



**UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTITLÁN**

**EVALUACION DE LA CAPACIDAD GENOTÓXICA DEL  
COMPUESTO POLIFENÓLICO DERIVADO DEL CAPE  
(ÉSTER FENÉTILICO DEL ÁCIDO CAFEÍCO) MEDIANTE  
EL ENSAYO DE ELECTROFORESIS UNICELULAR EN  
GEL IN VITRO.**

**T E S I S**

**PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**P R E S E N T A**

**MARÍA LUCERO PANIAGUA GARCÍA**

**ASESORA:**

**DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, MÉXICO. 2010**



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.

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Citogenética L521 y el laboratorio 9 de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, bajo la dirección de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo.**

## QUEDA PROHIBIDO

Queda prohibido llorar sin aprender,  
levantarte un día sin saber que hacer,  
tener miedo a tus recuerdos.

Queda prohibido no sonreír a los problemas,  
no luchar por lo que quieres,  
abandonarlo todo por miedo,  
no convertir en realidad tus sueños.

Queda prohibido no demostrar tu amor,  
hacer que alguien pague tus deudas y el mal humor.

Queda prohibido dejar a tus amigos,  
no intentar comprender lo que vivieron juntos,  
llamarles solo cuando los necesitas.

Queda prohibido no ser tú ante la gente,  
fingir ante las personas que no te importan,  
hacerte el gracioso con tal de que te recuerden,  
olvidar a toda la gente que te quiere.

Queda prohibido no hacer las cosas por ti mismo,  
no creer en Dios y hacer tu destino,  
tener miedo a la vida y a sus compromisos,  
no vivir cada día como si fuera un último suspiro.

Queda prohibido echar a alguien de menos sin  
alegrarte, olvidar sus ojos, su risa,  
todo porque sus caminos han dejado de abrazarse,  
olvidar su pasado y pagarlo con su presente.

Queda prohibido no intentar comprender a las personas,  
pensar que sus vidas valen más que la tuya,  
no saber que cada uno tiene su camino y su dicha.

Queda prohibido no crear tu historia,  
no tener un momento para la gente que te necesita,  
no comprender que lo que la vida te da, también te lo quita.

Queda prohibido no buscar tu felicidad,  
no vivir tu vida con una actitud positiva,  
no pensar en que podemos ser mejores,  
no sentir que sin ti este mundo no sería igual.

*Pablo Neruda*

## AGRADECIMIENTOS

A LA UNAM, POR SER  
UNA ESCUELA PARA LA VIDA.

A LA FESC POR PERMITIRME  
SER PARTE DE ELLA.

A LA DRA. SANDRA POR COMPARTIR  
SU TIEMPO Y SABIDURIA.

A MARITERE DOMINGUEZ  
POR SUS CONSEJOS.

A ROSALBA BONILLA  
POR SUS CONOCIMIENTOS Y AMISTAD.

A NATHALIEL SOTO  
POR PERMITIRME SER SU COMPAÑERA.

A TODOS MIS SINODALES  
POR SU TIEMPO Y EXPERIENCIA.

BRIGIDA CAMACHO, MARIO ARTURO MORALES, GERARDO CRUZ,  
ENRIQUE ANGELES, GUILLERMO PENIERES, EVA GODINEZ, MARCO  
ANTONIO VEGA, FRANCISCO LOPEZ Y A TODOS AQUELLOS  
PROFESORES QUE HAN SIDO UNA GUIA Y HAN COMPARTIDO SUS  
CONOCIMIENTOS PARA QUE CADA DIA SEA UNA MEJOR QFB.

## DEDICATORIAS

QUIERO DEDICARLA A TI PAPÁ POR LAS NOCHES DE DESVELO Y LOS DÍAS DE TRABAJO QUE HOY RINDEN FRUTOS.

A TI MAMÁ POR LAS COMIDAS QUE NO ME GUSTAN Y LOS POSTRES QUE ME ENCANTAN, LOS MALOS RATOS Y LOS CONSEJOS.

A MIS HERMANOS PORQUE SIN ELLOS NO SABRÍA QUIEN SOY EN MI FAMILIA.

ANA LAURA VÁZQUEZ PROFESORA, AMIGA Y GUÍA.

A MIS MUY ESTIMADOS Y QUERIDOS AMIGOS CHOCO, CESAR, ALMARCIANA, SOLISES, JORGE, FLORECITA, IRAIS, VIANEY, INGRACIA Y KIKI, PARA SEGUIR COMPARTIENDO LOCURAS Y EXPERIENCIAS.

PAULA Y ARTUR, SON TODO UN RETO AL ESPIRITO, ALMA Y MENTE, EXCELENTES AMIGOS Y QUÍMICOS ADMIRABLES.

VÍCTOR SIN TI HUBIERA SIDO MAS DIFÍCIL ÉSTE CAMINO, ERES UN EXCELENTE QUÍMICO Y SER HUMANO.

ALEX SIEMPRE ESTAS EN LOS MOMENTOS PRECISOS.

## INDICE

Abreviaturas .....	iii
Índice de figuras .....	v
Índice de tablas .....	vi
Resumen .....	vii
I. Marco teórico .....	1
I.1 El Cáncer .....	1
I.1.1. Desarrollo y progresión del cáncer .....	1
I.1.2. Oncogenes .....	4
I.1.3. Genes de supresión tumoral .....	5
I.1.4. Epidemiología del cáncer.....	7
I.2. Terapia farmacológica contra el cáncer.....	13
I.2.1. Clasificación de los antitumorales según su mecanismo de acción .....	13
I.2.2. Clasificación de los antitumorales según su actividad en el ciclo celular ...	15
I.3 CAPE .....	16
I.3.1. Propóleo .....	16
I.3.2. Ácido caféico y sus derivados .....	17
I.3.3. Mecanismos de acción de CAPE .....	17
I.3.4 Modificaciones al CAPE .....	22
I.4 Pruebas para la evaluación genotóxica .....	24
I.4.1 Electroforesis unicelular en gel .....	24
I.4.1.1 Principio de la electroforesis unicelular en gel.....	25
I.4.1.2 Cultivo celular .....	25
I.4.1.3 Evaluación de citotoxicidad y viabilidad celular .....	25
I.4.1.4 Sustancias a evaluar por electroforesis unicelular en gel y controles a utilizar .....	26
I.4.1.5 Análisis de cometas.....	26
II. Justificación.....	28
III. Objetivos .....	29

IV. Diagrama de flujo experimental .....	30
V. Materiales y métodos .....	31
VI. Resultados .....	35
VII. Discusión .....	38
VIII. Conclusiones .....	43
Perspectivas.....	44
Anexos .....	45
Bibliografía.....	47

## ABREVIATURAS

μL	Microlitros
A. C. S.	Sociedad Americana del Cáncer
ALMP	Agarosa de bajo punto de fusión
ALS	Sitios álcali-lábiles
AP	Proteína similar al factor de transcripción
ARE	Elemento de respuesta antioxidante
Bak	Proteína proapoptótica
Bax	Proteína proapoptótica
Bcl <sub>2</sub>	Proteína de células B linfoma/leucemia-2.
C6 Glioma	Línea celular de glioma
CA	Ácido caféico
CAPE	Éster fenético del ácido caféico
COX	Ciclooxigenasa
CYP	Citocromo
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
DEN	Dietilnitrosamina
DMAB	3,2'-Dimetil-4-aminobifenil
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DSB	Rupturas de cadena doble
ESCG	Electroforesis unicelular en gel
F-CAPE	Fluoro éster fenético del ácido caféico
FESC	Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán
GHX	Glutación Peroxidasa
HeLa	Línea celular de cáncer de cérvix
HepG2	Líneas celulares de carcinoma hepático
HIV-1	Virus de inmunodeficiencia humano tipo 1
HL-60	Células de leucemia humana
HO-1	Hemoxigenasa 1
HT 1080	Líneas celulares de carcinoma de colon
HUVECs	Células del endotelio venoso umbilical humano
ICHs	Intercambio de cromátidas hermanas
Keap	Proteína citoplasmática asociada con la actina del citoesqueleto
LPS	Lipopolisacarido
LPS	Lipopolisacarido
mA	Miliampers
MC	Metilcafeato
MMS	Metilmetanosulfonato
m-RNA	Ácido ribonucleico mensajero

MT-1 MMP	Metaloproteasas tipo matriz de membrana
NA01	N[2-clorobencil]cinamida
NF-E2	Factor nuclear E2
NF-kb	Factor nuclear kappa B
NO	Óxido nítrico
Nrf2	Factor 2 relacionado a NF-E2
PEC	Feniletilcafeato
PEDMC	Feniletildimetilcafeato
PKC	Proteincinasa C
PMA	Forbol-12-mistirato-13-acetato
RL	Radicales libres
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SCGE	Electroforesis Unicelular en Gel
SOD	Superóxido dismutasa
SSB	Rupturas de cadena sencilla
SYBR Green I	Colorante fluorescente
TIMP	Inhibidor de metaloproteinasas de matriz de tejido
TNF	Factor de necrosis tumoral
TPA	12-o-tetradecanoilforbol-13-acetato
TPK	Tirosincinasa
V	Volts
YOYO-1	Colorante fluorescente

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Fases del desarrollo tumoral .....	3
Figura 2. Distribución por estadios de cánceres específicos en hispanos y en blancos 2000-2003 .....	12
Figura 3. Composición principal del propóleo .....	16
Figura 4. Estructura del ácido caféico. ....	17
Figura 5. Estructura del CAPE. ....	17
Figura 6. Estructura del derivado NA01.....	22
Figura 7. Imágenes de cometas (de linfocitos), teñidos con DAPI. Representan las clases 0-4 usadas para la clasificación visual.....	27
Figura 8. Viabilidad celular de los distintos tratamientos con NA01, MMS y DMSO a 4 y 6 horas. ....	35
Figura 9. Resultados de la distribución de genotoxicidad en base a la cantidad de células en cada categoría de daño después de la exposición a NA01, MMS y DMSO durante 4 horas. ....	36
Figura 10. Resultados de la distribución de genotoxicidad en base a la cantidad de células en cada categoría de daño después de la exposición a NA01, MMS y DMSO durante 6 horas. ....	37
Figura 11. Síntesis del ácido cinámico precursor del NA01. ....	38
Figura 12. Síntesis del NA01 a partir del ácido cinámico .....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Oncogenes y función de protooncogenes .....	5
Tabla 2. Genes supresores de tumores y sus funciones .....	7
Tabla .3 Probabilidades de desarrollar cáncer invasivo entre hispanos .....	8
Tabla 4. Incidencia del cáncer* comparando hispanos y blancos no hispanos, 2000-2003...10	
Tabla 5. Mortalidad del cáncer* comparando hispanos y blancos no hispanos, 2000-2003..11	
Tabla 6. Resumen de estudios <i>in vitro</i> del CA y CAPE .....	19
Tabla 7. Ejemplos de sustancias utilizadas como controles positivos para el ensayo cometa .....	26
Tabla 8. Porcentaje de viabilidad celular por medio de azul de tripán.....	35
Tabla 9. Resultados del análisis de ensayo cometa de 4 h por categorías.....	36
Tabla 10. Resultados del análisis de ensayo cometa de 6 h por categorías.....	37

## RESUMEN

El cáncer es un grupo heterogéneo de trastornos que se originan a partir de una serie de cambios que conducen a la inmortalización y transformación de una célula de un tejido, siendo las alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores el origen de la mayoría de los tumores. Una vez diagnosticados, es importante dar al paciente una terapia efectiva, que combina varios fármacos que producen efectos secundarios agresivos.

Uno de los principales componentes del propóleo es el CAPE, a este componente se han encontrado y estudiado diversas actividades como: antiinflamatorio, antifúngico, antimicrobiano, entre otras. Entre estas diversas propiedades, destaca su efecto como un inhibidor de la proliferación celular de diversos tipos de líneas de células cancerígenas, así como también, se ha demostrado su efecto protector en hepatocarcinoma en rata.

CAPE tiene la capacidad de regular el estado redox de la célula, activando diversos genes del elemento de respuesta antioxidante (ARE), entre los que se encuentra la hemoxigenasa-1 (HO-1) y de igual manera es mediador del metabolismo de la dietilnitrosamida (DEN). En diversos estudios, se ha demostrado que la actividad biológica está en función de la estructura del compuesto. Con el fin de obtener una mejor actividad biológica se han realizado diversas modificaciones estructurales al CAPE y de estas modificaciones surge el derivado NA01.

Sin embargo, al realizar estas modificaciones se debe asegurar que no exista daño genotóxico por parte del compuesto con la finalidad de que su uso sea seguro. Por tanto, el objetivo de este trabajo es estudiar los efectos genotóxicos del NA01 mediante electroforesis unicelular en gel (SCGE). Para ello se sometieron linfocitos humanos a un estudio de genotoxicidad a diferentes concentraciones y tiempos (10 y 100  $\mu\text{g/mL}$  a 4 y 6 horas). Después se evaluó la viabilidad celular, se colocaron las células en agarosa, se lisaron y fueron sometidas a electroforesis. Después se realizó el análisis de los cometas categorizándolos en 5 grados de daño, contando 100 células de cada tratamiento. Al final los resultados se analizaron estadísticamente con ANOVA y prueba de Turkey 0.05 con el programa estadístico INSTAT. Finalmente se determinó que el compuesto NA01 presenta actividad genotóxica sobre este tipo de células sin embargo, no es comparable con la de otros compuestos antioxidantes de origen natural, por lo que se sugiere seguir realizando otros estudios sobre la actividad biológica de éste.

# **I. MARCO TEÓRICO**

## **I.1 Cáncer**

El cáncer no es una enfermedad única; más bien, es un grupo heterogéneo de trastornos caracterizado por la presencia de células que no responden a los controles normales de la división. Las células cancerosas se dividen de forma rápida y continua, para crear tumores que desplazan y comprimen las células normales y finalmente roban nutrientes a los tejidos sanos (Pierce, 2005).

El cáncer comprende un gran número de padecimientos diversos, todos ellos relacionados entre sí por una característica en común: la alteración de un conjunto de genes cuyos productos cumplen funciones vitales para el control de la proliferación y la diferenciación celular. Las células que forman las neoplasias malignas tienen, además de la capacidad para proliferar de manera descontrolada y formar tumores, la posibilidad de desarrollarlos a distancia para generar metástasis (Mas, 2004).

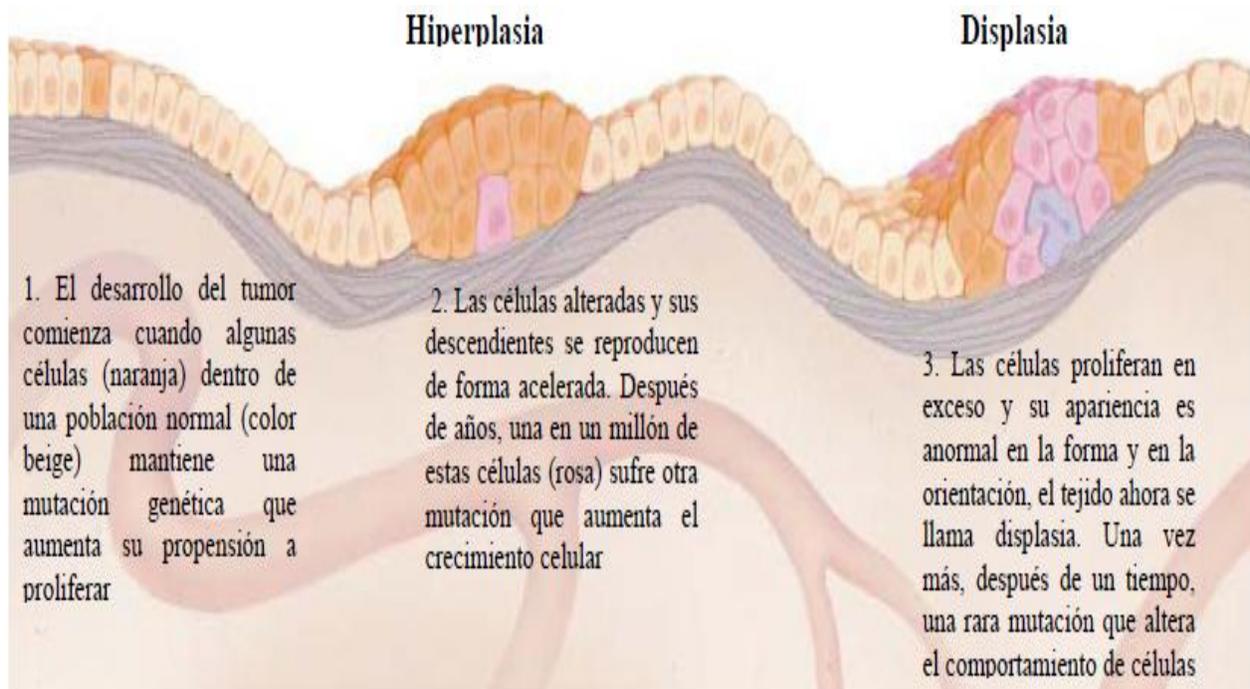
### **I.1.1 Desarrollo y progresión del cáncer**

El origen del cáncer es clonal, es decir, una célula de un tejido presenta cambios que conducen a la inmortalización y transformación (Domínguez, 2008). Estos cambios se producen generalmente por dos vías: inestabilidad en el DNA (mutaciones puntuales o deleciones/ inserciones de secuencias microsatélite) y la inestabilidad a nivel cromosómico (translocaciones, deleciones, duplicaciones, aneuploidias o inversiones) (Domínguez, 2008. Mas, 2004).

Las alteraciones en oncogenes y genes supresores de tumores son el origen de la mayoría, si no es que, de la totalidad de los tumores que afectan a los humanos. La incidencia de ciertos tumores se incrementa dramáticamente con la edad lo cual indica la existencia de eventos, a nivel molecular, que son irreversibles. Estos eventos están constituidos por mutaciones somáticas que se acumulan a un ritmo mayor que en células sanas, es decir, presentan un “fenotipo mutador”. La acumulación de las mutaciones son el origen del desarrollo del cáncer, ya que el fenotipo mutador puede alterar los mecanismos de control de

ciclo celular, resistencia a la apoptosis, reparación del DNA, o aumento en las frecuencias de errores en la replicación atribuibles a la DNA polimerasa. En promedio se requieren entre 5 y 7 mutaciones en diferentes genes para que se desarrolle un tumor invasor capaz de formar metástasis (Domínguez, 2008. Mas, 2004). Estas mutaciones hacen proliferar un conjunto de células troncales alteradas genéticamente, lo cual resulta en el aumento del número de células iniciadas, que podrían acumular otras alteraciones y, así, formar un tumor que terminará matando al paciente (Mas, 2004), ésta formación se puede observar en la figura 1 donde se muestran las fases del desarrollo tumoral.

Las mutaciones en las células del tumor, abarcan una amplia gama de alteraciones estructurales en el genoma, que pueden coexistir dentro de un mismo tumor. Una alteración simultánea en células tumorales induce anormalidades metabólicas; las vías estimuladas anormalmente son la glicólisis, glutaminólisis, síntesis de ácidos nucleicos, síntesis de lípidos y colesterol, sin embargo el comportamiento metabólico puede variar de acuerdo al tipo de tumor (Domínguez, 2008; Sugimura y cols, 1992).



## Fases del desarrollo tumoral



Figura 1. Fases del desarrollo tumoral. Modificado de Weingberg, 1996.

### **I.1.2 Oncogenes**

Los oncogenes representan versiones alteradas de genes normales denominados protooncogenes y se considera que sus productos funcionan de manera positiva al inducir la proliferación y división celular (Mas, 2004).

En 1975 Michael Bishop, Harold Varmus y colaboradores empezaron a usar sondas para oncogenes virales en busca de secuencias relacionadas en las células normales. Estos autores descubrieron que los genomas de todas las células normales poseen secuencias de DNA estrechamente relacionados con los oncogenes virales. Estos genes celulares se denominan protooncogenes. Son los responsables de funciones celulares básicas en las células normales, cuando mutan se transforman en oncogenes que contribuyen al desarrollo del cáncer.

Se han identificado protooncogenes que codifican proteínas muy diversas:

- Factores estimuladores del crecimiento celular.
- Receptores de factores de crecimiento o de hormonas.
- Proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales.
- Factores de transcripción que controlan la expresión de genes que codifican a su vez proteínas implicadas en la señalización, el control del ciclo celular o la apoptosis.
- Proteínas responsables de la activación directa del ciclo celular o de la inhibición de apoptosis (Domínguez, 2008; Munnes y cols., 1998).

Así mismo su localización y función celular es variada, como se puede observar en la tabla 1.

**Tabla 1. Oncogenes y función de protooncogenes. (Tomada de Griffiths, 2005 y Pearce, 2005)**

Algunos oncogenes y función de los protooncogenes correspondientes.		
Oncogén	Localización celular del producto	Función del protooncogén
Sis	Citoplasmático	Factor de crecimiento
ErbB	Membrana celular	Parte del receptor del factor de crecimiento
ErbA	Citoplasma	Receptor de la hormona tiroidea
Src	Membrana celular	Tirosincinasa de proteínas.
Ras	Membrana celular	Ligador de GTP y GTPasa
Myc	Núcleo	Factor de transcripción
Fos	Núcleo	Factor de transcripción
Jun	Núcleo	Factor de transcripción
bcl-1	Núcleo	Control del ciclo celular
Abl	Citoplasma	Tirosincinasa
Gsp	Citoplasma	Subunidad $\alpha$ de la proteína G.
Fms	Membrana citoplasmática	Receptor de tirosincinasa

### **I.1.3 Genes de supresión tumoral.**

En el caso de los tumores sólidos humanos, uno de los mecanismos más comunes para su formación involucra la pérdida completa de la(s) función(es) normal(es) de una serie de genes cuyos productos regulan el crecimiento de las células. Los productos de estos genes funcionan como inhibidores del crecimiento o de la división celular y debido a esto han sido genes supresores de tumores (Mas, 2004).

Los genes supresores de tumores son más difíciles de identificar que los oncogenes porque ellos inhiben el cáncer y son recesivos; ambos alelos deben mutar para que desaparezca la inhibición de la división celular. Debido a que la insuficiencia de su función es

lo que promueve la proliferación celular. Los genes supresores de tumores no pueden identificarse agregándolos a células y buscando la inhibición del cáncer (Pierce, 2005). En general se requieren defectos en ambas copias de un gen supresor de tumores para producir cáncer; un organismo puede heredar una copia defectuosa de un gen supresor de tumores (es heterocigótico para la mutación que causa cáncer) y no tener cáncer porque el alelo normal restante sigue produciendo la proteína supresora del tumor. Sin embargo, estos heterocigotos a menudo están predispuestos al cáncer porque la inactivación o la pérdida de un alelo remanente es todo lo que se requiere para eliminar por completo el producto supresor de tumores y se denomina pérdida de heterocigocidad. Un mecanismo frecuente de pérdida de heterocigocidad es una deleción en el cromosoma que portaba una copia normal del gen supresor de tumor.

En algunos casos la mutación o la pérdida de un solo alelo de un gen supresor de tumor recesivo es suficiente para producir cáncer. Este efecto se denomina haploinsuficiencia. Se considera que este fenómeno ocurre debido a los efectos de la dosificación: el heterocigoto solo produce el 50% del producto codificado por el fenotipo supresor de tumores (Pierce, 2005).

Al igual que los oncogenes, los genes supresores de tumor codifican proteínas que actúan sobre distintos puntos de las rutas de señalización de control y de la apoptosis:

- Factores inhibidores del crecimiento celular, receptores de factores inhibidores o de hormonas que frenan el crecimiento celular.
- Proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales.
- Proteínas que frenan el ciclo celular o producen apoptosis.

Y de la misma manera que los oncogenes, los genes supresores de tumor tienen diferentes localizaciones celulares como se puede observar en la tabla 2.

**Tabla 2. Genes supresores de tumores y sus funciones (Tomada de Griffiths y cols., 2005 y Pierce 2005)**

Algunos genes supresores de tumores y sus funciones		
Gen	Localización celular del producto	Función
NF1	Citoplasma	Activador de GTPasa
p53	Núcleo	Factor de transcripción, regula la apoptosis.
RB	Núcleo	Factor de transcripción
WT-1	Núcleo	Factor de transcripción

#### **I.1.4 Epidemiología del cáncer**

El cáncer es el mayor problema de salud pública en Estados Unidos de América y en muchas otras partes del mundo. Aproximadamente 1 de cada 4 muertes en los Estados Unidos de América ocurren a causa del cáncer (Ahmedin, 2008).

Más de un millón de personas desarrollan cáncer cada año. En Norte América, aproximadamente uno de cada dos hombres y una de cada tres mujeres, desarrollan algún tipo de cáncer en un momento de su vida (Beltrán y cols., 2006).

Durante el año 2006 se calculó un diagnóstico de 39 940 nuevos casos de cáncer en hombres hispanos en Estados Unidos y 42 140 en mujeres. Siendo el cáncer de próstata el más diagnosticado en hombres y el de seno en mujeres. Los cánceres de colon y recto, y de pulmón serán el segundo y tercer cáncer más frecuente diagnosticado en ambos sexos. Los cuatro tipos de cáncer más comunes (seno, próstata, colon y recto, pulmón) representan cerca del 50% del total de casos tanto en hombres como en mujeres como se puede observar en la tabla 3 (A. C. S., 2006).

**Tabla 3. Probabilidades de desarrollar cáncer invasivo entre hispanos. (Tomada de Sociedad Americana del Cáncer. Datos y estadísticas sobre el cáncer en los hispanos/latinos 2006-2008.)**

Cáncer		Nacimiento a 39 años (%)	40 a 59 años (%)	60 a 69 años (%)	70 en adelante (%)	Nacimiento a muerte (%)
Todos	Hombres	1.11	5.91	12.69	36.84	40.95
	Mujeres	1.63	7.07	7.87	24.03	33.30
Seno	Mujeres	0.37	2.91	2.38	4.78	9.23
Colon	Hombres	0.06	0.72	1.38	4.17	5.03
	Mujeres	0.06	0.55	0.89	3.63	4.48
Hígado y conducto biliar intrahepático	Hombres	0.01	0.37	0.45	0.94	1.46
	Mujeres	0.01	0.08	0.17	0.61	0.76
Pulmón y bronquios	Hombres	0.02	0.45	1.30	4.85	5.21
	Mujeres	0.02	0.34	0.77	2.71	3.36
Melanoma	Hombres	0.02	0.08	10	0.36	0.45
	Mujeres	0.06	0.12	0.09	0.27	0.49
Próstata	Hombres	<0.01	1.70	5.73	14.01	16.29
Estómago	Hombres	0.03	0.24	0.41	1.57	1.80
	Mujeres	0.03	0.18	0.23	1.12	1.36
Cuello uterino	Mujeres	0.19	0.50	0.27	0.35	1.22

Con la información disponible de 2004 a 2007 se observa que en México, al igual que en el plano internacional, existe un incremento en los casos de cáncer. Se puede observar en la tabla 4 que durante 2004 se registraron un total de 135 708 egresos hospitalarios, de los cuales 43.7% ocurrieron en varones y 56.3% en mujeres; durante 2005, hay un incremento de 1 429 casos (137 137 en total); para 2006, se presenta un aumento de 8 008 egresos hospitalarios más por tumores malignos al reportarse 145 145 casos y en 2007 se registra otro crecimiento en los egresos hospitalarios de 4 375 casos (INEGI, 2010).

Se entiende por etapa o estadio de la enfermedad, el alcance o propagación del cáncer en el momento del diagnóstico. El estadio local describe un cáncer maligno que está limitado al órgano de origen. El cáncer que se diagnostica en estadio regional indica que se ha extendido desde su punto original a los órganos o tejidos circundantes, o a los nódulos linfáticos próximos. El cáncer de estadio distante se extiende a órganos lejanos. En general, cuanto más se ha extendido el cáncer, menor es la probabilidad de eficacia del tratamiento. En la figura 2 se observa que aunque los hispanos tienen tasas de incidencia y mortalidad más bajas que los blancos no hispanos con respecto a la mayoría de los cánceres más comunes, las probabilidades de que su cáncer se diagnostique en una etapa más avanzada son más altas, esto probablemente debido a razones socioeconómicas (A. C. S., 2006). En la tabla 5 se puede ver que en 2006 murieron 12, 320 hombres y 11, 000 mujeres hispanas. Entre los hombres, el cáncer de pulmón es responsable de aproximadamente 21% del total de las muertes, seguido del cáncer de colon y recto (11%) y el de próstata (9%). Entre las mujeres el cáncer de seno es el que tiene la mayor incidencia de mortalidad (16% del total), seguido del cáncer de pulmón (14%) y el de colon y recto (9%) (A. C. S., 2006).

**Tabla 4. Incidencia del cáncer\* comparando hispanos y blancos no hispanos, 2000-2003. (Tomada de Sociedad Americana del Cáncer. Datos y estadísticas sobre el cáncer en los hispanos/latinos 2006-2008.)**

	Hombres			Mujeres		
	Hispanos	Blancos no hispanos	Razón de tasas <sup>†</sup>	Hispanos	Blancos no hispanos	Razón de tasas <sup>†</sup>
Todos los tipos	419.1	574.0	0.7	310.9	438.8	0.7
Próstata	141.1	167.9	0.8	-	-	-
Seno (mujeres)	-	-	-	89.1	140.6	0.6
Colon y recto	47.3	62.7	0.8	32.7	45.7	0.7
Pulmón y bronquios	44.7	81.9	0.5	24.0	56.8	0.4
Estómago	15.9	9.5	1.7	9.6	4.1	2.3
Cuello uterino	-	-	-	14.2	7.3	1.9
Hígado y conducto biliar intrahepático	14.1	6.9	2.0	5.6	2.5	2.2
Leucemia linfoblástica aguda	2.3	1.7	1.4	2.0	1.3	1.5
Vesícula biliar	1.5	0.7	2.0	3.4	1.1	3.0

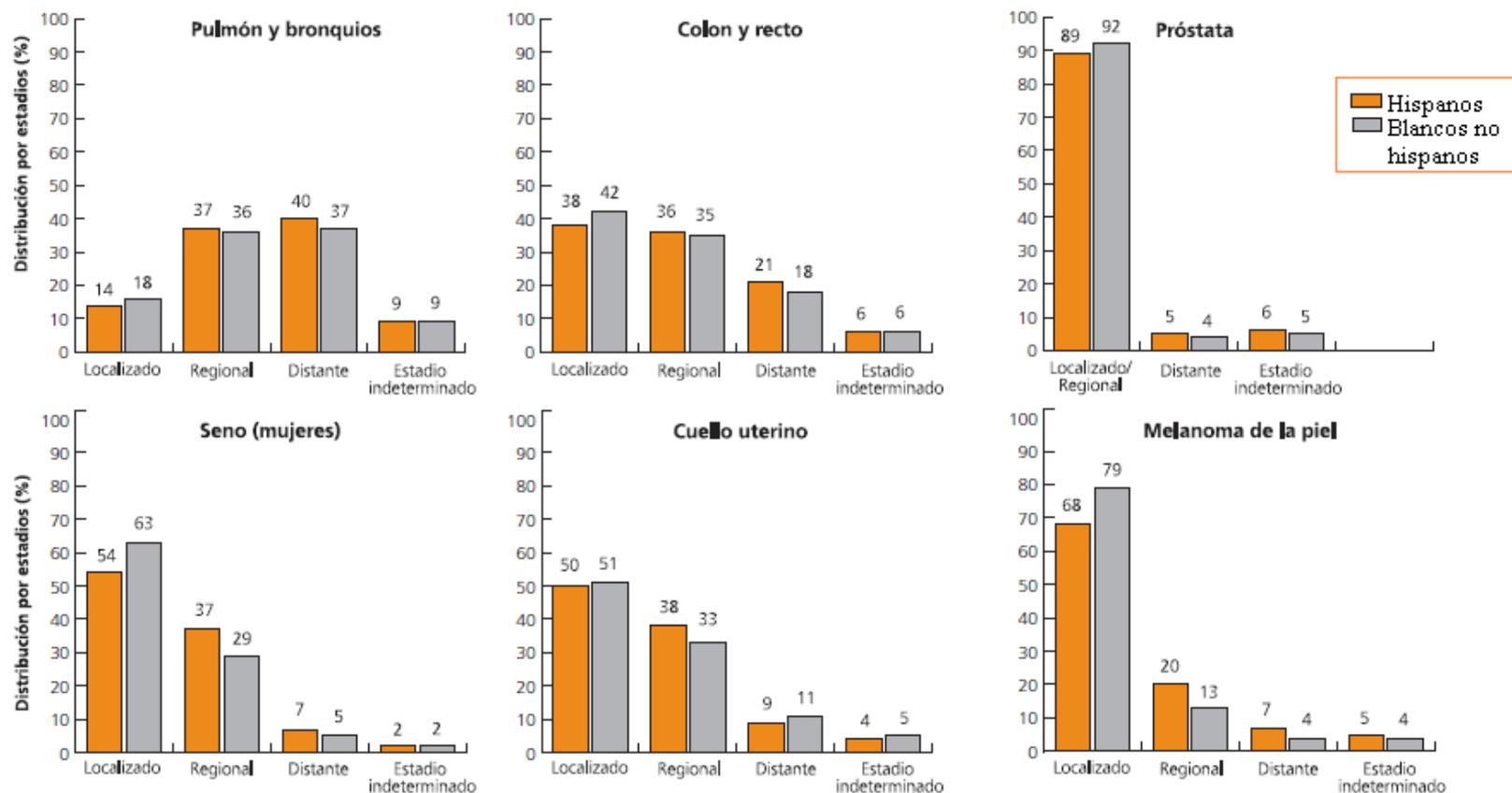
\*Las tasas son por 100, 000 habitantes y se ajustan según la edad a la población estándar de USA en el año 2000. <sup>†</sup> Las tasas se calculan como la tasa de incidencia de los hispanos dividida entre la tasa de incidencia de los blancos no hispanos.

**Tabla 5. Mortalidad del cáncer\* comparando hispanos y blancos no hispanos, 2000-2003. (Tomada de Sociedad Americana del Cáncer. Datos y estadísticas sobre el cáncer en los hispanos/latinos 2006-2008.)**

	Hombres			Mujeres		
	Hispanos	Blancos no hispanos	Razón de tasas <sup>†</sup>	Hispanos	Blancos no hispanos	Razón de tasas <sup>†</sup>
Todos los tipos	165.1	241.7	0.7	108.1	166.3	0.7
Próstata	21.8	26.2	0.8	-	-	-
Seno (mujeres)	-	-	-	16.2	25.8	0.6
Colon y recto	17.3	23.8	0.7	11.3	16.5	0.7
Pulmón y bronquios	36.6	76.2	0.5	14.7	44.3	0.3
Estómago	9.1	5.0	1.8	5.1	2.4	2.1
Cuello uterino	-	-	-	3.4	2.3	1.5
Hígado y conducto biliar intrahepático	10.7	6.1	1.8	5.0	2.6	1.9
Leucemia linfoblástica aguda	0.8	0.6	1.3	0.6	0.4	1.6
Vesícula biliar	0.8	0.5	1.8	1.4	0.7	1.9

\*Las tasas son por 100, 000 habitantes y se ajustan según la edad a la población estándar de USA en el año 2000.

<sup>†</sup> Las tasas se calculan como la tasa de incidencia de los hispanos dividida entre la tasa de incidencia de los blancos no hispanos.



\*Los hispanos no son mutuamente excluyentes de los blancos, afroamericanos, asiáticos/isleños del Pacífico e indios americanos/nativos de Alaska.

Nota: Es posible que los totales porcentuales no constituyan un 100% debido al redondeo de las cifras.

**Fuente:** Programa de Vigilancia, Epidemiología y Resultados Finales (SEER), 17 registros SEER, 2000 a 2003, División de Control del Cáncer y Ciencias de la Población, Instituto Nacional del Cáncer, 2006. Los datos de incidencia de los hispanos y de los blancos no hispanos se basan en el Algoritmo de Identificación Hispana (NHIA) NAACCR. Se excluyen los casos de Hawaii, Seattle, el Registro de Nativos de Alaska y Kentucky.

Figura 2. Distribución por estadios de cánceres específicos en hispanos y en blancos 2000-2003. (Tomada de Sociedad Americana del Cáncer. Datos y estadísticas sobre el cáncer en los hispanos/latinos 2006-2008.)

## **I.2 Terapia farmacológica contra el cáncer**

Los fármacos antitumorales son moléculas capaces de interferir en el proceso de desarrollo de ciertos tumores malignos y por tanto presentan la posibilidad de ser administrados para combatir dicho mal. Sin embargo estos fármacos poseen un estrecho margen terapéutico, elevada toxicidad y pueden inducir la aparición de resistencia en las células tumorales (Kalant, 2003).

### **I.2.1 Clasificación de antitumorales según su mecanismo de acción.**

Según su mecanismo de acción estos fármacos pueden dividirse en:

- **Agentes alquilantes.**

Los agentes alquilantes son fármacos químicamente diversos que actúan mediante enlace covalente de grupos alquilo con macromoléculas intracelulares. Estos agentes se clasifican como monofuncionales (un grupo reactivo) o bifuncionales (dos grupos reactivos). Los agentes alquilantes bifuncionales pueden formar enlaces cruzados entre moléculas biológicas y son el tipo más útil en la clínica. Los agentes alquilantes fueron los primeros empleados para tratar tumores malignos y ahora se usan en muchos regímenes quimioterápicos combinados. Algunos ejemplos son melfalan, nitrosoureas y clorambucil (Kalant, 2003).

- **Antimetabolitos**

Los antimetabolitos son fármacos sintéticos que actúan como inhibidores de vías bioquímicas fundamentales en la formación de DNA, RNA o la división mitótica (Florez, 1992; Kalant, 2003). Estos agentes tienden a ser dependientes del ciclo puesto que afectan células en división rápida. La toxicidad más común se observa en la mucosa gastrointestinal (estomatitis y diarrea) y médula ósea (neutropenia y trombocitopenia). Algunos ejemplos son el metotrexato, 5-fluoracilo y 6-tioguanina (Kalant, 2003).

- **Antibióticos antitumorales**

Los antibióticos antitumorales, al igual que sus homólogos antimicrobianos, son productos de fermentación derivados de cultivos de hongos o plantas, por ejemplo la

vinblastina y vinorelbina (Kalant, 2003). Sus mecanismos de acción difieren desde producción de rupturas en el DNA hasta unión selectiva al DNA, y existe toxicidad específica característica de cada fármaco (Florez, 1992).

- **Agentes diversos**

#### **L-asparaginasa**

El uso de la enzima L-asparaginasa (Elspar, Kidrolasa, Oncaspar) es resultado de uno de los intentos satisfactorios para identificar algún factor o rasgo único de las células cancerosas que pueda aprovecharse con propósitos diagnósticos o terapéuticos. Ciertas células leucémicas son deficientes en la enzima sintetasa L-asparaginasa y por tanto, dependen del suministro extracelular del aminoácido L-asparagina. Si este suministro se interrumpe por administración de L-asparaginasa, aquellas células leucémicas que carecen de la sintetasa L-asparagina sufren inhibición notable de la síntesis de proteína y no sobreviven. (Kalant, 2003).

#### **Hidroxiurea**

La hidroxiurea es un derivado de urea que se emplea sobre todo para reducir con rapidez el recuento alto de leucocitos en pacientes con leucemia granulocítica crónica (LGC). Su mecanismo de acción es inhibir la enzima ribonucleótido reductasa, por tanto, agota las reservas intracelulares de nucleótido y causa acumulación de células en la fases G1 tardía y S temprana del ciclo celular (Kalant, 2003).

- **Hormonas**

En el tratamiento de cánceres dependientes de hormonas se emplean algunos análogos sintéticos de hormonas y sus antagonistas, principalmente en cánceres de mama y de próstata (Kalant, 2003), ya que su función dependerá de sí existen o no los receptores apropiados en las células blanco (Florez, 1992).

- **Principios activos de plantas**

Este grupo de compuestos está representado por alcaloides de la vinca, epipodofilotoxinas, taxanos y camptotecina y sus análogos, todos ellos extraídos de plantas. Algunos de los mecanismos de protección de estas sustancias son el secuestro de radicales

libres, la reducción en la generación de especies reactivas del oxígeno o nitrógeno (ROS/RNS), el incremento del nivel de glutatión, la peroxidación lipídica y la oxidación de proteínas, el aumento de la reparación del DNA, el incremento de la proliferación celular, la detención del ciclo celular y la estabilización del potencial de membrana del citoplasma y la mitocondria (Alegría, 2006)

### **I.2.2 Clasificación según su actividad en el ciclo celular.**

También se pueden clasificar los quimioterapéuticos según su actividad sobre la cinética celular:

- **Agentes fase específicos** (Ciclo dependientes y fase dependientes) son fármacos que actúan sobre una fase concreta del ciclo celular. Su efectividad puede favorecerse por una exposición prolongada, ya que permite extender su acción sobre un mayor número de células, pero a partir de una dosis determinada el incremento de dicha dosis no incrementa la respuesta. Son ejemplos de agentes fase específicos los alcaloides de vincristina y vinblastina que actúan en la fase M y la L-asparaginasa que actúa en la fase G1.
- **Agentes ciclo específicos**, pero fase inespecíficos (ciclodependientes y fase independientes) destruyen las células que están dentro del ciclo celular, independientemente de la fase en que se encuentren. No actúan sobre la fase de reposo, más bien en las fases S, G2 y M. Son ejemplos de estos agentes los compuestos alquilantes, el cisplatino y los antibióticos antitumorales.
- **Agentes cicloinespecíficos y fase inespecíficos**: son efectivos tanto para células en fase de división como en fase de reposo. Son ejemplos de este tipo de sustancias los esteroides y la bleomicina (Kuklinski, 2000).

Sin embargo, de manera reciente se han buscado fármacos o productos, que prevengan la aparición del cáncer. La quimioprevención se basa en la hipótesis de la interrupción de los eventos biológicos involucrados en la carcinogénesis, ésta inhibirá el

proceso y evitará la presencia de cáncer (Beltrán y cols., 2006) reduciendo los gastos en tratamiento a mediano y largo plazo, proporcionando un ahorro monetario tanto a las personas susceptibles como a las instituciones de asistencia pública.

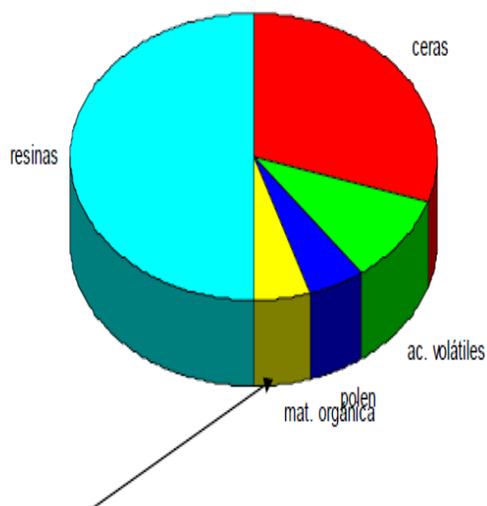
La quimiopreención se acuñó para describir una nueva disciplina en oncología, que consiste en el uso de compuestos sintéticos o naturales como el CAPE, para inhibir, retardar o revertir la carcinogénesis (Beltrán y cols., 2006).

### I.3 CAPE

#### I.3.1 Propóleo

El propóleo es una resina cerosa, de composición compleja y consistencia viscosa que las abejas elaboran a partir de sustancias resinosas de diferentes vegetales y que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena. Ampliamente utilizado desde la antigüedad con diversas finalidades (Farré y cols., 2004). El propóleo ha sido utilizado en

medicina tradicional desde 300 a. C. y ha sido reportado con un gran espectro de propiedades como antiinflamatorias, antimicrobianas, antineoplásicas, antifúngicas y antioxidantes (Nagaoka y cols., 2003) las cuales pueden contribuir a efectos protectores en varios procesos patofisiológicos (Wang y cols., 2010). Actualmente se investigan las acciones, efectos y posibles usos del propóleo en biología y medicina, destacando su utilización como suplemento dietético y en la industria farmacéutica (Farré y cols., 2004).



- Flavonoides (galangina, quercitina, etc.)
- Ácidos aromáticos y sus ésteres (ácido cafeico, cinámico...)
- Aldehídos aromáticos (vainillina, isovainillina)
- Cumarinas
- Vitaminas y minerales.

Figura 3. Composición principal del propóleo. (Tomada de Saiz y cols., 2001.)

Los principales componentes del propóleo son resinas y bálsamos que contienen flavonoides y ácidos fenólicos o sus ésteres (50%); poseen ceras de naturaleza variable (7.5-35%) que afectarán a los correspondientes componentes restantes; aceites volátiles (10%); polen (5%) e impurezas (4.4-19.5%). El propóleo contiene además pequeñas cantidades de terpenos, taninos, restos de las secreciones salivales de las abejas y otros posibles contaminantes (Domínguez, 2008).

### I.3.2 Ácido caféico y sus derivados

El éster fenetílico del ácido caféico (CAPE) ha sido identificado como uno de los componente principales del propóleo de abeja (Etzenhouser y cols., 2001). El CAPE es un derivado del ácido cinámico (figuras 4 y 5), que confiere directamente varias de estas propiedades al propóleo, el cual es citotóxico al tumor y a la transformación vírica pero no a las células normales. A este compuesto se le han realizado diversos estudios desde principios de la década de los 90's con los cuales se comenzó a establecer su potencial como agente quimiopreventivo por distintos mecanismos (Saiz y cols. 2001). CAPE es un antioxidante que ha tenido actividad contra el cáncer oral y de colobn, debido al efecto inhibitorio de la ciclooxigenasa II (COX-2) (Ya-Ting y cols., 2005).

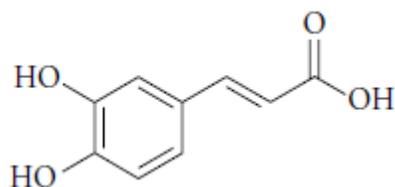


Figura 4. Estructura del ácido caféico.

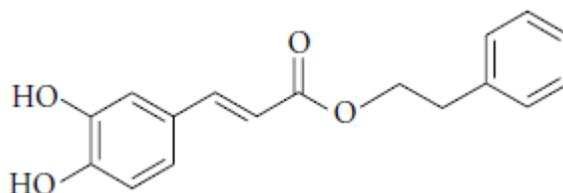


Figura 5. Estructura del CAPE.

### I.3.3 Mecanismos de acción del CAPE

En años recientes la atención se ha centrado en el empleo de compuestos polifenólicos como inhibidores del proceso oxidativo y estudiar su mecanismo de acción

(Etzenhouser, 2001). El daño oxidativo sobre las macromoléculas acarrea diversas alteraciones, por ejemplo tanto en los ácidos nucleicos en el DNA nuclear, que puede causar alteraciones genéticas, mutaciones, enfermedades autoinmunes y cáncer, como en el DNA mitocondrial, involucrado en los procesos de envejecimiento, pueden ser afectados por modificaciones oxidativas (Saiz y cols., 2001).

Saravana y colaboradores realizaron un estudio de mutagenicidad con la prueba de Ames acerca de la síntesis de 3 ésteres cafeícos, llamados metil cafeato (MC), feniletil cafeato (PEC) y feniletil dimetilcafeato (PEDMC), los examinaron contra el 2,3-dimetil-4-aminobifenil (DMAB, un carcinógeno de mama y colon) induciendo mutagenicidad en cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA 100. Ambas cepas de *S. typhimurium* tuvieron una sobrevivencia mayor de 98%, con una concentración de 2,500  $\mu\text{M}$  de CA, 150  $\mu\text{M}$  de MC, 70  $\mu\text{M}$  de PEC y 80  $\mu\text{M}$  de PEDMC/placa. Más de 150  $\mu\text{M}$  de MC, 40-80  $\mu\text{M}$  de PEDCM, 40-60  $\mu\text{M}$  de PEC inhiben significativamente la mutagenicidad inducida por DMAB (carcinógeno de colon y mama) en ambas cepas (Saravana y col., 2009).

Se ha encontrado que el CAPE inhibe el número de papilomas en piel de 24, 30, 45 y hasta 70% y el tamaño de los tumores por ratón decreció en 42, 66, 53 y 74%, respectivamente. Esto debido a que CAPE inhibe la activación del NF- $\kappa$ B dependiente de TNF, de manera dosis dependiente con un máximo efecto alrededor de 25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . La activación del NF- $\mu$ B inducida por el éster de forbol, forbol-12-mistirato-13-acetato (PMA) y por peróxido de hidrógeno también fue inhibido por CAPE. Esto previene la traslocación de la subunidad p-65 del NF- $\kappa$ B hacia el núcleo sin afectar la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  dependiente de TNF (Wang y cols., 2009).

Finalmente en el estudio de Saravana y colaboradores, se concluyó que CA y su derivado CAPE: (1) inhibe la actividad enzimática de MMP-9 que juega un papel muy importante en la invasión de cáncer y metástasis, (2) bloqueando el potencial invasivo a través de la supresión de la transcripción de MMP-9 por inhibición de la función NF- $\kappa$ B en PMA- simulado en células HepG2 y (3) supresión del crecimiento de células HepG2 y xenoinjertos en ratones sin pelo. Por tanto, estos dos compuestos fueron reportados como

fuertes candidatas para el tratamiento de cáncer y metástasis vía mecanismo dual (inhibición de actividad enzimática específica de metástasis y transcripción) (Saravana y col, 2009). En la tabla 6 se muestran los resultados de estudios en diversas líneas celulares *in vitro*.

**Tabla 6. Resumen de estudios *in vitro* del CA y CAPE. (Saravana y col., 2009)**

Componente	Línea celular probada	Resultados /Observaciones												
CAPE	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>20µM</td> </tr> <tr> <td>RNA</td> <td>75</td> <td>20µM</td> </tr> <tr> <td>Proteína</td> <td>47</td> <td>20µM</td> </tr> </tbody> </table>	Sustancia	% Inhibición	Concentración	DNA	95	20µM	RNA	75	20µM	Proteína	47	20µM
Sustancia	% Inhibición	Concentración												
DNA	95	20µM												
RNA	75	20µM												
Proteína	47	20µM												
CAPE	U-937	<p>(a) Máxima inhibición del NFκB a 25µg/mL después del tratamiento con TNF.</p> <p>(b) Sin efecto inhibitorio sobre AP-1, TFIID, y Oct-1</p> <p>(c) Análogos estructurales 5, 6-dihidroxi inhibieron fuertemente el NF-κB</p>												
CAPE	C6 glioma	<p>(a) Fragmentación de DNA a 50 µM después de 24 horas</p> <p>(b) p-p53 ↑, actividad de Caspasa 3 ↑, Bak and Bax ↑, Bcl2 ↓</p>												
CA, CAPE	HepG2	<p>(a) CA y CAPE inhibieron MMP-2 y 9 con IC<sub>50</sub> de 10–20 µM y 2–5 µM</p> <p>(b) CA a la concentración de 200 µg/mL redujo la viabilidad celular a 61% comparado con los controles, y el tratamiento con CAPE (20 µg/mL) en células HepG2 redujo la viabilidad a 72% de los controles</p>												
CAPE	HT 1080	<p>(a) Los niveles de m-RNA de MMP-2 y MMP-9 fueron inhibidos ↓</p> <p>(b) Los niveles de m-RNA de TIMP-1 y MT-1 MMP fueron inhibidos ↓</p>												

El CAPE también es un potente inhibidor de las enzimas ornitina descarboxilasa, ciclooxigenasa, lipooxigenasa e integrinas de HIV-1. Es sabido que las células poseen sistemas enzimáticos antioxidantes capaces de metabolizar los radicales libres (RL) generados en los diversos procesos redox del metabolismo celular. La catalasa y la glutatión peroxidasa (GHX) que descomponen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la superóxido dismutasa (SOD) que descompone O<sub>2</sub>, son las más importantes. Las deficiencias de selenio, cobre, cinc o manganeso pueden condicionar una inadecuada actividad de las enzimas antioxidantes lo que puede llevar a un estrés oxidativo en la célula y con ello a diversos cambios en las biomoléculas (Saiz y col, 2001). De igual manera al CAPE se le atribuye la capacidad de inhibir la formación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> intracelular y bases oxidadas en el DNA en células humanas con lo cual se ejerce un efecto cito y genoprotector (Etzenhouser y cols., 2001).

El control de la proliferación celular mediante apoptosis en diversos tipos celulares de mamífero es dirigido por un receptor mediante eventos que pueden conducir a la generación de  $O_2^{\cdot -}$  y  $H_2O_2$ . Entonces la proliferación y apoptosis celular son respuestas alternativas que dependen de un balance celular redox específico en un determinado tiempo (Chia y cols., 1995). La toxicidad de CAPE en células tumorales está influida por el estado redox de las células. La sensibilidad de las células a CAPE puede ser determinada por la pérdida de la regulación del estado redox normal en las células transformadas (Saiz y cols., 2001).

Trabajos previos de Wang, 2008 y Barañano, 2002 demuestran que el efecto citoprotector del CAPE contra el estrés oxidativo fue hecho por la regulación positiva del mRNA de la hemoxigenasa-1 (HO-1) y está correlacionado con la producción de la enzima (Wang, 2008) que es altamente inducible por diversos estímulos que causan el estrés celular (Barañano y cols., 2002).

Así mismo se ha demostrado que CAPE posee un efecto citoprotector a dosis de 5-10  $\mu\text{g/mL}$  (Wang y cols., 2006), contra la menadiona inducida por estrés oxidativo en HUVECs a través del mecanismo de la inducción de la enzima HO-1 (Wang y cols., 2008). HO-1 ha sido identificada como el componente mayoritario del sistema de defensa celular contra el estrés oxidativo mediante la generación de biliverdina, bilirrubina y monóxido de carbono que poseen potentes actividades antioxidantes y antiinflamatorias. Se ha encontrado también que a través del reciclamiento del hierro molecular en productos finales de degradación de ferroglobinas (Ryter y cols., 2006) el CAPE reduce los niveles de especies reactivas de oxígeno intracelulares (Wang y cols., 2010).

Un mecanismo cuantificable para la inducción de la HO-1 es a través de la activación de la vía Keap1/Nrf2/ARE por CAPE y F-CAPEs como aceptor en la reacción de Michael. En condiciones basales Keap-1 es, una proteína citoplasmática, asociada con la actina del citoesqueleto; secuestra Nrf2 en citoplasma en forma del complejo Keap1-Nrf2, así reprime su función. Los inductores con carbonilos  $\alpha$ - $\beta$  insaturados, tales como CAPE y

F-CAPE pueden reaccionar directamente con los grupos sulfhidrilos de dos residuos de cisteínas (C273 y C288) de Keap1 resultando en la formación de enlaces disulfuro. Este cambio conformacional disocia el enlace de Keap1 con Nrf2 liberando a Nrf2 el cual puede ser trasladado hacia dentro del núcleo donde se une al elemento de respuesta antioxidante (ARE) para acelerar la activación trascricional de los genes antioxidantes de fase 2 los cuales incluyen la enzima HO-1 (Wakabayashi y cols., 2004; Wangy cols, 2010).

Por otra parte se reporta que en diversos tumores se han encontrado altas concentraciones de prostaglandinas que estimulan la proliferación celular y a su vez inhiben la respuesta inmune. La inhibición de la síntesis de prostaglandinas, incluyendo la inhibición selectiva de la COX-2 (inhibe apoptosis), ejerce un efecto protector contra la carcinogénesis. El CAPE, con sus propiedades anticancerígenas y antiinflamatorias inhibe el desarrollo de criptas aberrantes en colon de ratas y también bloquea la tumorigénesis en cáncer de piel. Dichas propiedades del CAPE han sido atribuidas a que logra la supresión de la síntesis de eicosanóides (Michaluart y cols., 1999).

Michaluart y colaboradores (1999), reportan que el CAPE a concentración de 1µg/mL inhibe la acción mutagénica del TPA mediante la inhibición directa de COX-1 y COX-2 e inhibe la liberación de ácido araquidónico de la membrana fosfolípídica, *in vivo* se ha demostrado, debido a dicha acción que CAPE es capaz de estimular apoptosis y el sistema inmune. Sin embargo el ácido araquidónico puede ser convertido en otros eicosanosides por la lipooxigenasa, que modulan la inflamación y la tumorigénesis.

Con el descubrimiento del mecanismo por el cual CAPE suprime la inducción de COX-2, se puede decir que CAPE puede inhibir la actividad de proteincinasa C y la activación nuclear de la transcripción del factor NF-κB (Michaluart y cols., 1999).

Otro mecanismo a través del cual actúa el CAPE es el óxido nítrico (NO). El NO se secreta normalmente como mecanismo de defensa ante daños al DNA y como molécula regulatoria con actividades homeostáticas, sin embargo su excesiva producción ocasiona daños a los tejidos. El extracto etanólico del propóleo posee una potente actividad

inhibitoria en la activación de macrófagos de ratón vía LPS. La elongación de cadena de sitios alquilados de los ésteres del ácido caféico incrementan la inhibición del NO. Sin embargo, la cadena más larga de carbono muestra efectos tóxicos. Pero la inhibición de la actividad del NO puede estar correlacionada con las propiedades antiinflamatorias del propóleo (Nagaoka y cols, 2003). La acción antioxidante de los flavonoides se produce en el rango de concentración de 0.1-100 nM (Matsuno, 1994).

### I.3.4 Modificaciones al CAPE

A pesar de la gran variedad de actividades biológicas relacionadas con el CAPE, solo un limitado número de análogos estructurales han sido examinados, especialmente aquellos que implican modificaciones al anillo de catecol. El reemplazo del átomo de hidrógeno o de un grupo hidroxilo por un átomo de flúor en el anillo es importante debido a que la posición del sustituyente en este anillo puede retardar la degradación metabólica, incrementar la lipofilicidad y ejercer un impacto profundo en la unión al receptor o la selectividad (Wang y cols., 2006 y 2010). La introducción de un halógeno en el anillo de catecol ejerce un efecto inductivo negativo, incrementa la densidad electrónica en el sistema conjugado, fortalece el enlace éster y disminuye las interacciones con la catecol metiltransferasa. Así mismo el número de grupos hidroxilo puede tener un papel importante en la actividad antioxidante (Wang y cols., 2006), por lo que es necesario experimentar con diferentes modificaciones estructurales como las del N[2-clorobencil]cinamida (NA01) que se puede observar en la figura 6.

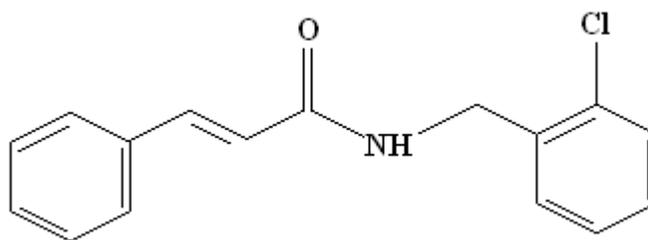


Figura 6. Estructura del derivado NA01

En estudios en modelos *in vivo* se ha demostrado que el CAPE posee capacidades antigenotóxicas y antineoplásicas mediante un mecanismo de detección de radicales libres y antioxidantes. El grupo de Carrasco y colaboradores (2006), ha demostrado el efecto

protector del CAPE cuando se administra una sola dosis antes del inicio de hepatocarcinogénesis en un modelo de rata, en el cual se observan resultados de protección contra la inducción de lesiones preneoplásicas. Debido a los resultados obtenidos con el CAPE, este mismo grupo ha comenzado a trabajar con diversos derivados.

Este mismo grupo ha demostrado que el CAPE ejerce un efecto quimioprotector al disminuir la expresión de mRNA's y disminución de la expresión de la proteína Glutación-S-Transferasa. Y basados en estudios tanto *in vitro* e *in vivo* han concluido que el CAPE tiene propiedades antioxidativas, antigenotóxicas y eliminador de radicales libres.

## **I.4 PRUEBAS PARA LA EVALUACIÓN GENOTÓXICA**

Las pruebas de evaluación genotóxica son diversas y cada una de ellas se enfoca en distintos tipos de daños al DNA, que pueden o no estar relacionados con la citotoxicidad, entre estas pruebas se encuentra la identificación de micronúcleos (fragmentos de cromatina separados del núcleo principal), intercambio de cromátidas hermanas (intercambio recíproco y simétrico de DNA entre cromátidas hermanas), electroforesis unicelular en gel (detección de rupturas de doble cadena, cadena sencilla y sitios álcali-lábiles) (Salamanca, 1990).

### **I.4.1 Ensayo cometa o electroforesis unicelular en gel (SCGE).**

Östling y Johanson, en 1984 desarrollaron un método para la evaluación de mutagenos potenciales de la industria química y farmacéutica, basado en la electroforesis de células embebidas y lisadas en agarosa sobre un portaobjetos. La lisis y la electroforesis fueron ajustados a un pH de 9.5, con esto no se rompió el DNA, después de la electroforesis de células irradiadas con rayos  $\gamma$ , el DNA es evidenciado con un fluorocromo, que se revela como un cometa con una cabeza y una cola (Hartmann y cols., 1997; Rojas, 2008). En 1976 Cook y colaboradores adicionaron detergentes no iónicos a la solución de lisis, bajo estas condiciones se detectaron rupturas de cadena doble (DSB) en el DNA (Klaude y cols., 1996).

Singh y colaboradores en 1988, usaron una electroforesis alcalina para analizar el daño al DNA de tratamientos con rayos X y peróxido, esto incrementó la duración y por tanto permitió la detección de rupturas de cadena sencilla (SSB) y sitios álcali-lábiles (ALS), sin embargo la migración se ve reducida por agentes que provocan aductos en el DNA (Rojas, 2008). Además se han encontrado aplicaciones dentro de distintas áreas como son toxicología genética, detección de daño y reparación de DNA, ecotoxicología, nutrición, epidemiología humana, monitoreo de tratamientos, quimio y radioterapia, etc (Hartmann y cols., 2003. Klaude y cols., 1996).

#### **I.4.1.1 Principio de la electroforesis unicelular en gel**

Las células embebidas en gel de agarosa, son lisadas para remover proteínas y restos celulares, después se colocan en solución alcalina que permite que la doble hélice se desenrolle contribuyendo a la expresión de ALS y rupturas en la cadena del DNA. Durante la electroforesis la cromatina y restos de DNA migran hacia el ánodo, por presentar cargas negativas, de una manera más rápida que el núcleo. De esta forma se observan dos mecanismos de formación del cometa:

- 1.\_ La migración del DNA que está en función del número y tamaño de los fragmentos libres de DNA.
- 2.\_El incremento en el largo de la cauda que depende de las condiciones de electroforesis y no del tamaño de los fragmentos (Hartmann y cols., 2003. Rojas, 2008).

#### **I.4.1.2 Cultivo celular**

Esta técnica tiene las ventajas de ser cuantitativa y muy sensible en la detección del daño al DNA, además permite seguir el daño y reparación del DNA y es indistinto a células eucariontes o procariontes *in vivo* o *in vitro* (Klaude y cols., 1996). Se puede realizar en cualquier momento del ciclo celular con una cantidad de muestra desde 5  $\mu$ L, solo se realizan determinación en 50 a 100 células por individuo de cualquier tejido, es una técnica que se puede obtener en horas además de que no es invasiva si se utiliza en humanos y que proporciona información de cada célula (Klaude y cols., 1996).

#### **I.4.1.3 Evaluación de citotoxicidad y viabilidad celular**

Para la realización de este ensayo es necesario llevar a cabo primero la evaluación de la citotoxicidad mediante una cuenta de viabilidad celular. Esto se debe a que la muerte celular está asociada con los niveles elevados de daño y rupturas en el DNA (Hartmann y cols., 2003). La imagen microscópica resultante, en el ensayo cometa, de células necróticas o apoptóticas son cometas con una pequeña o inexistente cabeza y caudas largas y difusas. Para tratamientos *in vitro* la viabilidad puede estar en un intervalo de 58 a 86%, excluidas con Azul de Tripán. Sí se incluyen las células necróticas o apoptóticas en el estudio es posible obtener resultados falsos positivos (Hartmann, 1997).

#### **I.4.1.4 Sustancias a evaluar por electroforesis unicelular en gel y controles**

Las sustancias a evaluar en caso de ser sólidas tienen que estar disueltas o suspendidas en solventes o vehículos que no produzcan efectos tóxicos a las dosis utilizadas y además no deben de reaccionar con la sustancia a evaluar (Hartmann, 2003).

Los controles positivos y negativos deben incluirse para cada sexo en cada parte experimental en caso de ser necesario. El control positivo tiene que ser un genotóxico estable, de actividad genotóxica bien conocida y detectable por ensayo cometa. Algunos ejemplos de controles positivos son:

**Tabla 7.** Ejemplos de sustancias utilizadas como controles positivos para el ensayo cometa. (Tomada de Hartmann, 1997.)

• EMS: Etil metano sulfonato.	• MMS: Metil metano sulfonato.
• ENU: Etil nitrosourea.	• N-nitrosodimetilamina

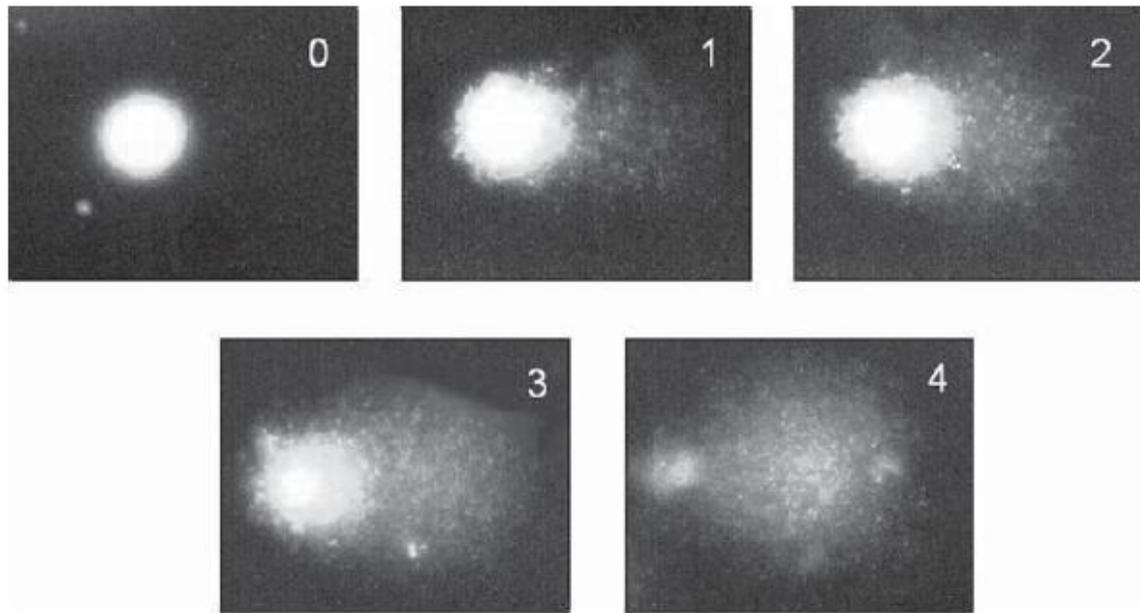
#### **I.4.1.5 Análisis de los cometas**

Los reactivos fluorescentes más utilizados para la visualización de los cometas son el bromuro de etidio, yoduro de propidio, 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI), SYBR Green I y YOYO-1. Para realizar el análisis de éstos, como mínimo se deben de contar 100 cometas por tratamiento, con una cuenta de 50 cometas por portaobjeto.

La evaluación del daño, determinado por la cantidad de migración del DNA debe ser determinada visualmente y se puede llevar a cabo categorizando las diferentes clases de migración mediante varias formas de manera cuantitativa o semicuantitativa:

- a) A través de evaluaciones visuales, para estimar en la imagen la longitud de la cauda y ancho del nucleoide o cabeza con un micrómetro para después calcular diversos parámetros y/o
- b) La clasificación en 5 categorías del daño dependiendo de la migración de DNA observada como se ilustra en la figura 7 (Collins, 2004).

c) De igual forma con ayuda de un analizador de imágenes es posible determinar: intensidad, área total, largo de la cauda, largo del cometa, tamaño de la cabeza, momentum de la cauda y momentum de la cauda de Olive. (Hartmann, 2003; Rojas, 2008).



**Figura 7. Imágenes de cometas (de linfocitos), teñidos con DAPI. Representan las clases 0-4 usadas para la clasificación visual. (Tomada de Collins, 2004.)**

Obteniendo con el último método datos más precisos y confiables de una manera más rápida, sin embargo es necesaria la utilización de un analizador de imagen y equipos especializados que resultan ser costosos para algunos laboratorios. Por otro lado la determinación visual con la categorización en 5 clases, arroja información confiable y no requiere de equipo adicional al microscopio de fluorescencia.

## II. JUSTIFICACIÓN

Uno de los principales componentes del propóleo es el CAPE, el cual entre sus diversas actividades biológicas presenta una capacidad anticancerígena como una de las más relevantes y debido a esta capacidad se perfila para ser utilizado como un agente quimioprotector, debido a que hoy en día la incidencia de casos de cáncer en el mundo aumenta considerablemente y en la actualidad se considera uno de los problemas más importantes de salud mundial.

Con la finalidad de tener mayor efectividad que el compuesto original se realizaron diversas modificaciones estructurales al CAPE, las cuales se espera tengan actividad biológica de mayor relevancia.

Por lo anterior, es importante investigar si el derivado NA01 presenta una actividad similar al CAPE en el organismo, o si por el contrario, debido a las modificaciones que presenta, podría actuar de manera diferente o contraproducente ocasionando daño citotóxico o genotóxico ya que actualmente no se han realizado estudios al respecto.

Y por esto en el presente trabajo se realizará dicho análisis por medio de la técnica de electroforesis unicelular en gel *in vitro*, debido a que presenta una gran sensibilidad ante los daños al DNA en una o en ambas cadenas para comprobar si NA01 presenta o no genotoxicidad y citotoxicidad.

### **III. OBJETIVOS**

#### **GENERAL**

Evaluar la capacidad genotóxica y citotóxica del compuesto polifenólico clave NA01 por medio de electroforesis unicelular en gel para determinar si existe una correlación entre la dosis de compuesto y el daño genotóxico.

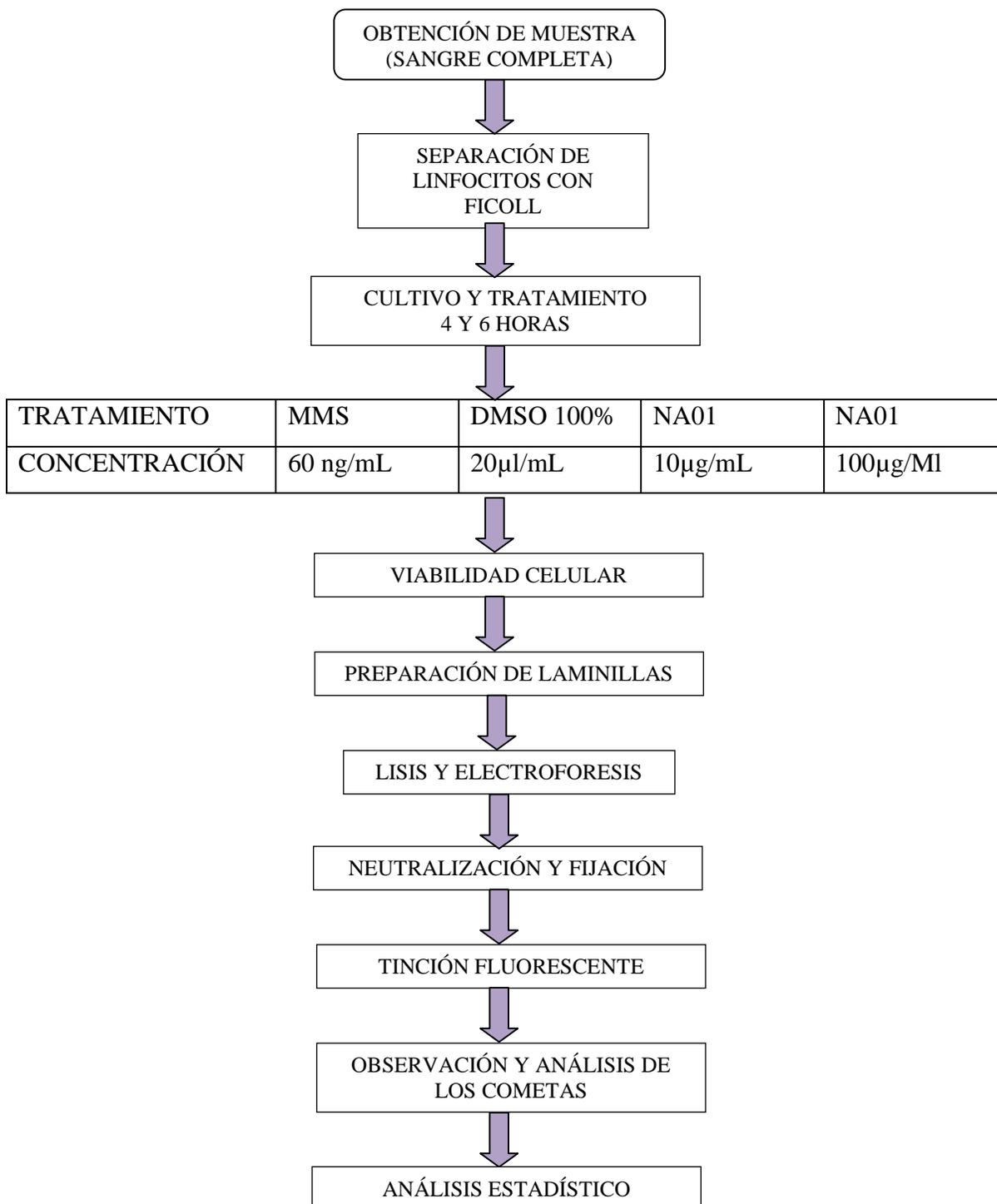
#### **PARTICULARES**

Exponer cultivos de linfocitos humanos a diferentes concentraciones del compuesto NA01 a distintos tiempos y evaluar el daño producido al DNA mediante SCGE.

Determinar el daño al DNA que produce a linfocitos humanos el MMS, mediante SCGE para comparar el daño producido por el compuesto NA01.

Establecer una relación concentración respuesta del grado de daño del NA01 para establecer su potencial genotóxico.

#### IV. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL



## V. MATERIAL Y MÉTODOS

### **MATERIAL**

#### **Equipos y materiales**

Cámara de electroforesis.  
Cámara de Neubauer.  
Cubreobjetos largos.  
Diverso material de cristalería.  
Jeringas de 10 mL desechables.  
Micropipetas 0.1-2  $\mu$ L, 50-200 $\mu$ L y 100-1000 $\mu$ L.  
Microscopio de fluorescencia.  
Microscopio óptico.  
Portaobjetos con pantalla.  
Tubos falcon de 15 ml.  
Vaso Copplin

#### **Material Biológico**

Sangre heparinizada

#### **Reactivos**

Agarosa de bajo punto de fusión.  
Agarosa de normal punto de fusión.  
Agua desionizada.  
Azul de Tripan.  
Bromuro de etidio.  
Buffer de fosfatos.  
Cloruro de sodio.  
Dimetilsulfóxido.  
EDTA sal disódica.  
Ficoll Hystopaque  
Heparina  
Hidróxido de sodio.  
Medio de cultivo RPMI.  
Metanol  
Metilmetano sulfonato.  
MMS  
NA01  
Solución de lisis  
Solución de electroforesis  
Solución de neutralización  
Triton X-100.  
Trizma base.

## MÉTODOS

### Desarrollo Experimental.

#### a) **Obtención y separación de linfocitos.**

Se obtuvo sangre venosa periférica, con jeringa previamente heparinizada aproximadamente de 10 a 12 mL, en zona de esterilidad, la cual se repartió en 4 tubos con igual cantidad de Ficoll para obtener únicamente los linfocitos, posteriormente se centrifugó por 30 minutos a 3500 rpm, a temperatura ambiente.

En esterilidad se retiró la capa de linfocitos (capa blanca), que se encuentra entre el Ficoll y el plasma. Estos linfocitos se colocaron en 5 mL de medio de cultivo RPMI, se mezclaron adecuadamente con ligera agitación y se centrifugaron 10 minutos a 3000 rpm, después se retiró el sobrenadante. Este lavado con medio de cultivo se realizó 2 ó 3 veces para eliminar el Ficoll.

#### b) **Tratamiento con NA01.**

En la última centrifugación del lavado con RPMI, se eliminó el sobrenadante y se agregaron 4.9 mL de medio de cultivo a dos tubos, en uno de ellos se agregan 100 µL de DMSO (Control negativo); al otro tubo se agregaron 100 µL de solución de NA01 obteniendo una concentración en el medio de 100 µg/mL; a un tercer tubo se agregaron 4.99mL y 10 µL de solución de NA01 resultando una concentración de 10 µg/mL; a un último tubo se agregaron 4.9986 mL de medio de cultivo y 1.4 µL de MMS con una concentración final de 60ng/mL en el medio. Se agitaron para que todas las células estuvieran en contacto con el medio y se incubaron por 4 y 6 horas a 37° C.

**c) Viabilidad celular (Citotoxicidad).**

Una vez concluido el tiempo de incubación se agitaron ligeramente los tubos y se obtuvo una muestra de 10  $\mu\text{L}$  de cada uno, estos 10  $\mu\text{L}$  se mezclan con 10  $\mu\text{L}$  de Azul de Tripán hasta homogenizar. Se colocan en la cámara de Neubauer y se contaron dentro de las 4 cuadrículas periféricas, se multiplican por un factor de 5. Se obtuvo el número total de células y el número de células muertas para obtener el porcentaje de la viabilidad celular.

**d) Preparación de los portaobjetos con las capas de agarosa.**

Primero se fundió la agarosa de punto de fusión normal. En portaobjetos limpios y desengrasados se colocaron 150  $\mu\text{L}$  de agarosa de punto de fusión normal posteriormente se colocó un cubreobjetos largo encima, se esperó a que solidificara lo suficiente para retirar el cubreobjetos sin romper la capa de agarosa. Finalmente se dejó solidificar para que quedara perfectamente adherida al portaobjetos.

Los tubos con el medio de cultivo y las células de cada tratamiento se centrifugaron durante 10 minutos a 3000 rpm y se retiró el sobrenadante, se resuspendieron en 1 mL de agarosa de bajo punto de fusión. La agarosa de bajo punto de fusión se fundió. Después se agregaron 600  $\mu\text{L}$  de agarosa de bajo punto de fusión y se resuspendieron las células en la agarosa. Se tomaron 150  $\mu\text{L}$  de la suspensión y se colocaron en el portaobjetos con capa de agarosa de punto de fusión normal, se puso el cubreobjetos encima de la agarosa y se retiró antes de que solidificara.

Se dejó solidificar la capa de agarosa con las células y se agregaron 150  $\mu\text{L}$  de agarosa de bajo punto de fusión sin células y se colocó un cubreobjetos que se retiró antes de que solidificara.

**e) Lisis y electroforesis.**

Los portaobjetos se colocaron en solución de lisis en vaso Copplin por una hora, posteriormente en la caja de electroforesis se cubren con el buffer de

electroforesis por lo menos 20 minutos, para expresar los sitios álcali lábiles, pasado este tiempo se comenzó la electroforesis en condiciones de 30 V y 300 mA por 15 minutos.

**f) Neutralización y fijación.**

Se retiraron los portaobjetos con ayuda de una pinza de la cámara de electroforesis, se colocaron en solución de neutralización por 1 minuto y posteriormente en metanol absoluto por 2 minutos. Se dejaron secar y se guardaron las laminillas para su posterior análisis.

**g) Tinción Fluorescente**

Se colocaron 30  $\mu$ L de bromuro de etidio sobre el portaobjetos con la agarosa y las células, se cubrió con un cubreobjetos largo para expandir el bromuro en todo el portaobjetos. Finalmente se analizaron los cometas a 10x y 40x, en microscopio de fluorescencia en una longitud de onda de 490-520nm.

**i) Observación y análisis de los cometas.**

Se analizaron 100 células de cada tratamiento, las cuales se clasificaron en 5 clases de grado de daño.

**j) Realizar análisis estadístico.**

Se utilizó el programa estadístico INSTAT versión 2 y se realizó el ANOVA y la comparación de medias con la prueba de Turkey  $P < 0.05$  de los datos obtenidos.

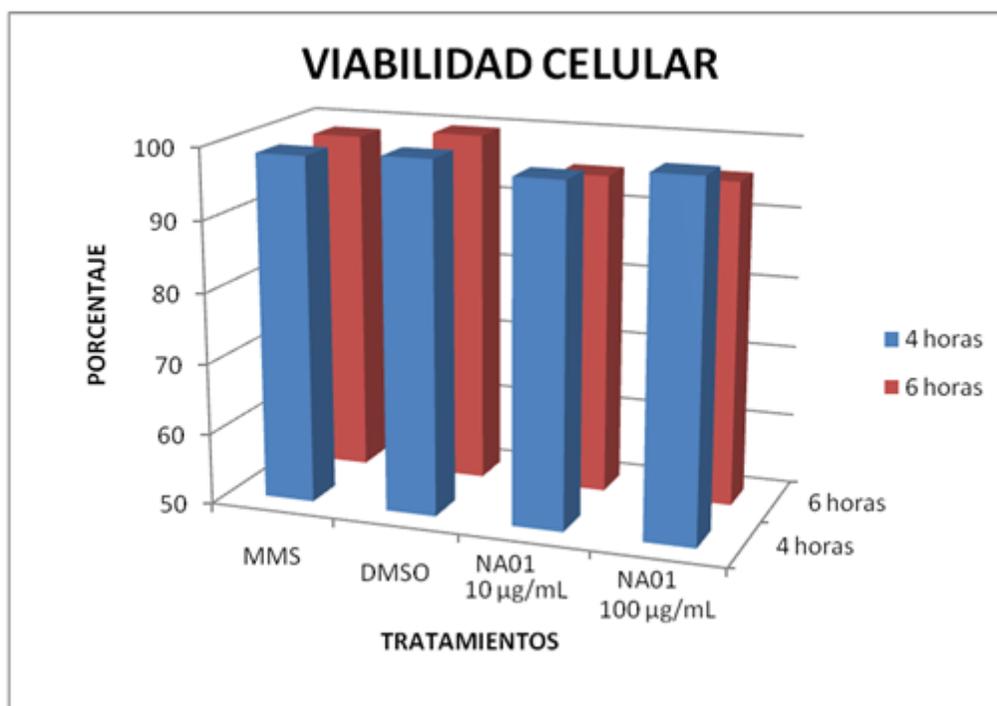
## VI. RESULTADOS

### Citotoxicidad

En la tabla 8 y figura 8 se presentan los resultados de la evaluación de la citotoxicidad, observándose que en todos los tratamientos el porcentaje de viabilidad está por encima del 90% aconsejable para el SCGE.

**Tabla 8. Porcentaje de viabilidad celular por medio de azul de tripán**

Tratamiento	% Viabilidad	
	4 horas	6 horas
Control + (MMS)	98.7	98.4
Control - (DMSO)	99.4	99.6
NA01 10 $\mu\text{g/mL}$	97.8	95.1
NA01 100 $\mu\text{g/mL}$	99.5	95.5



**Figura 8. Viabilidad celular de los distintos tratamientos con NA01, MMS y DMSO a 4 y 6 horas.**

## Daño genotóxico.

En la tabla 9 y figura 9 se presentan los resultados obtenidos de la SCGE en el tratamiento a 4 horas del NA01 mostrándose el porcentaje de células por categoría (tipos de cometa).

Tabla 9. Resultados del análisis de ensayo cometa de 4 h por categorías.

Tratamiento	Concentración	% Células por categoría				
		0	1	2	3	4
MMS	60 ng/ml	0	0	0	0	100
DMSO	20 µL/mL	100	0	0	0	0
NA01	10 µg/mL	90	10	0	0	0
NA01	100 µg/mL	3	94	3	0	0

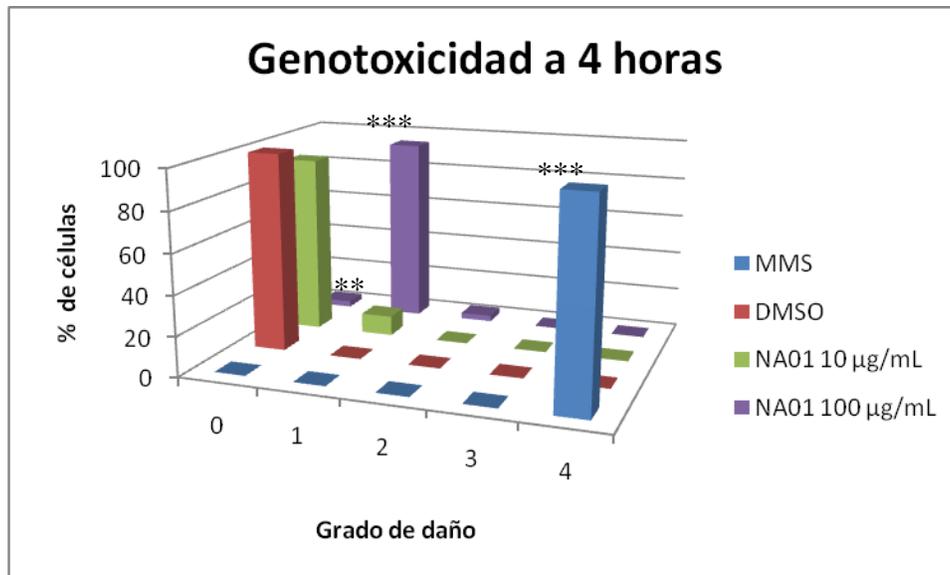
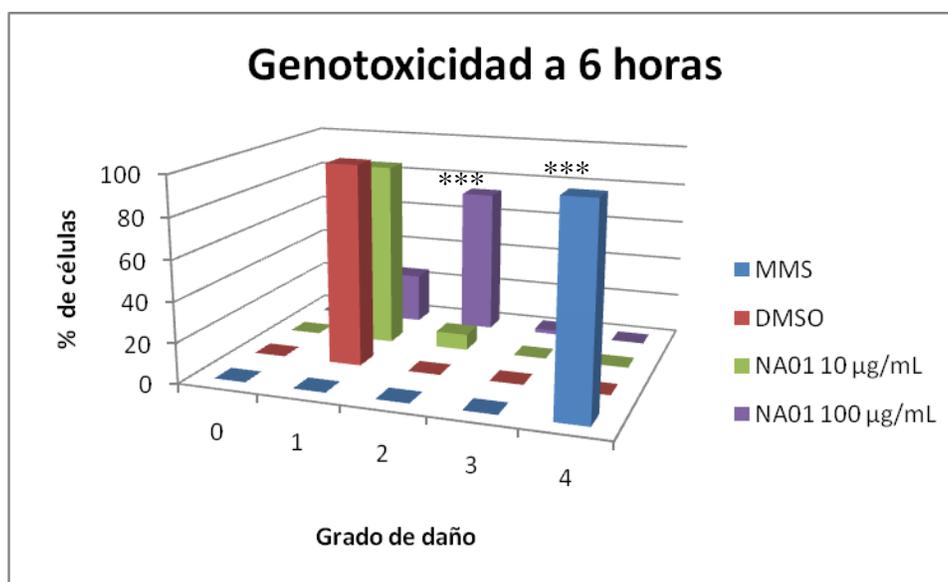


Figura 9. Resultados de la distribución de genotoxicidad en base a la cantidad de células en cada categoría de daño después de la exposición a NA01, MMS y DMSO durante 4 horas. (\*\*Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo con  $P < 0.01$ . \*\*\* Diferencia estadística altamente significativa con respecto al control negativo con  $P < 0.001$ .)

En la tabla 10 y figura 10 se presentan los resultados obtenidos de la SCGE en el tratamiento a 6 horas del NA01 mostrándose el porcentaje de células por categoría (tipos de cometa).

**Tabla 10. Resultados del análisis de ensayo cometa de 6 h por categorías.**

Tratamiento	Concentración	Células por categoría				
		0	1	2	3	4
MMS	60 ng/ml	0	0	0	0	100
DMSO	20 $\mu$ L/mL	0	100	0	0	0
NA01	10 $\mu$ g/mL	0	92	8	0	0
NA01	100 $\mu$ g/mL	0	25	73	2	0



**Figura 10. Resultados de la distribución de genotoxicidad en base a la cantidad de células en cada categoría de daño después de la exposición a NA01, MMS y DMSO durante 6 horas. (\*\*\*) Diferencia estadística altamente significativa con respecto al control negativo con  $P < 0.001$ )**

## VII. DISCUSIÓN

Como resultado del efecto quimioprotector que ha demostrado tener el compuesto polifenólico CAPE en los estudios de Carrasco y colaboradores desde 2006, en el Laboratorio de Química Medicinal de la FESC se realizó un análisis de la molécula y por diseño computarizado se obtuvo un grupo de derivados de éste que hipotéticamente pueden tener la misma o mejor acción quimioprotectora. El NA01 es uno de estos compuestos, obtenido por síntesis en dos partes, en la primera se obtiene el ácido cinámico (figura 11), mediante una reacción de Knoevenagel con la modificación de Doehner.

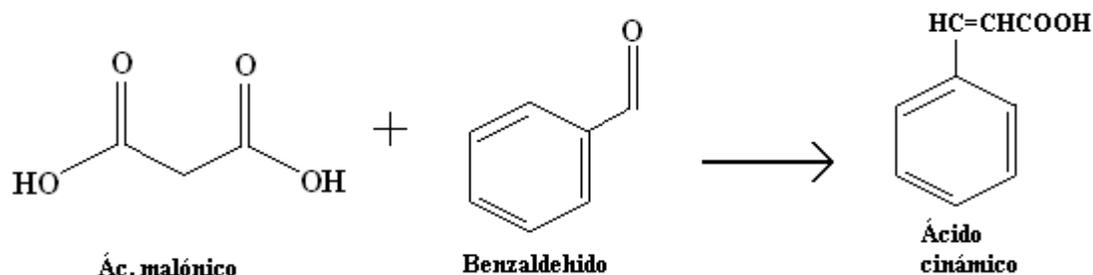


Figura 11. Síntesis del ácido cinámico precursor del NA01.

Una vez obtenido el ácido cinámico se procede a realizar una reacción de condensación con la 2-Clorobencilamina para obtener finalmente el NA01 (Angeles, datos no publicados) según se puede observar en la figura 12. Una de las razones de realizar la síntesis del derivado es preservar la fuente natural de obtención y a su vez mejorar la actividad biológica, para esto último se reemplazó el grupo funcional éster por un grupo amida por lo que al cambiar sus propiedades fisicoquímicas se puede modificar la actividad biológica. Esta modificación estructural no ha sido realizado por ningún investigador ya que solamente se habían analizado analogos del éster (Nagaoka, 2003).

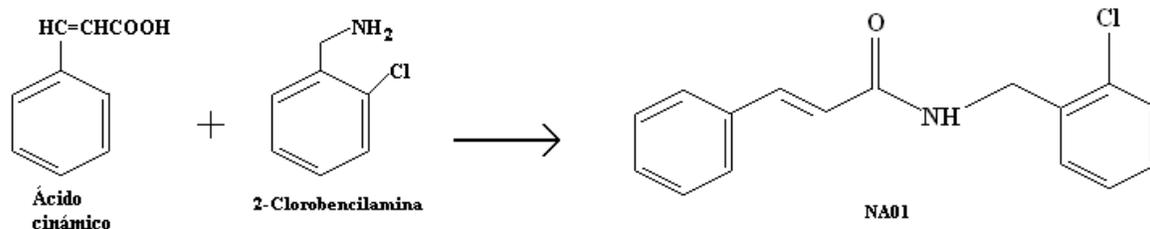


Figura 12. Síntesis del NA01 a partir del ácido cinámico

Los polifenoles son un componente del propóleo que incluso pueden ser usados como marcadores para un particular tipo de propóleo, entre estos polifenoles se encuentran la quercetina, los hidroxycinamatos y flavonoides, sin embargo los que han mostrado mayor acción antiproliferativa en líneas celulares son el ácido cafeico, los estéres del ácido caféico, crisino, galangin, quercetina, acetina, camferol, pinocembrina, pinobanksina y apigenina (Ferrerres y cols., 1994; Saravana y cols., 2009).

En diversos estudios se ha demostrado que los polifenoles derivados del propóleo tienen una amplia actividad anticancerígena, como por ejemplo la quercetina en la línea celular HL-60 (Células de leucemia humana) demostró un efecto inhibitorio remarcado en la actividad de la enzima PKC citosólica y TPK membranal, además en células de glioma provoca que éstas se arreten en el punto de restricción de G2 del ciclo celular y reduce el índice mitótico; el Camferol disminuye el potencial mitocontrial y aumenta el nivel de caspasa 3 en células HL-60; la pinobanksina inhibe la permeabilidad de la membrana de transición de la mitocondria (Saravana y cols., 2009).

Pero este efecto, está en función de su concentración debido a que pueden llegar a causar efectos citotóxicos a altas concentraciones, por ejemplo, la quercetina que en bajas concentraciones (1-20  $\mu\text{M}$ ) promueve la proliferación celular, en concentraciones más altas (50-200  $\mu\text{M}$ ) muestra un citotoxicidad dependiente de la concentración (Kang y col., 1997; Saravana y cols., 2009).

Como podemos observar el CAPE tiene un potencial quimioprotector contra el cáncer, de ahí la importancia de iniciar con los estudios preclínicos de NA01 y que en el presente estudio abordaron su capacidad genotóxica *in vitro*.

La evaluación de la citotoxicidad del compuesto NA01 tuvo 2 objetivos, por un lado obtener las concentraciones de trabajo para el SCGE ya que un aumento de los niveles de ruptura de las cadenas de DNA se asocia con el incremento de muerte celular, y a su vez este incremento puede ocasionar la aparición de falsos positivos (Hartmann, 2003). En la

tabla 7 se presentan los resultados de citotoxicidad sobre el cultivo de linfocitos humanos, y se puede observar en ambos tiempos de exposición que aumentó ligeramente la citotoxicidad a las concentraciones de 10 y 100 µg/mL, aunque se mantuvo por arriba del 95% de células vivas, lo cual permitió proseguir con la SCGE. Estas concentraciones se propusieron en relación a otros ensayos realizados con el CAPE (Wang y cols., 2006-2009), donde el intervalo de concentración correspondió a un efecto cito y genoprotector.

Los datos de daño al DNA obtenidos en este estudio mediante el ensayo de SCGE muestran que el efecto observado se debe a la sustancia de prueba, el tiempo de exposición y la concentración utilizada.

El grado de daño se determinó clasificando las células en 5 categorías, dependiendo de la migración observada, clasificándolos dentro de cada una de las clases de migración de 0 a 4, como también se ha realizado en diversos estudios como el hecho por Gilherme y colaboradores (2010), donde mediante la categorización de los cometas se determinó en células sanguíneas de *Anguilla anguilla* que el herbicida Roundup® es un genotóxico potencial debido a que produce rupturas de cadena sencilla.

El MMS se ha utilizado como control positivo ya que actúa como un agente alquilante del DNA que genera rupturas de doble cadena (DSBs) durante la replicación (Wyatt, 2006), esto lo hace un control ideal para el estudio por SCGE algunos autores como Rojas en 2008 utilizó al MMS como control positivo en un estudio genotóxico de compuestos tiomorfolínicos donde se demostró que produce la fragmentación del DNA en diversos tipos celulares. En primera instancia, se puede observar en los datos el incremento en el daño al DNA que pone en evidencia la inducción de la genotoxicidad en los linfocitos donde el porcentaje de células en categoría cero es del 100% para el control negativo y por parte del MMS como control positivo se categorizan al 100% en el grado 4, manifestando con esto una diferencia estadísticamente significativa.

El MMS puede ser utilizado como control positivo en los estudios de intercambios de cromátidas hermanas (ICHs) debido a su capacidad conocida desde hace algún tiempo

para inducir ICHs, de igual manera se le reconoce la propiedad de producir DSBs y por tanto utilizarse como control positivo, con base en el mismo mecanismo de alquilación (Wyatt, 2006). Por otro lado la ifosfamida es otro agente alquilante del DNA que contiene un grupo cloroetil (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-Cl) el cual, al separarse del sustituyente cloro, forma iones carbonio muy reactivos, de los cuales el blanco principal son las bases nitrogenadas del DNA. Debido a esto se forman puentes entre dos sitios blanco, resultando en enlaces cruzados entre cadenas sencillas, entre dos cadenas o entre cadenas de DNA y nucleoproteínas. Estas reacciones pueden inhibir la separación o bien dar lugar a una separación anormal (Kallant, 2003). Debido a que el daño producido por el MMS y la ifosfamida es evaluable por estas dos técnicas se puede tener un punto de comparación entre una y otra. A partir de esto se puede hacer la comparación de los datos obtenidos por Domínguez (2008) del daño genotóxico del CAPE con respecto del NA01, pudiéndose observar que el NA01 se comporta igual que el CAPE al mostrar daño genotóxico mínimo no comparable con el control positivo (MMS), en este caso demostrado con SCGE y en caso de Domínguez con ICHs, lo cual es muy importante porque esto da pauta a realizar otros estudios y se puede decir que el NA01 se perfila como un compuesto que podría ser utilizado como un anticancerígeno.

Analizando los resultados obtenidos para el tiempo de 4 horas las células expuestas al NA01 en la concentración de 10 µg/mL produjeron un 10% de células cuyo daño fue grado 1, lo cual estadísticamente arroja diferencias significativas con respecto al control negativo ( $P < 0.01$ ); al aumentar la concentración en este mismo período se observa que existe un daño en grado 1 en un 94%, representando un daño genotóxico altamente significativo en comparación con el control negativo ( $P < 0.001$ ). Sin embargo, en la exposición a 6 horas se observa que no existe diferencia con el control negativo en la concentración de 10 µg/mL lo que puede ser debido a que, para este momento, la célula fue capaz de reparar el poco daño ocurrido que se observó a cuatro horas. Mientras que en el caso de la concentración de 100 µg/mL, se observó que la mayor parte de las células se encontraron con un daño genotóxico tipo 2 con un 73% y un 2% en tipo 3, con el análisis estadístico realizado se puso en evidencia que en comparación con el control negativo sí existe una diferencia altamente significativa.

El epigallocatecina-3-galato (EGCG) es el principal constituyente polifenólico del té verde y cuya función es antioxidante. En los estudios *in vitro* de Kwang y colaboradores en 2009 se reporta que el EGCG produce una disminución de la viabilidad celular de una manera concentración dependiente, en células pancreáticas beta HIT-T15, mientras que el NA01 no muestra ésta tendencia en linfocitos humanos. En este mismo trabajo, se realizó el SCGE y se observó que en concentraciones mayores de 50  $\mu\text{M}$  de EGCG, el daño en las células es de tipo 3 y 4, los autores concluyeron que la disminución de la viabilidad celular causada con EGCG está acompañada por un incremento en la apoptosis; los resultados de viabilidad y de daño al DNA por parte del compuesto NA01 comparados con EGCG podrían sugerir que éste derivado del CAPE se perfila como un antioxidante seguro y eficaz.

En los estudios de Carrasco y colaboradores en 2006, se explica que uno de los posibles mecanismos del CAPE es la modificación de la actividad de algunos CYP que podrían estar involucrados en el metabolismo de la dietilnitrosamina (DEN), como el CYP1A1/1A2 y el CYP2B1/2B2; y al ser el NA01 un derivado del CAPE sería aconsejable evaluar si puede tener el mismo mecanismo. Además del efecto protector que puede lograrse por la inducción de la transcripción de los genes antioxidantes de fase 2 los cuales incluyen la enzima HO-1 (Wakabayashi, 2004. Wang, 2010).

Debido a que el compuesto NA01 es de diseño reciente no existen estudios que comparen su actividad con la del CAPE sin embargo al evidenciar leve actividad genotóxica por medio de este estudio es importante considerar realizar otros estudios *in vivo* de genotoxicidad y actividad antes de poder considerarlo como un quimioprotector o incluso un anticarcinógeno.

## VIII. CONCLUSIONES

El presente trabajo demuestra que el compuesto NA01 evaluado mediante el ensayo de SCGE presenta actividad genotóxica en linfocitos humanos en cultivo lo cual depende de la concentración y el tiempo de exposición.

Comparado con el daño ocasionado por el MMS, el NA01 produce un daño al DNA mucho menor y en relación a la citotoxicidad las dosis de 10 y 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no produjeron una muerte celular mayor al 5%.

## **PERSPECTIVAS**

El trabajo realizado apoya la realización de trabajos *in vivo* que permiten determinar si el derivado NA01 podría ser un buen agente antitumoral. Así mismo, se deben de realizar más estudios *in vitro* que muestren por otras técnicas que el derivado NA01 no presenta genotoxicidad.

De igual manera se puede continuar la línea de investigación realizando la evaluación de antigenotoxicidad que pudiera demostrar el derivado NA01 frente algún genotóxico comprobado. Además se sugiere realizar estudios de inhibición de la proliferación con diversas líneas celulares.

También es recomendado realizar ensayos de inducción de apoptosis en diversas líneas celulares.

## ANEXOS

### **Preparación de soluciones y reactivos.**

#### **a) Agarosas.**

i) Agarosa de bajo punto de fusión.

Se prepara al 5% en PBS (Solución Buffer de Fosfatos, preparada con agua desionizada). Se pesan 125 mg de agarosa y se coloca en un matraz Erlenmayer de 50 mL que contiene 25 mL de PBS, se mezcla un poco, se comienza a calentar poco a poco, agitando constantemente hasta obtener una solución transparente. Se guarda en refrigerador a 4° C, en viales de 5 mL.

ii) Agarosa de punto de fusión normal.

Se prepara de igual manera que la agarosa de bajo punto de fusión.

#### **b) Solución de lisis.**

i) Stock de lisis.

Para un litro de solución en agua desionizada, se pesan por separado 146.1 g de NaCl (Concentración final 2.5 M), 37.2 g de EDTA (C. F. 100 mM), Trizma Base 1.2 g (C. F. 10 mM) y NaOH ≈10 g. Se disuelve primero el NaOH y se coloca a pH= 10, después se pueden agregar los demás reactivos debido a que, a este pH todos se solubilizan. Se guarda a temperatura ambiente.

ii) Solución de lisis de trabajo.

Se mezclan 26.7 ml de solución stock de lisis, 3 mL de dimetilsulfóxido y 0.3 mL de Triton X-100. Si es necesario, se pueden modificar las cantidades según la necesidad y se utiliza justo después de prepararse.

#### **c) Buffer de electroforesis.**

i) Solución A.

Se pesan 200 g de NaOH y se disuelven en 500 mL de agua desionizada, para tener una solución de concentración 10 N.

ii) Solución B.

Se pesan 14.89 g de EDTA y se disuelven en 200 mL de agua desionizada, para tener una solución de concentración 200 mM.

iii) Buffer de trabajo para electroforesis.

Para preparar el buffer de electroforesis en el momento de utilizarlo se mezclan 30 mL de la solución A con 5 mL de la solución B, se ajusta a pH 13 y se afora a 1 litro con agua desionizada.

**d) Solución de neutralización.**

Se pesan 48.5 g de tris y se disuelven en agua desionizada, se lleva a un pH de 7.5 con HCl concentrado y se afora a un litro con agua desionizada.

**e) Solución de colorante fluorescente.**

i) Solución stock (10X).

Se pesan 10 mg y se disuelven en 50 mL de agua desionizada, se tiene una solución de concentración final 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , guardarlo protegido de la luz.

ii) Solución de trabajo (1X).

Se mezcla 1 mL de la solución stock con 9 mL de agua desionizada y se protege de la luz.

**f) Solución de CAPE.**

i) Se pesa 1 mg de CAPE y se disuelve en 200  $\mu\text{L}$  de DMSO, obteniéndose una concentración final de 5  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ .

## REFERENCIAS

1. A. C. S. Sociedad Americana del Cáncer. (2006). Datos y estadísticas sobre el cáncer en los hispanos/latinos 2006-2008. Atlanta, USA.
2. Ahmedin Jemal, Rebecca Siegel, Elizabeth Ward, Yongping Hao, Jiaquan Xu, Taylor Murray and Michael J. Thun. (2008). Cancer Statistics 2008. *CA Cancer J Clin* 58; 71-96.
3. Alegría Montoro Pastor. (2006). Evaluación citogenética del efecto radioprotector del extracto etanólico de propóleos. Tesis doctoral. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia, España.
4. Anderson D., T.-W. Yu, B.J. Phillips, P. Schmezer. (1994). The effect of various antioxidants and other modifying agents on oxygen-radical generated DNA damage in human lymphocytes in the COMET assay. *Mutation Research*. 307: 261-271
5. Barañano David E, Rao Mahil, Ferris Christopher D and Snyder Solomon H. (2002). Biliverdin reductase: A major physiologic Cytoprotectant. *PNAS*. Vol. 99 no. 25:16093–16098.
6. Beltrán Ramírez, Olga, Hernández Martínez Javier, Sierra Santoyo Adolfo, Villa Treviño Saúl. (2006). Mecanismo de quimiopreención del éster fenetílico del ácido caféico (CAPE) en la iniciación de un modelo de hepatocarcinogénesis: alteración de los CYP450. 2º Congresos Nacional de Química Médica. México, DF.
7. Carrasco C., Sánchez-Pérez Y., Márquez-Rosado L., Fattel-Fazenda S., Arce-Popoca E., Hernández-García S., Villa-Treviño S. (2006). A single dose of caffeic acid phenethyl ester prevents initiation in a medium-term rat hepatocarcinogenesis model. *World J Gastroenterol*. 14; 12(42): 6779-6785
8. Chia Chiao, Adelaida M. Carothers, Dezider Grunberg, Gregory Solomon, Gloria A. Preston, and J. Carl Barrett. (1995). Apoptosis and altered redox state induced by

- caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in transformed rat fibroblast cells. *Cancer Research*. 55:3576-3583
9. Collins Andrew R. (2004). The Comet Assay for DNA Damage and Repair Principles, Applications, and Limitations. *Molecular Biotechnology*. Volume 26:3, 249-261.
  10. Chun-nian Xia, Hai-bo Li, Feng liu, Wei-xiao Hu. (2008). Synthesis of trans-caffeate analogues and their bioactivities against HIV-1 integrase and cancer cell lines. *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 18, 6553-6557.
  11. Domínguez Rojas Maritere. (2008). Efecto del éster fenetílico del ácido cafeíco (CAPE) sobre la proliferación y apoptosis en varias líneas celulares *in vitro*. Tesis de maestría. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. IPN
  12. Etzenhouser, B., Hansch, C., Kapur, S. y Selassie D. (2001). Mechanism of Toxicity of Esters of Caffeic and Dihydrocaffeic. *Acids Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 9, 199-209.
  13. Farré R, Frasquet I, Sánchez A. (2004). Propolis and human health. *Arts Pharmaceutica*, 45: 21-43
  14. Ferreres F, Blazquez M A, Gil M I, and Tomás- Barberan F A. (1994). Separation of honey flavonoids by micellar electrokinetic capillary chromatography. *Journal of Chromatography A*. Vol. 669, no. 1-2, pp. 268–274.
  15. Florez, Jesús. (1992). *Farmacología humana*. Editorial \_Masson, México
  16. Guilherme S., Gaiva I., Santos M.A. and Pacheco M. (2010). European eel (*Anguilla anguilla*) genotoxic and pro-oxidant responses following short-term exposure to Roundup –a glyphosate-based herbicide. *Mutagenesis Advance Access published*. July 1-8
  17. Griffiths Anthony J. F., et Al. (2005). *Introduction to genetic analysis*. 8<sup>a</sup> ed. Freeman and Company. New York, U. S. A.

18. Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V. and Tice R.R. (2003) Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline Comet assay Mutagenesis vol. 18 no. 1 pp 45-51
19. Hartmann A., Speit G. (1997). The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel tests (comet assay). Toxicology Letters. 90, 183-188.
20. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2010). “Estadística a propósito del día mundial contra el cáncer 2010, Datos Nacionales” [http://www.uicc.org/index.php?option=com\\_content&task=view&id=13&Itemid=113](http://www.uicc.org/index.php?option=com_content&task=view&id=13&Itemid=113), consultada el 12 de mayo de 2010.
21. Kalant, H. (2003). Principios de Farmacología Médica. 6ª ed. Editorial Oxford. México D. F.
22. Kang T. and Liang M. (1997). Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL460 leukemia cells. Biochemical Pharmacology, vol. 54, pp. 1013–1018.
23. Klaude M., Eriksson S., Nygren J., Ahnström G. (1996). The comet assay: mechanisms and technical considerations. Mutation Research. No. 363, Pag. 89-96.
24. Kuklinski, C. (2000). Farmacognosia. Editorial Omega. Barcelona, España.
25. Mas Oliva, J. (2004). Diagnostico molecular en medicina. Editorial El Manual Moderno. México D. F.
26. Matsuno, T. (1994). Antitumoral and Therapeutical effects of Propolis. Tokio (Japan).
27. Michaluart P, Masferrer J. L, Carothers A. M., Subbaramaiah K, Zweifel B, Koboldt C, Mestre J, Grunberger D, Sacks P, Tanabe T and Dannenberg A. (1999). Inhibitory Effects of Caffeic Acid Phenethyl Ester on the Activity and Expression of Cyclooxygenase-2 in Human Oral Epithelial Cells and in a Rat Model of Inflammation. Cancer Research. 59, 2347-2357

28. Munnes M., Patrone G., Schmitz B., Romeo G. and Doer W. (1998). A 5'-CG 3'- rich region in the promoter of transcriptionally frequently silenced RET protooncogene lacks methylated cytidine residues. *Oncogene*. 17: 2573-2583
29. Nagaoka C., Banskota A, Tezuka Y., Midorikawa K., Matsushige K., and Kadota S. (2003). Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Analogues: Potent Nitric Oxide Inhibitors from the Netherlands Propolis *Biol. Pharm. Bull.* 26 (4) 487-491.
30. Pierce, Benjamín A. (2005). *Genética con un enfoque conceptual*. 2ª ed. Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina
31. Rojas Olivares Florencia Concepción. (2008). Evaluación de la capacidad genotóxica del compuesto tiomorfolínico LQM 319 mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel *in vivo*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. Cuautitlán Izcalli, México.
32. Ryter Stefan W, Alam Jawed, Augustine M. K. Choi. (2006). Heme Oxygenase-1/Carbon Monoxide: From Basic Science to Therapeutic Applications. *Physiol Rev.* 86: 583-650,
33. Saiz M, Lobo C, Serrano J. (2001). Conferencia Actividad Antitumoral del Propóleo. *Natura Medicatrix*. N°56-57
34. Salamanca, F. (1990). *Citogenética humana*. Editorial Médica Panamericana. México, D. F.
35. Saravana Kumar Jaganathan, Mahitosh Mandal. (2009). Antiproliferative Effects of Honey and of Its Polyphenols: A Review. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. Volume 2009.
36. Sugimura T., Terada M., Yolota j., Hirohashi S. and Wakabayashil K. (1992). Multiple Genetic Alterations in Human Carcinogenesis. *Enviramental Health Perpectives*. 98, 5-12.

37. Tice R, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu J, and Sasaki Y. F. (2000). Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *In Vitro* and *In Vivo* Genetic Toxicology Testing. *Environmental and Molecular Mutagenesis*. 35:206-221.
38. Wakabayashi N, Dinkova-Kostova A, Holtzclaw W D, Kang M, Kobayashi A, Yamamoto M, Kensler T W, and Talalay P. (2004). Protection against electrophile and oxidant stress by induction of the phase 2 response: Fate of cysteines of the Keap1 sensor modified by inducers. *PNAS*. Vol. 101 no. 7, 2040–2045.
39. Kwang Sik S, Suk C, Seungjoon O, Sung Woon K, Jin-Woo K, Young Seol K, & Jeong-Taek W. (2009). Prooxidative effects of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin-3-gallate on the HIT-T15 pancreatic beta cell line. *Cell Biol Toxicol*. 26:189–199
40. Wang X, Stavchansky S, Bowmanb P D, and Kerwinc S M. (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 & Medicinal Chemistry*. 14 (2006) 4879–4887.
41. Wang X, Stavchansky S, Bowmanb P D, and Kerwinc S M. (2008). Cytoprotection of human endothelial cells from menadione cytotoxicity by caffeic acid phenethyl ester: The role of heme oxygenase-1. *European Journal of Pharmacology*. 591: 28–35
42. Wang X, Stavchansky S, Bowmanb P D, and Kerwinc S M. (2010). Structure–activity relationships in the cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and fluorinated derivatives: Effects on heme oxygenase-1 induction and antioxidant activities. *European Journal of Pharmacology*. 635: 16–22
43. Weinberg Robert A. (1996). How Cancer Arises. *Scientific American*. 62-67
44. Wyatt M D. and Pittman D L. (2006). Methylating Agents and DNA Repair Responses: Methylated Bases and Sources of Strand Breaks. *Chem. Res. Toxicol.* 19, 1580-1594.

45. Ya-Ting L, Ming-Jaw D, Pei-Shih Hc, Yuh-Chiang S, Yin-Shen L, Kuo-Wei C, Chieh-Fu C, Li-Kang H. (2005). Cytotoxicity of phenolic acid phenethyl esters on oral cancer cells. *Cancer Letters*. 223: 19–25