



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

Estudio del efecto quimioprotector del compuesto LQM 755 mediante
la prueba de células binucleadas micronucleadas en linfocitos
humanos

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA

PRESENTA

MARIA FERNANDA ORTIZ PADILLA

ASESORA

DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO

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
AVENIDA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MÉXICO

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



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

ATN: LA. 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 del efecto quimioprotector del compuesto LQM755 mediante la prueba de células binucleadas micronucleadas en linfocitos humanos.

Que presenta la pasante: María Fernanda Ortiz Padilla

Con número de cuenta: 310288172 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 16 de Enero de 2020.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dra. Dolores Molina Jasso	
SECRETARIO	Q.F.B. María Llasbeth Hernández Calderón	
1er. SUPLENTE	LBD. Rosa María de los Angeles López Cabrera	
2do. SUPLENTE	M. en C. Gabriel Arturo Lima Villeda	

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

La presente investigación se realizó gracias al apoyo del proyecto PAPIIME clave PE206518 *“Fortalecimiento de la Farmacogenómica en la FESC”* bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo por lo cual agradecemos este apoyo.

Agradecimientos

A la UNAM por brindarme la oportunidad de estudiar lo que siempre he querido, permitirme no solo hacerme de conocimientos literarios sino también en la vida.

A mi mamá, Alma Verónica, porque aunque no entendiera los temas relacionados a mi carrera, me apoyo y siempre fue un gran ejemplo de que cuando crees en algo, trabajas en ello, no importa que tan difícil parezca siempre das el 100%.

A mi hermana, también Alma Verónica, por ayudarme a relajarme y desestresarme siempre que regresaba cansada de la escuela, por ser mi confidente siempre y hacerme reír.

A la Dra Sandra, por aceptarme en su laboratorio, aguantarme tanto tiempo, darme la oportunidad de concluir este trabajo y ser un gran ejemplo para mí.

A mis sinodales, por ayudarme a mejorar este trabajo.

A mis amigos de la carrera, Karla, Diana, Larisa, Fernanda, Dani, por hacer los días en la universidad, y fuera de ella, más divertida, y me alegro mucho al saber que continuaremos la amistad fuera de ella.

A uno de los donadores de muestra de este trabajo, por ayudarme en todo lo que pudiste.

A todos mis conocidos que he hecho a lo largo de mi vida, ya sea que nos hayamos hecho amigos, o simplemente estuvieran en mi vida por un periodo de tiempo, sea como sea han tenido un gran impacto en mi vida y me han motivado.

A mí, para recordar siempre que puedo lograr lo que me propongo mientras que sea constante y perseverante.

Índice

1.	ABREVIATURAS.....	1
2.	ÍNDICE DE TABLAS.....	2
3.	ÍNDICE DE FIGURAS.....	2
4.	RESUMEN	3
5.	MARCO TEÓRICO	4
5.1	Cáncer.....	4
5.1.1	Generalidades y definición de cáncer	4
5.1.2	Epidemiología.....	5
5.1.3	Ciclo Celular	5
5.1.4	Carcinogénesis.....	7
5.1.5	Quimiopreención y Anticarcinogénesis.....	9
5.2	Propóleo	11
5.2.1	Generalidades	11
5.2.2	Propiedades farmacológicas y químicas del propóleo.....	11
5.2.3	Composición química del propóleo.....	11
5.4	Éster Fenetílico del Ácido Cafeico	13
5.4.1	Generalidades	13
5.4.2	Mecanismo de acción del CAPE	14
5.4.3	Relación Estructura-Actividad	15
5.4.4	Análogos del CAPE.....	15
5.5	Compuestos CAPA	17
5.5.1	Serie LQM 700	17
5.5.2	LQM 755	17
5.6	Prueba Células Binucleadas Micronucleadas o Bloqueo de la Citocinesis.....	19
5.6.1	Fundamento de la prueba de CB-MN.....	19
5.6.2	Micronúcleos.....	19
5.6.3	Criterios de selección de Micronúcleos	20
5.6.4	Agentes inductores de micronúcleos.....	21
6	JUSTIFICACIÓN.....	22
7	OBJETIVOS	22
7.1.	Objetivo General	22
7.2.	Objetivos Particulares	22
8	HIPÓTESIS	22

9	MATERIALES Y MÉTODOS	23
10.	RESULTADOS.....	27
11.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO	29
12.	DISCUSIÓN	31
13.	CONCLUSIONES	35
14.	PERSPECTIVAS.....	36
15.	REFERENCIAS	37

1. ABREVIATURAS

CAPA	Amida fenética del ácido caféico
CAPE	Éster fenético del ácido caféico
CB	Célula binucleada
CBT	Células binucleadas totales
CBMN	Célula binucleada micronucleada
CT	Células totales
CYP450	Citocromo p450
DNA	Ácido desoxirribonucleico
LQM	Laboratorio de Química Medicinal
MMC	Mitomicina C
MN	Micronúcleo
mRNA	RNA mensajero
NF- κ B	Factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas
PHA	Fitohemaglutinina
RNA	Ácido ribonucleico
SCGE	Electroforesis Unicelular en Gel



2. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Características generales de Iniciadores y Promotores de Neoplasia	9
Tabla 2 Tipos de propóleos más difundidos: origen vegetal y principales componentes	11
Tabla 3 Resumen de estudios <i>in vitro</i> del CAPE	14
Tabla 4 Esquema de adición de las soluciones empleadas en los cultivos de linfocitos	25
Tabla 5 Resultados de la actividad citotóxica y genotóxica del donador 1	28
Tabla 6 Resultados de la actividad citotóxica y genotóxica del donador 2	28

3. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Etapas del ciclo Celular	6
Figura 2 Puntos de control del ciclo celular	7
Figura 3 Cambios genéticos en la formación del cáncer	8
Figura 4 Anticancerígenos, cancerígenos y Agentes quimiopreventivos	10
Figura 5 Estructura química del CAPE	13
Figura 6 Estructura química del ácido caféico	13
Figura 7 Regiones del éster fenetílico del ácido caféico (CAPE)	15
Figura 8 Estructura del compuesto LQM 755	18
Figura 9 Factores que influyen en la frecuencia de micronúcleos	20
Figura 10 Ejemplos de células binucleadas micronucleadas que son válidas para el conteo	21
Figura 11 Serie de microfotografías tomadas a 40X con tinción de Giemsa	29
Figura 12 Resultados comparando los resultados de ambos donadores para la evaluación citotóxica	30
Figura 13 Resultados comparando los resultados de ambos donadores para la evaluación genotóxica	30
Figura 14 Resultados generales de citotoxicidad	31
Figura 15 Resultados generales de genotoxicidad	31
Figura 16. Síntesis de análogos de CAPE	33
Figura 17 Estructura química del compuesto LQM 755 denotando los cambios realizados en su estructura comparándolo con la estructura del CAPE	34
Figura 18 Síntesis de los análogos fluorados de CAPE	35



4. RESUMEN

En este trabajo se realizó el análisis de la actividad genotóxica y citotóxica, con y sin reto, del compuesto LQM 755, derivado amídico del CAPE, por medio de la técnica de células binucleadas micronucleadas en linfocitos humanos, las cuales fueron analizadas en tres concentraciones diferentes (15 µg/mL, 20 µg/mL y 25µg/mL) y con reto del mutágeno Mitomicina C (0.15µg/mL), para observar la actividad citoprotectora y antimutagénica que puede presentar el compuesto.

Se realizaron por duplicado los cultivos de linfocitos de dos donadores diferentes, uno de sexo masculino y uno femenino, ambos de 25 años, sin exposición a medicamentos, alcohol o tabaco. Estos cultivos fueron incubados a 37°C durante 72 horas, pero a las 24 horas se adicionó el mutágeno a los tubos correspondientes y a las 44 horas la Citocalasina B. La cosecha celular se realizó a las 72 horas, la cual consiste en un choque con una mezcla de solución isotónica: hipotónica (NaCl 0.09%: KCl 0.075M) (9:1), para luego fijarse con una solución de Etanol:Ac. Acético (6:1), se tiñeron con Giemsa durante 12 minutos para observarlo al microscopio a 40x y realizar el conteo celular determinando la cantidad de CB encontradas en 1000 células totales, y la cantidad de CBMN encontradas en 1000 células binucleadas por cultivo de cada donador.

Se descartaron las diferencias significativas entre los donadores con el programa Graphpad Prism v 8.1.2 para posteriormente evaluar los resultados en conjunto.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que el compuesto LQM 755 mostró ser citotóxico por el número de CB encontradas, las cuales fueron disminuyendo conforme se aumentó la concentración del compuesto. Los cultivos con LQM 755 y reto de MMC mostraron un efecto citoprotector de daño ya que el número de CB aumentó conforme se aumentó la concentración del compuesto, encontrando que a la concentración de 25 µg/mL no hay diferencia significativa con el control negativo.

Los resultados para la actividad genotóxica mostraron que el compuesto LQM 755 es genotóxico *per se*, pero en menor medida con respecto al control positivo MMC. En los cultivos con reto de MMC se encontró un efecto antigenotóxico al ir disminuyendo el número de CBMN

Se concluye de este ensayo *in vitro* que el compuesto LQM 755 se perfila como un posible anticancerígeno y que se deberían de continuar con las pruebas para poder validarlo como un fármaco efectivo.



5. MARCO TEÓRICO

5.1 Cáncer

5.1.1 Generalidades y definición de cáncer

El término “cáncer” es genérico y designa un amplio grupo de enfermedades que pueden afectar cualquier parte del cuerpo. El cáncer es un crecimiento tisular producido por la proliferación continua de células anormales con capacidad de invasión y destrucción de tejidos (Instituto Nacional de Cáncer, 2011).

Existen muchos tipos de cáncer, pues no es una sola enfermedad. El cáncer puede originarse en los pulmones, en el seno, en el colon o hasta en la sangre. Los diferentes tipos de cáncer tienen algunas similitudes, pero son diferentes en la manera en que crecen y se propagan.

Las células normales se dividen de manera ordenada. Éstas mueren cuando se han desgastado o se dañan, y nuevas células toman su lugar. El cáncer se origina cuando las células comienzan a crecer sin control. Las células del cáncer siguen creciendo y formando nuevas células que desplazan a las células normales. Esta continua división celular produce acumulaciones de células o bultos anómalos, que son los tumores.

Los tumores pueden ser benignos o malignos. Si el tumor es benigno, las células se multiplican de forma descontrolada, pero no se extienden a otras partes del organismo. Generalmente, los tumores benignos no ponen en peligro la vida, aunque si continúan creciendo, la presión puede terminar afectando a los órganos cercanos, por lo que suele ser necesario extirparlos. En cambio, si el tumor es maligno, las células que lo forman tienen capacidad para extenderse a otras áreas del organismo y también pueden crecer en estos órganos. Esta propagación es lo que se denomina metástasis (ACS, 2016).

Las células cancerosas también se pueden propagar a otras partes del cuerpo. Por ejemplo, las células cancerosas en el pulmón pueden viajar hasta los huesos y crecer ahí. La propagación de las células de cáncer se denomina metástasis. Cuando las células del cáncer de pulmón comienzan a crecer en los huesos, se sigue llamando cáncer de pulmón. Para los médicos, las células cancerosas en los huesos lucen justo como las que se originaron en el pulmón. La enfermedad no es referida como cáncer óseo (cáncer en los huesos) salvo que se haya originado en los huesos (ACS, 2016).



5.1.2 Epidemiología

En términos generales, a nivel mundial, el cáncer es una enfermedad que va en aumento y es considerada como una de las principales causas de muerte. Tan solo en el 2012, se registraron 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de personas fallecidas, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), en su informe mundial sobre el cáncer 2014. No obstante, en el 2018, se estima que la carga del cáncer ascendió a 18 millones de casos nuevos y 9.6 millones de muertes (Secretaría de Salud, 2019).

Debido a los cambios en el crecimiento poblacional y el envejecimiento, la OMS estima que para el 2030 los casos nuevos sobrepasarán los 20 millones anuales. Sin embargo, esos números podrían reducirse significativamente, ya que se calcula que entre el 30% y el 50% de los tipos de cáncer son prevenibles mediante la adopción de hábitos saludables, vacunación y diagnósticos y tratamientos oportunos (OMS, 2018)

En México la magnitud de los efectos del cáncer no es muy diferente al panorama mundial, pues es la tercera causa de muerte, después de las enfermedades cardiovasculares y la diabetes. Para los hombres, los tipos de cáncer con mayor índice de mortalidad son de próstata, de pulmón, colorrectal, de hígado y gástrico, en ese orden; mientras que para las mujeres son el de seno, cervicouterino, de hígado, colorrectal y ovario (Secretaría de salud, 2019)

5.1.3 Ciclo Celular

El ciclo celular (Figura 1) regula la división celular y es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto. Se distinguen varias fases: en la fase G₀ o de reposo las células permanecen sin dividirse, pero conservan la capacidad de reiniciar el ciclo para repoblar un tejido; en la fase G₁ de presíntesis, las células producen ARN y proteínas; en la fase S se replica el DNA; en la fase G₂ o de postsíntesis el núcleo se organiza para la división celular, que se produce en la fase M o de mitosis (Burgués et. al. 2005).



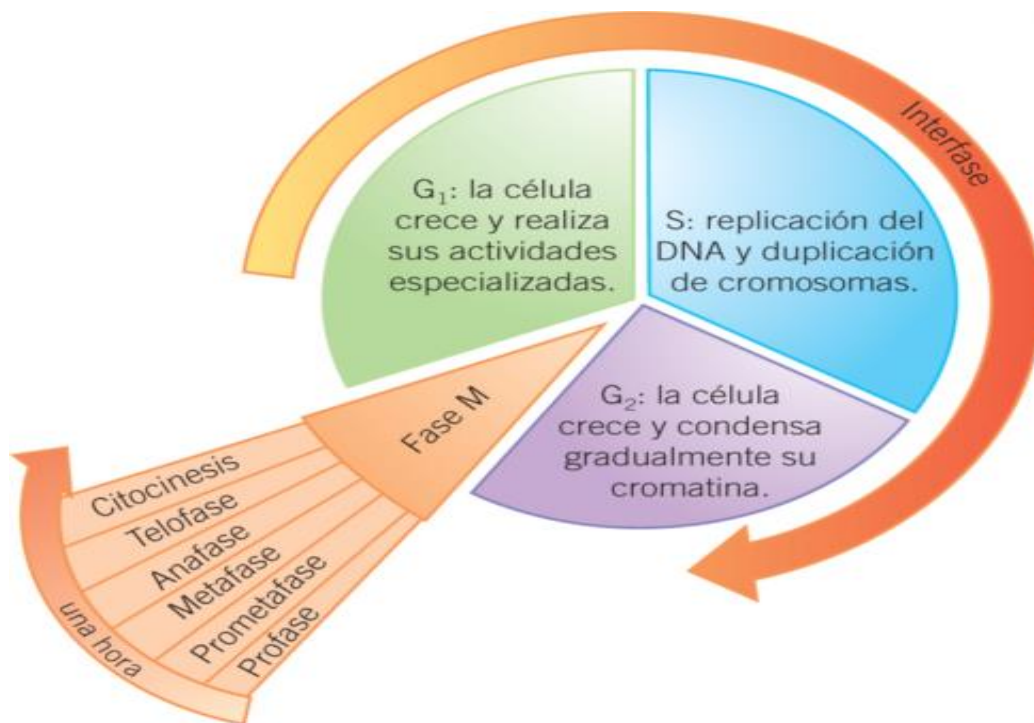


Figura 1. Etapas del ciclo celular. Modificado de Alcántar et. al. 2013

El ciclo completo dura desde 12 horas hasta meses o años. Mientras la mitosis tiene una duración constante de 1 hora, las células pueden permanecer “arrestadas” en G₀ durante años. Las moléculas reguladoras del ciclo celular son universales y están muy conservadas durante la evolución (Burgués et. al 2005).

Los puntos de control evitan la progresión del ciclo celular en presencia del DNA dañado, dando tiempo para que la reparación se produzca al mismo tiempo y se prevengan alteraciones genéticas capaces de propagarse en las generaciones posteriores. Consistentemente, los puntos de control proporcionan una barrera para el desarrollo del cáncer (Lagunas et. al. 2014).

En el punto de control G₁ la célula decide si se divide o no, una vez que la célula pasa el punto de control G₁ y entra a la fase S, se compromete a la división. En este punto la célula comprueba si las condiciones internas y externas son adecuadas para la división; algunos de los puntos que evalúa son el tamaño, nutrientes, señales moleculares y la integridad del DNA. Si hay algún problema en este punto de control la célula puede salir del ciclo celular y entrar a un estado de reposo llamado G₀, algunas células se quedan permanentemente en él, mientras que otras reanudan la división si mejoran las condiciones (Pickup, 2014).



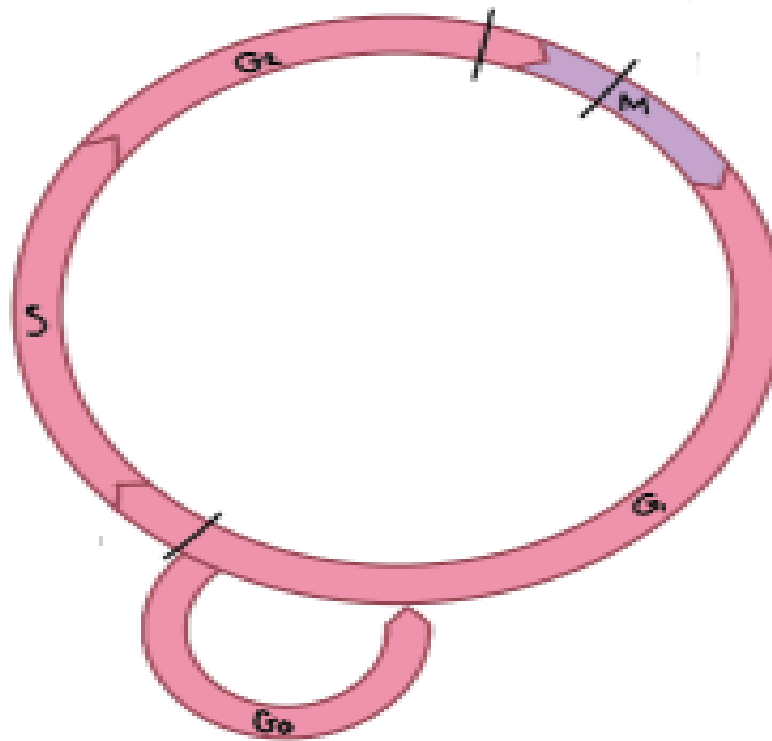


Figura 2. Puntos de control del ciclo celular. Modificado de Khan Academy.

Para asegurar que la división celular se realice sin problemas, la célula tiene un punto de control antes de la fase M, llamado punto de control G2, en esta etapa la célula comprueba la integridad del DNA y si fue replicado correctamente durante la fase S. Si se detectan daños la célula se detendrá brevemente para activar los mecanismos de reparación donde la célula intenta ya sea completar la replicación del DNA o repararlo, si el daño resulta ser irreversible la célula puede experimentar la muerte celular programada (Han et. al., 1995).

Las células cancerosas son diferentes de las normales en muchos aspectos, control en crecimiento, morfología, interacciones célula – célula y la expresión génica.

Hay dos clases de genes que juegan un papel principal en la inducción de cáncer: proto-oncogenes y los genes supresores de tumores. Los proto-oncogenes son genes que en condiciones normales ayudan a la célula a multiplicarse, pero cuando uno de estos muta o tiene demasiadas copias, se convierte en un oncogén (Alemán, 2015; Lodish et. al., 2000).

5.1.4 Carcinogénesis

Para que una célula normal cambie su fenotipo y se convierta en una célula neoplásica se requieren varias mutaciones en varios genes y eso ocurre a través de mucho tiempo, a veces de años, de estar expuesto a un agente carcinogénico (Martín, 2011).



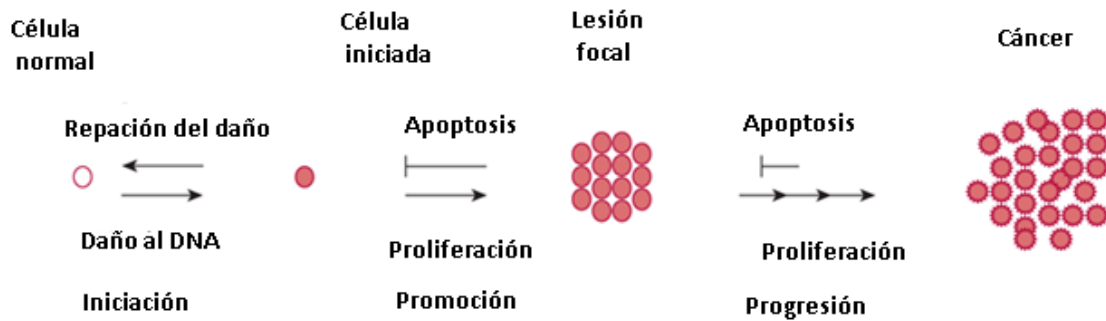


Figura 3. Cambios genéticos en la formación del cáncer. Modificado de Klaassen et. al., 2010

Los diversos cambios genéticos que nos llevan al cáncer pueden ser ordenados con fines didácticos en 3 pasos (Figura 3):

1. La iniciación.
2. La promoción.
3. La progresión.

INICIACIÓN

Es un fenómeno que se produce por la acción de un agente carcinogénico (o de uno de sus metabolitos) sobre determinado gen (usualmente uno), lo cual le confiere ventajas para la multiplicación y crecimiento celular. Esto facilita a la célula ser activada por agentes inductores de la promoción de la multiplicación celular.

Estas importantes primeras mutaciones son generalmente del tipo puntuales, deleciones, inserciones, translocaciones cromosómicas y amplificaciones.

En este sentido es importante el metabolismo que el organismo realice del agente carcinogénico, la capacidad de reparación del DNA de la célula dañada, así como también la tasa de multiplicación celular que normalmente tenía el tejido invadido (Grados, 2016).

PROMOCIÓN

Representa la etapa de crecimiento tisular con la formación del tumor. Participan: los factores de crecimiento y los receptores a los factores de crecimiento, como también la angiogénesis y degradación de las matrices extracelulares. Los factores de crecimiento (FC), son péptidos producidos por las mismas células o por las vecinas y actúan como facilitadores de la mitosis incorporando en fase S, a algunas células que se encuentran en fase G0 o G1 prolongada. Los FC se sintetizan en una célula y luego migran al espacio intercelular, ejerciendo sus acciones sobre las células vecinas (Cohen et.al 1991)

En la tabla 1 se muestra un resumen de las características de las etapas de iniciación y promoción de la neoplasia.



Tabla 1. Características generales de Iniciadores y Promotores de Neoplasia. Modificado de Haschek et. al. 2013.

Iniciadores / Iniciación	Promotores / Promoción
Irreversible	Reversible
La pura iniciación no resulta en neoplasia a menos que un promotor sea aplicado	Los agentes no son considerados carcinógenos si no co-carcinogenos
Solo con una exposición es suficiente	La exposición prolongada es requerida
Número de células iniciadas depende de la dosis	Modulado por la dieta, hormonas y ambiente
Producción de electrófilos y unión covalente al DNA	No hay producción de electrófilos ni unión covalente con el DNA

PROGRESIÓN

Implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia, por parte de la célula tumoral maligna. Esa capacidad está codificada también en los genes, con modificaciones estructurales y funcionales. Las células normales, se encuentran “ancladas” en un hábitat que les es propio. El contacto con las células vecinas controla su propia división celular y existen moléculas de adhesión que las mantienen próximas y permiten la transmisión de señales de una a otra; las células normales son incapaces de atravesar la membrana basal que las separa del tejido conjuntivo sub-basal de donde obtiene los materiales que las nutren; tampoco tienen capacidad de introducirse a los capilares sanguíneos o linfáticos, aunque los linfocitos, hacen excepción a esta particularidad (Martin, 2011).

5.1.5 Quimioprevención y Anticarcinogénesis

La quimioprevención involucra la utilización de agentes químicos naturales o sintéticos para corregir, suprimir o impedir el proceso carcinogénico, evitando así el desarrollo de una neoplasia maligna invasora (Yuli et. al. 2008).

Los antineoplásicos útiles en clínica poseen mayor citotoxicidad contra los tejidos cancerosos que contra las células normales del sujeto que sufre cáncer, en otras palabras, muestran toxicidad selectiva, lo cual es posible gracias a las diferencias metabólicas entre las células malignas y las normales. Casi todas las diferencias cuantitativas entre las células normales y las cancerosas dependen de vías bioquímicas, procesos de transporte y mecanismos de reparación de DNA (Bevan, 1982).

Aunque los agentes anticarcinogénicos y carcinógenos son vistos como opuestos, estos dos agentes tienen ciertas similitudes, por ejemplo, aunque los agentes alquilantes son carcinogénicos como la metilnitrosurea o dietilnitrosamina, también hay fármacos anticancerígenos como Ciclofosfamida, cloroambucil y carbopatin. Otro ejemplo es la



radiación, que es tanto carcinógeno como efectivo en la terapia anticancerígena, como lo es el yodo radioactivo que causa cáncer de tiroides y al mismo tiempo es la terapia más efectiva para este mismo pues retiene la habilidad de acumular yodo (Blagosklonny, 2005).

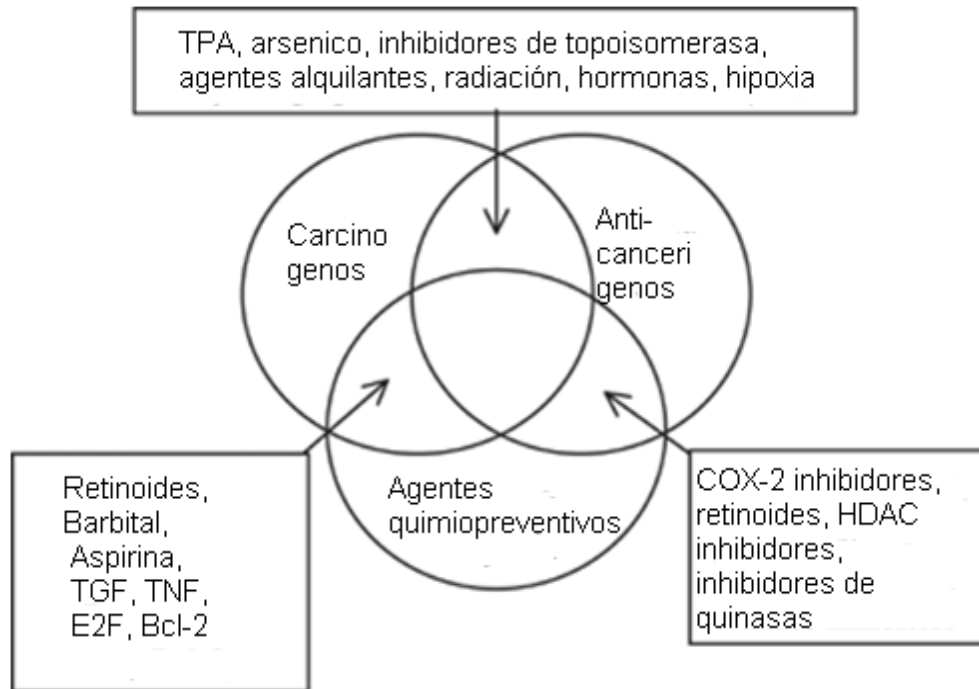


Figura 4. Anticancerígenos, cancerígenos y agentes quimiopreventivos. Modificado de Blagosklonny, 2005

Los quimioprotectores se han detectado frecuentemente cuando se estudia el efecto de sustancias purificadas de extractos de productos naturales, a los cuales la medicina alternativa les ha atribuido propiedades terapéuticas. Este es el caso del propóleo y sus componentes (Farré et. al. 2004).



5.2 Propóleo

5.2.1 Generalidades

Esta sustancia es una resina de origen céreo, de composición compleja y consistencia viscosa que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales y que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena.

El propóleo no es solo un ingrediente para construcción, es el “arma química” más poderosa de las abejas contra microorganismos patógenos y se ha usado como remedio por los humanos desde tiempos antiguos (Wollenweber, et. al., 1990).

5.2.2 Propiedades farmacológicas y químicas del propoleo

Debido a su popularidad en la medicina tradicional, el propóleo ha sido objeto de varios estudios farmacológicos y químicos los cuales han probado la versatilidad de sus actividades farmacológicas: antibacterial, antifúngico, antiviral, antiinflamatorio, hepatoprotector, antioxidante, antitumorígeno, etc. (Bankova, 2005).

Las investigaciones realizadas en el campo de la química y la farmacología han permitido un uso más amplio y eficaz del propóleo en el mejoramiento de la salud humana, debido a su actividad biológica *sui generis* y por ser un compuesto natural capaz de comportarse como un producto vivo con posibilidades de establecer múltiples combinaciones sinérgicas (Álvarez, 2012).

El propóleo es una sustancia soluble en solventes orgánicos como: alcohol, benceno, acetona y éter; es un producto delicado, debe ser conservado en bolsas de polietileno, se conserva mejor congelado o a una temperatura de 15 °C, es susceptible a la polilla, lo cual disminuye su calidad. No debe refrigerarse porque permite el crecimiento de hongos que destruyen su valor comercial (Manrique, 2000).

5.2.3 Composición química del propóleo

Las características morfológicas y la composición química del propóleo son heterogéneas y varían según la región donde se localiza la colmena, las variedades vegetales que predominan alrededor de la colmena (Tabla 2) y las condiciones ambientales, por ello, su color puede variar del pardo rojizo al amarillo verdoso y oscurecerse al negro, dependiendo también de la edad (Flores, 2018).

Aunque la actividad biológica del propóleo siempre ha estado presente, en muestras de diferentes zonas geográficas y condiciones climáticas (Tabla 2), esta actividad fue el resultado



de una composición química totalmente diferente, por ello se han realizado diversos estudios para comparar la composición química del propóleo de lugares diferentes (Bankova, 2005).

Tabla 2 Tipos de propóleos más difundidos: origen vegetal y principales componentes. Tomado de Bankova, 2011.

TIPO DE PROPÓLEO	ORIGEN GEOGRÁFICO	FUENTE BOTÁNICA	CONSTITUYENTES MAYORITARIOS
ÁLAMO	Europa, Norteamérica, Regiones no tropicales de Asia, Nueva Zelanda	<i>Populus spp</i> , más a menudo <i>P. nigra</i>	Flavonas, flavononas, ácido cinámico y sus ésteres
VERDE BRASILEÑO (ALECRIM)	Brasil	<i>Bacaris spp</i> predominando <i>B. dracunculifolia DC.</i>	Ácidos cumáricos prenilados, ácidos diterpénicos
ABEDUL	Rusia	<i>Betula verrucosa</i>	Flavonas, flavononas diferentes a las del álamo.
PROPÓLEOS ROJOS	Cuba, México, Brasil,	<i>Dalbergia spp</i>	Isoflavonoides
MEDITERRÁNEOS	Sicilia, Grecia, Creta, Malta	<i>Cupressaceae</i>	Diterpenos
“CLUSIA”	Cuba, Venezuela	<i>Clussia spp</i>	Benzofenonas preniladas
“PACÍFICO”	Región del Pacífico, Okinawa, Taiwán, Indonesia	<i>Macaranga tanarius</i>	C- Prenil flavononas

Entre los componentes resinosos destacan los siguientes flavonoides: galangina (9%), quercetina (6%) canderol (6%), apigenina (4.5%), pinobankisina (2%), pinocembrina (0.8%) y pinostobina (0.6%), así como los ácidos fenólicos, cumárico, cafeico y cinámico y sus derivados, entre los que destaca el éster feniletílico del ácido cafeico, con interesantes propiedades biológicas en apoptosis, metástasis y sensibilidad a radiaciones de células cancerosas (Gil, 2010)



5.4 Éster Fenético del Ácido Cafeico

5.4.1 Generalidades

Estructuralmente el CAPE es derivado del ácido cafeico (Figura 5) es un compuesto fenólico perteneciente al grupo de los ácidos hidroxicinámicos. Su alta prevalencia en alimentos como frutas, vegetales y condimentos; y en bebidas como el café, el vino y el té, lo convierte en el compuesto más abundante en la dieta humana. Este compuesto predomina en la forma de conjugados de éster (Castillo, 2019)

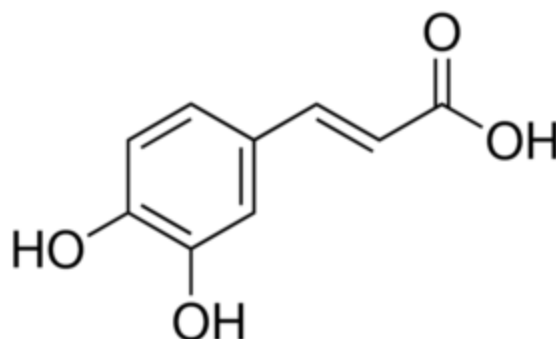


Figura 5. Estructura química del ácido cafeico. Obtenida de Sigma Aldrich.

El éster fenético del ácido cafeico (CAPE) es un componente natural con varias actividades biológicas, pero la producción industrial del CAPE (Figura 6) realizando la esterificación del ácido cafeico y el 2- fenetil etanol catalizada por la lipasa en líquidos iónicos es obstaculizada por bajas concentraciones del sustrato y un largo tiempo de reacción (Gu, et. al., 2014).

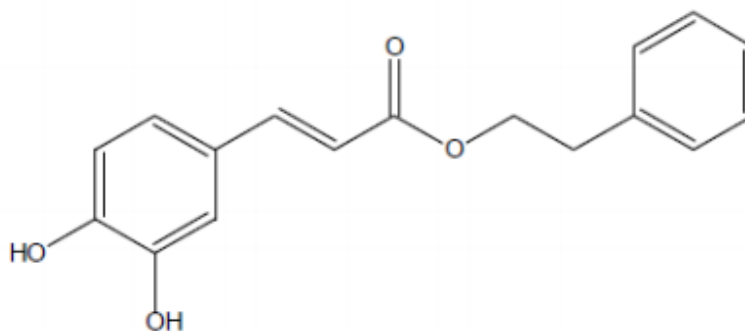


Figura 6 Estructura química del CAPE. Tomado de Natarajan et al, 1996



5.4.2 Mecanismo de acción del CAPE

Existen ya varios estudios (Tabla 3) que promueven el uso terapéutico del propóleo y varios de sus componentes aislados han mostrado actividad biológica. Se ha demostrado su intervención en mecanismos de inflamación e inmunomodulación, capacidad de inducción de apoptosis en hepatocitos y en células de glioma, además de su calidad como quimioprotector (Tabla 3)

Tabla 3 Resumen de estudios *in vitro* del CAPE. Modificado de Saravana y Mahitosh, 2009

LÍNEA CELULAR	RESULTADOS/ OBSERVACIONES										
HELA	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Sustancia</th> <th>% Inhibición</th> <th>Concentración</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>DNA</td> <td>95</td> <td rowspan="3">20µm</td> </tr> <tr> <td>RNA</td> <td>75</td> </tr> <tr> <td>Proteína</td> <td>47</td> </tr> </tbody> </table>	Sustancia	% Inhibición	Concentración	DNA	95	20µm	RNA	75	Proteína	47
Sustancia	% Inhibición	Concentración									
DNA	95	20µm									
RNA	75										
Proteína	47										
U – 937	<ul style="list-style-type: none"> • Máxima inhibición del NF- κβ a 25 µg/mL después del tratamiento con TNF. • Sin efecto inhibitorio en AP – 1, TFIIID y Oct – 1. • Análogos estructurales 5,6 – dihidroxi inhibieron fuertemente el NF- κβ. 										
C6 GLIOMA	<ul style="list-style-type: none"> • Fragmentación de DNA a 50 µM después de 24 horas. • Proteína p53, Bak y Bax y Caspasa 3 activa aumentó, BCl₂ disminuyó. 										
HEP G2	<ul style="list-style-type: none"> • Inhibió MMP-2 y 9 con IC₅₀ de 2 µM. 										
HT 1080	<ul style="list-style-type: none"> • Los niveles de mRNA de MMP-2 y MMP-9 fueron inhibidos. • Los niveles de mRNA de TIMP-1 y MT-1 MMP disminuyeron. 										

Como antioxidante, el CAPE es un fuerte inhibidor de la lipoxigenasa y la actividad xantina / xantina oxidasa *in vitro*, y también frena la formación inducida por TPA de superóxido por los neutrófilos humanos (Huang, et al, 1996).



5.4.3 Relación Estructura-Actividad

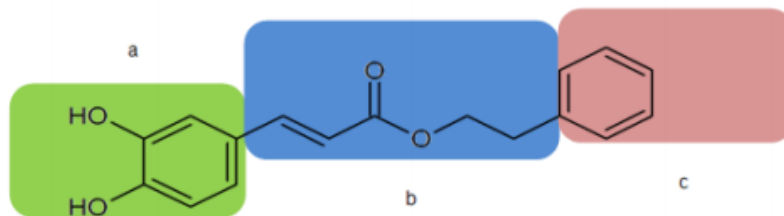


Figura 7 Regiones del éster fenetílico del ácido cafeico (CAPE) Tomado de Gerónimo, 2011.

El CAPE se divide en las siguientes regiones como se observa en la figura 7:

- El anillo catecol
- El grupo éster
- El Benceno

El anillo catecol es importante para el potencial antioxidante y la quelación de metales.

Al aumentar el número de carbonos en la cadena donde se encuentra el éster, la actividad fungitóxicas se ve disminuída. Cuando se introducen halógenos en el anillo del benceno se incrementa la actividad antibacteriana contra bacterias Gram – negativo (Gerónimo, 2011).

5.4.4 Análogos del CAPE

Un impedimento para el uso del 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; por síntesis química y métodos de purificación se requiere una gran cantidad de tiempo, obteniendo rendimientos bajos de entre el 35 al 50%, lo que resulta en un elevado costo de producción. Sin embargo, se han sintetizado moléculas con estructuras similares al CAPE que han sido estudiadas y que conservan la actividad biológica, pero resultan menos caras y de una obtención más rápida (Martínez, 2014).

Una de las primeras modificaciones que se le realizaron a la molécula del CAPE fue la incorporación de un átomo de flúor en diferentes posiciones del anillo catecol mostrando que estos análogos tuvieron un mejor efecto citotóxico que el CAPE, en la línea celular del cordón umbilical HUVEC (Yang et. al. 2010).

Zou y colaboradores variaron los sustituyentes en el anillo catecol del CAPE, el átomo de unión de oxígeno por el nitrógeno (Compuesto CAPA) y el benceno de una serie de derivados del ácido aza caféico obteniendo que los análogos que tienen unida la piperazina fueron más citotóxicos que CAPE y el control positivo utilizado (cisplatino) (Zou, H et. al. 2010).



Debido a estos estudios se fundamenta la adición de diversos compuestos en diferentes posiciones de las moléculas análogas del CAPE, pues se demuestra que estos sustituyentes influyen en el efecto citotóxico.

En comparación con CAPE, a los compuestos CAPA se le encontró que eran más estable en plasma; ya que el primero es más propenso a la hidrólisis por medio de esterasas y eso evidencia una vida más corta en plasma, esto se demostró mediante un método validado de HPLC de fase inversa C18 con detección UV a 320 nm El hecho de que un compuesto sea estable en plasma es importante para el desarrollo de fármacos ya que esto determina cuanto de la dosis inicial llega realmente a la célula blanco (Yang, et. al, 2012).



5.5 Compuestos CAPA

5.5.1 Serie LQM 700

En la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán en el laboratorio de Química Medicinal dirigido por el Dr. Enrique Ángeles se sintetizaron análogos del CAPE por medio de la síntesis de un análogo de ácido cinámico, preparado por la condensación de Knoevenagel a partir de un aldehído aromático con ácido malónico (Arroyo, 2011).

Hernández en 2013 evaluó el efecto antígeno tóxico del compuesto LQM 731, análogo del éster fenetílico del ácido cafeico (CAPE) mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel, demostrando que este compuesto posee actividad antígeno tóxica al disminuir el daño al DNA causado por Mitomicina C (MMC) en células de hígado murino en un 91.7% empleando una dosis de 20 mg/Kg y un 90.2% en células de riñón a la misma dosis en un tiempo de 3 horas post- administración (Hernández, 2013).

En 2014 Cruz demostró mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel que el LQM 738 reduce el daño provocado al DNA por MMC hasta en un 88.42% en células hepáticas y un 57.6% en renales a una dosis de 20 mg/Kg (Cruz, 2014).

Uno de los factores que pueden influir en el efecto citotóxico que presentan los compuestos LQM 700's es que se encuentren dobles sustituyentes electronegativos en diferentes posiciones del benceno ya que estos pueden estar retirando densidad electrónica a la molécula haciéndola más reactiva y también que se encuentren sistemas conjugados en el anillo catecol (Ruiz, 2012).

5.5.2 LQM 755

En 2011 se sintetizaron en el Laboratorio de Química Medicinal otros 4 análogos del éster fenetílico del ácido cafeico a partir del ácido cinámico, obtenido por la reacción de Knoevenagel, con una reacción que involucra la colocación del ácido 3-(4- fenoxi) fenil - 2 propenoico junto con una de las 4 aminas que ahí se emplean (bencilamina, fenetilamina, 3,4-Diclorobencilamina, 2-clorobencilamina) en un medio libre de disolvente obteniéndose los compuestos LQM 752, 753, 754 y 755 (Arroyo L, 2011).

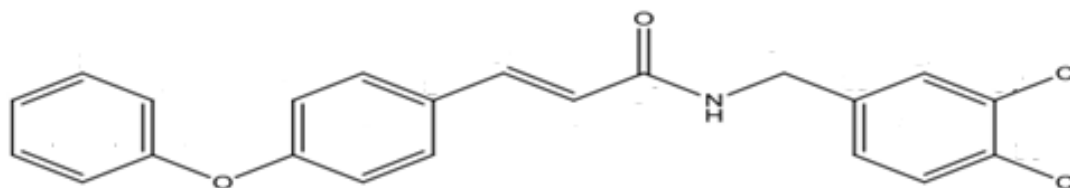


Figura 8. Estructura del compuesto LQM 755. Obtenida de Arroyo (2011)



En el estudio realizado en 2012 por Ruiz se observó que el compuesto LQM 755 en la línea PC-3 a un tiempo de 12 horas obtuvo un porcentaje de viabilidad de 35.56% y a 24 horas de 32.65%, en la línea celular HeLa a las 24 horas se obtuvo un porcentaje de 21.9% y en la línea MDA-MB 231 a las 12 horas la viabilidad fue de 62.96% y a las 24 horas de 35.12% (Ruiz, 2012).

En 2014 Aguilar realizó un estudio *in vivo* con la prueba de electroforesis unicelular en gel (SCGE) donde el LQM 755 demostró tener un efecto antigenotóxico al ser retado con Mitomicina C a una dosis de 20 mg/Kg a 3 horas de su administración tanto en hígado como en riñón pero a las 18 horas el daño es mayor tanto en hígado como en riñón, esto se puede explicar debido a que el vehículo de compuesto en el que se administró el LQM 755 puede retrasar su absorción y por lo tanto su metabolismo es más lento y a las 18 horas alcanza su pico máximo de activación, por lo que el sistema no alcanza a reparar el daño ocasionado por la MMC y la otra explicación podría ser que se genere un metabolito biológicamente más activo, y que al eliminarse sea por riñón produciendo un aumento del daño principalmente en las células de este órgano. A las 3 horas de administración, la viabilidad celular en todos los tratamientos fue superior a la indicada por el SCGE de 85% tanto en hígado como en riñón, a las 18 horas en hígado se mantuvo la viabilidad por encima del 85%, mientras que en riñón hubo una disminución importante de la viabilidad ideal (>85%) (Aguilar, 2012).



5.6 Prueba Células Binucleadas Micronucleadas o Bloqueo de la Citocinesis

5.6.1 Fundamento de la prueba de CB-MN

El ensayo de micronúcleos *in vitro* es una prueba de mutagenicidad usada para la detección de sustancias químicas que inducen la formación de pequeños fragmentos de DNA (Kirsch-Volders, 1997).

La prueba puede realizarse con cualquier tipo de células que se dividen, pero normalmente se utilizan líneas celulares ya establecidas, en monocapa o suspensión, o linfocitos humanos estimulados por un mitógeno tomados de sangre periférica. Para asegurarse de que las células han pasado por al menos una mitosis, después del tratamiento, la división citoplasmática es inhibida por la Citocalasina B dando así células binucleadas (Doherty, 2016).

La Citocalasina B es un compuesto que impide la formación del anillo microfilamentoso requerido para la división del citoplasma después de la telofase, el momento óptimo para su adición es crucial para el ensayo ya que al aumentar el tiempo de exposición a este, existe el riesgo de que también aumente la proporción de células multinucleadas que surgen de células binucleadas que intentan dividirse de nuevo, por lo que el tiempo estimado es generalmente 44 horas después de la estimulación con PHA (Fenech, 2007).

5.6.2 Micronúcleos

El origen de la formación de los micronúcleos es de cromosomas completos no incluidos en el núcleo de la célula hija o de fragmentos que se perdieron durante la división nuclear. En las células que se dividen, la formación de los micronúcleos deriva de la mal segregación del cromosoma debido a una mal función mitótica o por lesiones al DNA ya sea mal reparadas o no reparadas que generan ruptura cromosomal. Los eventos descritos pueden ser inducidos por varios factores incluyendo estrés oxidativo, exposición a agentes clastógenos o aneúgenos, varios defectos genéticos que involucran mal funcionamiento de los puntos de control del ciclo celular y/o reparación del DNA; también deficientes de nutrientes importantes como cofactores para el metabolismo del DNA y de la maquinaria de segregación cromosómica (Fenech, 2007).



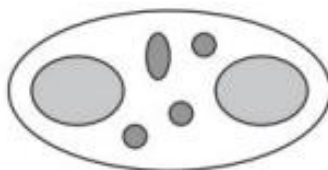
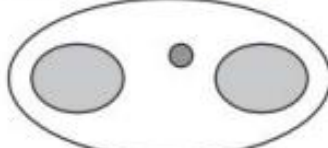
<p>Incrementan nº micronúcleos ‰</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Edad [$>$edad $>$MN ‰] • Género (♀ $>$ ♂) • Presencia de homocisteína plasmática • Déficit de folato y vit B12 • Procesos fisiológicos (menopausia y osteoporosis) • Drogas citostáticas (tratamientos antitumorales) • Alcohol • Exposición agentes tóxicos a diario
<p>Reducen nº micronúcleos ‰</p> 	<ul style="list-style-type: none"> • Agentes antioxidantes • Vitamina E y C • β-caroteno • Infusiones de ginseng y té

Figura 9. Factores que influyen en la frecuencia de micronúcleos. Tomado de Fenech, 2007

5.6.3 Criterios de selección de Micronúcleos

El Proyecto Internacional de Micronúcleos Humanos (HUMN por sus siglas en inglés) fue creado para coordinar la investigación en el mundo dirigida al ensayo de células binucleadas micronucleadas (CBMN), para estudiar el daño del DNA en poblaciones humanas y para establecer protocolos estandarizados de manera que la comparación de datos pueda ser más confiable entre los laboratorios y países (Pardini, 2017)

El HUMN establece ciertos criterios de selección para considerar una célula apta para el análisis estadístico (Zalacain et. al. 2005):

Criterios para células binucleadas

- ✓ El citoplasma debe distinguirse claramente
- ✓ Membranas citoplasmáticas y nuclear intactas
- ✓ Núcleos con similar grado de condensación de la cromatina
- ✓ Pueden estar unidos por puentes nucleoplasmáticos
- ✓ Pueden tocarse, pero no solaparse
- ✓ Ninguno de los núcleos debe encontrarse en etapas de apoptosis

Criterios para micronúcleos

- ✓ El diámetro oscila entre $1/16 - 1/3$ de la media del diámetro del núcleo principal
- ✓ No refractarios
- ✓ Intensidad de la tinción similar a los núcleos principales de la célula binucleada
- ✓ No conectados con ninguno de los núcleos de la célula binucleada
- ✓ Pueden tocar los núcleos de la célula binucleada pero no solaparse con ellos



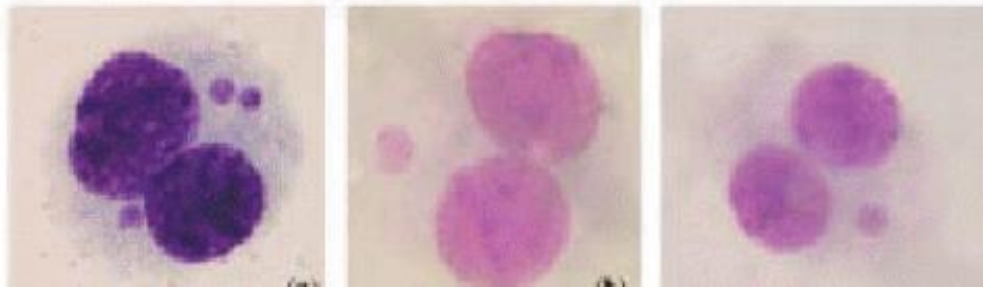


Figura 10 Ejemplos de células binucleadas micronucleadas que son válidas para el conteo de micronúcleos

5.6.4 Agentes inductores de micronúcleos

Los agentes formadores de micronúcleos se pueden clasificar en dos tipos basándose en su mecanismo de acción.

Aneugénicos: Bloquean la formación del huso mitótico, originando el rezago de cromosomas completos los cuales no se incluyen en los núcleos hijos (Parry, et. al., 2002)

Clastogénicos: Pueden ser análogos de base y actúan intercalándose en el DNA inhibiendo su síntesis y ocasionan posteriormente un debilitamiento de enlaces lo que provoca una rotura cromosómica (Chávez, 2006).

Cuando un agente clastogénico produce las roturas en la fase S del ciclo celular, se denomina S dependiente, y aquellos que no necesitan pasar por la fase S para generar una rotura son denominados S- independientes.

Un ejemplo de agente S dependiente es la Mitomicina C (MMC), la cual es una sustancia utilizada ampliamente en la terapia antitumoral pues es capaz de producir la muerte de las células que se dividen al bloquear su replicación: éste es un agente alquilante que se une covalentemente a la molécula de DNA, la base que se une preferentemente con la MMC es la guanina formando enlaces intra o intercatenarios y como resultado se presenta una rotura de tipo cromatídico, sin embargo la MMC también es capaz de inducir aneuploidía y producir un retraso en el ciclo de división celular en los cultivos de células de mamíferos (Chávez, 2006).

En estudios *in vivo* la MMC induce micronúcleos en la primera división celular después de su administración, alcanzando su punto máximo de formación de micronúcleos a las 32 horas independiente de la dosis administrada (Morales, et. al., 2002).



6 JUSTIFICACIÓN

Debido a la alta incidencia de cáncer en México y en el mundo y a los diversos efectos secundarios provocados por varios de los tratamientos anticancerígenos que afectan no solo a células dañadas sino también a células sanas, por ello se ha trabajado para sintetizar diversos fármacos que tengan mayor especificidad.

Hay varios estudios que demuestran la efectividad protectora del CAPE, por ello, el laboratorio de Química Medicinal de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán se ha dado la tarea de sintetizar análogos del éster fenetílico del ácido cafeico (CAPE) y Amidas fenéticas del mismo ácido cafeico (CAPA). Ruiz en 2012 evaluó la serie LQM 700, de 30 compuestos el compuesto LQM 755 demostró tener una mayor actividad citotóxica en células cancerígenas que en células sanas en ensayos *in vitro* de diferentes líneas celulares, por ello es importante continuar con las pruebas preclínicas para este compuesto como lo son las pruebas genotóxicas, entre ellas, la prueba de células binucleadas micronucleadas.

7 OBJETIVOS

7.1. Objetivo General

Evaluar la actividad quimioprotectora del análogo amídico halogenado del CAPE (LQM 755) en un cultivo de linfocitos humanos, mediante la técnica *in vitro* de células binucleadas micronucleadas.

7.2. Objetivos Particulares

Determinar la frecuencia de células binucleadas en los diferentes tratamientos de los cultivos celulares para medir el efecto citotóxico que pudiera presentar el compuesto LQM 755.

Determinar la frecuencia de células binucleadas micronucleadas en los diferentes tratamientos de los cultivos celulares para medir el efecto genotóxico que pudiera presentar el compuesto LQM 755.

8 HIPÓTESIS

Si el CAPE y varios de sus análogos CAPA han demostrado tener efectos citoprotectores en estudios anteriores entonces el compuesto LQM 755 presentará características similares y revertirá la citotoxicidad y genotoxicidad causada por la Mitomicina C en un cultivo de linfocitos humanos.



9 MATERIALES Y MÉTODOS

- Materiales

Muestra: Linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica completa heparinizada extraída por venopunción

	Donador 1	Donador 2
Sexo	Masculino	Femenino
Edad	25 años	25 años
Fumador	NO	NO

- Compuestos:

Mitomicina C (MMC) (0.15 µg/mL). Concentración base: 10 µg/mL

Citocalasina B (6 µg/mL). Concentración base: 4 mg/ 3 mL

Compuesto de prueba: LQM 755 (3000 µg/mL) Concentración de la solución base*

Sistemas de trabajo de los cultivos de linfocitos:

Concentración 1	15 µg/mL LQM 755
Concentración 2	20 µg/mL LQM 755
Concentración 3	25 µg/mL LQM 755
Reto 1	15 µg/mL LQM 755 + MMC
Reto 2	20 µg/mL LQM 755 + MMC
Reto 3	25 µg/mL LQM 755 + MMC

Agente disolvente: DMSO

*Sintetizado y proporcionado por en el Laboratorio de Química Medicinal a cargo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano de la FESC-1 UNAM

- Soluciones y reactivos

Buffer de fosfatos pH 6.8 Colorante Giemsa Etanol 95%
Fitohemaglutinina (PHA)
Antibiótico Estreptomicina – Penicilina (1%)
Solución 9:1 de Cloruro de sodio 0.9% y Cloruro de potasio 0.075M
Medio HAM F10
Etanol absoluto
Ácido acético glacial
Heparina sódica
Agua destilada
Agua inyectable



- Metodología para el Cultivo Celular

1. Obtener 3 mL de sangre venosa de cada donador por medio de una jeringa previamente heparinizada
2. Adicionar a cada frasco de cultivo estéril 5 mL de medio de cultivo HAM F-10, previamente preparado con PHA y antibiótico, y 0.2 mL de sangre.
3. Mezclar e incubar a una temperatura de 37°C.
4. Transcurridas las 24 horas, adicionar al frasco correspondiente MMC, LQM 755 y la Citocalasina B con base en la tabla 4

Tabla 4. Esquema de adición de las soluciones empleadas en los cultivos de linfocitos

	Control negativo	Control positivo	LQM 755			Retos		
			Conc 1	Conc 2	Conc 3	Reto 1	Reto 2	Reto 3
24 horas								
Mitomicina C μL	0	30	0	0	0	30	30	30
44 horas								
LQM 755 μL	0	0	25	34	42	25	34	42
Citocalasina B μL	60	60	60	60	60	60	60	60

Nota. Cada frasco de cultivo por cada donador se realiza por duplicado en condiciones de esterilidad

5. Transcurridas las 72 horas se procede a realizar la cosecha celular.

- Metodología para la Cosecha Celular

1. Vaciar el contenido celular de cada frasco de cultivo a tubos de ensayo previamente marcados
2. Centrifugar el contenido de cada tubo a 3000 rpm durante 10 minutos y retirar sobrenadante.
3. Adicionar 5 mL de la solución 9:1 de NaCl y KCl a 37 °C e incubar a la misma temperatura por 30 minutos.
4. Volver a centrifugar por 5 minutos a 3000 rpm y desechar sobrenadante.
5. Agregar lentamente y con agitación constante 5 mL de solución fijadora etanol- ácido acético (6:1) recién preparada y a -4°C (Respetar la temperatura).



6. Centrifugar durante 5 minutos a 3000 rpm y desechar sobrenadante. Repetir 2 veces más los pasos 5 y 6.
7. En la última centrifugación dejar 1 mL de la solución fijadora para resuspender el paquete celular. Tomar un poco de este con una pipeta Pasteur y realizar preparaciones celulares por goteo desde una altura no mayor de 10 cm.
8. Dejar secar.
9. Teñir con Giemsa previamente filtrado durante 12 minutos y observar al microscopio a 40 y 100X

El daño citotóxico se evalúa determinando en 1000 células totales el número de células binucleadas (CB).

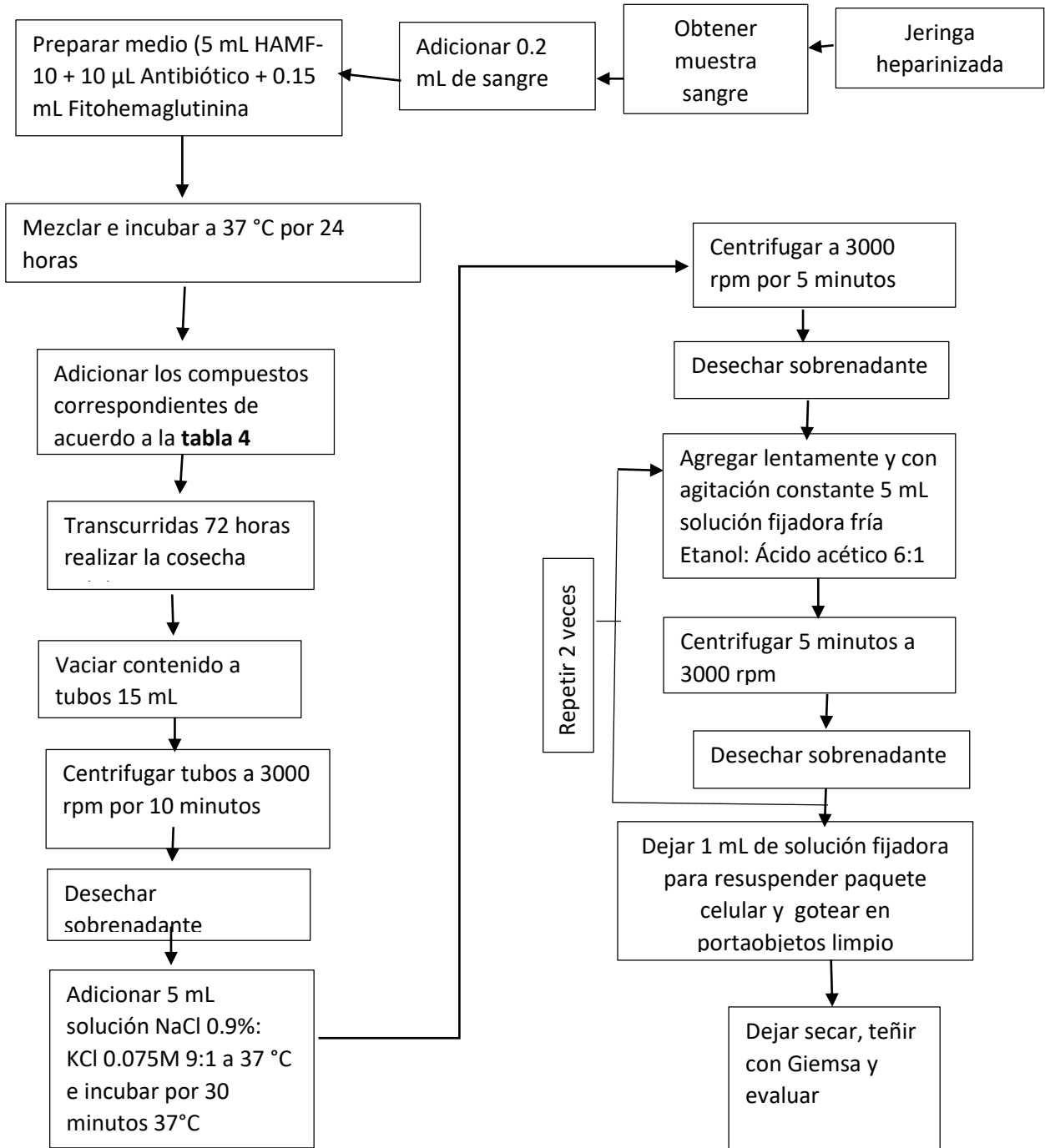
$$CITOTOXICIDAD = \frac{\# CB}{1000 CT}$$

El daño genotóxico se evalúa determinando en 1000 células binucleadas el número de células binucleadas micronucleadas (CBMN).

$$GENOTOXICIDAD = \frac{\# CBMN}{1000 CB}$$



▪ Diagrama experimental



10. RESULTADOS

Tabla 5 Resultados de la actividad citotóxica y genotóxica del donador 1

Tratamiento	Control negativo	Control positivo	Conc 1	Reto 1	Conc 2	Reto 2	Conc 3	Reto 3
ACTIVIDAD CITOTÓXICA								
CT	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
CB	222	135	177	61	102	102	56	211
	243	144	139	44	97	106	42	204
Promedio	232.5	139.5	158	52.5	99.5	104	49	207.5
SEM +/-	10.5	4.5	19	8.5	2.5	2	7	3.5
ACTIVIDAD GENOTÓXICA								
CBT	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
CBMN	0	3	3	0	2	0	0	5
	0	4	1	2	1	2	0	4
Promedio	0	3.5	2	1	1.5	1	0	4.5
SEM +/-	0	0.5	1	1	0.5	1	0	0.5

CT: Células totales, CB: Células binucleadas, SEM: Error estándar

Tabla 6 Resultados de la actividad citotóxica y genotóxica del donador 2

Tratamiento	Control negativo	Control positivo	Conc 1	Reto 1	Conc 2	Reto 2	Conc 3	Reto 3
ACTIVIDAD CITOTÓXICA								
CT	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
CB	223	159	156	69	96	99	87	208
	206	128	186	82	101	104	80	219
Promedio	214.5	143.5	171	75.5	98.5	101.5	83.5	213.5
SEM +/-	8.5	15.5	15	6.5	2.5	2.5	3.5	5.5
ACTIVIDAD GENOTÓXICA								
CBT	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
CBMN	0	4	0	1	1	0	0	1
	0	5	1	0	1	0	0	3
Promedio	0	4.5	0.5	0.5	1	0	0	2
SEM +/-	0	0.5	0.5	0.5	0	0	0	1

CT: Células totales, CB: Células binucleadas, SEM: Error estándar



Microfotografías

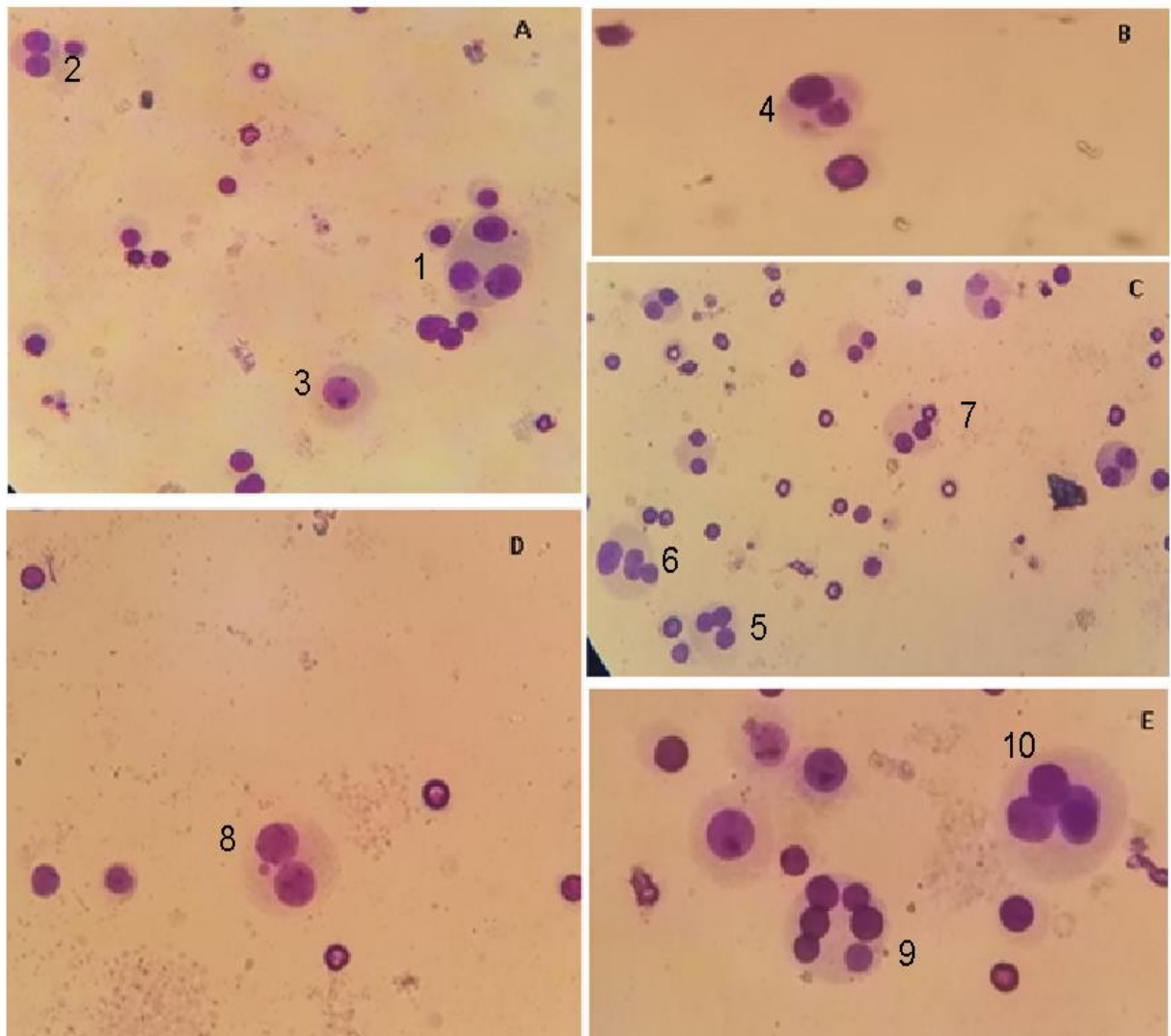


Figura 11. Serie de microfotografías tomadas a 40X con tinción Giemsa. (A) Se observa una célula trinucleada con dos micronúcleos (1), una célula binucleada (2) y una célula mononucleada (3) (B) Se observa una célula binucleada con un micronúcleo (4). (C) Se observan 5 células binucleadas sin micronúcleo, una célula binucleada micronucleada (7) y dos células multinucleadas (5) y (6). (D) Se observa una célula binucleada con micronúcleo (8) y varios núcleos a los cuales no se distingue claramente el citoplasma. (E) Se observa una célula hexanucleada (9), una trinucleada (10) y varias mononucleadas.



11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Debido a las diferencias que puede haber en la inducción de CBMN en relación con el sexo de los donadores se realizó el análisis estadístico de prueba de ANOVA y Prueba de Comparación Múltiple de Bonferroni con el programa Graphpad Prism v.8.1.2 para evaluar las diferencias entre los donadores, comparando cada tratamiento entre sí.

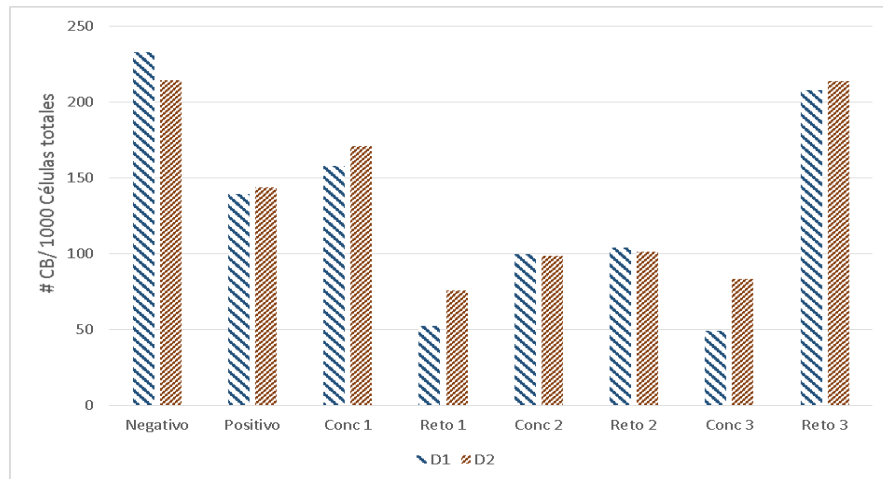


Figura 12 Resultados comparando los valores de ambos donadores para la evaluación citotóxica. Se observan los resultados de citotoxicidad de ambos donadores. Para todos los casos el valor de $p > 0.05$

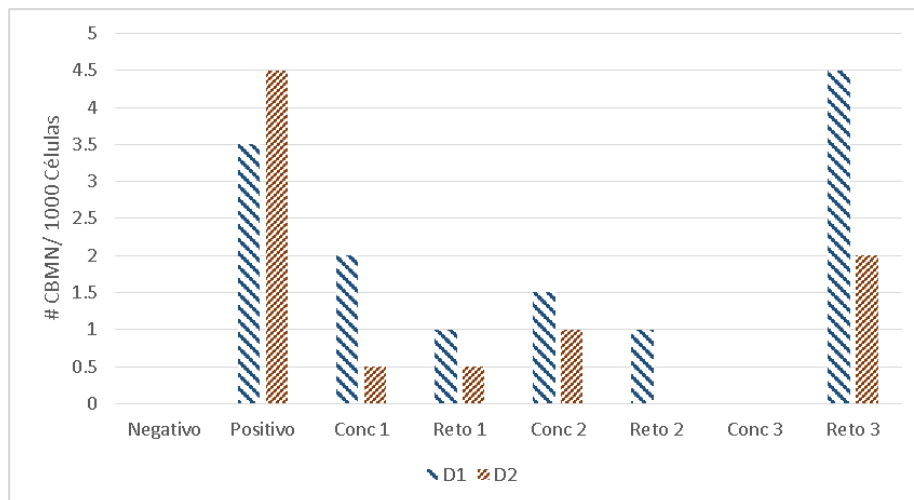


Figura 13. Resultados comparando los resultados de ambos donadores para la evaluación genotóxica. Se observan los resultados de genotoxicidad de ambos donadores. Para todos los casos el valor de $p > 0.05$

En las figuras 12 y 13 se puede observar que para ambos casos, citotoxicidad y genotoxicidad, no hubo diferencias significativas entre los donadores, por ello se procedió a realizar el análisis en conjunto como se muestra a continuación:



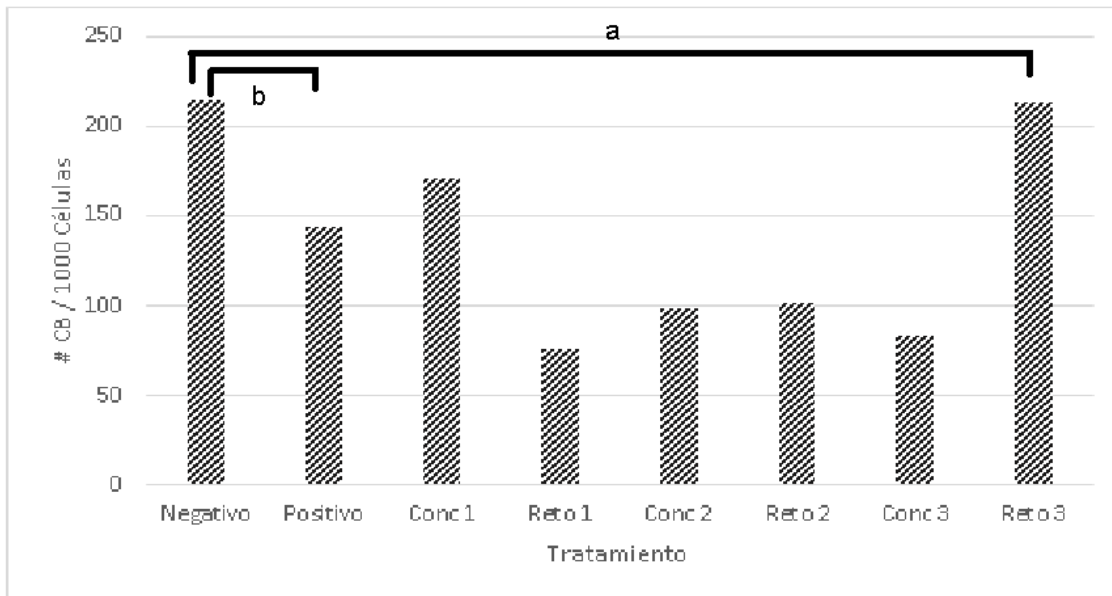


Figura 14 Resultados generales de citotoxicidad. En la gráfica se observa que (a) no hubo diferencia significativa entre el control negativo y el reto 3, entre el control negativo y el positivo (b) si mostro haber diferencias altamente significativas.

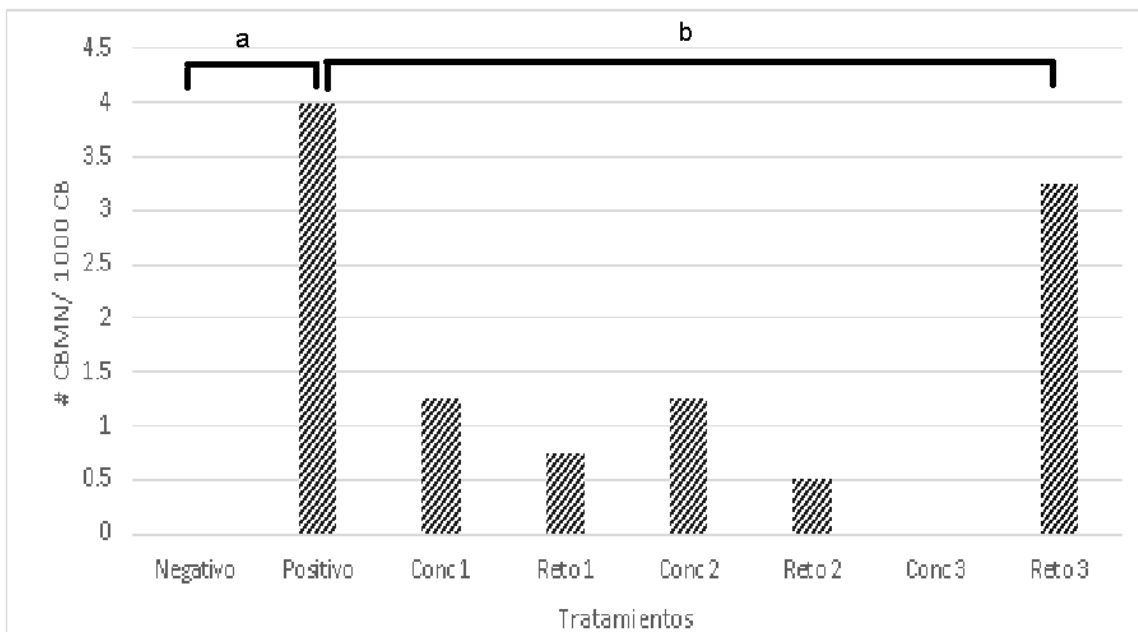


Figura 15 Resultados generales de genotoxicidad. . En la gráfica se observa que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el control negativo y las diferentes concentraciones del compuesto LQM755, pero se obviaron las diferencias (a) altamente significativas entre el control y la MMC. En los tratamientos de reto 1 y 2 se observa que hubo una inhibición de la mutagenicidad de la MMC por parte de LQM755, no así con el reto 3 donde no hubo (b) diferencias estadísticamente significativas con la MMC. Anova $p < 0.05$ y Prueba de comparación múltiple de Bonferroni.



12. DISCUSIÓN

Ya que el cáncer es un serio problema de salud pública que cada año va en aumento y los tratamientos que existen son altamente tóxicos y agresivos, el descubrimiento y estudio de tratamientos alternativos que sean menos agresivos y específicos de células cancerígenas se encuentra en constante crecimiento.

La utilización de fármacos naturales y sus análogos toma cada vez más fuerza en este ámbito ya que los pacientes diagnosticados con algún tipo de cáncer implementan dentro de su tratamiento medicina alternativa de este tipo. Por ello es importante probar el efecto genotóxico y antigenotóxico del compuesto en un sistema *in vitro*.

En este trabajo se evaluó la acción *in vitro* de LQM 755 en la inducción de micronúcleos por medio de la técnica de CBMN pues a través de los estudios de genotoxicidad podemos evaluar la capacidad quimioprotectora de una sustancia determinada.

Se empleó a la MMC (0.15 µg/mL) como control positivo ya que, como ya se expuso anteriormente, es un potente antineoplásico, el cual ha sido utilizado como tratamiento para cáncer de estómago y de páncreas en estadios avanzado o que se han diseminado a otras partes del cuerpo, además de que ha sido utilizado como mutágeno en ensayos de MN (Madrigal – Bujaidar et. al. 1996). Otra ventaja de utilizar a la MMC es que se conoce su mecanismo de acción y biotransformación; la activación de MMC comienza con la reducción de la estructura quinona y se metaboliza a un número de formas activas por reducción enzimática, las cuales se piensa ejercen la actividad antineoplásica mediante la formación de enlaces cruzados con el DNA, alquilación y la ruptura de la cadena de DNA con la formación de radicales libres (Kyowa Kirin, 2013). En nuestro estudio se observa que la Mitomicina C disminuye considerablemente el número de CB con respecto al control negativo, ejerciendo su efecto citotóxico.

El compuesto LQM 755 fue evaluado a 3 concentraciones diferentes de 15, 20 y 25 µg/mL en cultivos por separado para poder evaluar su actividad citotóxica y genotóxica del compuesto *per se*, y en cultivos retándolo con MMC para observar si el compuesto es capaz de revertir el daño provocado por éste, o si habrá un sinergismo en cuanto al daño observado.

En la evaluación de la genotoxicidad del LQM 755 se observa un aumento estadísticamente significativo, siendo que el compuesto *per se* mostró ser genotóxico a las dosis más bajas y nula a la dosis más alta de 25 µg/mL siendo que esta última y el control negativo no tienen diferencias significativas entre sí.

LQM 755 demostró tener un efecto antigenotóxico en los retos a las Concentraciones de 15 µg/mL y 20 µg/mL comparándolos con el control positivo, pero no hubo diferencias significativas entre el control positivo y el reto a la concentración de 25 µg/mL.



Aunque los mecanismos por los cuales el CAPE es antígeno tóxico no se han dilucidado por completo, Carrasco en 2006 mencionó que puede deberse a su capacidad como antioxidante y/o a su capacidad para modificar la actividad de algunos CYP que están involucrados en el metabolismo de carcinógenos y que impiden su bioactivación (Hernández, 2013).

La actividad citotóxica es muy importante para un buen fármaco antineoplásico ya que se espera que sea efectiva en células malignas; el LQM 755 demostró ser citotóxico al ir disminuyendo el número de células binucleadas cuando se aumenta la concentración en los cultivos por sí solo. Cuando se realiza el reto con el mutágeno podemos ver que la citotoxicidad disminuye, así en el tratamiento con la concentración de 25 µg/mL el número de células no presenta diferencias significativas con el control negativo.

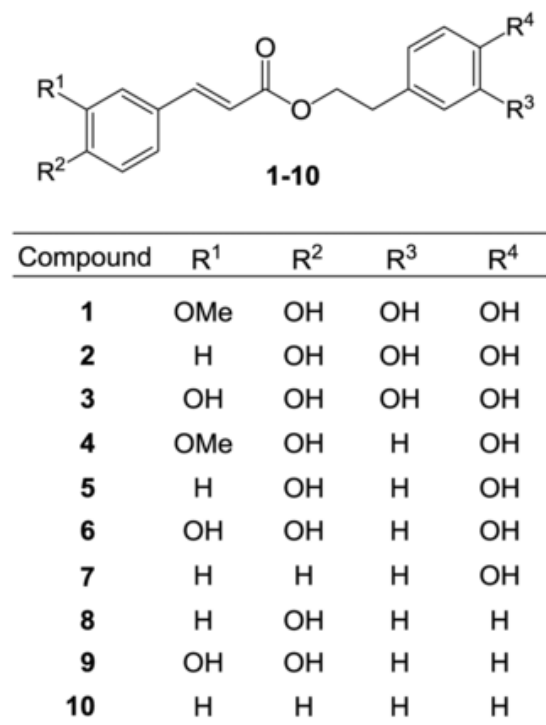


Figura 16 Síntesis de análogos de CAPE. Tomado de Uesawa, 2018

Yoshihiro Uesawa y colaboradores sintetizaron 10 análogos de CAPE (Figura 16) modificando la posición de los grupos hidroxilo y del grupo metoxi, se encontró que los compuestos 3, 6 y 9, al tener dos grupos hidroxilo en R1 y R2, mostraron la mayor citotoxicidad contra las células OSCC. Mencionan que al remplazar el grupo hidroxilo en R1 por el grupo metoxi la citotoxicidad se ve disminuida, esto sugiere la importancia de estos grupos en la posición R1 en la inducción de citotoxicidad contra esta línea celular. Ese mismo estudio demostró que al tener dos grupos hidroxilo en R1 y R2, pero no en R3 y R4, hay una mayor citotoxicidad específica de tumor. El análisis con QSAR demostró que la especificidad de los compuestos estaba relacionada con el tamaño, forma y potencial de ionización (Uesawa, et. al, 2018).



Yang y colaboradores en 2010 evaluaron al CAPE, CAPA y varios análogos de este, en este estudio ellos mencionan que los grupos hidroxilo en el anillo catecol pueden ser los que contribuyen a la citotoxicidad del compuesto, por ello estos autores probaron con diferentes radicales, entre ellos grupos metilo, metoxi, hidroxilo y flúor como halógeno, obteniendo que los compuestos con flúor eran significativamente citoprotectores con respecto al control, además observaron que al introducir el flúor en el anillo catecol se incrementa la densidad electrónica en el sistema conjugado lo cual puede hacer más reactiva a la molécula.

Tanto el estudio realizado por Yang como el realizado por Uesawa muestran conclusiones similares, ya que ambos se enfocan en la adición de grupos con potencial de ionización elevado que incremente la densidad electrónica para volver más reactiva a la molécula, como se puede observar en la Figura 17 las modificaciones realizadas a la estructura química del LQM 755 son la adición de Cloro al anillo del benceno, el cuál es uno de los elementos más electronegativos, la adición del grupo fenil formando un fenoxi en el anillo catecol, además de la eliminación de un grupo hidroxilo en el mismo. En el apartado de la relación estructura – actividad mencionamos que entre los factores que determinan la citotoxicidad del compuesto es la adición de grupos halógeno al benceno y la adición de sistemas conjugados en el anillo catecol, pues estos aumentan la reactividad del compuesto.

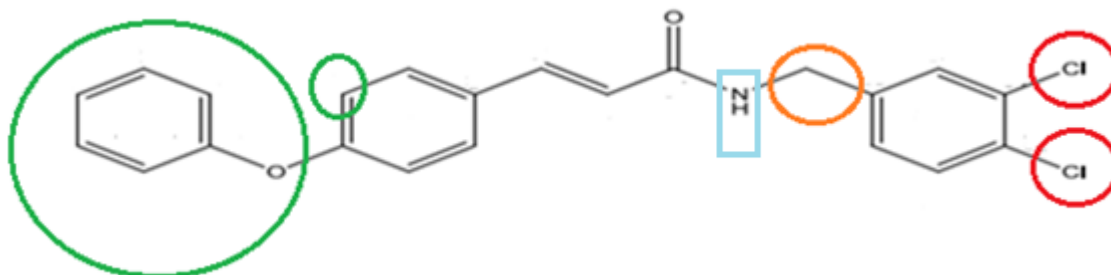
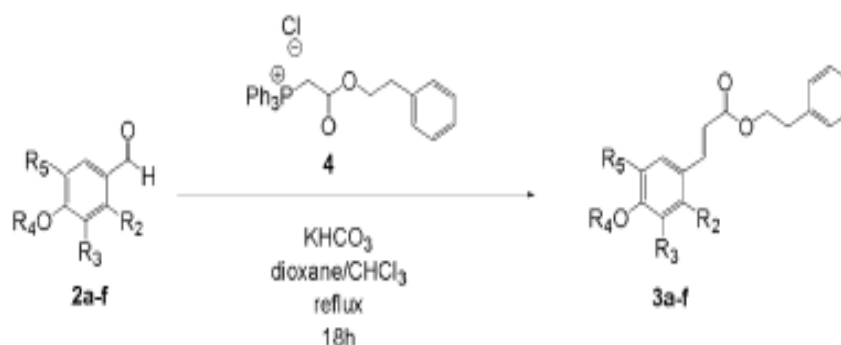


Figura 17. Estructura química del compuesto LQM 755 denotando los cambios realizados en su estructura comparándolo con la estructura del CAPE (Ortiz, 2020 Autoría propia).

En 2006 Wang y colaboradores sintetizaron 6 análogos donde añadieron flúor en el anillo catecol (Figura 18), además se prepararon otros donde los grupos hidroxilo del anillo catecol fueron metilados. Se evaluaron en un cultivo de células HUVEC a diferentes concentraciones (5, 10 y 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$) por 24 horas. La viabilidad celular menor del 90% fue considerada tóxica. Los resultados demostraron que mientras CAPE, y los compuestos 3b, 3e, 3a y 3f fueron tóxicos a la concentración más alta, los análogos 3d y 3c no fueron tóxicos a ninguna de las concentraciones evaluadas.





Compound	R ₂ =	R ₃ =	R ₄ =	R ₅ =
a	H	OMe	H	F
b	H	OH	H	F
c	H	H	H	F
d	F	H	Me	OMe
e	F	H	H	OH
f	F	H	Me	OH

Figura 18 Síntesis de los análogos fluorados de CAPE. Tomado de Wang , et.al, 2006

En el estudio de Wang el compuesto 3b presentó una citotoxicidad menor a 10 µg/mL que a 5 y 15 µg/mL, la razón por la que ocurre este fenómeno no es conocida, sin embargo, ya se han reportado varios compuestos, como lo es el ácido cafeico, que no siguen la curva dosis – respuesta (Wang, et. al, 2006).

Yang y colaboradores realizaron también estudios para determinar la vida media de CAPA en plasma de rata, a dosis de entre 5 – 20 mg/ Kg, por medio de HPLC en fase reversa con columnas de C12 usando como gradiente de elusión agua y acetonitrilo, obteniendo un rango entre 243.1 y 295.8 min, el cual fue mayor que CAPE, siendo este de 92.26 min (Yang et. al. 2014)

De acuerdo con los resultados observados en general podemos concluir que el compuesto LQM 755 puede perfilarse como un compuesto citoprotector ya que pudo revertir el daño citotóxico causado por la MMC a 25 µg/ mL, aunque a esa misma concentración mostró no ser genotóxica por sí misma, si demostró no ser capaz de revertir el daño genotóxico provocado por la MMC.

La técnica de MN *in vitro* tiene varias ventajas pues es una técnica de relativo bajo costo, fácil y rápida de realizar en comparación con otras técnicas, sin embargo, sería conveniente complementar el estudio con una técnica que pueda determinar el origen de los MN, como lo es la hibridación *in situ* con sondas centroméricas de marca fluorescente (FISH), puesto que estos pueden originarse de fragmentos cromosómicos o de cromosomas completos.



13. CONCLUSIONES

El compuesto LQM755 mostró una actividad antígenotóxica en el cultivo de linfocitos humanos a las concentraciones de 15 µg/mL y 20 µg/mL, no así en la concentración más alta que fue de 25 µg/mL.

Se determinó que el compuesto LQM755 *per se* tiene acción citotóxica al reducir significativamente el número de células binucleadas en comparación al control negativo en los cultivos de linfocitos Humanos en todas a las concentraciones ensayadas.

En el caso de los tratamientos de reto con el mutágeno, la concentración más alta (reto 3) mostró un efecto citoprotector, ya que el número de células binucleadas se mantuvo sin diferencias estadísticamente significativas con el control negativo.



14. PERSPECTIVAS

- Continuar los estudios de las propiedades del compuesto LQM 755 y los demás análogos del CAPE
- Evaluar el compuesto en un mayor número de personas para tener un parámetro de comparaciones estadísticas más amplio del daño y efecto del compuesto.
- Complementar el estudio con la técnica de FISH para determinar el origen de los micronúcleos.
- Realizar estudios para elucidar el mecanismo de acción del compuesto LQM 755.



15. REFERENCIAS

1. A.C.S (2016) American Cancer Society. Consultado en página web <https://www.cancer.org/es/cancer/aspectos-basicos-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer.html>
2. Alcántar, B., Salazar, A, Hernández, L (2013). Biología Molecular. Fundamentos y Aplicaciones.. Consultado en página web: <https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1803§ionid=124154883>
3. Aguilar, K. (2014) Evaluación del efecto genotóxico y antígenotóxico del análogo del éster fenético derivado del ácido cafeico LQM 755 mediante electroforesis unicelular en ratones CD1. Tesis de Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica. FES Cuautitlán.UNAM, México.
4. Alemán, M (2015) ¿Qué son los Protooncogenes y genes supresores de tumores?. Cefegen. Consultado en página web en julio 2019 <https://cefegen.es/blog/que-son-protooncogenes-genes-supresores-tumores>
5. Alvarez, M (2012) Organoleptic Characterization and Physical- Chemistry of Propolis of the Department of Liberty. Universidad Nacional Agraria La Molina. Perú Consultado en Julio 2019
6. Arroyo, L. (2011). Síntesis de análogos y/o derivados del éster fenético del ácido cafeico (CAPE) con posible actividad biológica. Tesis de Licenciatura Química. FES Cuautitlán.UNAM, México
7. Bankova, V (2005) Chemical diversity of propolis and the problema of standardization. Journal of Ethnopharmacology, 100, 114-117
8. Bankova, V (2011). Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? Journal of Ethnopharmacology, 133, 253-260.
9. Bevan, J (1982) Fundamentos de farmacología. Introducción a los principios de acción de los fármacos. 2 ed. México: Latinoamericana.
10. Blagosklonny, M.V (2005) Carcinogenesis, cancer therapy and chemoprevention. Cell Death Differ 12, 592–602
11. Burgués, J.P, Pontones, J.L., Vera, C.D., Jiménez, J.F., Ozonas, M. (2005) Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga. Actas Urológicas Españolas 29 (9), 846 – 859
12. Castillo, S (2019) Efecto protector del ácido caféico en un modelo de neurodegeneración estriatal de la enfermedad de Huntington. Tesis de Licenciatura Biología. FES Iztacala. UNAM, México.
13. Chávez, D (2006) Aplicación de técnicas de citogenética molecular para la detección de aneuploidia y clastogenicidad en células humanas expuestas a arsénico. Universidad Autónoma de Barcelona Facultad de Ciencias. Departamento de Genética y de Microbiología.
14. Cohen, S, Ellwein, L.B. (1991) Errores genéticos, proliferación celular y carcinogénesis. Cancer Research, 51,6493-6505
15. Cruz, L. (2014). Evaluación de la capacidad genotóxica y antígenotóxica del compuesto LQM 738 análogo del cape mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel, en ratones CD1. Tesis de Licenciatura Químico Farmacéutico Biólogo. FES Cuautitlán. UNAM, México.



16. Klaassen, C, Watkins, JI (2010) Casarett & Doull's Essentials of Toxicology 3 edición McGraw Hill
17. Doherty, A (2016). Genetic Toxicology Testing, A Laboratory Manual. Elsevier. 161-205.
Consultado de página web en julio 2019
<https://www.criver.com/sites/default/files/resources/GeneticToxTestingFormulationofTestArticles.pdf>
18. Farré, R, Frassetto, I, Sánchez, A (2004) El própolis y la salud. *Ars Pharmaceutica* 45, 21-43
19. Fenech M (2007) Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols* 2(5), 1084–1104
20. Flores, I (2018) Evaluación del efecto del propóleo en cultivos celulares infectados con *Malassezia pachydermatis*. Tesis de Maestría. FES Cuautitlán. UNAM, México.
21. Grados, O (2016) Medicarte. Consultado en página web
<http://www.medicarteoncologia.com/carcinogenesis-como-se-inicia-el-problema/>
22. Gerónimo, K (2011) Síntesis orgánica de compuestos derivados del éster fenético del ácido cafeico pertenecientes a la serie LQM con posible actividad biológica. Tesis de Licenciatura en Química Industrial. FES Cuautitlán. UNAM, México.
23. Gil, A (2010) Tratado de nutrición. 2 ed. Médica Panamericana. Madrid. p 786
24. Gu, S, Wang, J, Wei, X, Cui, H, Wu, X (2014) Enhancement of Lipase-catalyzed Synthesis of Caffeic Acid Phenethyl Ester in Ionic Liquid with DMSO Co-solvent. *Bioorganic & Medical Chemistry*. 22, 1314-1321.
25. Han, Z, Chatterjee, D, He, DM, Early J, Pantazis, P, Wyche, JH, Hendrickson, EA (1995) Evidence for a G2 checkpoint in p53-independent apoptosis induction by X-irradiation. *Molecular and Cellular Biology*, 15 (11), 5849
26. Hernández, M (2013). Evaluación del efecto antígenotóxico del compuesto LQM 731, análogo del éster fenético del ácido cafeico (CAPE) mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa). Tesis de Licenciatura Químico Farmacéutica Biológica. FES Cuautitlán. UNAM, México.
27. Huang, M et al (1996) Inhibitory effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on 12-O-tetradecanoylphorbol – 13- acetate induces tumor promotion in mouse skin and the synthesis of DNA, RNA and protein in HeLa cells. *Carcinogenesis*, Vol 17 (4), 761-765
28. Instituto Nacional de Cáncer (2011). Manual de Enfermería Oncológica. Ministerio de Salud. Argentina.
29. Khan Academy. Regulación del ciclo celular, cáncer y células madre. Consultado en página web en julio 2019 <https://es.khanacademy.org/science/biology/cellular-molecular-biology/stem-cells-and-cancer/a/cell-cycle-checkpoints-article>
30. Kirsch-Volders, M (1997) Towards a validation of the micronuclei test. *Mutation RES.*, 392, 1-4
31. Kyowa Kirin. Mitomycin C. Consultado en página web en julio 2019
<http://www.mitomycin.net/professionals/index.html>
32. Lagunas, M, Valle, A, Soto, I (2014) Ciclo Celular: Mecanismos de Regulación. *Revista Especializada en Ciencias de la Salud* 17 (2):98-107
33. Lodish, H, Berk, A, Kaiser, C, Krieger, M, Bretscher, A, Ploegh H et. al. (2000) *Biología Celular y Molecular*. 4 ed. Nueva York. WH Freeman
34. Madrigal – Bujaldar, E, Cassani, MI (1996) Efecto mutagénico de la Mitomicina C en cultivos de linfocitos humanos. *Bioquímica*. 21 (3), 538 - 544



35. Haschel, W, Rousseaux's C, Wallg, M (2013) Haschek and Rousseaux's Handbook of Toxicology Pathology. 3 edición. Elsevier. USA
36. Manrique, A (2000) Producción del propóleo. FONAIAP divulga No. 66. Brasil
37. Martín, M (2011) Carcinogénesis. Salud Pública de México 53 (5), 405-414
38. Martínez, M (2014) Estudio Anatomopatológico del efecto de LQM 731 (derivado de CAPE) en un modelo de lesiones preneoplásicas. Tesis de Licenciatura Bioquímica Diagnóstica. FES Cuautitlán. UNAM, México.
39. Morales, P, Vallarino, T, Cruz, V , Alvaro, H (2002) Inferencia de algunos parámetros farmacocinéticos de la mitomicina C, mediante el análisis de su cinética de inducción de eritrocitos policromáticos micronucleados. XIII Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN.
40. Moret, Y, López, J, Sánchez, C. (2008). Quimioprevención de condiciones potencialmente malignas y cáncer bucal. Acta Odontologica Venezolana. 48
41. Nataranjan, K, Singh S, Burke TR Jr, Grunberger D, Aggarwal BB. (1996) Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B. Immunology, 93, 9090-9095.
42. OMS (2018) Consultado de página web en julio 2019 <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer>
43. Pardini, B (2017) Increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of bladder cancer. British Journal of Cancer 116, 202-210.
44. Parry, E.M, Parry, J.M, Corso, C, Doherty, A, Haddad, F, Hermine, T.F et. al. (2002) Detection and characterization of mechanisms of action of aneugenic chemicals. Mutagenesis 17 (6), 509 – 521
45. Pickup, M (2014) The extracellular matrix modulates the hallmarks of cancer. EMBO Reports 15 (12), 1244
46. Ruiz, M (2012) Evaluación in vitro de la citotoxicidad de compuestos derivados del éster fenético del ácido cafeico (CAPE), en diferentes líneas celulares de cáncer. Tesis de Licenciatura Química Industria. FES Cuautitlán. UNAM, México.
47. Saravana, K Mahitosh, M (2009) Antiproliferative Effects of Honey and of its Polyphenols: A review. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2009, 1-13
48. Secretaria de Salud (2019) INFOcancer Consultado de página web <https://www.infocancer.org.mx/?c=conocer-el-cancer&a=estadisticas-mundiales-y-locales>
49. Sigma Aldrich. Consultado de página web en julio 2019 <https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c0625?lang=en®ion=US>
50. Uesawa, Y (2018) Quantitative Structure–Cytotoxicity Relationship of Cinnamic Acid Phenethyl Esters. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 28, 3400–3403
51. Wang, X, Stavchansky S, Bowman PD, Kerwin SM. (2006) Cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and catechol ring-fluorinated CAPE derivatives against menadione-induced oxidative stress in human endothelial cells. Bioorganic & Medical Chemistry 14, 4879 – 4887
52. Wollenweber, E , Hausen, B, Greenaway, W (1990) Phenolic constituents and sensitizing properties of propolis, poplar balsam and balsam of Peru. Bulletin de Groupe Polyphenols. 15, 112 – 120
53. Yang, J , Marriner, GA, Wang, X, Bowman, PD, Kerwin, SM, Stavchansky, S (2010) Synthesis of a series of caffeic acid phenethyl amide (CAPA) fluorinate derivatives: Comparison of



- cytoprotective effects to caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Bioorganic & Medical Chemistry*. 18, 5032 – 5038.
54. Yang, J, Kerwin, SM, Bowman, PD, Stavchansky, S (2012) Stability of caffeic acid phenethyl amide (CAPA) in rat plasma. *Biomedical Chromatography*. 26, 594 – 598
 55. Yang, J, Bowman, PD, Kerwin, SM, Stavchansky, S (2014) Development and validation of an LCMS method to determine the pharmacokinetic profiles of caffeic acid phenethyl amide and caffeic acid phenethyl ester in male Sprague-Dawley rats. *Biomed Chromatogr* 28,241-6
 56. Zalacain, M, Sierrasesúmaga, L, Patiño, A (2005) El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra* 28 (2), 1137 – 6627
 57. Zou, H, Wu, H, Zhang X, Zhao Y, Stöckigt J, Lou Y, Yu Y. (2010) Synthesis, biological evaluation, and structure activity relationship study of novel cytotoxic aza- caffeic-acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 18, 6351-6359

