



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

**EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIGENOTÓXICO DEL
COMPUESTO LQM 731, ANÁLOGO DEL ÉSTER
FENETÍLICO DEL ÁCIDO CAFEÍCO (CAPE), MEDIANTE
EL ENSAYO DE ELECTROFORESIS UNICELULAR EN
GEL (ENSAYO COMETA).**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

MARÍA LLASBETH HERNÁNDEZ CALDERÓN

ASESORA: DRA. SANDRA DÍAZ BARRIGA ARCEO.

CUAUTILÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

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

U. N. A. M.

ASUNTO: VOTO APROBATORIO



DRA. SUEMI RODRÍGUEZ ROMO
DIRECTORA DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: L.A. ARACELI HERBERA HERNÁNDEZ
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 a comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis

Evaluación del efecto antigenotóxico del compuesto LQM 731, análogo del éster fenilico del ácido cafeico (CAPE), mediante el ensayo de electroforesis unicelulares en gel (ensayo cometa)

Que presenta la pasante: María Liasbeth Hernández Calderón

Con número de cuenta: 305242190 para obtener el Título de: Química Farmacéutica Bióloga

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

ATENTAMENTE

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 05 de agosto de 2013.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dr. Enrique R. Angeles Anguiano	
VOCAL	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
SECRETARIO	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
1er. SUPLENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
2do. SUPLENTE	QFB. Gabriela Escalante Reynoso	

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

HHA/iac

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

CRÉDITOS

- La fase experimental del presente proyecto se llevó a cabo en el **Laboratorio 9 Toxicología y Genética de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria** de la FES-Cuautitlán bajo la dirección de la **Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo** con la colaboración de la **Unidad de Asilamiento y Bioterio** de la FES-Cuautitlán a cargo del **M. en C. Crisóforo Mercado Márquez**.
- El compuesto LQM 731 objeto del presente estudio fue desarrollado en el **Laboratorio de Química Medicinal** de la FES-Cuautitlán a cargo del **Dr. Enrique Ángeles Anguiano**.
- El análisis de las imágenes con el equipo de epifluorescencia Axioimager que contiene el software Comet Imager 2.1 fue realizado en el Instituto de Ciencias de la Salud de la **Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo** con la colaboración de la **Dra. María del Carmen Alejandra Hernández Ceruelos**.

DEDICATORIAS

A mis padres, que han hecho hasta lo imposible por dar educación a sus hijos y que gracias a todo el esfuerzo que ellos han realizado hoy poseo una carrera Universitaria. Soy quien soy por ustedes. Este logro es suyo. Los amo.

A mis hermanitos, Juan, Irene y Anni, porque son lo mejor que me ha dado la vida. Los amo.

Con especial cariño a las tres mujeres que han inspirado y guiado mi vida académica: Dra. María Ester Revuelta Miranda, QFB. Rosalba Bonilla Sánchez y Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo. Las recordaré siempre.

AGRADECIMIENTOS

*A mi querida **Universidad Nacional Autónoma de México**, por hacer de mí una mujer libre, crítica, de firmes ideales y darme las cosas más importantes que poseo.*

*A mi asesora, la **Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo**, por el apoyo que me mostró en todo momento, por toda la paciencia que tuvo para la realización y revisión a fondo de este proyecto y por iniciarme en el maravilloso mundo de la investigación y la docencia donde siempre hay algo que hacer. Gracias por todo.*

*A mis compañeros y amigos **Lázaro Cruz Vargas** y **Karina Aguilar Ramos**, por toda la ayuda que me brindaron para llevar a término este proyecto. Gracias.*

*A la **Dra. Alejandra Hernández Ceruelos**, por todos sus consejos y recomendaciones para mejorar este trabajo. Gracias.*

*A mi querida profesora **Rosalba Bonilla Sánchez** por todas las cosas que me ha enseñado, por haber confiado en mí, recibirme en el laboratorio y permitirme aprender de ella el arte de la docencia.*

*Al **Sr. Pablo Palacio**, laboratorista del L-521, por siempre tener una taza de café para mí, un chiste, un consejo y una sonrisa para alegrarme el día.*

*A las profesoras **Sara Hernández Matilde** y **Maritere Domínguez Rojas** con quienes siempre pude contar.*

*A mis sinodales, el **Dr. Enrique Ángeles Anguiano**, **Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo**, **QFB Rosalba Bonilla Sánchez**, **Dr. Andrés Romero** y **QFB Gabriela Escalante**, por tomarse el tiempo de revisar y mejorar este trabajo.*

*Su cuerpo dejará no su cuidado;
Serán cenizas, mas tendrá sentido;
Polvo serán, mas polvo enamorado.*

(Francisco de Quevedo)

ÍNDICE

ABREVIATURAS	I
ÍNDICE DE FIGURAS	II
ÍNDICE DE TABLAS	III
I. RESUMEN	1
II. MARCO TEÓRICO	2
1. CARCINOGENESIS Y ANTICARCINOGENESIS, PERSPECTIVAS HISTÓRICAS	2
2. CARCINOGENESIS	5
2.1 Definición	5
2.2 Etapas de la carcinogénesis	6
2.2.1 Iniciación	7
2.2.2 Promoción	9
2.2.3 Progresión	11
3. CARCINOGENOS	12
3.1 Definición	12
3.2 Clasificación de los carcinógenos químicos según su mecanismo de acción	12
3.2.1 Carcinógenos genotóxicos	12
3.2.2 Carcinógenos no genotóxicos	13
4. ANTICARCINOGENESIS	15
4.1 Mecanismos de Anticarcinogénesis	15
4.1.1 Iniciación y anticarcinogénesis	18
4.1.2 Promoción y anticarcinogénesis	20
4.1.3 Progresión y anticarcinogénesis	22
5 ÉSTER FENÉTILICO DEL ÁCIDO CAFÉICO (CAPE)	24
5.1 Propóleo	24
5.2 CAPE, generalidades	25
5.3 Mecanismos de acción del CAPE	26
5.4 Análogos estructurales del CAPE	30
6 ENSAYO DE ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL (SCGE) O ENSAYO COMETA, VERSIÓN ALCALINA	35
6.1 Fundamento	35
6.2 Mecanismo de formación de cometas	36
6.3 Ventajas y aplicaciones del ensayo cometa	36
6.4 Evaluación de daño	37
7 ANTECEDENTES DEL COMPUESTO CAPA LQM 731	39
III. JUSTIFICACIÓN	41
IV. OBJETIVOS	42
4.1 OBJETIVO GENERAL	42
4.2 OBJETIVOS PARTICULARES	42
V. MATERIAL	43
5.1 MATERIAL BIOLÓGICO	43
5.2 COMPUESTO DE PRUEBA	43

5.3	REACTIVOS Y SOLUCIONES	43
5.4	EQUIPOS Y MATERIALES	44
VI.	METODOLOGÍA	45
6.1	METODOLOGÍA. CARACTERÍSTICAS Y ESQUEMA EXPERIMENTAL	45
6.1.1	<i>Administración de los compuestos</i>	45
6.1.2	<i>Sacrificio y disección</i>	45
6.2	METODOLOGÍA DEL ENSAYO COMETA EN CONDICIONES ALCALINAS	45
6.2.1	<i>Obtener las células que serán sometidas a la prueba</i>	45
6.2.2	<i>Determinación de la viabilidad celular por medio de la técnica de azul de tripán</i>	46
6.2.3	<i>Preparar los portaobjetos para el ensayo</i>	46
6.2.4	<i>Realizar la electroforesis de microgeles de agarosa</i>	47
6.2.5	<i>Teñir las preparaciones</i>	47
6.2.6	<i>Evaluar el daño al DNA</i>	47
VII.	DIAGRAMA EXPERIMENTAL	49
VIII.	RESULTADOS	50
8.1	EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD A 3 Y 18 HORAS POST ADMINISTRACIÓN DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	50
8.2	EVALUACIÓN DE DAÑO AL DNA A 3 Y 18 HORAS POST ADMINISTRACIÓN DE LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS	52
8.2.1	<i>Evaluación de daño al DNA en células de hígado de ratón Balb C a 3 y 18 horas post administración de los diferentes tratamientos</i>	53
8.2.2	<i>Evaluación de daño al DNA en células de riñón de ratón Balb C a 3 y 18 horas post administración de los diferentes tratamientos</i>	54
IX.	DISCUSIÓN	55
X.	CONCLUSIONES	62
XI.	PERSPECTIVAS A FUTURO	63
XII.	REFERENCIAS	64
	ANEXO I	72

ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
26-L5	Línea celular de carcinoma de colon
2-AAF	2-Acetilaminofluoreno
AN	Agarosa de normal punto de fusión
AP-1	Proteína similar al factor de transcripción
B16-BL6	Línea celular de melanoma
CA	Ácido caféico
CAPE	Éster fenetílico del ácido caféico
CDDO	Bardoxolone
CDKI	Inhibidor de ciclina dependientes de cinasa
CKI	Inhibidor de ciclincinasa
COX-2	Ciclooxigenasa 2
CYP 1 A1	Isoforma A1 del citocromo P450
DEN	Dimetil nitrosamina
DMBA	7,12-dimetilbenzo (A) antraceno
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERKS	Señalización extracelular dependiente de cinasa
FHA	Focos de hepatocitos alterados
GGT	Gama glutamil transpeptidasa
GHX	Glutación peroxidasa
GW2974	Factor de crecimiento dual
HepG2	Línea celular de carcinoma hepático
HIV-1	Virus de inmunodeficiencia humana tipo1
HO-1	Hemoxygenasa- 1
HUVEC	Células de endotelio venoso umbilical humano
iNOS	Inductor de la sintetasa de óxido nítrico
<i>IκBα</i>	Inhibidor del factor de transcripción NF-κB
LMP	Agarosa de bajo punto de fusión
LPS	Lipopolisacáridos
LLC	Línea celular de leucemia linfocítica crónica
MAPK	Actividad mitógena de la proteína cinasa
mg/Kg	Miligramos por kilogramo
mg/ml	Miligramos por mililitro
MMP-9	Metaloproteinasa de matriz
NF-κB	Factor nuclear kappa B
NO	Oxido nítrico
PAH	Hidrocarburos policíclicos aromáticos
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato.
RAD-001	40-O-(2-hidroxietil)
RL	Radicales libres
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SnPPIX	Protoporfirina de estaño
SOP	Súper óxido dismutasa
TNF	Factor de transcripción nuclear.
TPA	12-O-tetradecanoil-13-forbol acetato.
U-937	Línea celular de leucemia monoblástica

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Etapas del desarrollo tumoral.</i>	6
<i>Figura 2. Etapas de la carcinogénesis en un modelo de piel de ratón.</i>	7
<i>Figura 3. Etapas de la carcinogénesis: iniciación.</i>	9
<i>Figura 4. Etapas de la carcinogénesis: promoción.</i>	10
<i>Figura 5. Etapas de la carcinogénesis: progresión.</i>	11
<i>Figura 6. Clasificación de los carcinógenos químicos según su mecanismo de acción.</i>	14
<i>Figura 7. Posibles mecanismos de anticarcinogénesis.</i>	24
<i>Figura 8. Estructuras químicas del ácido caféico (CA) y el éster fenílico del ácido caféico (CAPE).</i>	25
<i>Figura 9. Esquema de tratamiento del modelo del hepatocito resistente.</i>	28
<i>Figura 10. Efecto del CAPE en el daño tisular 24 horas después de la administración de DEN.</i>	28
<i>Figura 11. Ecuación de esterificación entre el ácido caféico y alcoholes.</i>	30
<i>Figura 12. Derivados fluorados del CAPE.</i>	33
<i>Figura 13. Síntesis de CAPA y análogos fluorados de CAPA.</i>	34
<i>Figura 14. Estructura química del derivado análogo del CAPE, NA01 (N-[2 clorobencil]cinamida).</i>	34
<i>Figura 15. Estructura química del derivado análogo del CAPE, PA01 (N-[(2 clorofenil)metil]- Benzenacetamida).</i>	35
<i>Figura 16. Cometas observados en un ensayo de electroforesis unicelular en gel.</i>	36
<i>Figura 17. Clasificación de daño a las células según el grado de migración observada.</i>	38
<i>Figura 18. Partes que componen a un cometa.</i>	38
<i>Figura 19. Parámetros obtenidos con el analizador de imagen Comet Imager 2.1.</i>	38
<i>Figura 20. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de hígado de ratón Balb C a 3 horas post- administración.</i>	50
<i>Figura 21. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de hígado de ratón Balb C a 18 horas post- administración.</i>	50
<i>Figura 22. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de riñón de ratón Balb C a 3 horas post- administración.</i>	51
<i>Figura 23. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de riñón de ratón Balb C a 18 horas post- administración.</i>	51
<i>Figura 24. Daño causado al DNA de células de hígado de ratón Balb C en los distintos tratamientos a 3 horas post-administración, expresado en pixeles</i>	53
<i>Figura 25. Daño causado al DNA de células de hígado de ratón Balb C en los distintos tratamientos a 18 horas post-administración, expresado en pixeles.</i>	53
<i>Figura 26. Daño causado al DNA de células de riñón de ratón Balb C en los distintos tratamientos a 3 horas post-administración, expresado en pixeles</i>	54
<i>Figura 27. Daño causado al DNA de células de riñón de ratón Balb C en los distintos tratamientos a 18 horas post-administración, expresado en pixeles</i>	54

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Carcinógenos químicos</i>	13
<i>Tabla 2. Mecanismos de acción de inhibidores de mutagénesis y carcinogénesis</i>	16
<i>Tabla 3. Inhibidores de la etapa I y etapa II de la promoción de tumores y sus posibles mecanismos de acción</i>	21
<i>Tabla 4. Ejemplos de factores dietarios y agentes quimioprotectores que actúan en etapas específicas del proceso carcinogénico</i>	23
<i>Tabla 5. Resumen de estudios in vitro del CA Y CAPE</i>	29
<i>Tabla 6. Análogos estructurales del CAPE</i>	31
<i>Tabla 7. Citotoxicidad causada por el compuesto LQM 731 en tres diferentes líneas celulares neoplásicas</i>	39
<i>Tabla 8. Citotoxicidad causada por el compuesto LQM 731 en cultivos primarios de células no cancerosas</i>	40
<i>Tabla 9. Lotes de trabajo y tratamientos</i>	45
<i>Tabla 10. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de hígado de ratón Balb C a 3 y 18 horas post-administración, evaluada con la técnica de azul de tripán.</i>	50
<i>Tabla 11. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de riñón de ratón Balb C a 3 y 18 horas post-administración, evaluada con la técnica de azul de tripán.</i>	51
<i>Tabla 12. Resultados de los promedios de los momentos de la cauda obtenidos (expresados en pixeles) y su respectivo error estándar.</i>	52

I. RESUMEN

Existe un número limitado de análogos del éster fenetílico del ácido caféico (CAPE), ejemplo de ello son los compuestos CAPA, análogos amídicos del CAPE, pertenecientes a la serie LQM 700 y de los cuales al menos a 30 de ellos se les han realizado estudios de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer de mama, cérvix y próstata (Ruíz, 2012); estudios de genotoxicidad en cultivos celulares de linfocitos humanos (Paniagua, 2010) y recientemente han sido empleados en el modelo modificado del hepatocito resistente demostrando que poseen actividad quimioprotectora (Macías, 2013).

El objetivo del presente trabajo fue evaluar la capacidad antígenotóxica del compuesto LQM 731 en un modelo *in vivo* mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa) como parte de los estudios preclínicos que permitan perfilarlo como un agente quimioprotector.

Para lograr este objetivo se establecieron 7 lotes de trabajo por horario (3 y 18 horas), que contaron con 5 ratones Balb C, machos, jóvenes, cada uno y a los cuales se les administraron los siguientes tratamientos: Lote blanco, sin tratamiento; Control negativo, DMSO al 80%; Control positivo, MMC (2 mg/Kg); Control LQM 731 dosis 1, LQM 731 a 20 mg/Kg; Control LQM 731 dosis 2, LQM 731 a 40 mg/Kg; Reto dosis 1, MMC + LQM 731 a 20 mg/Kg; Reto dosis 2, MMC + LQM 731 a 40 mg/Kg.

Primeramente se realizaron las pruebas para determinar la viabilidad celular de las suspensiones celulares mediante la prueba de exclusión con azul de tripán. Una vez comprobado que el porcentaje de viabilidad celular era superior al 85% se procedió a realizar el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa) en su versión alcalina ($\text{pH} > 13$) a células de hígado y riñón.

Con base a los resultados obtenidos en la evaluación de daño al DNA a 3 horas post-administración, se puede decir que el DMSO 80% es un buen control negativo y puede fungir como disolvente del compuesto LQM 731 ya que no causa daño al DNA y mostró diferencias altamente significativas ($P < 0.001$) con respecto al control positivo. El control MMC resultó ser un buen control positivo ya que a 3 horas post-administración mostró el pico máximo de daño al DNA con un promedio del momentum de la cauda de 145.83 pixeles en células hepáticas y 186.95 pixeles en células renales. En relación a los controles del LQM 731 en ambas dosis demostraron causar daño mínimo al DNA mostrando diferencias altamente significativas con respecto al control positivo ($P < 0.001$). Por lo que respecta a los retos se demostró que el compuesto LQM 731 posee actividad antígenotóxica al disminuir en células de hígado el daño al DNA causado por MMC en un 91.7% empleando la dosis de 20 mg/Kg y en un 89.7% en la dosis de 40 mg/Kg (estos valores se obtuvieron tomando como 100% el daño al DNA causado por MMC en células de hígado). Por lo que respecta a las células de riñón el LQM 731 fue capaz de disminuir el daño al DNA causado por MMC en un 90.2% empleando la dosis de 20 mg/Kg y de un 88.1% en la dosis de 40 mg/Kg (estos valores se obtuvieron tomando como 100% el daño al DNA causado por MMC en células de riñón).

En el estudio de daño al DNA a las 18 horas post-administración se encontró que el daño causado es mínimo y atribuible a los metabolitos de cada tratamiento a excepción del control del LQM 731 a la dosis de 40 mg/Kg que demostró ser una dosis tóxica.

En conclusión se puede decir que la dosis efectiva a la que el LQM 731 ejerce su efecto antígenotóxico es a 20 mg/Kg y por el comportamiento observado es posible perfilarlo como fármaco quimioprotector, por lo que se recomienda continuar con la investigación de estos compuestos.

II. MARCO TEÓRICO

1. Carcinogénesis y anticarcinogénesis, perspectivas históricas

Fue el cirujano inglés Percivall Pott el primero en reconocer en 1775 la relación causal entre la exposición a sustancias del medio ambiente y el desarrollo neoplásico. Este autor describió la aparición de alteraciones cancerosas en la piel del escroto de limpiadores de chimeneas de Londres como consecuencia de la repetida contaminación localizada con hollín. Algunos años después, y basado en esta observación distribuyó una guía a los limpiadores de chimeneas de Dinamarca recomendando que estos profesionales tomaran un baño diario para evitar tal aparición (Oliveira et. al., 2007). Este fue el primer reporte clínico sobre carcinogénesis química ocupacional. Desde entonces numerosos carcinógenos físicos, químicos y biológicos han sido reportados en el medio ambiente y en el ámbito laboral. El aumento en la incidencia de cáncer de piel se asoció con exposiciones a químicos generados por materiales que contienen carbón, petróleo, esquisto, arsénico; así como radiaciones. El cáncer de vejiga fue asociado con la fabricación de colorantes de anilina, por ejemplo magenta y auramina. Algunos compuestos que contienen metales, por ejemplo níquel, cromo, berilio y arsénico, productos de carbón, petróleo y asbestos se creía, eran responsables de la alta incidencia de cáncer de pulmón en el ambiente ocupacional. De manera similar, la leucemia fue asociada con el benceno y las radiaciones ionizantes generadas por radón y radium (Warshawsky y Landolph, 2006).

En 1890, una alta incidencia de cáncer de vejiga en químicos y trabajadores de la industria del caucho fue observada a través de Europa. A finales del siglo diecinueve llegó a ser evidente que la exposición ocupacional a ciertos químicos o mezclas de estos tenían efectos carcinogénicos. El siguiente paso de suma importancia fue la investigación y reproducción sistemática de esta enfermedad en el entorno experimental.

El primer trabajo experimental en carcinogénesis química fue llevado a cabo en 1915 por el patólogo Katsusaburo Yamagiwa y su asistente. Ellos frotaron alquitrán de hulla en las orejas de conejos y observaron el desarrollo de papilomas y carcinomas. Mientras tanto, otros investigadores estudiaron la carcinogénesis de vejiga, hígado, riñón, páncreas y pulmón usando animales de laboratorio. Later, Bermlum y Shubik usaron hidrocarburos policíclicos aromáticos y aceite de crotón para estudiar la carcinogénesis en piel de ratones

y demostraron que el desarrollo del cáncer incluye varias etapas. Cuando se aplicaron en bajas dosis, ninguna de estas sustancias tuvo propiedades cancerígenas por ellas mismas. Sin embargo, cuando se mezclaron en dosis iguales, ellos indujeron el desarrollo de neoplasia. El orden de exposición de estas sustancias fue fundamental para la carcinogénesis. El desarrollo de la neoplasia ocurrió sólo cuando los hidrocarburos fueron administrados primero que el aceite de croton, nunca de otra manera. Estos autores pensaron que la acción cancerígena de estas sustancias fue responsable de convertir las células normales en células neoplásicas. Para ellos, la carcinogénesis fue un complejo proceso que incluye una etapa llamada iniciación y otra llamada promoción, con uno o más cambios genéticos para desarrollar cáncer (Oliveira et. al., 2007).

Ernest L. Kennaway en 1925 demostró en Inglaterra que el hollín de carbón y el alquitrán provenientes del acetileno e isopropeno calientes eran cancerígenos. Para los 1930s hubo una gran cantidad de literatura sobre carcinogénesis experimental y el tópico llegó a alcanzar las treinta mil entradas (Proctor, 2011).

Durante la siguiente década, Foulds (1954) introdujo el término progresión para el estudio de adenocarcinoma de mama en ratones hembras. En la pre-era Watson y Crick, antes de que fuera conocido que los carcinógenos se unen al DNA, se suponía que el cáncer producido por carcinogénesis química, era debido a su interacción con proteínas en tejidos específicos. A finales de 1960s, una creciente evidencia apuntaba a una correlación entre la capacidad de unión de partículas cancerígenas al DNA y su potencia biológica (Oliveira et. al., 2007).

Desde entonces el número de carcinógenos identificables ha aumentado y el número de compuestos químicos sintéticos ha ido incrementando cada vez más rápido. En los Estados Unidos, hay más de 80,000 químicos comerciales registrados y cerca de 2,000 compuestos nuevos son introducidos anualmente para el uso diario como alimentos, productos para el cuidado personal, fármacos, productos de limpieza para el hogar, productos para el mantenimiento del césped, etcétera. De todos estos compuestos reportados, menos del 2% de los que se encuentran en comercios han sido sometidos a pruebas de carcinogenicidad (Warshawsky y Landolph, 2006).

Una vez que se llegó a la conclusión de que existe un proceso estructurado y complejo que incluye una gran variedad de mecanismos que llevan a la inducción de un proceso canceroso, el cual es denominado carcinogénesis, muchos investigadores decidieron enfocarse al estudio de la prevención o reversión de la carcinogénesis, es decir a la anticarcinogénesis.

“La prevención es mejor que la cura” y esta frase es muy cierta en el caso del cáncer (Saravana y Mahitosh, 2009). La quimioprevención fue originalmente definida por Sporn en el año 1976 para indicar: “la potenciación farmacológica o fisiológica mediante las cuales la progresión de una lesión preneoplásica puede ser prevenida, detenida o revertida” (Zamorano et. al. 2008) es decir, que inducen un proceso de anticarcinogénesis. Muchos estudios epidemiológicos y experimentales sugieren una estrecha relación entre el riesgo de cánceres y factores dietarios. Aunque muchos constituyentes en los alimentos tales como macronutrientes, micronutrientes y fitoquímicos no nutritivos (Saravana et. al., 2009) se han asociado a una disminución en el riesgo de padecer cáncer, la evidencia epidemiológica es quizá más fuerte en lo relativo al consumo de vegetales (Zamorano et. al., 2008).

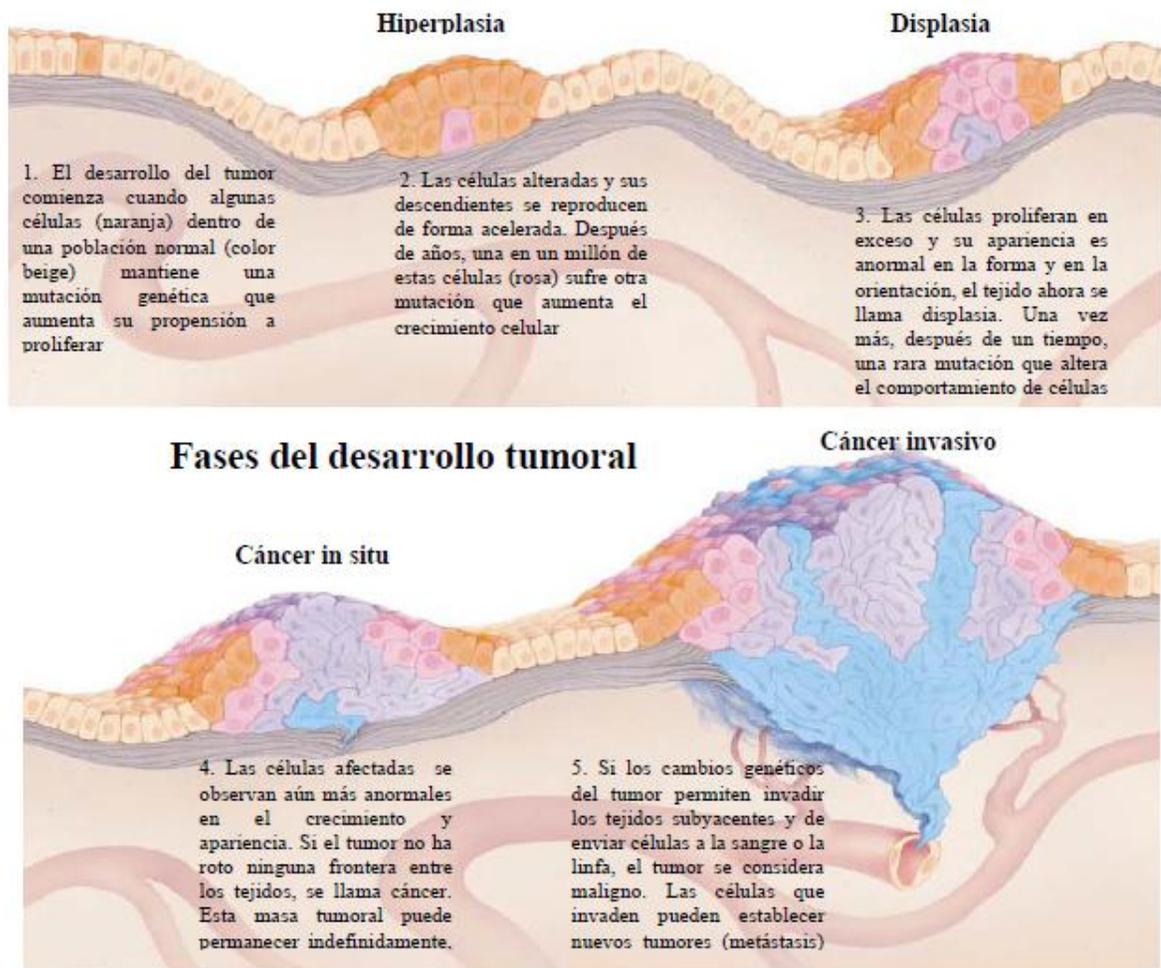
Un elevado número de sustancias actualmente empleadas en el tratamiento del cáncer lo componen metabolitos secundarios de origen vegetal (flavonoides, taninos, alcaloides, etcétera). Los componentes de la dieta constituyen una fuente de agentes antitumorales, que están presentes en muchas frutas, hortalizas, hierbas y especias. Los extractos de varias especies de uso común han mostrado elevados efectos citotóxicos en cultivos de células tumorales, así como una considerable actividad reductora de tumores en modelos animales (Fernández y Escribano, 2000). Tal es el caso del ginseng (Hasegawa y Benno, 2000), el uso del azafrán que presentó actividad antitumoral y anticarcinogénica, además de mostrar efectos citotóxicos y antimutagénicos. Algunos otros metabolitos como los alcaloides vincristina y vinblastina aislados de la planta *Vinca rosea* se han empleado en el tratamiento de linfomas y tumores sólidos (Fernández y Escribano, 2000). Desde entonces y hasta nuestros días la medicina alternativa se ha ido desarrollando y definiendo de manera que ha dado lugar a la realización de numerosas investigaciones sobre el empleo de metabolitos extraídos primordialmente de vegetales y que han presentado cualidades anticarcinogénicas.

2. Carcinogénesis

2.1 Definición

La *carcinogénesis* se define como el proceso por el cual las células que poseen una ventaja de crecimiento sobre otras se transforman, debido a mutaciones en los genes que controlan la división celular, en células que ya no responden a las señales de regulación (Biochemistry in perspective, 2010). Dicho proceso consta de múltiples etapas que llevan al desarrollo de un neoplasma maligno.

Una neoplasia es un desorden en el crecimiento celular, caracterizado por una proliferación excesiva, alterada e incontrolada de las células que no guarda relación alguna con las demandas fisiológicas del órgano implicado, dando como resultado una masa anormal (tumor) procedente de los tejidos originales. El proceso canceroso pasa por una serie de fases: iniciación, promoción, y progresión. La neoplasia puede ser benigna o maligna, siendo ésta última la que se conoce como cáncer, caracterizado por un rápido crecimiento, invasión y destrucción de los tejidos adyacentes y una diseminación por todo el organismo (metástasis) (Figura 1), que en la mayoría de los casos es la responsable de la muerte del individuo afectado (Granados et. al, 2006).



*Figura 1. Etapas del desarrollo tumoral.
(Modificado de: Weinberg, 1996)*

2.2 Etapas de la carcinogénesis

En la carcinogénesis se han identificado tres grandes estadios a saber: iniciación, promoción y progresión (Zamorano et. al., 2008). Iniciación, la célula es iniciada debido a mutaciones; promoción, la expansión clonal de las células iniciadas forman lesiones preneoplásicas; y progresión, las lesiones preneoplásicas llegan a ser tumores por un aumento de cambios metabólicos y genéticos (Beltrán et. al., 2008) (Figura 2).

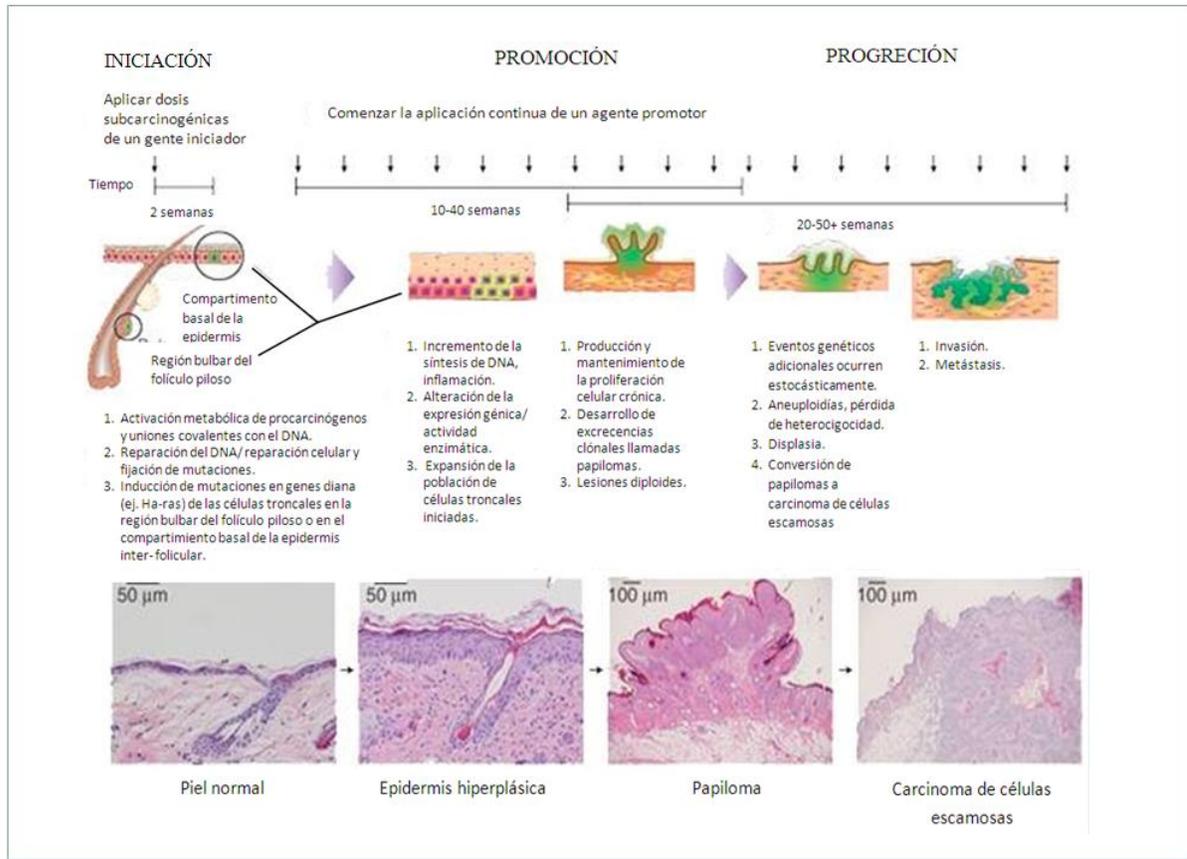


Figura 2. Etapas de la carcinogénesis en un modelo de piel de ratón.
 (Modificado de: Abel et. al., 2009)

2.2.1 Iniciación

La primera etapa de la carcinogénesis ha sido denominada iniciación. Los resultados de varios experimentos han permitido llegar a la conclusión de que la iniciación es causada por cambios genéticos irreversibles que predisponen a las células normales a la evolución maligna y la inmortalidad. Esta etapa comienza con una alteración en alguna célula integrante de un tejido, como resultado de la actividad tóxica de un carcinógeno químico bajo la exposición de una dosis única. Es decir, se produce la transformación de una célula normal en otra denominada célula iniciada, en la que los sistemas controladores del ciclo celular no funcionan de modo adecuado (Figura 2). La célula iniciada no es una célula neoplásica aunque ha dado el primer paso hacia esta condición y después de sucesivos cambios fenotípicos y genotípicos ha de ocurrir su transformación. Desde la perspectiva

fenotípica, la célula iniciada es similar a las demás células. Estas sufren mutaciones que inducen la proliferación pero no la diferenciación (Bello y López de Cervantes, 2001; Oliveira et. al., 2007).

El daño al DNA ha sido establecido como el evento por el cual inicia la carcinogénesis. Las células que están en proliferación tienen menos tiempo para reparar el daño al DNA y remover los enlaces covalentes que los químicos establecen con el DNA conocidos como aductos. En esta etapa la célula iniciada puede permanecer latente por semanas, meses o años, o pueden crecer de forma autónoma y en modo clonal. Este proceso de iniciación asegura que la división celular se mantenga simétrica mediante la creación de dos nuevas células iniciadas. La expansión clonal de las células iniciadas resulta de un proceso mitogénico causado por un incremento en el número de nuevas células y la inhibición de la apoptosis, que previene que las células iniciadas mueran. El incremento de daño en el DNA es específicamente importante a las células troncales, porque ellas sobreviven por un largo tiempo y existen en varios tejidos. Por definición, las células troncales son células inmortales hasta que se inducen su diferenciación o muerte. Si se retrasa su diferenciación ellas se convierten en iniciadas y se acumulan en los tejidos como clones de células anormales.

La iniciación es un fenómeno rápido, irreversible y es transmitido a las células hijas. La proliferación celular es esencial para esta etapa, si la división celular ocurre antes de que los sistemas de reparación de DNA puedan actuar entonces el daño será permanente e irreversible. La iniciación es un proceso aditivo, el desarrollo de la neoplasia depende de la dosis del carcinógeno, si aumenta la dosis incrementa la incidencia y la multiplicidad de la neoplasia resultante y se reduce el período de latencia de esta manifestación. No todas las células de un organismo vivo expuestas a un agente iniciador serán iniciadas, incluso si han sufrido mutaciones, y los genes que regulan la diferenciación terminal deben estar mutados (Figura 3).

La iniciación celular espontánea ocurre en todos los organismos vivos. La iniciación puede suceder debido a sucesos como:

- Mutaciones espontáneas.

- Depurinización y desaminación del DNA.
- Errores en la replicación del DNA.

Aunque la iniciación espontánea es menos común que la iniciación inducida, su existencia ha sido confirmada por la presencia de neoplasias espontáneas en animales de laboratorio (Oliveira et. al., 2007).

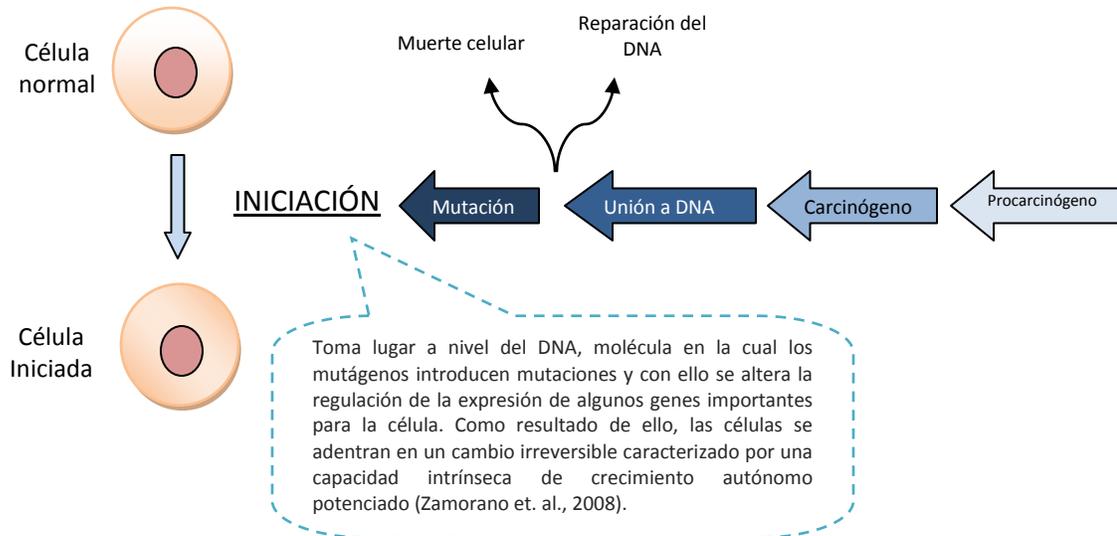


Figura 3. Etapas de la carcinogénesis: iniciación.
(Modificado de: Granados et. al., 2006)

2.2.2 Promoción

El concepto de promoción se introdujo cuando fueron descubiertas las sustancias químicas que presentaban una elevada actividad carcinogénica.

Llegado a este punto, el mecanismo neoplásico continúa con la implicación de importantes alteraciones en la expresión de genes y en la proliferación celular que son la base de la promoción, donde la célula iniciada se transforma en una población perceptible de células precancerosas (Bello y López de Cervantes, 2001).

Los compuestos promotores no interactúan directamente con el DNA y desencadenan efectos biológicos sin ser metabólicamente activos. Estos agentes incrementan la proliferación celular en tejidos susceptibles, contribuyen a la fijación de mutaciones,

inducen alteraciones en la expresión genética y causan cambios en el control del crecimiento celular (Figura 4). Por otra parte, estos promotores pueden dañar al DNA indirectamente por oxidación. Al inicio, estas peculiaridades fueron asociadas con mecanismos epigenéticos, pero hoy en día esta ampliamente reconocido que la promoción también implica cambios genéticos. La actividad más importante de los promotores es la mitogénesis ya que la acción genotóxica y mutacional no se requieren en esta etapa. El promotor debe estar presente por semanas, meses o años para poder ser efectivo y su efectividad depende de su concentración en los tejidos diana (Figura 2).

La promoción es una etapa reversible que ocurre una vez que el promotor deja de estar presente en el tejido con lo que puede ocurrir la regresión de la proliferación celular, probablemente por apoptosis. Esta es una etapa que puede ser moldeada por factores fisiológicos y por lo tanto limita el alcance de la carcinogénesis. Algunos agentes promotores son específicos para tejidos en particular mientras que otros actúan sobre varios tejidos.

No todas las células expuestas a promotores participan en ésta etapa, únicamente aquellas células que son estimuladas para dividirse, que son indiferenciadas, han sobrevivido a la apoptosis, pueden contribuir a la inestabilidad entre el crecimiento y muerte de la célula y conducen a la aparición de una neoplasia maligna (Oliveira et. al., 2007).

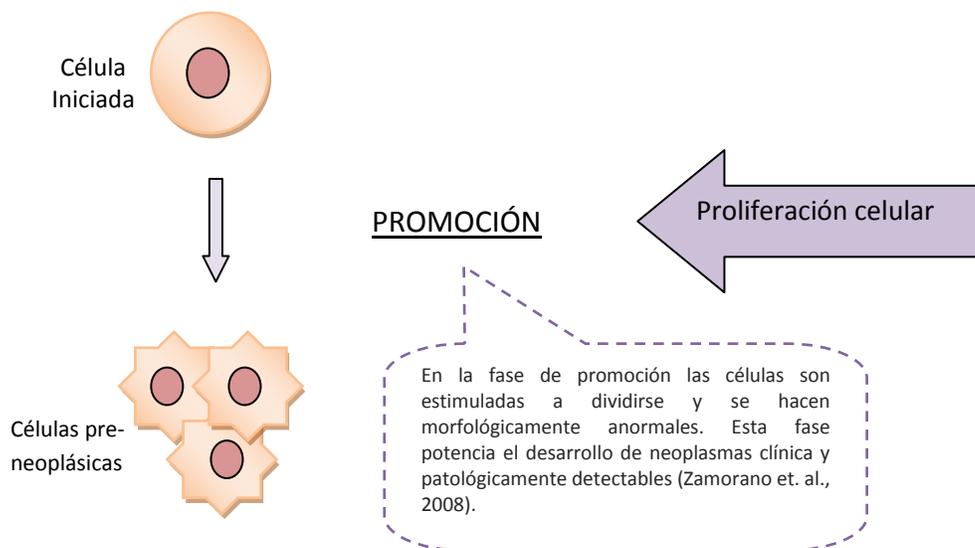


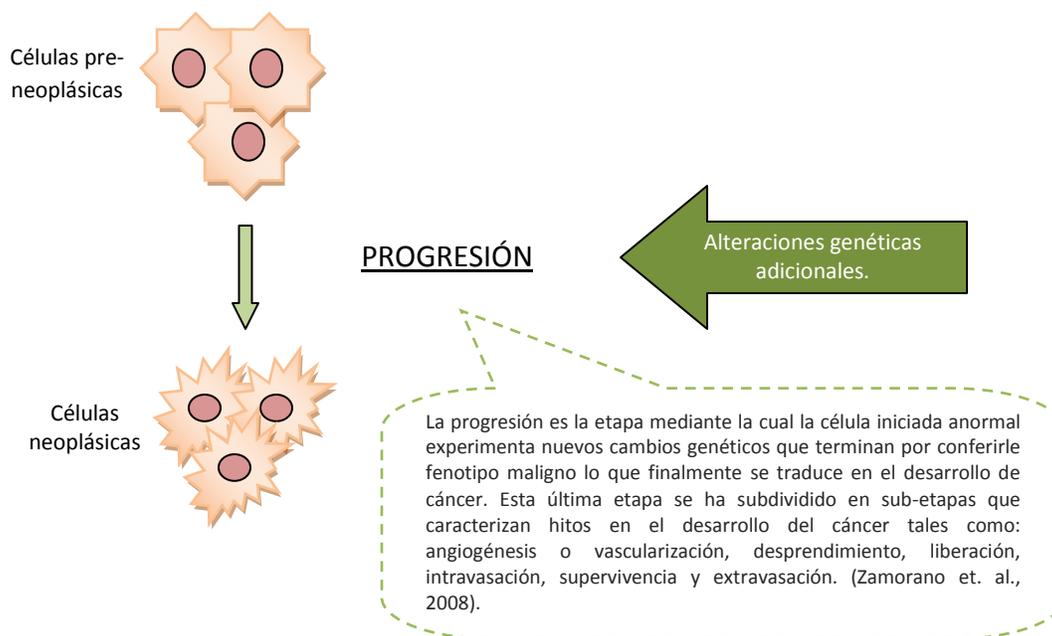
Figura 4. Etapas de la carcinogénesis: promoción.
(Modificado de: Granados et. al., 2006)

2.2.3 Progresión

La secuencia de lesiones identificadas, histopatológicamente, entre la iniciación y la promoción son designadas como lesiones preneoplásicas y/o neoplasias benignas. Su transformación en lesiones malignas es la última de las etapas de la carcinogénesis y es la más extensa; esta etapa es llamada progresión (Figura 5).

En la progresión, el fenotipo neoplásico es adquirido mediante mecanismos genéticos y epigenéticos. Durante la progresión, la proliferación celular es independiente de la presencia de estímulos. Esta etapa es caracterizada por ser irreversible, genéticamente inestable, las células presentan rápido crecimiento, invasión y metástasis por los cambios en las características bioquímicas, metabólicas y morfológicas de las células (Figura 2).

La angiogénesis, como un suceso epigenético, es esencial para la progresión neoplásica. La adquisición de un fenotipo angiogénico precede al desarrollo de características que contribuyen a la malignidad y al retraso de la inhibición del desarrollo neoplásico (Oliveira et. al., 2007).



*Figura 5. Etapas de la carcinogénesis: progresión.
(Modificado de: Granados et. al., 2006)*

3. Carcinógenos

3.1 Definición

Un carcinógeno se define como cualquier agente químico, físico o viral que causa cáncer o incrementa la incidencia del mismo (Schwab, 2001). Visto desde una perspectiva meramente experimental un carcinógeno es un agente cuya administración a animales que no han recibido un tratamiento previo produce un incremento en la incidencia de neoplasmas malignos estadísticamente significativo en relación con los animales control no tratados, tanto si dichos animales tienen una incidencia elevada o baja de carácter espontáneo del neoplasma en cuestión (Bello y López de Cervantes, 2001)

3.2 Clasificación de los carcinógenos químicos según su mecanismo de acción

En general, para su estudio, los agentes con capacidad carcinogénica se clasifican atendiendo a que actúen o no afectando al DNA celular, diferenciándose entre agentes genotóxicos y no genotóxicos o epigenéticos (Figura 6).

3.2.1 Carcinógenos genotóxicos

Algunos agentes carcinógenos, en especial los agentes iniciadores y progresores se caracterizan por su capacidad de alterar la estructura del DNA y/o de los cromosomas. Estos efectos genotóxicos inducen directamente la aparición de células neoplásicas (transformadas o malignas). Tales efectos genotóxicos podríamos resumirlos en mutaciones, formación de aductos y aberraciones cromosómicas. Sin embargo, en la mayor parte de los casos, la acción carcinógena de estos agentes consiste en un aumento del potencial oxidativo de las células lo cual resulta en modificaciones en el DNA (oxidación del DNA) o formación de uniones covalentes de los agentes o sus metabolitos a las cadenas de DNA (aductos) (Tabla 1). En la acción de este tipo de sustancias juega un papel fundamental el metabolismo celular, a través del cual se produce la biotransformación de sustancias en principio inocuas a compuestos (generalmente reactivos) que presentan capacidad genotóxica y que son llamados (carcinógenos finales). En todo caso, la acción de un agente carcinogénico debe acompañarse, para que ésta sea efectiva, de un desbalance en los mecanismos de reparación del DNA (BioCancer, 2010a).

3.2.2 Carcinógenos no genotóxicos

Son aquellos compuestos químicos que actúan por mecanismos que no incluyen la modificación directa del DNA, dando lugar finalmente a células genéticamente inestables (tumor). Estos agentes parece ser que modulan el crecimiento y la muerte celular. En general, estos compuestos actúan modificando la fisiología normal de órganos y sistemas específicos produciéndose una sobre estimulación persistente cuyo resultado es una replicación celular intensificada (alteración del ciclo celular con efecto mitogénico). Esto puede dar lugar a un incremento de mutaciones espontáneas y de las probabilidades de alterar el DNA tanto por factores endógenos como exógenos antes de que haya posibilidad de reparación. Normalmente se trata de compuestos exógenos, aunque en determinadas circunstancias compuestos endógenos (hormonas) podrían considerarse como carcinógenos epigenéticos (BioCancer, 2010b).

Tabla 1. Carcinógenos químicos (Modificado de: Oliveira et. al., 2007)

GRUPO	COMPUESTO	MECANISMO DE ACCIÓN	ÓRGANO AFECTADO/TIPO DE CÁNCER
Hidrocarburos policíclicos aromáticos	Benzo[a]pireno Bifenilos policlorados	Forman aductos con las bases purinas del DNA, muchos de los cuales resultan en transversiones.	Piel, pulmones, estómago Hígado, piel
Aminas aromáticas/ amidas	2-Acetilaminofluoreno 4-Aminobifenil 2-Naftilamina	Compuestos genotóxicos que incrementan la tasa de replicación celular	Hígado, vejiga Vejiga Vejiga
Colorantes aminoazo	<i>o</i> -Aminoazotolueno <i>N,N</i> -dimetil-4-aminoazobenceno	Forman aductos con el DNA y con la hemoglobina	Hígado, pulmones, vejiga Pulmones e hígado
Compuestos N-nitrosos	N-Nitrosodimetilamina	Forma aductos en los átomos N-y O- en las bases del DNA.	Hígado, pulmones, riñones
Carbamatos	Esteres de N-metilcarbamato	Aberraciones cromosómicas, mutaciones génicas y transformación celular.	Resultados experimentales mostraron que hígado, riñones y pruebas de degeneración
Compuestos halogenados	Tricloroetileno	Mutaciones somáticas, modificación de las vías del ciclo celular	Resultados experimentales mostraron que riñones e hígado y a su vez causa cáncer de pulmón.
Carcinógenos naturales	Aflatoxina B1 Asbestos	Forma aductos con guaninas, reacciona con el RNA y proteínas	Hígado Pulmones
Metales	Arsénico Cadmio Níquel	Estrés oxidativo Inhibe las vías de reparación del DNA y la reparación por escisión de nucleótidos Acetilación de histonas e hipermetilación del DNA	Piel, pulmones, hígado Pulmones, próstata, riñones Pulmones, cavidad nasal
Fármacos anti-cáncer	Agentes alquilantes	Uniones cruzadas inter o intracatenarias.	Leucemia

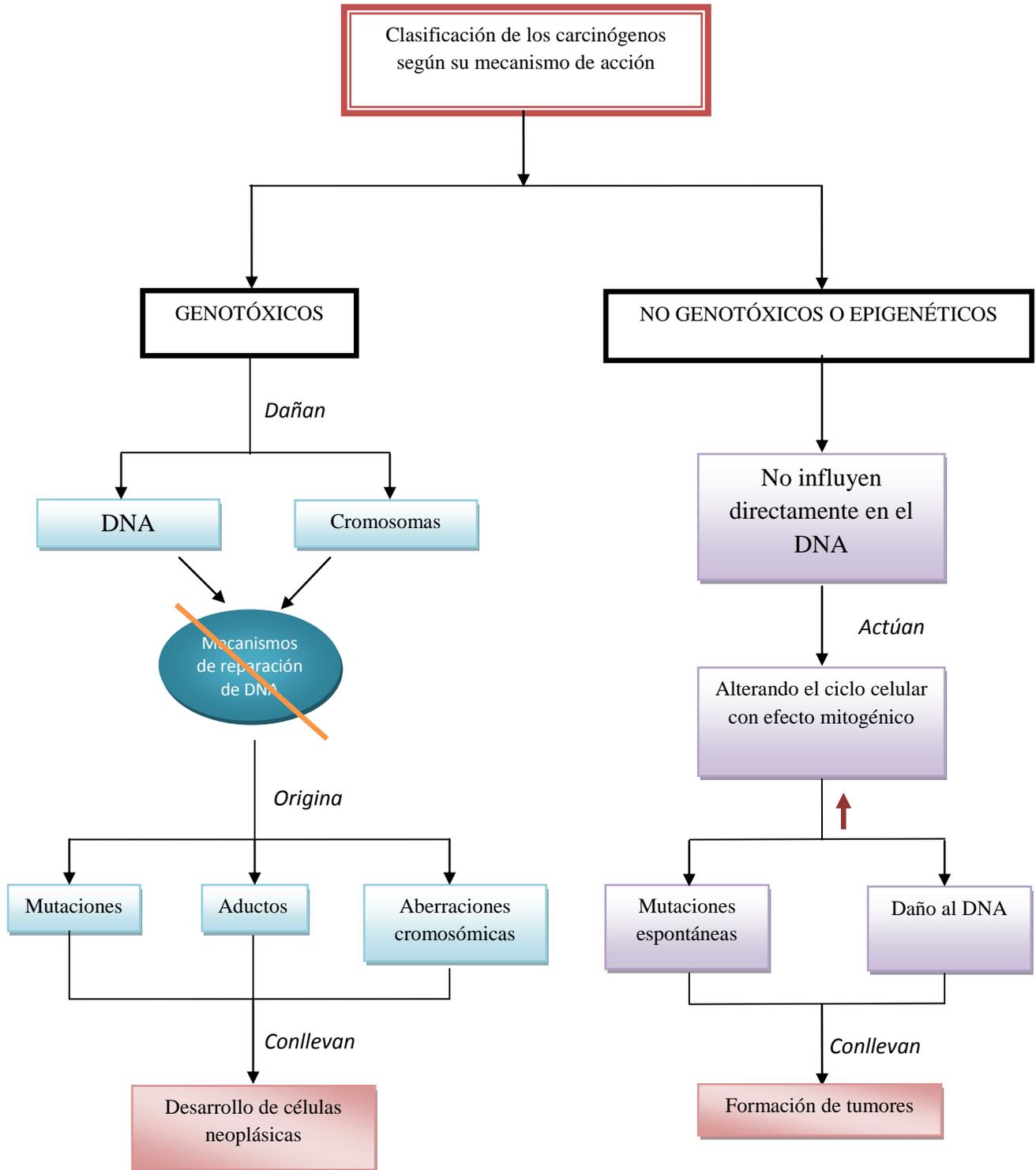


Figura 6. Clasificación de los carcinógenos químicos según su mecanismo de acción. (Hernández, 2013)

4. Anticarcinogénesis

Los estudios realizados sobre carcinogénesis, tanto en modelos animales como en tejidos humanos, han tenido como objetivo principal dilucidar los procesos involucrados en la inducción del cáncer con la finalidad de que la intervención y prevención de estos conlleven a evitar el desarrollo de la enfermedad (Penning, T.M., 2011), por lo que este proceso ha sido denominado *anticarcinogénesis*.

4.1 Mecanismos de Anticarcinogénesis

El entendimiento de que la carcinogénesis química está constituida por múltiples etapas ha permitido el descubrimiento de mecanismos de intervención, llamados *mecanismos de anticarcinogénesis*, que actúan de manera etapa-específica, lo que implica que las sustancias que poseen propiedades anticarcinogénicas pueden llevar a cabo su acción en cualquiera de estas, dependiendo de su especificidad (Penning, T.M., 2011).

Para su estudio, las sustancias anticarcinogénicas se han clasificado en tres categorías según su mecanismo de acción:

1. Sustancias que pueden inhibir la formación de mutágenos y carcinógenos a partir de sus precursores.
2. Sustancias que pueden inhibir la llegada de carcinógenos a las células blanco o que pueden evitar que reaccionen con ellas; estos son llamados agentes bloqueadores.
3. Sustancias que pueden inhibir la expresión de las características malignas; llamados agentes supresores (Kuroda y Hara, 1998).

Sin embargo, una clasificación más completa es la realizada por De Flora y Ramel (De Flora y Ramel, 1988) y que se expone a continuación en la tabla 2.

*Tabla 2. Mecanismos de acción de inhibidores de mutagénesis y carcinogénesis
(Modificado de: De Flora y Ramel, 1988)*

CLASIFICACIÓN	EJEMPLOS
<p>1. Inhibidores de la mutagénesis que actúan extracelularmente.</p> <p>1. Inhibición de la captación de mutágenos o de sus precursores.</p> <p>1.1.1 Dificultando su penetración.</p> <p>1.1.1.1 Dentro del organismo.</p> <p>1.1.1.2 Dentro de la célula.</p> <p>1.1.2 Favoreciendo su eliminación.</p> <p>2. Inhibición de la formación endógena de mutágenos.</p> <p>1.2.1 Inhibición de la reacción de nitrosación.</p> <p>1.2.2 Modificación de la flora intestinal microbiana.</p> <p>3. Desactivación de mutágenos.</p> <p>1.3.1 Por reacciones físicas.</p> <p>1.3.2 Por reacciones químicas.</p> <p>1.3.3 Por reacción enzimáticas.</p>	<p>Ácidos grasos, putresina, aminoácidos aromáticos, yoduro.</p> <p>Fibras.</p> <p>Ácido ascórbico, tocoferoles, fenoles.</p> <p>Fermentación de productos lácteos.</p> <p>Mantenimiento del pH fisiológico en los fluidos corporales.</p> <p>Tioles y antioxidantes.</p> <p>Verduras con actividad peroxidasa.</p>
<p>2. Inhibidores de la mutagénesis que actúan intracelularmente.</p> <p>1. Modulación del metabolismo</p> <p>2.1.1 Inhibición de la división celular.</p> <p>2.1.2 Favoreciendo el secuestro de mutágenos en células no diana.</p> <p>2.1.3 Inhibición de la activación de promutágenos.</p> <p>2.1.4 Inducción de mecanismos de destoxificación.</p> <p>2. Bloqueo de moléculas reactivas.</p> <p>2.2.1 Reacción con electrófilos.</p>	<p>Retinoides.</p> <p>Tioles.</p> <p>Modulación de reacciones de fase I.</p> <p>Fenoles y tioles.</p>

<p>2.2.1.1 Por reacciones químicas.</p> <p>2.2.1.2 Por reacciones enzimáticas.</p> <p>2.2.2 Neutralización de especies reactivas de oxígeno.</p> <p>2.2.3 Protección de los sitios nucleofílicos del DNA.</p> <p>3. Moduladores de la replicación del DNA o reparación.</p> <p>2.3.1 Aumento de la fidelidad de la replicación del DNA.</p> <p>2.3.2 Favoreciendo la reparación del DNA dañado.</p> <p>2.3.3 Inhibición de las vías de reparación propensas a errores.</p>	<p>Compuestos sulfurosos.</p> <p>Inductores de las reacciones de fase II.</p> <p>Una variedad de antioxidantes.</p> <p>Ácido elágico, retinoides.</p> <p>Cloruro cobaltoso, arsenito de sodio.</p> <p>Cinamaldehído, cumarina, umbeliferona, vainillina, tioles.</p> <p>Inhibidores de proteasas.</p>
<p>3. Inhibidores que actúan sobre las células iniciadas o neoplásicas.</p> <p>1. Moduladores de la promoción de tumores</p> <p>3.1.1 Inhibición de los efectos genotóxicos.</p> <p>3.1.2 Neutralización de radicales libres.</p> <p>3.1.3 Inhibición de la proliferación celular.</p> <p>3.1.4 Inducción de la diferenciación celular.</p> <p>3.1.5 Modulación de las señales de transducción.</p> <p>2. Moduladores de la progresión de Tumores.</p> <p>3.2.1 Inhibición de los efectos genotóxicos.</p> <p>3.2.2 Actuando sobre hormonas o factores de crecimiento.</p> <p>3.2.3 Actuando sobre el sistema inmune.</p> <p>3.2.4 Agentes antineoplásicos físicos, químicos o biológicos.</p>	<p>Ver 1 y 2.</p> <p>Una variedad de antioxidantes.</p> <p>Retinoides, glucocorticoides, hipertermia.</p> <p>Retinoides, glucocorticoides, calcio, vitamina D₃.</p> <p>Inhibidores de proteína cinasa C.</p> <p>Ver 1 y 2.</p> <p>Tratamientos hormonales, antagonistas de la dopamina, inhibidores de proteasas.</p> <p>Inmunoreguladores (retinoides, lipotropes) vacunas, anticuerpos monoclonales.</p> <p>Radiación, medicamentos antitumorales, interferón.</p>

3.2.5 Modulación de las señales de transducción.	Inhibidores de proteína cinasa C.
4. Inhibición de invasión y metástasis.	Catequinas y Teaflavina de infusión de té verde y polifenoles (Kuroda y Hara, 1998).
5. Inducción de apoptosis.	Polifenoles (Kuroda y Hara, 1998).

4.1.1 Iniciación y anticarcinogénesis

El proceso de iniciación hipotéticamente involucra los siguientes pasos:

- a. La generación de especies electrofílicas reactivas.
- b. La unión de especies electrofílicas reactivas al DNA celular y otras macromoléculas.
- c. Las células que han sido modificadas por carcinógenos requieren de la proliferación celular para reparar las lesiones bioquímicas.

El papel de la anticarcinogénesis en estabilizar estos pasos ha sido extenso. Los mecanismos de acción anticarcinogénicos que pueden presentarse durante la fase de iniciación se resumen en:

1. Alteración de la activación de carcinógenos: por el incrementando de la destoxificación (proceso que se ve alterado por la activación de enzimas destoxificadoras), por la inhibición de las enzimas responsable de la activación del carcinógeno o por la neutralización directa de electrófilos reactivos con el DNA y radicales libres (Rotstein y Slaga, 1988; Penning, T.M., 2011).
- Algunos estudios han demostrado que el ácido elágico inhiben el metabolismo de los PAH y por lo tanto han mostrado la prevención de la iniciación. El ácido elágico es conocido por su acción moduladora de la activación de carcinogénesis por medio de la inhibición de las enzimas de la fase I del citocromo P450 e inducción de las enzimas de la fase II que están involucradas en la destoxificación carcinogénica. El ácido elágico a concentraciones entre 1-100 $\mu\text{m/L}$, mostró una fuerte actividad anti-

proliferativa contra células cancerígenas de colon, pulmón y próstata. Se han reportado investigaciones sobre la inhibición de la proliferación de células malignas de cáncer de piel (melanoma), cáncer de mama, estómago, esófago, hígado y otros. (Cruz et. al., 2010).

2. Neutralización de reactivos electrofílicos (Rotstein y Slaga, 1988; Penning, T.M., 2011).

- Las especies reactivas del oxígeno (ROS), como el superóxido, el peróxido de hidrógeno, el oxhidrilo, el óxido nítrico y radicales del peroxinitrito, desempeñan un papel importante en el estrés oxidativo relacionado con la patogenia de varias enfermedades. En individuos sanos, la producción de radicales libres es balanceada por el sistema antioxidante de la defensa; sin embargo, se genera estrés oxidativo cuando el equilibrio favorece la generación del radical libre, como resultado de un agotamiento de niveles antioxidantes. El daño oxidativo, causado por la acción de radicales libres, puede iniciar y promover la progresión de algunas enfermedades crónicas, entre ellas el cáncer. El 7,12-dimetilbenzo (A) antraceno (DMBA) es uno de los hidrocarburos policíclicos aromáticos más potentes para inducir cáncer de mama, debido a su bioactivación e interacción con el DNA. Así, en la célula mamaria, el metabolito reactivo diol-epóxido adiciona residuos de adenina y guanina al DNA. La formación de metabolitos genotóxicos como el diol epóxido del DMBA es favorecida por acción de la familia de citocromo P450. Se ha identificado CYP1A1 y CYP1B1 como enzimas que metabolizan la conversión del DMBA a 3,4-diol-epóxido. Al respecto, se conoce que los flavonoides tipo naftoflavona, inhiben competitivamente CYP1A y además inhiben la unión al ADN (Arroyo et. al., 2010).

3. Inhibición de la proliferación celular (Rotstein y Slaga, 1988).

- La inhibición de la proliferación celular hipotéticamente permitiría a la célula tener mayor tiempo para reparar los daños inducidos por los carcinógenos. Se ha demostrado que inhibiendo la síntesis de macromoléculas esenciales para la división

celular, la iniciación de los tumores puede ser prevenida. Tal es el caso de los esteroides anti-inflamatorios que pueden bloquear la iniciación debido a su capacidad antiproliferativa (Rotstein y Slaga, 1988). Ejemplo de ello es el ácido acetil salicílico (aspirina) el cual causa un efecto antiproliferativo debido a que inhibe la síntesis de prostaglandinas uniéndose reversiblemente a la ciclooxigenasa (DiSaia y Creasman, 2002).

4. Modulación de ciertos mecanismos de reparación del DNA (Penning, T.M, 2011)

- El oligoelemento selenio es un micronutriente esencial que ha recibido considerable atención por su uso potencial en la prevención del cáncer. Evidencias experimentales indican que un posible mecanismo por el cual los suplementos de selenio puede ejercer sus beneficios es mediante la mejora de la respuesta de reparación de daños en el DNA. Se ha demostrado que los suplementos de selenio son benéficos en la reducción de la frecuencia de aductos de DNA y cromosómicos, reduciendo consecuentemente la probabilidad de mutaciones perjudiciales que en última instancia, contribuyen a la carcinogénesis. Los beneficios de selenio se pueden atribuir, al menos en parte, a que es un constituyente fundamental de selenoproteínas tales como glutatión peroxidasas y tiorredoxina reductasas, proteínas que desempeñan papeles importantes en la defensa antioxidante y mantener el ambiente reductor celular.

4.1.2 Promoción y anticarcinogénesis

La promoción de tumores ha sido dividida para su estudio en dos etapas (Rotstein y Slaga, 1988):

- Etapa I: involucra una exposición breve a un agente promotor, por ejemplo el 12-*O*-tetradecanoil-13-forbol acetato (TPA) uno de los promotores más potentes en el modelo de piel de ratón.
- Etapa II: continúa con la repetición del tratamiento pero esta vez con un promotor más débil.

Esta variación en el modelo ha permitido establecer inhibidores para cada una de las etapas (tabla 3).

Tabla 3. Inhibidores de la etapa I y etapa II de la promoción de tumores y sus posibles mecanismos de acción (Rotstein y Slaga, 1988)

Inhibidor		Posible mecanismo
Etapa I	<p>Hidroxiurea</p> <p>Acetónido de fluocinolona</p> <p>Vitamina E</p> <p>Tosilo de fenilalanina</p> <p>Clorometil cetona</p> <p>Briostatina</p>	<p>Bloquea la proliferación celular</p> <p>Anti-inflamatorio que bloquea la proliferación celular</p> <p>Anti-inflamatorio</p> <p>Alteran el procesamiento de proteínas</p> <p>Bloquean la inducción de la ornitina descarboxilasa</p>
Etapa II	<p>Ácido retinoico</p> <p>Acetónido de fluocinolona</p> <p>Butilato de hidroxianisol difluorometilornitina</p>	<p>Bloquea la proliferación celular y altera la diferenciación</p> <p>Anti-inflamatorio que bloquea la proliferación celular</p> <p>Neutralización de radicales libres</p> <p>Bloquea la inducción de la ornitina descarboxilasa.</p>

Los posibles mecanismos de anticarcinogénesis que puede bloquear los procesos involucrados en las etapas de promoción y progresión se resumen a continuación (Penning, T.M, 2011).

1. Neutralización de especies reactivas de oxígeno (ROS).
2. Alteración de la expresión de genes.
3. Disminución de la inflamación.
4. Bloqueo específico de vías de señalización intracelular.
5. Inducción de la diferenciación.
6. Inducción de apoptosis.

Algunos de los más prometedores agentes han sido o son actualmente sometidos a ensayos clínicos (Tabla 4).

4.1.3 Progresión y anticarcinogénesis

- Los pasos críticos en los procesos de progresión no han sido establecidos. Algunos investigadores demostraron que tratando papilomas con carcinógenos de acción directa como el uretano, N-metil-N'-nitro-N-nitrosaguanidina o el etilnitrosourea, pueden mejorar la progresión de tumores, sin embargo, el promotor de tumores TPA no aumentó la incidencia de carcinomas. Una interpretación de estos resultados es que el proceso de progresión involucra eventos como mutaciones. En contraste Rotstein y Slaga demostraron que agentes no carcinógenos como el peróxido de benzoilo y el peróxido de hidrogeno pueden mejorar el desarrollo del cáncer. Mecanísticamente estos agentes no-carcinógenos trabajan induciendo estrés oxidativo y conduciendo a la perturbación de la membrana, alterando la función de las proteínas, así como, modificando el genoma.

En la figura 7 se muestra un resumen de los posibles mecanismos anticarcinogénicos que se cree pueden actuar en cada una de las etapas del proceso carcinogénico.

Tabla 4. Ejemplos de factores dietarios y agentes quimioprotectores que actúan en etapas específicas del proceso carcinogénico (Modificado de: Penning, T.M., 2011)

Etapa de la carcinogénesis	Mecanismo de anticarcinogénesis	Agente anticarcinógeno
Iniciación	Inhibición de la activación del carcinógeno	Cumarinas, ácido elágico, galato de epigallocatequina (EGCG), genisteína, indol-3-carbinol, fenilisotiocianato (PEITC), resveratrol, selenio.
	Neutralización de electrófilos.	EGCG, ácido elágico.
	Aumento de la destoxificación de carcinógenos.	CDDO, sulfuro de dialilo, EGCG, <i>N</i> -acetilcisteína, oltipraz, PEITC, resveratrol.
	Optimización de las vías de reparación del DNA.	Restricción calórica (CR), EGCG, selenio.
Promoción/ progresión	Neutralización de especies reactivas de oxígeno.	Antioxidantes (ej. tocoferol, ácido ascórbico, EGCG), CR, selenio.
	Alteración de la expresión génica.	CR, dehidroepinandrosterona (DHEA), fluasterona, genisteína, monoterpenos (limoneno), retinóides (ácidos <i>trans</i> -retinóicos, fenretinida).
	Disminución de la inflamación.	Antihistaminicos, CR, DHEA, fluasterona, Anti-inflamatorios no esteroideos (aspirina), resveratrol, inhibidores selectivos de la COX-2 (celebrex).
	Inhibición de proliferación.	CR, DHEA, difluorometil-ornitina, finasteina, erlotinib, finasteride, fluasterona, genisteína, GW2974, RAD-001, rapamicina, retinoides, selenio, tamoxifen.
	Inducción de diferenciación	Calcio, retinoides, butirato de sodio,
	Inducción de apoptosis	DHEA, fenretinida, fluasterona, inhibidores de HDAC, butirato de sodio.

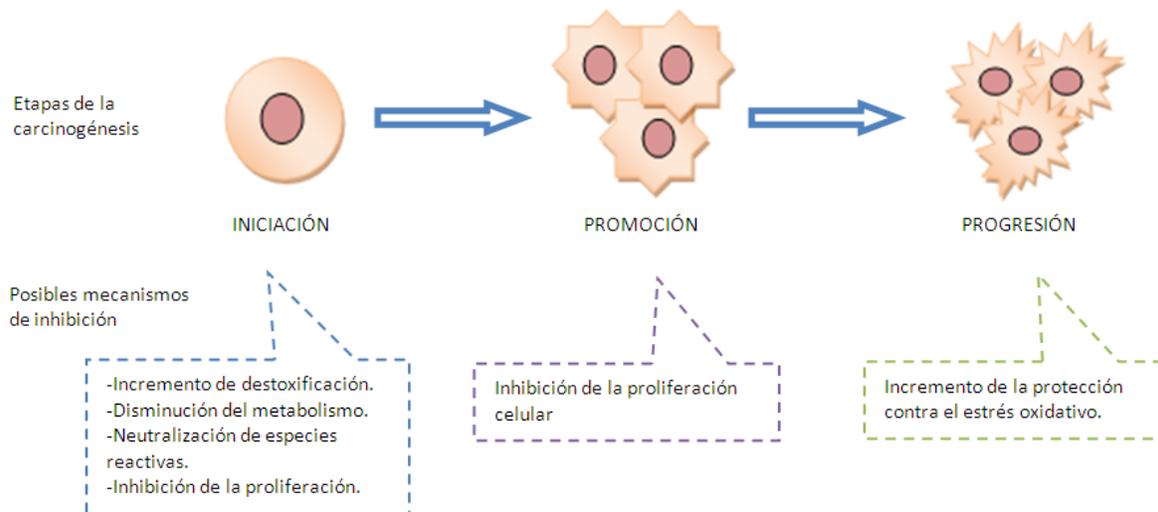


Figura 7. Posibles mecanismos de anticarcinogénesis. (Modificado de: Rotstein y Slaga, 1988)

5 Éster Fenólico del Ácido Caféico (CAPE)

5.1 Propóleo

El propóleo es el nombre genérico dado al producto obtenido de sustancias resinosas, el cual es de apariencia gomosa y balsámica, este es recolectado de diversas flores, brotes, exudados de plantas y resinas de árboles que son transformados por las abejas melíferas (*Apis mellifera*) (Toreti, V.C., et.al., 2013). Esta sustancia resinosa presenta varios colores que van desde el amarillo-verdoso al café oscuro. Durante las temporadas de frío su consistencia es dura y quebradiza mientras que en las de calor es blanda y muy pegajosa. Este es un fuerte adhesivo que las abejas utilizan como pegamento para bloquear grietas y agujeros en las colmenas, fortalecer los bordes de sus nidos, sellar los panales y suavizar las paredes internas de la colmena. El propóleo previene el crecimiento de microorganismos y protege las colmenas de la entrada de intrusos (De Castro, 2001). Las abejas también lo usan como una sustancia embalsamadora para cubrir a sus presas y así prevenir la descomposición y difusión de enfermedades (Toreti, V. C., et. al., 2013).

El propóleo ha sido utilizado en la medicina tradicional desde 300 años a.C (Nagaoka et. al., 2003) y ha sido reportado que posee un gran número de propiedades bioactivas tales como antioxidantes, anti-inflamatorias (Wang et. al., 2006), antineoplásicas, antibióticas y

antifúngicas (Nagaoka., et.al. 2003), antiviral, antiprotozoaria, regeneración de tejidos y acción inmunomoduladora en reacciones alérgicas (De Castro, 2001).

La composición química del propóleo es muy compleja y hasta la fecha han sido identificados más de 300 constituyentes. Su composición varía con la época del año y la vegetación en las áreas en la cual es colectado (De Castro, 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 (7.5-3.5%), ácidos grasos y alifáticos (24-26%), flavonoides (18-20%), azúcares (15-18%), ácidos aromáticos (5-10%), ésteres (2-6%), alcoholes y terpenos (2-3.3%), microelementos (0.5-2.0%) de los cuales Fe y Zn son los más abundantes y vitaminas (2-4%). En menor proporción cetonas, lactosa, quinonas, esteroides, polen, taninos, terpenos, restos de secreciones salivales de las abejas entre otros posibles contaminantes (Sawicka et. al., 2012; Domínguez, 2008).

5.2 CAPE, generalidades

Estructuralmente CAPE [ácido 2-propenoico, 3-(3,4-dihidroxifenil)-, 2-fenetil éster] es un compuesto polifenólico derivado del ácido caféico (CA) (Figura.8) de apariencia sólido, color blanco, cuya fórmula molecular es $C_{17}H_{16}O_4$ y presenta un peso molecular de 284.31 g/mol (Saravana y Mahitosh, 2009; Domínguez, 2008).

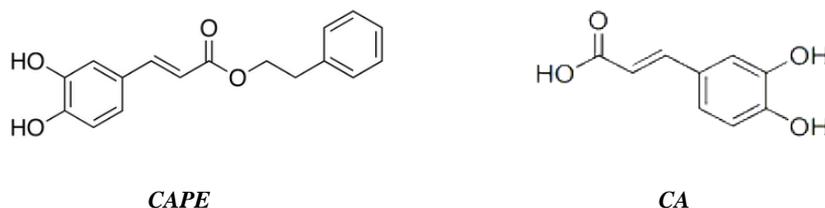


Figura 8. Estructuras químicas del ácido caféico (CA) y el éster fenetílico del ácido caféico (CAPE).

El éster fenetílico del ácido caféico (CAPE), es un componente natural del propóleo el cual ha sido estudiado desde 1987 y ha mostrado poseer un amplio espectro de propiedades biológicas a concentraciones no tóxicas en organismos mamíferos, entre las que figuran su actividad antiinflamatoria, antioxidante, anticarcinógena, antibacteriana, (Beltrán et. al., 2008; Macías et. al., 2012), diferencialmente suprime el crecimiento de numerosas células cancerígenas humanas e inhibe promotores de tumores. Se ha reportado que el CAPE es

citotóxico para las células tumorales y las transformadas viralmente, pero no para las células normales (Tseng y Lee, 2006). Inhibidor de la ornitina descarboxilasa y la proteína tirosina cinasa. Encontrado que es un inhibidor específico del factor de transcripción nuclear, NF- κ B. También se ha demostrado que suprime significativamente la vía de la lipoxigenasa del metabolismo del ácido araquidónico durante la inflamación (Toronto Research Chemicals, 2011). Por otra parte es quimiopreventivo contra cáncer intestinal, de colon y piel, y ha demostrado disminuir la formación de lesiones hepáticas preneoplásicas cuando fue administrado en un modelo de carcinogénesis de hígado en rata (Macías et. al., 2012).

5.3 Mecanismos de acción del CAPE

Los primeros reportes sobre las actividades biológicas y farmacológicas del propóleo aparecieron a principios de los años 90s. Desde este periodo, cientos de documentos que tratan sobre el tema han sido publicados (De Castro, 2001). Dado que el CAPE es uno de los componentes activos del propóleo que ha sido ampliamente estudiado, varios investigadores han tratado de dilucidar los mecanismos de acción que dotan a este compuesto de las propiedades que se le atribuyen, dichos mecanismos se exponen brevemente a continuación.

La base molecular de la acción del CAPE fue dilucidada por K, Natarajan y su equipo de trabajo. Desde que se descubrió que el NF- κ B tiene un papel en estas actividades, ellos examinaron de manera exhaustiva el efecto del CAPE en este factor de transcripción. El experimento que desarrollaron consistía en incubar células de la cepa U-937 con CAPE a diferentes concentraciones durante dos horas antes del tratamiento con TNF (0.1nM) por 15 minutos. CAPE inhibió la acción del NF- κ B dependiente de TNF, de manera dosis-dependiente presentando máximo efecto a los 25 μ g/mL. La activación del NF- κ B inducida por el éster de forbol, forbol-12-miristato-13-acetato (PMA), ceramida, ácido ocaidaico y peróxido de hidrogeno también fue inhibida por el CAPE. Este impidió la traslocación de la subunidad p-65 del NF- κ B al núcleo celular sin afectar la degradación de I κ B α dependiente de TNF. No mostró ningún efecto inhibitorio en la transcripción de otros factores de transcripción como el AP-1, TFIID y oct-1 (Saravana y Mahitosh, 2009).

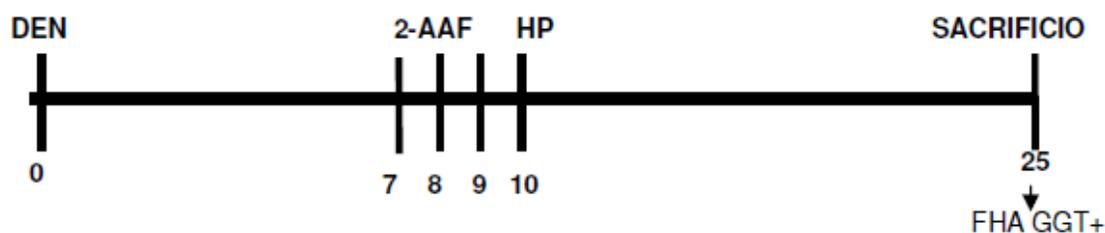
Tseng y Lee, 2006 encontraron que el CAPE muestra citotoxicidad significativa en células de glioma C6. Después del análisis del ciclo celular, se encontró que 55% de las células se encontraban en fase G₀/G₁, 8% en fase S y 0% en fase G₂ después de 36 horas del tratamiento con CAPE. En estudios adicionales se encontró que las células C6 fueron sometidas a fragmentación internucleosomal del DNA y a cambios morfológicos característicos de la apoptosis después de 36 horas del tratamiento con CAPE (50µM). Finalmente las células tratadas con CAPE durante 6 horas pudieron incrementar la expresión del supresor tumoral p53, la proteína blanco p-21 y el inhibidor de ciclina dependiente de cinasa (CDKI/CKI)-p27. Estos resultados sugieren que CAPE induce el arresto del ciclo celular y apoptosis en células glioma C6 vía p53. La vía de señalización implicada en la acción de CAPE ha demostrado ser vía de señalización extracelular dependiente de cinasas (ERKs) y la actividad mitogénica de la proteína cinasa p38 (p38 MAPK) en células glioma C6 (Tseng y Lee, 2006).

Chung et.al. concluyeron que tanto CA como su derivado CAPE: (1) inhiben 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-kB en PMA-simulado en células HepG2 y (3) supresión del crecimiento de células HepG2 y xenoinjertos de ratones sin pelo. Por tanto, estos dos compuestos fueron reportados como fuertes candidatos para el tratamiento de cáncer y metástasis vía mecanismo dual (inhibición de la actividad enzimática específica de metástasis y transcripción) (Saravana y Mahitosh, 2009).

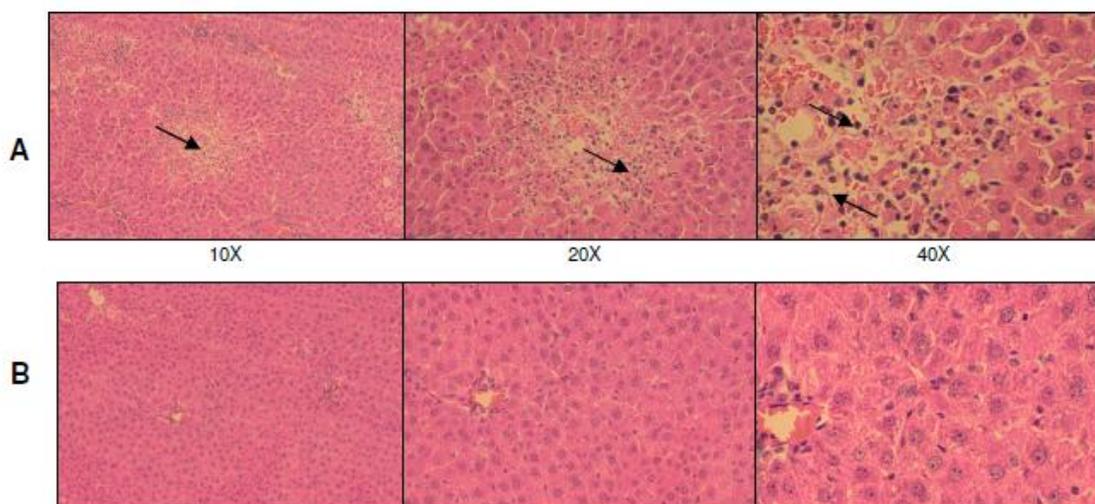
Beltrán et.al. 2006 han utilizado el CAPE como agente quimioprotector en la etapa de iniciación del modelo modificado del hepatocito resistente (Figura 9), donde mostró una inhibición notable de la inducción de focos de hepatocitos alterados GGT+ (FHA-GGT+) (84%) en ratas Wistar macho, al administrar una sola dosis de 20 mg/kg del compuesto, 12 horas antes de la administración de DEN. El posible mecanismo de quimioprevención es desconocido hasta el momento aunque a través de este trabajo se trató de dilucidar si el mecanismo de acción del quimioprotector involucra la modificación de las isoformas de citocromos (CYP) que pueden estar participando en el metabolismo del DEN en la etapa de iniciación del proceso de hepatocarcinogénesis, o bien, conocer el efecto del carcinógeno

sobre otras isoformas. Se propusieron las siguientes como las principales isoformas que participan en la bioactivación del DEN: CYP2E1, CYP1A1/1A2 y CYP2B1/2B2 (Beltrán et. al., 2006).

Cuando administraron el tratamiento completo de DEN, 2AAF y se realizó la hepatectomía parcial a las ratas observaron un número elevado de FHA GGT+ (Figura. 10-A), pero cuando pretrataron a las ratas con una sola dosis de CAPE 12 horas antes de administrar DEN, observaron una disminución del 70% en la inducción de la formación de FHA GGT+. El pretratamiento con CAPE disminuye el daño tisular producido por DEN (Figura 10-B). Este resultado reafirma que el efecto protector del CAPE en el hígado durante la etapa de iniciación, interfiere con el daño causado por el carcinógeno (Beltrán et. al., 2006).



*Figura 9. Esquema de tratamiento del modelo del hepatocito resistente.
(Beltrán et. al., 2006)*



*Figura 10. Efecto del CAPE en el daño tisular 24 horas después de la administración de DEN. Tinciones de hematoxilina-eosina en corte de 4 micras de espesor. A= DEN. B=DEN+CAPE. Las flechas indican las zonas de tejido dañadas.
(Beltrán et. al., 2006)*

Trabajos previos de Wang, demuestran que el efecto citoprotector del CAPE contra el estrés oxidativo fue dado por la regulación positiva del RNAm de la hemoxigenasa-1 (HO-1) y está correlacionada con la producción de la enzima que puede ser inhibida por la protoporfirina de estaño (SnPPIX). Por otra parte se ha demostrado que la inducción de HO-1 juega un papel importante para el efecto citoprotector del CAPE (Wang et. al., 2010).

Numerosos estudios han demostrado que CAPE interfiere con la replicación del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1), ya que inhibe la enzima integrasa HIV-1. Compuestos que contienen una fracción molecular de ácido caféico fueron considerados como una nueva familia de compuestos antivirales naturales (De Castro, 2001).

Tabla 5. Resumen de estudios in vitro del CA Y CAPE, (Saravana y Mahitosh, 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	20 μ M	RNA	75	20 μ M	Proteína	47	20 μ M
Sustancia	% Inhibición	Concentración												
DNA	95	20 μ M												
RNA	75	20 μ M												
Proteína	47	20 μ M												
CAPE	U-937	<ul style="list-style-type: none"> a) Máxima inhibición del NFκB a 25μg/mL después del tratamiento con TNF. b) Sin efecto inhibitorio sobre AP-1, TFIID, y Oct-1. c) Análogos estructurales 5, 6-dihidróxi inhibieron fuertemente el NF- κB. 												
CAPE	C6-glioma	<ul style="list-style-type: none"> a) Fragmentación de DNA a 50μM después de 24 horas. b) P-p53\uparrow, actividad de Caspasa 3\uparrow, Bak and Bax \uparrow, Bcl$_2$$\downarrow$ 												
CA, CAPE	HepG2	<ul style="list-style-type: none"> a) CA y CAPE inhibieron MMP-2y 9 con IC$_{50}$ de 10-20μM y 2- μM respectivamente. 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. 												
CAPE	HT 1080	<ul style="list-style-type: none"> a) Los niveles de m-RNA de MMP-2 y MMP-9 fueron inhibidos \downarrow. b) Los niveles de m-RNA de TIMP-1 y MT-1 MMP fueron inhibidos \downarrow 												

El CAPE también es un potente inhibidor de las enzimas ornitina descarboxilasa, ciclooxigenasa y lipooxigenasa. Es sabido que las células poseen sistemas enzimáticos 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 $_2$ O $_2$ y la superóxido dismutasa (SOD) que descomponen O $_2$, son las más importantes. Las

deficiencias de selenio, cobre, zinc o manganeso pueden condicionar una inadecuada actividad de las enzimas antioxidantes lo que puede llevar a un estrés oxidativo en las células y con ello a diversos cambios en las biomoléculas. De igual manera al CAPE se le atribuye la capacidad de inhibir la formación de H₂O₂ intracelular y bases oxidadas en el DNA en células humanas con lo cual se ejerce un efecto cito y genoprotector (Paniagua, 2010)

5.4 Análogos estructurales del CAPE

Como se revisó en el tema anterior son varias las actividades farmacológicas que se ha demostrado presenta el CAPE, es por esta razón que se ha continuado realizando modificaciones a la molécula base, dando lugar a los análogos estructurales del CAPE con los que se pretende comprender la relación estructura-actividad de estas moléculas.

Nagaoka et. al., 2002 llevaron a cabo la síntesis del CAPE (Tabla 6, compuesto 2) y 20 análogos (Tabla 6, compuestos 1, 3-21), los cuales fueron sintetizados empleando una reacción de esterificación entre el ácido caféico y un alcohol o cloruro de tionilo, empleando dioxano como catalizador (Figura 11) (Nagaoka et.al., 2003).

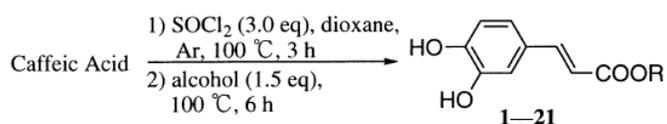


Figura 11. Ecuación de esterificación entre el ácido caféico y alcoholes. (Nagaoka et. al., 2002)

Los análogos sintetizados fueron probados mediante el ensayo de MTT en el crecimiento de seis diferentes líneas de células tumorales. Entre las líneas celulares analizadas, los análogos del CAPE poseen actividad antiproliferativa selectiva hacia la línea celular de colon 26-L5, especialmente, los ésteres 4-fenilbutil cafeato, (Z)-8-fenil-7-octanil (10a), (E)-8-fenil-7-octil (10b) y 12 mostraron una actividad más fuerte que los controles positivos, 5-fluorouracilo y la doxorubicina. Teniendo en cuenta la relación estructura-actividad, el éster por si mismo parece ser importante para la actividad antiproliferativa, y la estructura de la parte alcohólica, es decir, un grupo fenilo, enlace doble conjugado y grupo ciclohexilo, llevan a cabo sólo pequeños cambios en su actividad. Sin embargo, la fuerza de

la actividad antiproliferativa se incrementó del benzil cafeato (Tabla 6, compuesto 1) a el 8-feniloctil cafeato (Tabla 6, compuesto 7) contra las línea celulares de colon 26-L5, B16-BL6 y LLC. El alargamiento adicional de la cadena de alquilo disminuye la actividad antiproliferativa. En ésteres con un alquilo de cadena lineal, la cadena alcohólica C8-C12 pareció ser una estructura más eficaz para la actividad antiproliferativa. Por otra parte CAPE induce la fragmentación del DNA a concentraciones de 1 a 10 μ g/mL contra la línea celular 26-L5 (Nagaoka et. al., 2002).

Tabla 6. Análogos estructurales del CAPE (Nagaoka et. al., 2002)

PRODUCTO	R	RENDIMIENTO (%)
1	-CH ₂ Ph	75
2	-(CH ₂) ₂ Ph	55
3	-(CH ₂) ₃ Ph	55
4	-(CH ₂) ₄ Ph	57
5	-(CH ₂) ₅ Ph	53
6	-(CH ₂) ₆ Ph	56
7	-(CH ₂) ₈ Ph	41
8	-(CH ₂) ₁₂ Ph	54
9	-CH ₂ CH=CHPh	36
10	-(CH ₂) ₆ CH=CHPh	40
11	-(CH ₂) ₁₀ CH=CHPh	50
12	-(CH ₂) ₂ - <i>c</i> -Hex	74
13	-CH ₃	40
14	-CH ₂ CH ₃	17
15	-(CH ₂) ₂ CH ₃	58
16	-(CH ₂) ₃ CH ₃	76
17	-(CH ₂) ₇ CH ₃	64
18	-(CH ₂) ₉ CH ₃	48
19	-(CH ₂) ₁₁ CH ₃	57
20	-(CH ₂) ₁₃ CH ₃	45
21	-(CH ₂) ₁₅ CH ₃	35

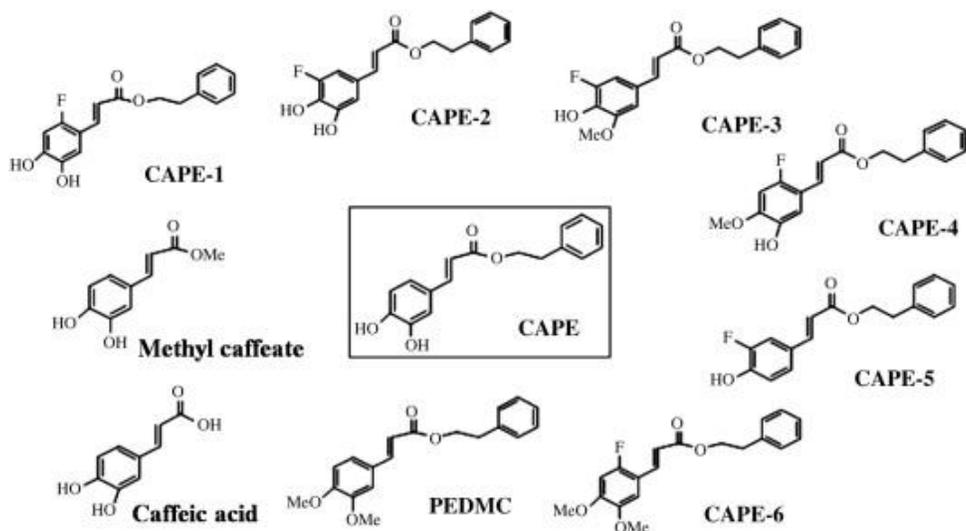
En estudios posteriores Nagaoka et.al., 2003 evaluaron nuevamente a CAPE y los 20 análogos que sintetizaron, descubriendo que todos ellos poseen un gran potencial inhibidor del NO, incluso más potente que L-NMMA y polimixina B que fueron utilizados como controles positivos. El NO se secreta normalmente 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 actividad de macrófagos de ratón vía LPS. Se observó que la elongación de cadena de sitios alquilados de los ésteres del ácido caféico

incrementa la inhibición del NO. Sin embargo, la cadena más larga de carbono muestra efectos tóxicos. El efecto inhibitor de los análogos del CAPE se debió probablemente al bloqueo de la acción de los iNOS. Pero la inhibición de la actividad del NO puede estar correlacionada con las propiedades antiinflamatorias del propóleo (Nagaoka et. al., 2003).

Para precisar el papel que juega el CAPE en la inhibición del factor NF- κ B varios análogos estructurales del CAPE fueron analizados. Se encontró que en un biciclo, en rotación restringida, la forma 5,6-dihidroxi mostró supremacía sobre la variante 6,7-dihidroxi que fue la última en inhibir el NF- κ B. Con estos resultados se concluyó que el CAPE es un potente y específico inhibidor de la acción de NF- κ B, lo que podría proveer las bases moleculares para explicar las múltiples actividades inmunomoduladoras y antiinflamatorias de CAPE (Saravana y Mahitosh, 2009).

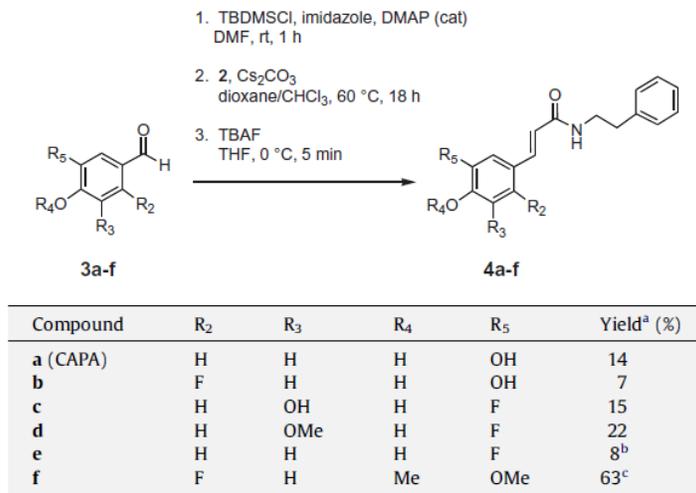
Por otra parte para determinar la relación entre las modificaciones del anillo de catecol y la actividad del CAPE como un agente citoprotector, Wang et. al., 2010 evaluaron seis derivados del CAPE con el anillo de catecol fluorado (Figura 12) empleando el modelo de HUVEC-menadiona. La sustitución del flúor en el diseño y síntesis de pequeñas moléculas para potenciar su efecto terapéutico ha sido muy común. El remplazo de un átomo de hidrógeno o un grupo hidroxilo por un átomo de flúor en un anillo puede retardar la degradación metabólica, incrementar la lipofilicidad, y ejercer un profundo impacto en la unión al receptor o la selectividad, dependiendo la posición en la que ha sido sustituido el flúor. Los grupos hidroxilos del anillo catecol funcional del CAPE pueden explicar su actividad antioxidante directa. En este estudio sólo se investigó el efecto de sustituir un grupo hidroxilo con un átomo de flúor o una metilación en uno o ambos grupos hidroxilos que posee el anillo del catecol. Los resultados derivados de los estudio de citoprotección sugirieron que la metilación de compuestos polifenólicos puede derivar en la pérdida de la capacidad de neutralizar radicales libres (Wang et. al., 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 et. al., 2006, 2010).



*Figura 12. Derivados fluorados del CAPE.
(Wang et. al., 2010)*

En el trabajo realizado por Yang et. al., 2010 sintetizaron a CAPA y derivados fluorados de CAPA (Figura 13) e investigaron su actividad citoprotectora contra el estrés oxidativo inducido por el peróxido de hidrógeno en el modelo HUVEC. Todos menos uno de los derivados de CAPA sintetizados fueron no tóxicos hasta la concentración máxima probada, sólo el 4c fue tóxico a todas las concentraciones probadas. Los resultados mostraron que CAPA y los análogos 4b, 4c, y 4e son todos significativamente citoprotectores en este modelo. Los únicos dos análogos que no fueron citoprotectores corresponden a los compuestos metilados 4d y 4f. Aunque el mecanismo de citoprotección para estas amidas no es bien conocido, la citoprotección se correlaciona con la presencia de grupos hidroxilos libres en el anillo de catecol en los análogos examinados. CAPA fue menos tóxico en HUVEC cuando fue comparados con CAPE, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas en citoprotección entre los dos compuestos. Esto significa que CAPA conserva la actividad citoprotectora de CAPE, sin embargo es más estable en plasma (Yang et. al., 2010).



^a Isolated overall yield from benzaldehyde 3 after column chromatography and recrystallization.

^b Isolated as ~3:1 mixture of (*E*)-/(*Z*)-isomers.

^c Step 2 only.

Figura 13. Síntesis de CAPA y análogos fluorados de CAPA.
(Yang *et. al.*, 2010)

Como resultado del efecto quimioprotector que ha demostrado tener el compuesto polifenólico CAPE en los estudios de Carrasco y colaboradores desde 2004, en el Laboratorio de Química Medicinal de la FES-Cuautitlán 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 N[2-clorobencil]cinamida (NA01) es uno de estos compuestos (figura 14). El estudio de este compuesto mediante SCGE demostró que el NA01 presenta ligera actividad genotóxica en cultivos de linfocitos humanos, sin embargo, este daño es mucho menor al que produce el MMS empleado como control positivo, por otra parte en cuanto a la evaluación de la citotoxicidad NA01 a dosis de 10 y 100 µg/mL no produjeron muerte celular mayor al 5% (Paniagua, 2010).

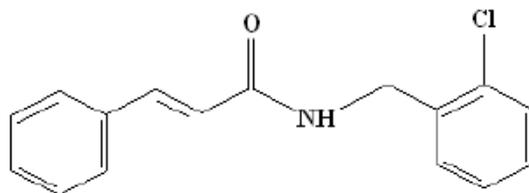


Figura 14. Estructura química del derivado análogo del CAPE, NA01 (N-[2 clorobencil]cinamida).
(Paniagua, L. 2010)

Otro de los análogos del CAPE diseñado y sintetizado en FES-Cuautitlán fue el PA01, cuya estructura se muestra en la figura 15.

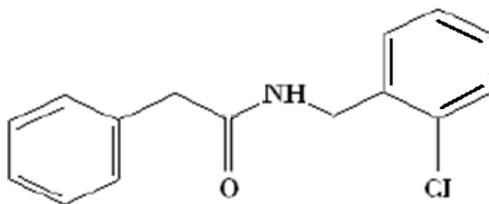


Figura 15. Estructura química del derivado análogo del CAPE, PA01 (N-[(2 clorofenil)metil]-Benzenacetamida). (Macías, 2012)

6 Ensayo de electroforesis unicelular en gel (SCGE) o ensayo Cometa, versión alcalina

El ensayo cometa, también conocido como electroforesis unicelular en gel, constituye un método rápido, sensible y relativamente simple para determinar el daño al DNA a nivel de células individuales y a su vez permite llevar a cabo el seguimiento de reparación del DNA.

6.1 Fundamento

Esta técnica es capaz de estimar el aumento en el nivel de fragmentaciones en la molécula de DNA (1 x 10¹⁰ Da) de células eucariotas individuales de cualquier organismo, como resultado de la exposición a sustancias genotóxicas (agentes alquilantes o intercalantes), radiaciones UV y daño oxidativo. El ensayo cometa se basa en el hecho de que el DNA en condiciones normales se encuentra enrollado en el núcleo, mientras que al estar dañado o roto y ser sometido a un campo electromagnético, este migrará más que un DNA sin daño. En condiciones alcalinas la técnica es capaz de evidenciar rompimientos de una sola hebra, sitios retardados de reparación y sitios álcali lábiles; mientras que a un pH neutro, la técnica es capaz de evaluar rompimientos de doble cadena en el DNA. La imagen que se puede observar después de exponer las muestras a una electroforesis asemeja a un cometa (Figura 16), en donde la cabeza representa el DNA sin dañar, mientras que la cola del mismo es el DNA dañado o fragmentado (Corona et. al., 2008).



*Figura 16. Cometas observados en un ensayo de electroforesis unicelular en gel.
(Fotografía: Hernández, 2013)*

6.2 Mecanismo de formación de cometas

Las células embebidas en un gel de agarosa y colocadas en portaobjetos, son lisadas para remover las proteínas y restos celulares, subsecuentemente se colocan en solución alcalina cuya función es desenrollar la doble hélice del DNA lo que contribuye a la expresión de sitios álcali lábiles y rupturas de la cadena del DNA. Posteriormente se realiza la electroforesis durante la cual la cromatina relajada y los fragmentos rotos del DNA debido a la carga negativa que presenta migran hacia el ánodo de manera más rápida que el núcleo. Así se pueden distinguir dos principios de formación del cometa:

1. La migración del DNA está en función del número y tamaño de los fragmentos libres del DNA.
2. El incremento en el largo de la cauda depende de las condiciones de electroforesis, y no del tamaño de los fragmentos (Rojas, 2008)

6.3 Ventajas y aplicaciones del ensayo cometa

Ventajas.

- Técnica cuantitativa, muy sensible en la detección de daño al DNA.
- Permite el seguimiento de daño y reparación del DNA.
- Aplicable a la mayoría de células eucariotas o procariotas, en estudios *in vivo* o *in vitro*.

- No requiere células en proliferación celular como las técnicas de MN e ICH.
- No requiere una gran cantidad de células (5-10µl).
- Sólo se realizan determinaciones en 50-100 células por individuo.
- Es relativamente rápido.
- De bajo costo.
- Es una técnica no invasiva si se utiliza en estudios de biomonitoreo en seres humanos.
- Detecta rupturas de cadena sencilla (SSB), rupturas de cadena doble (DSB) y sitios álcali lábiles (ALS) en nucleoides individuales (Rojas, 2008; Vindas et. al., 2004).

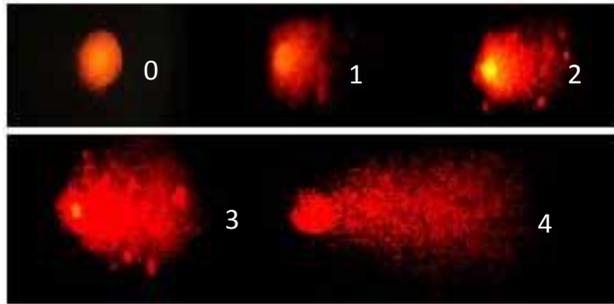
Aplicaciones.

- Toxicología genética: evaluación de xenobióticos *in vivo* e *in vitro*.
- Detección de daño inducido por mutágenos ambientales, nitrosaminas, drogas, entre otros.
- Permite la evaluación de los mecanismos de reparación del DNA.
- Eco-Toxicología, estudio del daño genético inducido por plaguicidas.
- Nutrición.
- Biomonitoreo de genotoxicidad en seres humanos expuestos.
- Epidemiología humana; banco de sangre, banco de espermatozoides.
- Monitoreo en radio y quimioterapia en pacientes con cáncer (Rojas, 2008; Vindas et. al., 2004).

6.4 Evaluación de daño

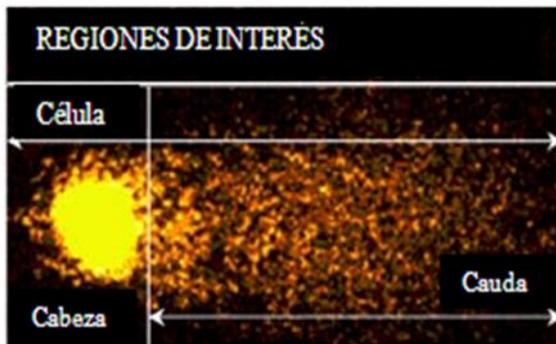
Existen dos maneras de evaluar el daño en el ensayo cometa:

1. De manera semi-cuantitativa: consiste en realizar evaluaciones visuales; tales como la determinación de la cauda y el ancho del nucleoide utilizando un micrómetro adaptado al ocular del microscopio, y/o la clasificación de las células en 5 categorías de daño que dependen de la migración observada (Figura 17) (Tice et. al., 2000; Industrial Toxicology Research Center, 2008a).

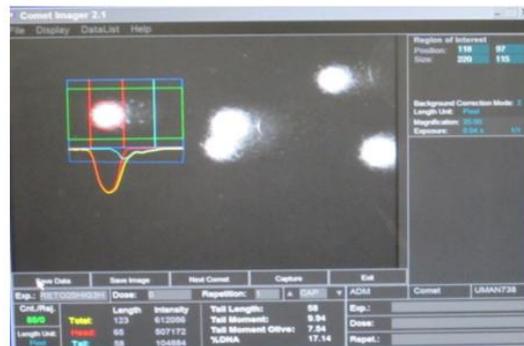


*Figura 17. Clasificación de daño a las células según el grado de migración observada.
(Modificado de: Ávila, V.M y Nota, C. 2010)*

- De manera cuantitativa: empleando un software analizador de imagen, el cual permite determinar los parámetros que dependen de la intensidad de luz, ejemplo de ellos es el Tail momento o momento de la cauda (TM) (Vilhar, 2004), definido como el porcentaje de DNA en la cauda, y la Longitud de la cauda (TL), definida como la longitud de migración del DNA medida en micrómetros (μm), ambos parámetros son determinados por un software analizador de imagen.



*Figura 18. Partes que componen a un cometa.
(Modificado de: Comet Assay Forum, 2008b)*



*Figura 19. Parámetros obtenidos con el analizador de imagen Comet Imager 2.1.
(Fotografía: Hernández, 2013)*

Los parámetros que se obtienen dependen del software empleado (Figuras 18 y 19) (Industrial Toxicology Research Center, 2008b).

7 ANTECEDENTES DEL COMPUESTO CAPA LQM 731

El grupo de Química Medicinal, bajo la dirección del Dr. Enrique Ángeles, se ha encargado de sintetizar una gama de compuestos análogos del CAPE denominados compuestos CAPA de los que forma parte la serie LQM 700. En 2012, Ruíz, S.M., estudió 30 de estos compuestos, entre los que se encontraba el **LQM 731**. El experimento consistió en poner a prueba dichos compuestos (a la concentración de 100µM) en tres líneas celulares neoplásicas: MDA-MB 231 (cáncer de mama), HeLa (cáncer de cérvix) y PPC-3 (cáncer de próstata), además de emplear un cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica (linfocitos) y células de tejido sano (fibroblastos). Por otra parte se evaluó la citotoxicidad de los compuestos mediante la técnica de Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) y cristal violeta (CV) (Ruíz, 2012).

Ruíz, 2012, llegó a los siguientes resultados:

1. Se evaluó el efecto citotóxico del compuesto **LQM 731** a una concentración de 100 µM en las líneas celulares neoplásicas mencionadas en un tiempo de exposición de 24 horas mediante las técnicas de MTT y CV. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7.

Tabla 7. Citotoxicidad causada por el compuesto LQM 731 en tres diferentes líneas celulares neoplásicas (Ruíz, 2012)

Compuesto	% citotoxicidad con la técnica de MTT.			% citotoxicidad con la técnica de CV.		
	MDA-MB 231	HeLa	PPC-3	MDA-MB 231	HeLa	PPC-3
LQM 731(100 µM)	13.70	22.14	29	30.28	23.92	17.94
CAPE	20	125	125	24.86	47.48	13.28

2. Se evaluó el efecto citotóxico del **LQM 731** a una concentración de 100 µM en cultivos primarios de células no cancerosas (linfocitos) y en tejido sano (fibroblastos) a un tiempo de exposición de 24 horas mediante las técnicas de MMT y CV. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Citotoxicidad causada por el compuesto LQM 731 en cultivos primarios de células no cancerosas (Ruíz, 2012)

Compuesto	% citotoxicidad con la técnica de MTT.		% citotoxicidad con la técnica de CV.	
	Linfocitos	Fibroblastos	Linfocitos	Fibroblastos
LQM 731(100 µM)	84	54.25	90.31	77.74
CAPE	27	12.0	80	6.42

3. Con base a los datos obtenido de la viabilidad celular se calculó el valor de la concentración inhibitoria al 50% (IC_{50}). El **LQM 731** posee una IC_{50} de 41.19 µM superando a CAPE en el efecto dosis-respuesta. Por otra parte por medio de la técnica de CV se puso de manifiesto que este compuesto a concentraciones superiores a los 300 µM no presentó citotoxicidad en linfocitos a 24 horas de exposición.

Como conclusión Ruíz, 2012 planteó que de los 30 compuestos CAPA estudiados, si bien el **LQM 731** no fue el mejor de ellos, este supera significativamente los parámetros alcanzados por CAPE que posee un reconocido efecto quimioprotector, lo cual indica que el panorama del **LQM 731**, como quimioprotector en los casos de cáncer mencionados, es bueno.

III. JUSTIFICACIÓN

Mundialmente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad, cuya incidencia se relaciona directamente con la edad, ya que las personas están más tiempo expuestas a factores causales relacionados con esta enfermedad (INEGI, 2012).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasará de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población; además, estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones (OMS, 2011).

Aunque millones de personas viven con cáncer o han recibido medicamentos para su tratamiento, la prevención representa la mejor alternativa (Beltrán, 2008). Dicho precepto ha llevado a la búsqueda de nuevos tratamientos que ayuden a prevenir, en la medida de lo posible, el desarrollo de un cáncer. Como se ha demostrado CAPE representa una opción para la quimioprevención, sin embargo, uno de los impedimentos para poder usarlo es que su extracción a partir de productos naturales como el propóleo es muy compleja y se obtienen muy bajos rendimientos. De manera similar, la obtención por síntesis química implica reacciones y procesos de purificación prolongados y el rango de rendimiento obtenido es entre 35 y 50% lo que ocasiona que se comercialice a muy altos costos (Macías et. al., 2012).

Es por esta razón que en el Laboratorio de Química Medicinal de la FES-Cuautitlán han diseñado computacionalmente y sintetizado una serie de compuestos análogos del CAPE, denominados compuestos CAPA, que son menos costosos, su síntesis es más rápida e hipotéticamente podrían igualar o incluso mejorar las propiedades farmacológicas de la molécula base. Bajo la idea de que “la prevención es mejor que la cura” el presente trabajo se ha planteado estudiar el efecto antígenotóxico del compuesto CAPA LQM 731 con la intención de demostrar que posee propiedades quimioprotectoras.

IV. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la capacidad antigenotóxica del compuesto CAPA LQM 731 mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa) como parte de los estudios preclínicos que permitan perfilarlo como un agente quimioprotector.

4.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Demostrar por medio del ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa) que el compuesto LQM 731 presenta propiedades quimioprotectoras en células de hígado y riñón al ser retado con un mutágeno conocido (MMC)
- Inducir daño genotóxico en un modelo *in vivo* (ratones machos de la cepa Balb C) empleando mitomicina C como agente mutagénico para demostrar por medio del ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa) la acción del compuesto LQM 731.
- Analizar el comportamiento del efecto antigenotóxico del compuesto LQM 731 con respecto a las dosis de trabajo (20 y 40 mg/kg) con la finalidad de establecer una dosis terapéutica.

V. *MATERIAL*

5.1 Material biológico

- Ratones machos, jóvenes (25-30g), cepa Balb C, proporcionados por la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la FES-Cuautitlán a cargo del M. en C. Crisóforo Mercado Márquez.

5.2 Compuesto de prueba

- Compuesto CAPA LQM 731, sintetizado en el Laboratorio de Química Medicinal de la FES-Cuautitlán por el Dr. Enrique Ángeles Anguiano y su equipo de trabajo.

5.3 Reactivos y soluciones

- Mitomicina C (Sigma)
- Agarosa de normal punto de fusión (NA) (Sigma).
- Agarosa de bajo punto de fusión (LMP) (Sigma).
- Cloruro de sodio (Monterrey).
- EDTA (sal disódica) (Sigma).
- Trizma base (Sigma).
- Hidróxido de sodio (J.T Baker).
- Dimetilsulfóxido grado biología molecular (Sigma).
- Triton X-100 (Sigma).
- Tris (Sigma).
- Bromuro de etidio (Sigma).
- Bicarbonato de sodio.
- Ácido clorhídrico.
- Metanol absoluto.
- Agua desionizada.
- PBS pH=7.4 (Sigma).
- Azul de tripán (Sigma).
- Hielo frapé.

5.4 Equipos y materiales

- Balanza analítica.
- Cajas de petri.
- Cámara de Neubauer.
- Cámara electroforética.
- Cubreobjetos de 24 x 50 mm.
- Equipo de disección.
- Fuente de poder.
- Horno de microondas.
- Micropipetas de 5, 10 y 100 μ l con puntas.
- Microscopio de epifluorescencia Axioimager (Zeiss Alemania) con filtro de excitación 515-560 nm y filtro barrera de 590 nm. Acoplado al software analizador de imagen Comet imager 2.1.
- Microscopio óptico.
- Placas de hielo.
- Portaobjetos de 76 x 26 mm.
- Termobloc.
- Tubos Eppendorf.
- Vasos Coplin.

VI. METODOLOGÍA

6.1 METODOLOGÍA. CARACTERÍSTICAS Y ESQUEMA EXPERIMENTAL

- i. Marcar, pesar y distribuir animales para establecer los lotes de trabajo, según indica la tabla 9.

Tabla 9. Lotes de trabajo y tratamientos

LOTE	TRATAMIENTO	DOSIS	TIEMPO (HRS)
BLANCO	Sin tratamiento	-----	3
			18
CONTROL NEGATIVO	DMSO 80%	-----	3
			18
CONTROL POSITIVO	Mitomicina C (MMC)	2 mg/Kg*	3
			18
CONTROL LQM 731 DOSIS 1	LQM 731	20 mg/Kg	3
			18
CONTROL LQM 731 DOSIS 2	LQM731	40 mg/Kg	3
			18
RETO DOSIS 1	MMC + LQM 731	2 mg/Kg + 20 mg/Kg**	3
			18
RETO DOSIS 2	MMC + LQM 731	2 mg/Kg + 40 mg/Kg**	3
			18

*Se utilizó a una concentración de 2 mg/ mL.
**El compuesto CAPA se administró 30 minutos después del mutágeno.
El compuesto CAPA LQM 731 fue solubilizado en DMSO al 80%

6.1.1 Administración de los compuestos

- i. Administrar los compuestos de trabajo por vía intraperitoneal, según corresponda al lote (Tabla 9).

6.1.2 Sacrificio y disección

- i. Sacrificar por la técnica de dislocación cervical.
- ii. Realizar la disección y necropsia de cada animal poniendo especial atención en la membrana peritoneal y órganos de interés: riñón e hígado.

6.2 METODOLOGÍA DEL ENSAYO COMETA EN CONDICIONES ALCALINAS

6.2.1 Obtener las células que serán sometidas a la prueba

- i. Aislamiento de tejido de hígado y riñón.

Remover un segmento del órgano a trabajar, colocarlo en 3 ml de PBS frío y trabajar la muestra sobre hielo frapé. Cortar en finas piezas empleando tijeras y macerar con jeringa, dejar sedimentar, remover 10 µl de suspensión celular y acondicionarla a la agarosa de bajo punto de fusión.

6.2.2 Determinación de la viabilidad celular por medio de la técnica de azul de tripán

- i. Mezclar en un portaobjetos 5µl de suspensión celular y 5µl de azul de tripán.
- ii. Colocar 5µl de la mezcla en una cámara de Neubauer.
- iii. Observar al microscopio óptico a 40x y llevar a cabo el conteo en cuatro cuadrantes. Las células vivas (CV) se observan ligeramente amarillentas, mientras que las células muertas (CM) se tiñen de color azul.

6.2.3 Preparar los portaobjetos para el ensayo

- i. Calentar la agarosa regular al 1% (AN) en horno de microondas hasta su fusión, Posteriormente se agita hasta su homogenización y se mantiene en termoblock a 37°C para su utilización.
- ii. Sumergir por inmersión los portaobjetos en agarosa regular completamente líquida hasta que queden completamente embebidos, retirar el excedente de agarosa de una de las caras, secar en estufa a 37°C durante 24 horas.
- iii. Mantener tubos eppendorf que contengan 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión (LMP) al 0.5% en un termoblock a 37°C.
- iv. Mezclar 75 µl de agarosa de bajo punto de fusión (37°C) con 10 µl de la suspensión celular.
- v. Adicionar a un cubreobjetos 75 µl de la mezcla agarosa-células realizada en el paso anterior, colocando sobre este un portaobjetos de manera que la agarosa regular entre en contacto con dicha mezcla. Colocar los portaobjetos sobre una placa de hielo hasta que solidifique.
- vi. Retirar el cubreobjetos y agregar una tercera capa de 75 µl de agarosa de bajo punto e fusión. Colocar la laminilla en un bloque de hielo hasta que solidifique.
- vii. Retirar el cubreobjetos y lentamente colocar los portaobjetos dentro de vasos coplin que contienen solución de lisis (Solución stock de lisis, DMSO y Triton X-100) fría

y recientemente preparada. Proteger de la luz y colocar en refrigerador a 4°C por mínimo 24 horas.

6.2.4 Realizar la electroforesis de microgeles de agarosa

- i. Retirar los portaobjetos de la solución de lisis y colocarlos en la cámara de electroforesis.
- ii. Llenar la cámara con el buffer de electroforesis (NaOH 300mM, EDTA 1 mM, pH 13) recientemente preparado hasta que cubran los portaobjetos (evitar la formación de burbujas sobre la agarosa). Dejarlos en estas condiciones por 20 minutos. Los 20 minutos parecen ser óptimos para que el DNA se desenrolle bajo condiciones alcalinas, así como la expresión de diferentes clases de daño en los sitios alcalinolábiles. Por otra parte permite el equilibrio de los portaobjetos con el buffer, ya que éste carece de detergentes, tiene baja concentración de sales y un pH alto (mayor de 13); para que la migración se lleve a cabo adecuadamente.
- iii. Encender la fuente de poder a 25 volts y ajustar la corriente a 300 miliamperes por el incremento o la disminución del nivel del buffer de electroforesis. Dejar 30 minutos en estas condiciones.
- iv. Apagar la fuente de poder. Levantar suavemente los portaobjetos de la cámara y colocarlos en una bandeja de tinción, gotearlos hasta cubrirlos con buffer de neutralización (Tris 0.4M, pH 7.5). Dejarlos por al menos 5 minutos. Repetir este proceso dos veces más.

6.2.5 Teñir las preparaciones

- i. Adicionar 50 µL del colorante bromuro de etidio 1X y montar con un cubreobjetos.
- ii. Antes de examinar los portaobjetos, secar el exceso de líquido en el reverso y los bordes con papel secante.

6.2.6 Evaluar el daño al DNA

- i. Analizar los nucleoides teñidos empleando un microscopio de epifluorescencia Axioimager (Zeiss Alemania) con el objetivo calibrado para todas las lecturas de 20x/0.65 seco, filtro de excitación 515-560 nm y filtro barrera de 590 nm. Capturar

- la imagen de cada nucleoide con el programa Comet Imager 2.1, evaluar 50 nucleoides/órgano/ratón/lote y obtener el momento de la cauda (TM) de cada uno (Información proporcionada por la Dra. María del Carmen Alejandra Hernández Ceruelos, del Instituto de Ciencias de la Salud de la UAEH).
- ii. Realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos empleando el programa GraphPad InStat®, versión 3,10.

VII. DIAGRAMA EXPERIMENTAL



VIII. RESULTADOS

8.1 Evaluación de citotoxicidad a 3 y 18 horas post administración de los diferentes tratamientos

Tabla 10. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de hígado de ratón Balb C a 3 y 18 horas post-administración, evaluada con la técnica de azul de tripán.

Tratamiento	% viabilidad celular		Error estándar	
	3 horas	18 horas	3 horas	18 horas
BLANCO (sin tratamiento)	98	96	1.225	1
DMSO 80%	96.2	91.2	1.158	0.4899
MMC (0.2 mg/ml)	94.2	93.6	0.663	0.8718
LQM 731 (20mg/Kg)	95	96.2	1.517	0.9695
LQM 731 (40mg/Kg)	96	97.8	0.3162	0.3742
MMC + LQM 731 (20 mg/Kg)	96.4	97.4	1.03	0.24449
MMC + LQM 731 (40 mg/Kg)	96.2	98	0.8	0.3162

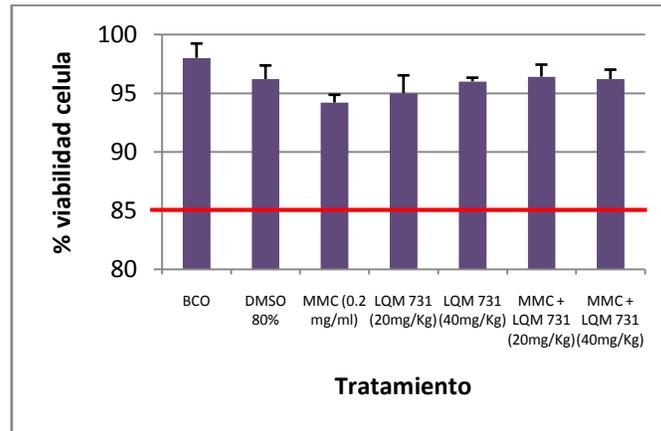


Figura 20. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de hígado de ratón Balb C a 3 horas post-administración.

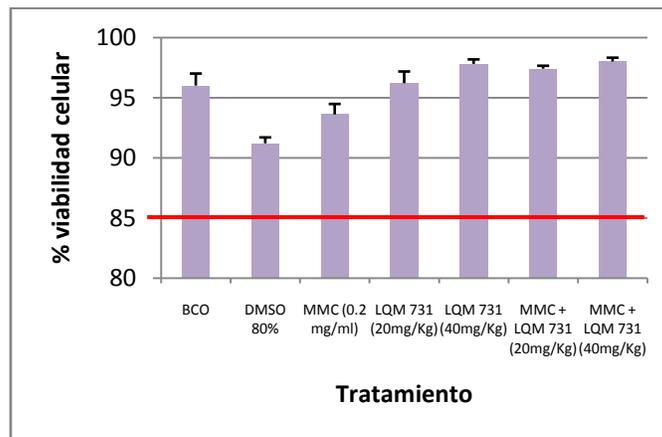


Figura 21. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de hígado de ratón Balb C a 18 horas post-administración.

Tabla 11. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de riñón de ratón Balb C a 3 y 18 horas post-administración, evaluada con la técnica de azul de tripán.

Tratamiento	% viabilidad celular		Error estándar	
	3 horas	18 horas	3 horas	18 horas
BLANCO (sin tratamiento)	96	96	1	1
DMSO 80%	96	88.2	1.703	2.354
MMC (0.2 mg/ml)	92	88.8	1.503	2.596
LQM 731 (20mg/Kg)	91.2	95	2.354	0.7071
LQM 731 (40mg/Kg)	92.6	97.8	1.122	0.6633
MMC+LQM 731 (20 mg/Kg)	95.2	91.8	1.241	4.684
MMC+LQM 731 (40 mg/Kg)	95.2	96	0.5831	0.3162

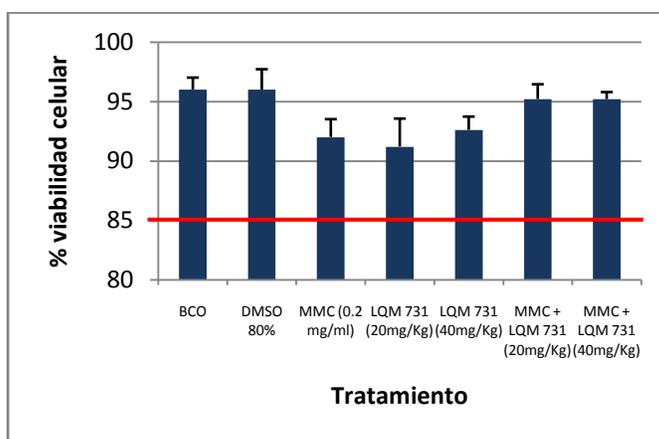


Figura 22. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de riñón de ratón Balb C a 3 horas post-administración.

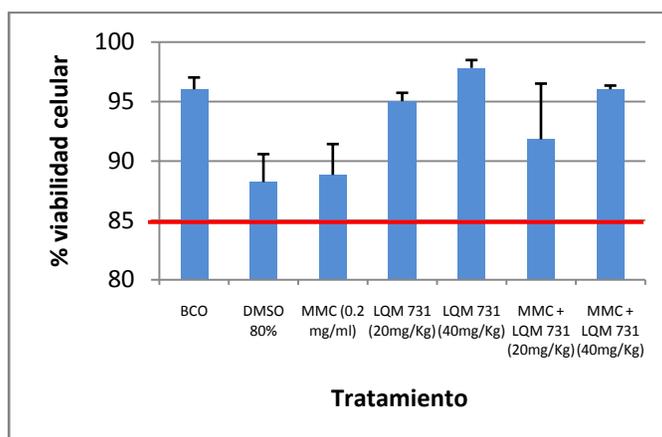


Figura 23. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de riñón de ratón Balb C a 18 horas post-administración.

8.2 Evaluación de daño al DNA a 3 y 18 horas post administración de los diferentes tratamientos

Tabla 12. Resultados de los promedios de los momentos de la cauda obtenidos (expresados en pixeles) y su respectivo error estándar.

Tratamiento	Dosis	Hígado		Riñón	
		Media	Error std	Media	Error std
3 HORAS					
BCO	----	6.452	3.167	13.717	4.023
DMSO 80%	----	5.676	1.572	16.667	5.420
MMC (0.2 mg/ml)	2 mg/Kg	145.83	21.139	186.95	17.109
LQM 731 (20mg/Kg)	20mg/Kg	54.924	8.851	41.670	11.876
LQM 731 (40mg/Kg)	40mg/Kg	30.655	12.367	27.247	6.163
MMC+LQM 731 (20 mg/Kg)	2 mg/Kg + 20 mg/Kg	12.158	4.359	18.489	9.032
MMC+LQM 731 (40 mg/Kg)	2 mg/Kg + 40 mg/Kg	15.124	1.183	22.164	7.385
18 HORAS					
BCO	----	6.452	3.167	13.717	4.023
DMSO 80%	----	3.731	0.6741	4.965	1.815
MMC (0.2 mg/ml)	2 mg/Kg	9.694	3.883	20.281	8.722
LQM 731 (20mg/Kg)	20mg/Kg	18.055	6.742	34.311	13.564
LQM 731 (40mg/Kg)	40mg/Kg	67.795	8.471	78.314	15.998
MMC+LQM 731 (20 mg/Kg)	2 mg/Kg + 20 mg/Kg	10.750	4.007	37.466	22.561
MMC+LQM 731 (40 mg/Kg)	2 mg/Kg + 40 mg/Kg	14.631	11.937	33.170	21.970

8.2.1 Evaluación de daño al DNA en células de hígado de ratón Balb C a 3 y 18 horas post administración de los diferentes tratamientos

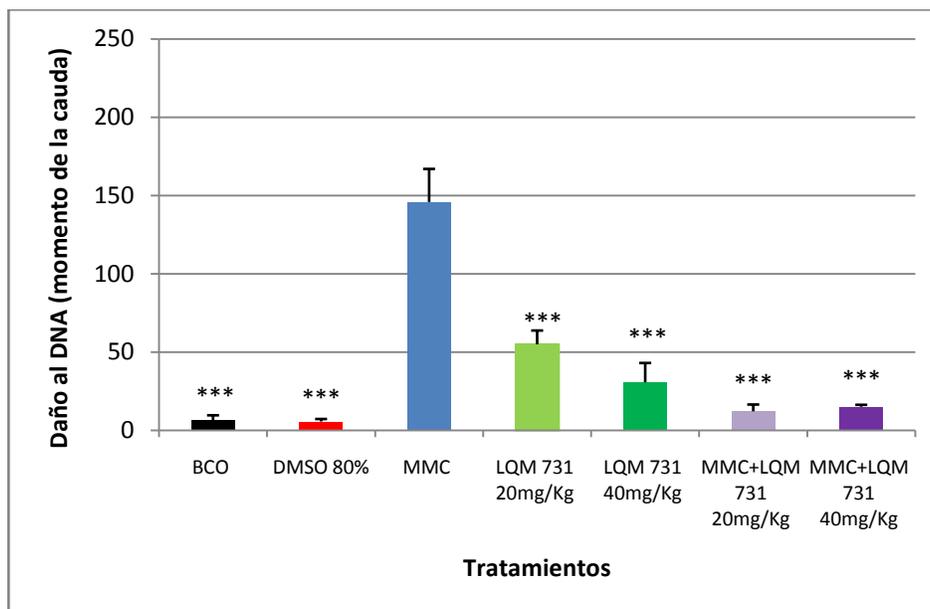


Figura 24. Daño causado al DNA de células de hígado de ratón Balb C en los distintos tratamientos a 3 horas post-administración, expresado en pixeles.

*** Diferencias consideradas altamente significativas con respecto al control positivo (ANOVA, Tuckey-Kramer $P < 0.001$).

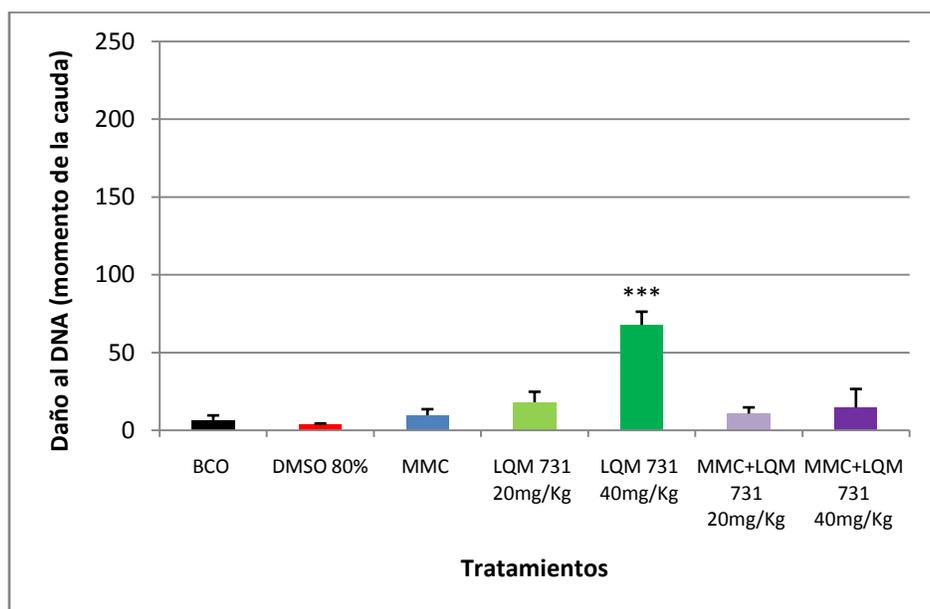


Figura 25. Daño causado al DNA de células de hígado de ratón Balb C en los distintos tratamientos a 18 horas post-administración, expresado en pixeles.

*** Diferencias consideradas altamente significativas con respecto al control negativo (ANOVA, Tuckey-Kramer $P < 0.001$).

8.2.2 Evaluación de daño al DNA en células de riñón de ratón Balb C a 3 y 18 horas post administración de los diferentes tratamientos

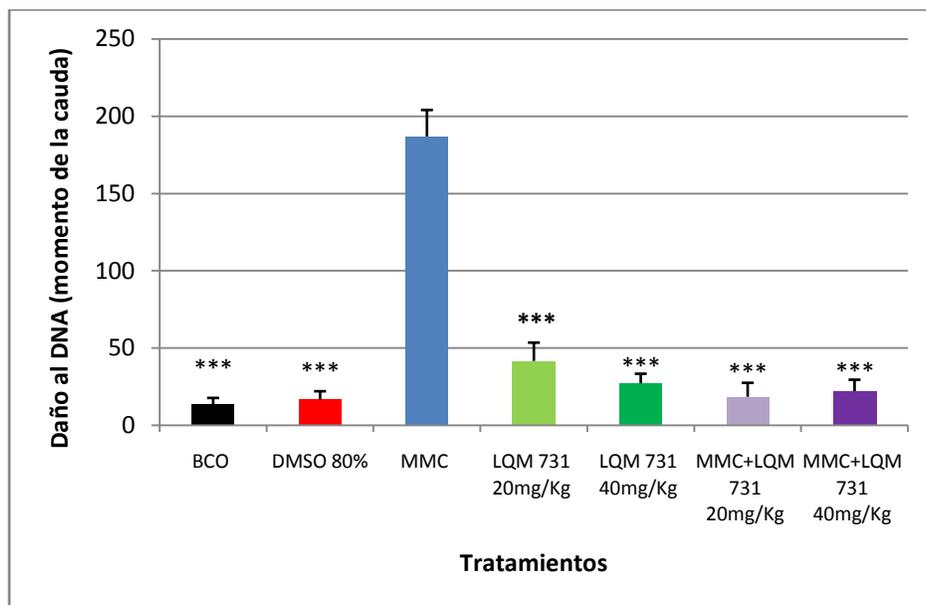


Figura 26. Daño causado al DNA de células de riñón de ratón Balb C en los distintos tratamientos a 3 horas post-administración, expresado en pixeles.

*** Diferencias consideradas altamente significativas con respecto al control positivo (ANOVA, Tuckey-Kramer $P < 0.001$).

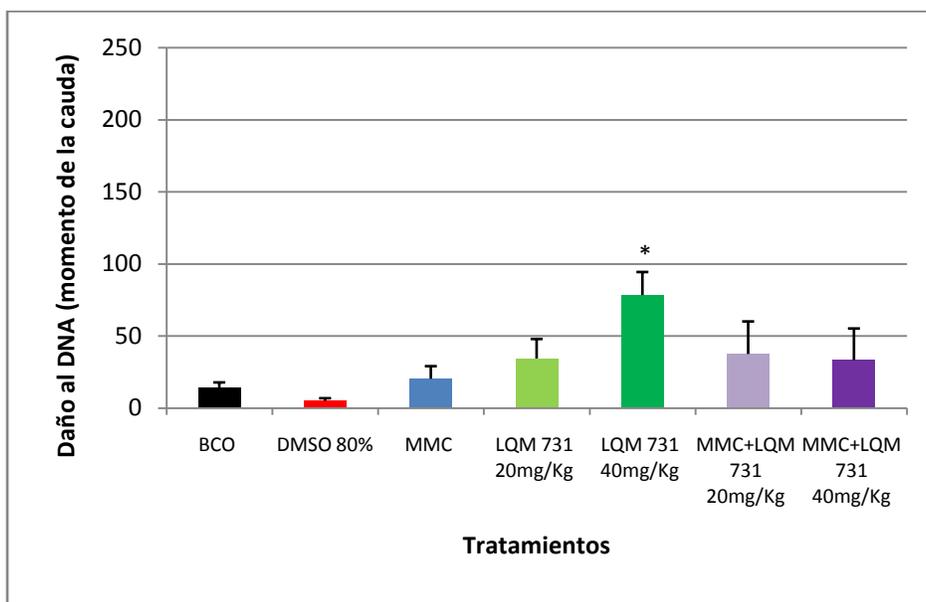


Figura 27. Daño causado al DNA de células de riñón de ratón Balb C en los distintos tratamientos a 18 horas post-administración, expresado en pixeles.

*Diferencias consideradas estadísticamente significativas con respecto al control negativo (ANOVA, Tuckey-Kramer, $P < 0.05$).

IX. DISCUSIÓN

El estudio sobre los compuestos CAPA es reciente y son pocos los autores que han indagado sobre estas modificaciones, tal es el caso del Dr. J. Yang, el grupo de investigación del Dr. Saúl Villa Treviño y el grupo de investigación del Dr. Enrique Ángeles Anguiano. El compuesto LQM 731 es un análogo amídico halogenado del CAPE al que se le han retirado los sustituyentes hidroxilo del anillo del catecol, su fórmula condensada es $C_6H_{12}ONCl_4$, presenta un peso molecular de 375.08 gr/mol (datos no publicados, Dr. Enrique Ángeles Anguiano) y cuya estructura ha sido definida por los métodos espectroscópicos adecuados pero debido al proceso de patente no se ha mostrado en esta tesis. Es necesario que este compuesto, al ser de reciente síntesis, cuente con estudios sobre genotoxicidad, con los que debe cumplir todo compuesto que desee perfilarse como nuevo fármaco. La discusión sobre los resultados obtenidos se expone a continuación.

La validación del ensayo de electroforesis unicelular en gel se realiza a través de la prueba de viabilidad celular, la cual debe encontrarse por arriba del 85% en el caso específico del ensayo cometa (Cossio et. al., 2003) y debe ser superior al 75% en sustancias cuyo riesgo es desconocido. Se consideran estos valores ya que se ha observado que las células que presentan viabilidades menores al 70% son capaces de inducir un incremento en la migración del DNA como respuesta a daño físico o químico en las membranas celulares, causando falsos positivos (Henderson et.al., 1998).

Es por esta razón que en el presente trabajo se determinó el porcentaje de viabilidad celular empleando la técnica de exclusión con azul de tripán. Los resultados indicaron que las suspensiones celulares obtenidas se encontraban en condiciones óptimas para ser utilizadas en el ensayo cometa ya que todos los lotes mostraron porcentajes de viabilidad celular superiores al 85% (Figuras 20 - 23).

Los lotes blancos fueron los que exhibieron mayor porcentaje de viabilidad celular, tanto en hígado como en riñón a 3 horas post-administración, comportamiento que habla sobre un buen manejo de la técnica al descartar daño celular causado por manipulación.

La razón por la cual se seleccionó el DMSO como vehículo del compuesto LQM 731 fue porque éste presenta excelentes propiedades de solvatación junto con un perfil de toxicidad favorablemente bajo y bien documentado que lo colocan como compuesto de muy baja toxicidad. McKim y Strub, 2007 mencionan que DMSO está aprobado como ingrediente farmacéutico activo (API) y está siendo evaluado como un API de varios medicamentos huérfanos en todo el mundo. Actualmente existen disponibles una serie de productos regulados que incluyen DMSO como un componente de la fórmula final. Los lotes de DMSO 80% en los dos órganos se mantuvieron por arriba del 95% de viabilidad celular, comportamiento que coincide con el reportado por Gaylord Chemical Company, 2005.

En el caso de los lotes tratados con mitomicina C (MMC) estos fueron los que obtuvieron menores porcentajes de viabilidad celular aunque se cuidó que se mantuviera dentro del límite permitido, utilizando una concentración adecuada (2 mg/ml).

Por lo que respecta a los lotes control del compuesto LQM 731 en ambos órganos estos presentaron porcentajes de viabilidad celular por arriba del 90% en ambas dosis, se observó que el porcentaje de viabilidad celular a la dosis de 20 mg/Kg tiende a disminuir en riñón al presentar un 91.2 % pero no de manera significativa con respecto a hígado que exhibe un 95%. Existe el antecedente de que el compuesto LQM 731 presenta citotoxicidad sobre líneas celulares cancerígenas (Ruíz, 2012), pero por lo que respecta a células sanas de hígado y riñón, evaluadas en el presente ensayo, los niveles de citotoxicidad mostrados son mínimos e inherentes al compuesto ya que como se señaló anteriormente DMSO 80% no es citotóxico.

Los resultados obtenidos en los lotes retos en ambas dosis muestran una tendencia, por parte del compuesto LQM 731, a disminuir el daño causado por MMC ya que se observó un ligero aumento en los niveles de viabilidad celular con respecto a los obtenidos en los lotes de MMC, aunque estas diferencias no son estadísticamente significativas.

Por lo que respecta al comportamiento observado a las 18 horas post-administración en ambos órganos, todos los lotes de trabajo presentaron porcentajes de viabilidad celular superiores al 85%. Vale la pena destacar que el DMSO mostró una disminución en el porcentaje de viabilidad celular, en ambos órganos, comparado con el que resultó a las 3

horas post-administración (graficas 21 y 23). Se cree que este comportamiento puede atribuirse al dimetil sulfona (DMSO₂) un metabolito resultante de la biotransformación del DMSO y que se elimina vía renal (Kocsis et. al., 1975; Wong et. al., 1971). A temperatura ambiente este es un sólido cristalino, color blanco, soluble en agua que Gaylord Chemical Company, 2007 ha reportado como no tóxico, sin embargo, a bajas temperaturas causa daño físico celular por la formación de cristales (McGann y Walterson, 1987).

Una vez validadas las suspensiones celulares se procedió a llevar a cabo el análisis genotóxico el cual se efectuó de manera cuantitativa empleando el software Comet Imager 2.1, leyendo células consecutivas y excluyendo únicamente células apoptóticas ya que no eran el objetivo de estudio. Se decidió evaluar el momento de la cauda para determinar el daño causado al DNA, expresado en pixeles.

Los resultados obtenidos en el ensayo genotóxico de células hepáticas y renales a 3 horas post-administración mostraron el siguiente comportamiento.

Los lotes blancos presentaron diferencias altamente significativas ($P < 0.001$) con respecto al control de MMC, comportamiento que habla sobre la sensibilidad del ensayo al garantizar que MMC está ejerciendo su acción como mutágeno y que se refleja en el daño causado al DNA en este lote.

Los lotes de DMSO 80%, en células de hígado y riñón, mostraron diferencias altamente significativas ($P < 0.001$) con respecto a sus respectivos controles de MMC, lo que indica que el DMSO 80% es una buena opción de vehículo para el LQM 731 ya que permite su completa solubilidad y el daño que causa al DNA es mínimo y atribuible a la concentración a la que fue usado, datos que corresponden con los presentados por Aye et. al., 2010 quienes reportaron que el DMSO no es genotóxico ya que en el estudio que realizaron no induce rupturas de cadena del DNA, ni micronúcleos. Por lo que la mayor parte del daño observado en los controles del LQM 731 es inherente al compuesto y no al disolvente (Figuras 24 y 26).

MMC se empleó como control positivo ya que este es un fármaco utilizado en el tratamiento contra cáncer del que se conoce su mecanismo de acción y biotransformación. La activación de MMC comienza con la reducción de la estructura de quinona y se

metaboliza a un número de formas activas por reducción enzimática, que se cree, ejercen actividad antineoplásica a través de la formación de enlaces cruzados (cross links) con el ADN (cross-link inter e intracatenarios), alquilación y la ruptura de la cadena de ADN con la formación de radicales libres (KYOWA KIRIN, 2013).

A pesar de que MMC ha sido ampliamente usada como control positivo en estudios sobre genotoxicidad como los realizados por Remigio et. al., 2007 y Castañeda et. al., 2011, autores como Henderson et. al., 1998 no recomiendan su uso para el ensayo cometa ya que al ser un cross-linker retarda la migración del DNA, sin embargo, bajo las condiciones presentadas en este estudio y en un modelo *in vivo*, MMC demuestra una buena respuesta positiva, lo que permitió obtener diferencias altamente significativas ($P < 0.001$) al compararla con los demás lotes de ambas muestras celulares (Figuras 24 y 26). Cabe mencionar que es importante que la MMC que se emplee para el estudio deba ser de reciente adquisición ya que una vez en suspensión el almacenaje reduce su potencia y por consiguiente disminuye la respuesta observada.

Al comparar las figuras 24 y 26 es evidente que MMC tiende a afectar más a las células de riñón que a las células hepáticas aunque no de manera estadísticamente significativa.

Por lo que respecta a los lotes control del LQM 731 a la dosis de 20 mg/Kg en el horario de 3 horas post-administración, ambas muestras celulares presentaron diferencias altamente significativas ($P < 0.001$) con respecto al control de MMC, por lo que el daño causado al DNA por parte del compuesto es mínima y afecta a los órganos en la misma medida ya que no existen diferencias significativas entre ellos. El caso de la dosis de 40 mg/Kg se discutirá más adelante ya que este lote presenta un comportamiento particular a las 18 horas.

Los lotes retos en ambas dosis exhibieron diferencias altamente significativas ($P < 0.001$) con respecto al control positivo, tanto en células hepáticas como en renales, lo que indica que el compuesto LQM 731 posee actividad antígeno tóxica al disminuir significativamente el daño causado al DNA por MMC. No obstante que el presente trabajo carece de un control del CAPE con el cual correlacionar los resultados obtenidos, en base a los trabajos realizados por Carrasco et. al., 2004 y Carrasco et. al., 2006, se puede argumentar que el intercambiar el grupo éster por una amida no elimina la actividad antígeno tóxica que

presenta CAPE. Por lo que es muy viable que se emplee el LQM 731 como quimioprotector.

Aunque los mecanismos por los cuales CAPE posee actividad antígenotóxica no se han dilucidado por completo se ha planteado que puede deberse a su capacidad como antioxidante, a mecanismos de neutralización de radicales libres (Carrasco et. al., 2006) y/o a su capacidad para modificar la actividad de algunos CYP que están involucrados en el metabolismo de carcinógenos y que impide su bioactivación (Beltrán et. al., 2009).

Por las modificaciones que presenta el LQM 731 resulta factible que el mecanismo por el cual ejerza su efecto antígenotóxico sea similar al presentado por Beltrán et. al., 2009, ya que este compuesto carece de radicales hidroxilo que están estrechamente relacionados con la capacidad antioxidante y de neutralización de radicales libres.

En el estudio realizado a 18 horas post-administración cabe destacar el comportamiento del control del LQM 731 a la dosis de 40 mg/Kg que en células de hígado mostró diferencias altamente significativas ($P < 0.001$) con respecto al control negativo y en células de riñón mostró diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.005$) con respecto al control negativo. Este comportamiento posiblemente indique que al ser una mayor cantidad de compuesto y prácticamente insoluble en agua, la absorción es más lenta razón por la cual el pico de daño se observa hasta las 18 horas y se atribuye a que se ha llegado a una dosis tóxica que afecta por igual a los 2 órganos estudiados (Figuras 25 y 27). Estos lotes no se pueden comparar con MMC ya que el tiempo de vida media de esta es de 3 horas, por lo que a 18 horas se observa el daño al DNA causado por sus metabolitos.

Por lo que concierne a los demás lotes estos no presentan diferencias estadísticamente significativas entre ellos, y el daño al DNA a este horario puede ser atribuido a los metabolitos de cada uno de los tratamientos, ya que se sabe que los mecanismos de reparación del DNA actúan poco tiempo después de infringida la lesión (Herráez, 2012), por lo que se supondría que dentro de las primeras 6 horas el daño causado al DNA hubiera sido reparado.

Comparando el daño al DNA obtenido en los lotes donde se administró el LQM 731 (a excepción del lote de 40 mg/Kg) a las 3 horas y 18 horas en células de hígado (Figuras 24 y 25) resulta evidente que este tiende a disminuir, sin embargo, lo hace en muy poco grado. El control de 20 mg/Kg pasa de 54.92 a 18.055 pixeles, el reto de la dosis de 20 mg/Kg pasa de 12.15 a 10.75 pixeles y finalmente el reto de la dosis de 40 mg/Kg que pasó de 15.12 a 14.631 pixeles. En el caso de células de riñón el daño al DNA en los lotes retos en ambas dosis a las 18 horas (Figura 27) tienden a aumentar con respecto a las 3 horas (Figura 26), pasando de 18.489 a 37.466 pixeles en el reto de la dosis de 20mg/Kg y de 22.164 a 33.17 pixeles en el caso de la dosis de 40 mg/Kg. Si bien en el lote control LQM 731 a la dosis de 20 mg/Kg si disminuye el daño, lo hace en menor grado comparado con hígado, por lo que podríamos suponer que el compuesto sea metabolizado en hígado como la mayoría de las amidas (Romero, 2011) y genere metabolitos genotóxicos que sean eliminados vía renal y que como respuesta aumenten el daño ocasionado a estas células.

Por lo que se sabe sobre el compuesto CAPA (Yang et. al., 2011) y los análogos halogenados de CAPE presentados por Wang et. al., 2010, se podría pensar que el compuesto LQM 731 puede mejorar o igualar la capacidad quimioprotectora de CAPE ya que este al ser un derivado amídico lo hace más estable en plasma (Yang et. al., 2011) y al poseer sustituyentes halogenuros contribuyen a retardar la degradación metabólica del compuesto.

Con base a los resultados obtenidos se puede decir que el compuesto LQM 731, análogo amídico halogenado de CAPE, posee actividad antígenotóxica al disminuir en células de hígado el daño al DNA causado por MMC en un 91.7% empleando la dosis de 20 mg/Kg y en un 89.7% en la dosis de 40 mg/Kg (estos valores se obtuvieron tomando como 100% el daño al DNA causado por MMC en células de hígado). Por lo que respecta a las células de riñón el LQM 731 fue capaz de disminuir el daño al DNA causado por MMC en un 90.2% empleando la dosis de 20 mg/Kg y de un 88.1% en la dosis de 40 mg/Kg (estos valores se obtuvieron tomando como 100% el daño al DNA causado por MMC en células de riñón). Por lo que finalmente se puede decir que la dosis efectiva a la que el LQM 731 ejerce su

efecto antígenotóxico es a 20 mg/Kg y por el comportamiento observado es posible perfilarlo como fármaco quimioprotector.

X. CONCLUSIONES

- Se logró evaluar la capacidad antigenotóxica del compuesto LQM 731 mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa) como parte de los estudios preclínicos de este compuesto y con base a los resultados obtenidos se considera posible perfilarlo como un agente quimioprotector.

- Se demostró que el compuesto LQM 731 causa poco daño genotóxico y a su vez presenta propiedades quimioprotectoras en células de hígado y riñón ya que disminuyó significativamente el daño al DNA causado por mitomicina C.

- Mediante el análisis del comportamiento del efecto antigenotóxico del compuesto LQM 731 con respecto a las dosis de trabajo (20 y 40 mg/kg) se concluye que la dosis terapéutica corresponde a la de 20 mg/Kg, mientras que la dosis de 40 mg/Kg es una dosis tóxica.

- No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los órganos estudiados con respecto a la disminución de daño al DNA causada por el compuesto.

XI. PERSPECTIVAS A FUTURO

1. Continuar con el estudio de las propiedades del compuesto LQM 731 y los análogos CAPA en general.
2. Determinar la DL₅₀ del LQM 731.
3. Evaluar la capacidad antigenotóxica del compuesto en modelos *in vivo* empleando técnicas diferentes al ensayo cometa con la finalidad de validar los resultados obtenidos.
4. Determinar posibles metabolitos genotóxicos resultantes del metabolismo del compuesto.
5. Tratar de elucidar el posible mecanismo de acción del LQM 731.
6. Realizar el estudio de la capacidad antigenotóxica del LQM 731 empleando el ensayo cometa y evaluando tiempos de 3, 9, 18, 27, 48 y 72 horas con la finalidad de conocer la cinética completa del compuesto.

XII. REFERENCIAS

1. Abel, E.L, Ángel, J. M, Kiguchi, K y DiGiovanni J. (2009). *Multi-stage chemical carcinogenesis in mouse skin: fundamental and applications*. Nat Protoc. 4. Pp. 1350-62.
2. Arroyo, J. Bonilla, P., Ráez, E., Barreda, A. y Huamán, O. (2010). *Efecto quimioprotector de Bidens pilosa en el cáncer de mama inducido en ratas*. Anales de la Facultad de Medicina.Vol.71. No.3. Pp. 153-159.
3. Ávila, V.M y Nota, C. (2010). *Informe del Primer Encuentro Nacional de Médicos de pueblos fumigados*. Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba. Información en línea. Tomado de: <http://www.reduas.fcm.unc.edu.ar/informe-encuentro-medicos-pueblos-fumigados/>. Fecha de consulta: noviembre de 2012.
4. Aye, M., Di Giorgio, C., De Mo, M., Botta, A., Perrin, J y Courbiere, B. (2010). *Assessment of the genotoxicity of three cryoprotectants used for human oocyte vitrification: Dimethyl sulfoxide, ethylene glycol and propylene glycol*. Food and Chemical Toxicology. 48, Pp. 1905-1912.
5. Bello, G. J y López de Cervantes, S.A. (2001). *Fundamentos de ciencia y toxicología*. Díaz de Santos. Madrid, España. Pp. 165-167.
6. Beltrán, R. O., Hernández, M. J., Sierra, S. A., Villa, T. S. (2006). *Mecanismo de quimiopreención del éster fenético del ácido caféico (CAPE) en la iniciación de un modelo de hepatocarcinogénesis: Alteración de los CYP450*. 2 Congreso Nacional de Química Médica. Querétaro, Qro., México; 4 al 8 de Septiembre de 2006
7. Beltrán, R. O., Aleman, L. L., Salcido, N. M., Hernández, G.S., Fattel, F.S., Arce, P.E., Arellanes, R.J., García, R.R., Vázquez, V.P., Sierra, S. A., Villa, T.S. (2008). *Evidence that the Anticarcinogenic Effect of Caffeic Acid Phenethyl Ester in Resistant Hepatocyte Model Involves Modifications of Cytochrome P450*. Toxicología Sciences 104 (1).Pp. 100-106.
8. Bera, S., De Rosa, V., Rachidi, W y Diamond, A. M. (2013). *Does a role for selenium in DNA damage repair explain apparent controversies in its use in chemoprevention?* Mutagenesis. 28(2). Pp. 127-34.

9. BioCancer research journal. (2010a). *Carcinógenos genotóxicos*. Tomado de: <http://www.biocancer.com/journal/810/31-carcinogenos-genotoxicos>. Fecha de consulta: septiembre de 2012.
10. BioCancer research journal. (2010b). *Carcinógenos no genotóxicos o epigenéticos*. Tomado de: <http://www.biocancer.com/journal/813/32-carcinogenos-no-genotoxicos-o-epigeneticos>. Fecha de consulta: septiembre de 2012.
11. Biochemistri in perspective: *carcinogenesis*. (2010) Tomado de: <http://www.oup.com/us/companion.websites/9780195305753/pdf/Carcinogenesis.pdf>. Fecha de consulta: septiembre de 2012.
12. Carrasco, L. C. E, Márquez, R. L, Fattel, F. S, Arce, P. E, Pérez, C.J.I, Villa, T. S. (2004). *Chemoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester on promotion in a medium-term rat hepatocarcinogenesis assay*. Int J Cancer. 108 (4). Pp. 488-92.
13. Carrasco, L. C. E, Sánchez, P. Y, Márquez, R. L, Fattel, F.S, Arce, P. E, Hernández, G.S, Villa, T. S. (2006). *A single dose of caffeic acid phenethyl ester prevents initiation in a medium-term rat hepatocarcinogenesis model*. World J Gastroenterol. 12 (42). Pp. 6779-85.
14. Castañeda, S.A., Téllez, M.G, Ocotero, V. M, Carballo, O. M. A, García A. M, Valdés, R. J, Gutiérrez, E. R, Rodríguez, A. R. (2011). *Chronic toxicity, genotoxic assay, and phytochemical analysis of four traditional medicinal plants*. J. Med. Food. 14(9). Pp. 1018-22.
15. Corona, V. D., Cram, H.S., y Rojas, del C. E. (2008). *Ensayo de Genotoxicidad con la lombriz de tierra Eisenia andrei*. Tomado de: <http://www2.ine.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap16.pdf>. Pág. 233-273.
16. Cossio, A.M, González, H. Y., Gracia, P.J.C. y Prieto, G. E. (2003). *Uso del ensayo cometa para evaluar el efecto de la temperatura sobre la reparación del daño genético inducido por peróxido de hidrógeno y la radiación ultravioleta A en células sanguíneas humanas*. Acta Farm. Bonaerense. 23(3). Pp. 277-84.
17. Cruz, A. F.V., Saucedo, P.S., Martínez, V.G., Aguilera, A. Rodríguez, R. y Aguilar, C.N. (2010). *Propiedades químicas e industriales del ácido elágico*. Revista Científica de la Uniuniversidad Autónoma de Coahuila. Año 2. No.3. Tomado de

- <http://www.postgradoeinvestigacion.uadec.mx/AQM>. Fecha de consulta: octubre de 2012.
18. De Castro, S.L. (2001). *Propolis: Biological and Pharmacological Activities. Therapeutic Uses of this bee-product*. Ann Rev Biomed Sci. No. 3. Pp. 49-83.
 19. De Flora, S. and Ramel, C. (1988). *Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. Classification and overview*. Mutation Research. No. 202. Pp. 258-306.
 20. DiSaia, P.J y Creasman, W. T. (2002). *Oncología ginecológica*. 6ta. Ed. Elsevier. España. Pp. 430.
 21. Domínguez, R.M. (2008). *Efecto del éster fenetílico del ácido caféico (CAPE) sobre la proliferación y apoptosis en varias líneas celulares in vitro*. Tesis de Maestría en Ciencias. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. IPN.
 22. Fernández, P.J.A y Escribano M. J. (2000). *Bioteología del Azafrán*. Ediciones de la Universidad de Castilla-La Mancha. Salamanca, España. Pp. 25.
 23. Gaylord Chemical company. (2005). "Dimethyl sulfoxide (DMSO). Physical properties". Bulletin #101. Información en línea. Tomado de: http://www.gaylordchemical.com/uploads/images/pdfs/literature/101B_english.pdf
Fecha de consulta: junio de 2013.
 24. Gaylord Chemical company. (2007). *Dimethyl sulfone (DMSO₂). Physical properties*. Bulletin #301. Información en línea. Tomado de: <http://redironhosting.com/~gaylordc/uploads/images/pdfs/literature/301B.pdf>. Fecha de consulta: junio de 2013.
 25. Granados, S., Quiles, J.L., Gil, A., Ramírez-Tortosa, M.C. (2006). *Lípidos de la dieta y cáncer*. Nutrición Hospitalaria. Vol. 21. Supl.2. Pp. 44-54.
 26. Hasegawa Hideo and Benno Yoshimi. (2000). *Anticarcinogenesis in mice by ginseng-hydrolyzing colonic bacteria*. Microbial Ecology in Health and Disease. Vol 12. No.2. Pp. 85-91.
 27. Hernández, C. Ma. Ll. (2013). *Material realizado para el trabajo de tesis: Evaluación del efecto antigenotóxico del compuesto LQM 731, análogo del éster fenetílico del ácido caféico (CAPE), mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo comtea)*. Tesis de licenciatura de QFB. FES-Cuautitlán. UNAM.

28. Hernderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bouiner, C. and Windebank, S. (1998). *The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and citotoxins*. *Mutagenesis*. 13 (1). Pp. 89-94.
29. Herráez, A. (2012). *Biología molecular e ingeniería genética*. 2ª. ed. Elsevier. España. Pp. 536.
30. Industrial Toxicology Research Center (2008a). Comet Assay Forum. Introduction. (2008a). Tomado de: <http://www.cometassayindia.org/introduction.htm>. Fecha de consulta: noviembre de 2012.
31. Industrial Toxicology Research Center (2008b). Comet Assay Forum. Definitions. Tomado de: <http://www.cometassayindia.org/definitions.htm>. Fecha de consulta: noviembre de 2012.
32. INEGI. (2012). *Incidencia de Cáncer en México*. Tomado de: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2781&ep=51>. Fecha de consulta: diciembre de 2012.
33. Kocsis, J.J., Harkaway, S y Snyder, R. (1975). *Biological effects of the metabolites of dimethyl sulfoxide*. *Ann NY Acad Sci*. 243. Pp. 104-9.
34. Kuroda, Y. y Hara Y. (1998). *Antimutagenesis and Anticarcinogenesis activity of tea polyphenols*. *Mutations Research*. No. 436. Pp. 69-97.
35. KYOWA KIRIN. (2013). *Mitomycin C*. Información en línea. Tomado de: <http://www.mitomycin.net/professionals/about01.html>. Fecha de consulta: junio de 2013.
36. Macías P. J.R., Beltrán R, O., Villa T, S. (2012). “*Searching for Analogues of the Natural Compound, Caffeic Acid Phenethyl Ester, with Chemprotective Activity*”. A compendium of Essays on Alternative Therapy, Dr. Arup Bhattacharya. Información en línea. Tomado de <http://www.intechopen.com/books/a-compendium-of-essays-on-alternative-therapy/searching-for-analoguesof-the-natural-compound-caffeic-acid-phenethyl-ester-with-chemprotective-act>. Fecha de consulta: mayo de 2012.
37. Macías, P. J. R. (2010). *Efecto de los análogos del éster fenético del ácido caféico en el modelo modificado del hepatocito resistente*. Centro de investigación y estudios avanzados del IPN. Ppt.

38. McGann, L.E and Walterson, M.L. (1987). *Cryoprotection by dimethyl sulfoxide and dimethyl sulfone*. *Cryobiology*. 24(1). Pp. 11-16.
39. McKim, A.s. and Strub, R. (2007). *Dimethyl sulfoxide USP, PhEur in approved pharmaceutical products and medical devices*. *Pharmaceutical Technology*. Información en línea. Tomado de: <http://www.gaylordchemical.com/index.php?page=166b-dmsu-usp-pharmaceutical-medical>. Fecha de consulta: junio de 2013.
40. Nagaoka T., Banskota A. H., Tezuba, Y., Saiki, I and Kadota, S. (2002). *Selective antiproliferative activity of caffeic acid phenethyl ester analogues on highly liver-metastatic murine colon 26-L5 carcinoma cell line*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. 10. Pp. 3351-3359.
41. Nagaoka, T., Banskota, A.H., Tezuka, Y., Midorikawa, K., Matsushige K y Kadota S. (2003). *Caffeic Acid Phenethyl Ester (CAPE) Analogues: Potent Nitric Oxide Inhibitors from the Netherlands Propolis*. *Biol. Pharm. Bull.* 26 (4). Pp. 487-491.
42. Oliveira, Paula A., Colaço Aura, Chaves, Raquel., Guedes-Pinto, Henrique., De la Cruz P. Luis F., Lopes Carlos. (2007). *Chemical Carcinogenesis*. *Annals of the Brazilian Academy of Sciences*. Vol. 49. No.4. Pp. 593-616.
43. OMS. (2011). *Salud de la mujer*. Nota descriptiva No.334, Noviembre de 2009. Tomado de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs334/es/index.html>. Fecha de consulta: diciembre de 2012.
44. Paniagua, L. (2010). *Evaluación de la capacidad genotóxica del compuesto NA01 polifenólico derivado del CAPE mediante el ensayo de SCGE in vitro*. Tesis de licenciatura QFB, FES Cuautitlán- UNAM.
45. Penning, T.M. (2011). *Chemical Carcinogenesis*. Springer. USA. Pp. 456.
46. Proctor, R.N. (2011). *Golden Holocaust: Origins of the Cigarette Catastrophe and the Case for Abolition*. University of California Press. London, England. Pp. 150.
47. Remigio, M., Antonia, C., Piloto F, J., García, L. A., Guerra, O. M., Sánchez, G. E y Vega, H. Y. (2007). *Genotoxicidad de Indigofera suffruticosa Mill: (añil cimarrón)*. *Rev. Cubana Plant Med.* 12(3). Información en línea. Tomado de: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_issuetoc&pid=1028-479620070003&lng=en&nrm=i. Fecha de consulta: junio de 2013.

48. Rojas, O. F. (2008). *Evaluación de la capacidad genotóxica del compuesto tiomorfolínico LQM 319 mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel in vivo*. Tesis de licenciatura QFB, FES Cuautitlán- UNAM.
49. Romero, M. A. R. (2011). *Manual de cirugía menor de atención primaria*. Editorial Club Universitario. España. Pp. 400.
50. Rotstein, J.B. y Slaga, T.J. (1988). *Anticarcinogenesis mechanisms, as evaluated in the multistage mouse skin model*. Mutation Research. No. 202. Pp. 421-427.
51. Ruiz, S. M. (2012). *Evaluación in vitro de la citotoxicidad de compuestos derivados del Éster Fenético del Ácido Caféico (CAPE), en diferentes líneas celulares de cáncer*. Tesis de licenciatura. Química Industrial. Fes-Cuautitlán. UNAM.
52. Saravana Kumar Jaganathan y Mahitosh Mandal. (2009). *Antiproliferative Effects of Honey and of its Polyphenols: A Review*. Journal of Biomedicine and Biotechnology. Vol. 2009. Pág. 1-13. Tomado de <http://www.hindawi.com/journals/biomed/2009/830616/>
53. Sawicka, D., Car, H., Borawska, M H. and Niklinski, J. (2012). *The anticancer activity of propolis*. Folia Histochemica. Et Cytobiologica. Vol. 50, No. 1. Pp. 25-37.
54. Schwab, M. (2001). *Encyclopedia Reference of Cancer*. Springer. Alemania. Pp. 157.
55. Tice, R., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J., Sasaki, Y., (2000). *Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for in vivo and in vitro Genetic Toxicology Testing*. Environmental and Molecular Mutagenesis 35. Pp. 206-221.
56. Toreti, V.C., Sato, H. H., Pastore, G. M y Park, Y.K. (2013). *Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin*. Evid Based Complement Alternat Med. Información en línea. Tomado de: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3657397/#_ffn_sectitle.
57. Toronto Research Chemicals. (2011). *Caffeic Acid Phenethyl Ester*. Tomado de: [http://www.trccanada.com/detail.php?CatNum=C080050&CAS=104594709&Chemical_Name=Caffeic%20Acid%20Phenethyl%20Ester&Mol_Formula=C17H16O4&Synonym=3-\(3,4](http://www.trccanada.com/detail.php?CatNum=C080050&CAS=104594709&Chemical_Name=Caffeic%20Acid%20Phenethyl%20Ester&Mol_Formula=C17H16O4&Synonym=3-(3,4)

Dihydroxyphenyl)2propenoic%20Acid%202Phenylethyl%20Ester;%20CAPE;%20Phenethyl%20Caffeate. Fecha de consulta: Octubre de 2012.

58. Tseng, T. y Lee Y., (2006). *Evaluation of Natural and Synthetic Compounds from East Asiatic Folk Medicinal Plants on the Mediation of Cancer*. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*: (6). Pp. 347-365.
59. Vilhar B (2004). *Help! There is a comet in my computer!* Tomado de: http://botanika.biologija.org/exp/comet/comet_guide01.pdf. Fecha de consulta: noviembre de 2012.
60. Vindas, R., Ortiz, F., Ramírez, V. y Cuenca, P. (2004). *Genotoxicidad de tres plaguicidas utilizados en la actividad bananera de Costa Rica*. *Rev. Biol. Trop.* 52 (3). Pp. 601-609.
61. Wang, X., Stavchansky, S., Bowman, P. y Kerwin S., (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 and Medicinal Chemistry*:(14). Pp. 4879-4887.
62. Wang X, Stavchansky S, Bowman P , 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. Pp. 16-22.
63. Warshawsky, D. and Landolph, J.R. (2006). *Molecular carcinogenesis and the molecular biology of human cancer*. CRC Press. Boca Ratón, Florida. Pág. 1-3.
64. Weinberg, R.A. (1996). *How Cancer Arises*. *Sci. Am.* Sep. 275 (3). Pp. 62-70.
65. Wong, K., Wang, G.M., Dreyfuss, J and Schreiber, E.C. (1971). *Absorption, excretion and biotransformation of dimethyl sulfoxide in man and miniature pigs after topical application as an 80% gel*. *The Journal of Investigative Dermatology*. 56 (1).
66. Yang, J., Kerwin, S.M., Bowman, P.D and Stavchansky, S. (2011). *Stability of caffeic acid phenethyl amide (CAPA) in rat plasma*. *Biomedical Chromatography*. 26 (5). Pp. 594-598.
67. Yang, J., Marriner, G.A., Wang, X., Bowman P. D., Kerwin, S.M. and Stavchansky, Salomon. (2010). *Synthesis of a series of caffeic acid phenethyl amide (CAPA)*

fluorinated derivatives: Comparison of cytoprotective effects to caffeic acid phenethyl ester (CAPE). Bioorganic & Medicinal Chemistry. 18 (2010). Pp. 5032-38.

68. Zamorano, Ponce. E., Lagos Muñoz, P., Rivera Caamaño, P., Fernández Romero, J. (2008). *Un modelo experimental inducible en ratón para conducir estudios en quimiopreención y anticrcinogénesis.*Theoria. Vol. 17, No. 1, Pp. 71-86.

Anexo I

PREPARACIÓN DE SOLUCIONES EMPLEADAS EN EL ENSAYO COMETA

1. Agarosas

La agarosa de normal punto de fusión (AN) y la agarosa de bajo punto de fusión (LMP) se preparan al 0.5% en PBS (Solución Buffer de Fosfatos libre de Ca^{+2} y Mg^{+2}) empleando agua desionizada.

Compuesto	Gramos	Volumen
Agarosa AN	0.125	25 ml
Agarosa LMP al 1% *	0.5	50 ml

***Nota:** la AN se puede preparar a diferentes concentraciones con la finalidad de lograr que se adhiera con mayor fuerza a los portaobjetos. Las variaciones más usuales son al 0.75% y 1% y puede aplicarse a los portaobjetos sumergiéndolos verticalmente en un vaso pequeño.

2. Solución Stock de lisis

Compuesto	Concentración	Gramos para un litro	Gramos para 500 ml
NaCl	2.5 M	146.1	73.05
EDTA	100 mM	37.2	18.6
Trizma base	10 mM	1.2	0.6
NaOH	-----	≈10	≈5

Con el NaOH poner el pH=10m de esta manera todos los compuestos se solubilizarán.

c.b.p. 890 ml de agua desionizada.

Esterilizar por filtración a temperatura ambiente.

3. Solución lisis de trabajo

Compuesto	Volumen por vaso coplin de 30 ml
Solución stock de lisis	26.7
Dimetilsulfóxido	3.0
Triton X-100	0.3

4. Buffer de electroforesis

Solución "A"

Compuesto	Concentración	Gramos para 500 ml
NaOH	10 N	200

Solución "B".

Compuesto	Concentración	Gramos para 200 ml
EDTA sal disódica	200 mM	14.89

Ambas sales deben ser disueltas en agua desionizada, en el caso de la solución A el agua empleada debe estar completamente fría ya que se genera una reacción exotérmica fuerte, el NaOH debe de adicionarse poco a poco y si el calor liberado es mucho se debe esperar un momento a que se regule la temperatura antes de adicionar la siguiente cantidad del NaOH.

5. Buffer de trabajo de Electroforesis (300 mM de NaOH / 1 mM EDTA)

Esta solución debe ser preparada al momento de la electroforesis.

5.1 Procedimiento de preparación

Mezclar 30 ml de solución "A" de Buffer de electroforesis con 5 ml de solución "B" de Buffer de electroforesis, ajustar el pH ≥ 13 con NaOH y aforar a 1 L con agua desionizada.

Nota: la caja electroforética grande tiene capacidad de 2 litros, la mediana de 1.5 litros y la chica de 500 ml.

6. Solución de neutralización

Compuesto	Concentración	Gramos
TRIS	0.4 M	48.5

Disolver en agua desionizada, ajustar el pH= 7.5 con HCl concentrado y aforar a 1 litro con agua desionizada.

7. Solución colorante fluorescente

Preparar una solución stock de bromuro de etidio a 20 µg/ml (10X)

mg de bromuro de etidio	Volumen
10	50 ml

Para preparar una solución 1X, mezclar 1 ml de solución stock con 9 ml de agua desionizada. Guardar las soluciones protegidas de la luz.