viviana, Menéndez Castillo Rosa, Carrillo Domínguez Carmen, Ortiz Infante Melba (2008) Toxicología subcrónica del extracto acuoso de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Rev Cubana Plant Med, vol.13, n.1, pp. 0-0. ISSN 1028-4796. Online, última actualización 10, 09,17 disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962008000100004&script=sci\\_arttext](http://scielo.sld.cu/scielo.php?pid=S1028-47962008000100004&script=sci_arttext)

UNAM (2019) Plan de estudios de la licenciatura Bioquímica Diagnóstica, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Online, Última revisión 20,11, 2019 disponible en: [http://www.cuautitlan.unam.mx/licenciaturas/bioquimica\\_diagnostica/plan\\_estudios.html](http://www.cuautitlan.unam.mx/licenciaturas/bioquimica_diagnostica/plan_estudios.html)

WHO (World Health Organization) (2015). Cancer Fact sheet N°297, Online, Última revisión 15, 11,2015, disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>