



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

---

ESTUDIO DEL EFECTO DEL COMPUESTO LQM 731 SOBRE  
LA INDUCCIÓN DE CÉLULAS BINUCLEADAS  
MICRONUCLEADAS EN CULTIVO DE LINFOCITOS  
HUMANOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

CYNTHIA ETELVINA CHEHIN ALANIS

ASESORA

DRA. SANDRA DIAZ BARRIGA ARCEO

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2014



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

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

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

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

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

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

Estudio del efecto del compuesto LQM 731 sobre la inducción de células binucleadas micronucleadas en cultivo de linfocitos humanos

Que presenta la pasante: Cynthia Etelvina Chehin Alanis  
Con número de cuenta: 407013423 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 30 de Septiembre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	QFB. Rosalba Bonilla Sánchez	
SECRETARIO	Dr. Andrés Romero Rojas	
1er. SUPLENTE	M. en C. Maritere Domínguez Rojas	
2do. SUPLENTE	Dra. Dolores Molina Jasso	

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

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-Cuautitlan”. La investigación se realiza a cargo de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo.

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Después de un sueño viene un propósito, después de un propósito una meta y cuando esa meta se cumple es cuando te das cuenta de que todo lo vivido ha valido la pena, tantos años de espera, intentos fallidos, parchaduras y caídas, no fueron suficientes para detenerme, hoy es cuando le doy gracias a **Dios** por haberme ayudado a terminar este sueño, y no haberme dejado en el camino, en especial **a mis 3 ángeles** en el cielo que me cuidan y protegen todo el tiempo los amo esto es para ustedes.

**A mis padres**, que les debo todo no solo la vida, si no la enseñanza de cómo vivirla, son mi más grande motor y orgullo, sé que esto no fue fácil pero lo logramos! Esto es de ustedes y para ustedes gracias por todo su amor, paciencia, comprensión, apoyo y entrega, quisiera poder darles todo y esto es lo primero, te amo María y Víctor.

**A mis hermanos**, que me enseñan el papel que tengo yo en la familia, gracias por su amor y cariño, nunca es demasiado tarde para comenzar algo ni para terminarlo, tenlo en mente hermano y aunque el camino sea largo vale la pena siempre recorrerlo sin importar el tiempo que te lleve, te amo Jesús.

**A mi amigo, cómplice y compañero de vida**, gracias por tu amor, apoyo y fe en mi aún más grande que la que yo me pueda tener, por tu valiosa aportación en mi índice y en mi corazón, siempre juntos, un sueño nos espera! te amo Eduardo.

**A toda mi familia**, por estar conmigo todo el tiempo, por no dejarme subir nuevamente por una pelota, por sus consejos efectivos, por su apoyo para terminar este trabajo y por confiar en mí, los quiero.

**A todos mis amigos y compañeros**, de la facultad que sin sus risas y ocurrencias esto no hubiera sido igual, por los ratos compartidos, consejos y ayuda en tiempos difíciles gracias, los quiero.

**A mis amigos del alma**, considerados mis hermanos por todas las experiencias vividas, triunfos y derrotas compartidas, no sé qué haría sin ustedes Carlos, Sandro y Jorge, en especial a mi amiga, hermana y cuñada por su amor, complicidad, ejemplo y fortaleza nunca te rindas! Te quiero Arai.

**A todos mis profesores** por sus consejos, puntos de vista y ejemplos, los llevare siempre en mi mente, en especial a la profesora Maritere, Rosalba y Lolita por su amistad, cariño y atención prestada en este trabajo. Al doctor Andrés por sus pláticas y apoyo en tiempos difíciles de verdad gracias.

*A la doctora Sandra*, por aguantarme tantos años, por todo su apoyo constante, tiempo y consejos valiosos para terminar este trabajo, por sus pláticas y ejemplo, es un excelente ser humano, que dios la bendiga siempre, gracias totales!.

*A la UNAM*, porque al aferrarme a un sueño, me aferre a mi futuro, porque siempre será mi hogar, y me llenare de orgullo al decir “por mi raza hablara el espíritu” a ella gracias.

“No hay medicina que cure lo que cura la felicidad”

Gabriel García Marquez.

En memoria a todos los enfermos de cáncer que han perdido la batalla y los que aun siguen en guerra, esperando que el tiempo sea un aliado en su cura.

# INDICE

1. TABLA DE ABREVIATURAS .....	8
2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS .....	9
3. RESUMEN .....	10
4. MARCO TEÓRICO .....	12
4.1 DEFINICIÓN DE CÁNCER .....	12
4.1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER.....	13
4.1.2 ETIOLOGÍA DEL CÁNCER.....	14
4.1.3 CICLO CELULAR DE CÉLULAS CANCEROSAS .....	16
4.1.4 CARCINOGENESIS.....	17
4.1.5 QUIMIOPREVENCIÓN Y ANTICARCINOGENESIS .....	18
4.2 EL PROPÓLEO.....	19
4.2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PROPÓLEO .....	20
4.2.2 PROPIEDADES FÍSICAS DEL PROPÓLEO .....	20
4.2.3 LA ACCIÓN TERAPÉUTICA DEL PROPÓLEO.....	21
4.3 CAPE .....	23
4.3.1 ÁCIDO CAFÉICO Y SU DERIVADO TIPO ÉSTER.....	23
4.3.2 ESTUDIOS REALIZADOS CON CAPE .....	25
4.3.3 ESTUDIOS REALIZADOS CON CAPE EN MÉXICO .....	26
4.3.4 RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DEL CAPE .....	27
4.3.5 ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DEL CAPE .....	30
4.4 MICRONÚCLEOS (MN).....	32
4.4.1 ANTECEDENTES EN LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS .....	33
4.4.2 LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS .....	34
4.4.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MICRONÚCLEOS.....	35
4.4.4 TIPOS DE CÉLULAS UTILIZADAS EN EL ENSAYO DE MICRONUCLEOS .....	36
4.4.5 AGENTES INDUCTORES DE MICRONÚCLEOS .....	38
4.4.6 REQUERIMIENTOS DE LA PRUEBA DE MICRONUCLEOS .....	39

4.4.7 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PRUEBA DE MICRONUCLEOS .....	44
5. JUSTIFICACIÓN.....	46
6. OBJETIVOS.....	47
6.1. OBJETIVOS PARTICULARES .....	47
7. HIPÓTESIS.....	47
8. MATERIAL Y METODOLOGÍA .....	48
8.1. DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL .....	51
9. RESULTADOS.....	52
10. DISCUSIÓN.....	54
11. CONCLUSIONES .....	59
12. ANEXOS.....	60
13. BIBLIOGRAFÍA.....	63



## 1. TABLA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
CB	Células Binucleadas
CBMN	Células Binucleadas Micronucleadas
CT	Células Totales
PHA	Fitohemaglutinina
KCL	Cloruro de potasio
CAPE	Éster fenético del ácido caféico
CAPA	Amida fenil del ácido caféico
C	Centígrados
CO <sub>2</sub>	Dióxido de Carbono
AC	Ácido caféico
DMSO	Dimetil sulfóxido
MN	Micronúcleos
MMC	Mitomicina C
NF-KB	Factor de transcripción nuclear kappa de las células B
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ARN	Ácido Ribonucleico
DEN	Dietil nitrosamina
ROS	Especies reactivas de oxígeno
COX	Ciclo oxigenasa
NFAT	Factor nuclear de activación en células T
HDAC	Histona deacetilasa
AP-1	Activador de proteína 1
PHA	Fitohemaglutinina
Cyt-B	Citocalasina B
SFB	Suero Fetal Bovino
m.o	Microscopio óptico
rpm	Revoluciones por minuto
µg/mL	Microgramos por mililitro
µL	Microlitros

## 2. ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura No. 1. Etapas del Ciclo Celular .....	16
Figura No. 2. Etapas de la Carcinogénesis .....	18
Figura No. 3. Estructuras químicas del éster fenílico del ácido caféico (CAPE) y del ácido caféico (CA) .....	24
Figura No. 4. Estudios de relación estructura-actividad de varios análogos de CAPE.....	30
Figura No. 5. Estructuras de CAPE y CAPA y el proceso de síntesis de CAPA .....	32
Figura No. 6. Célula Binucleada con un micronúcleo .....	33
Figura No. 7. Estructura química de la MMC .....	39
Figura No. 8. Formación de la citocinesis.....	40
Figura No. 9. Fotografías donde se muestran A) Células mononucleadas sin división celular, B) Células binucleadas con una división celular y C) Células polinucleadas con más de una división celular .....	41
Figura No.10. Daños al ADN y muerte celular, efectos que pueden detectarse en el ensayo de CBMN .....	43
Figura No.11. Protocolo del ensayo de CBMN en linfocitos de sangre periférica .....	51
Figura No.12. Evaluación citotóxica con y sin reto del donador (1).....	53
Figura No.13. Evaluación citotóxica con y sin reto del donador (2).....	53
Figura No.14. Evaluación genotóxica con y sin reto del donador (1) .....	53
Figura No.15. Evaluación genotóxica con y sin reto del donador (2) .....	53
Figura No.16. Sustituciones halogénicas realizadas en los análogos de CAPE .....	56
Figura No.17. Microfotografías de CB y CBMN obtenidas en los distintos sistemas a diferentes concentraciones de LQM 731.....	60
Figura No.18. Microfotografías de daño celular obtenidas en algunos cultivos.....	62
Tabla No. 1. Diferencias entre tumores benignos y malignos .....	15
Tabla No. 2. Composición promedio del propóleo .....	20
Tabla No. 3. Propiedades y compuestos químicos del propóleo .....	23
Tabla No. 4. Diversas actividades y objetivos moleculares de CAPE .....	24
Tabla No. 5. Factores que influyen en la frecuencia de micronúcleos .....	37
Tabla No. 6. Volúmenes y soluciones agregadas a cada sistema de trabajo .....	49
Tabla No. 7. Frecuencia de CB y CBMN obtenidas en cada tratamiento del donador 1.....	52
Tabla No. 8. Frecuencia de CB y CBMN obtenidas en cada tratamiento del donador 2.....	52

### 3. RESUMEN

En México, las enfermedades crónico-degenerativas son un problema de salud pública, siendo el cáncer la tercera causa de muerte en la población. Cuando se pretende usar medicamentos contra el cáncer, antes de pasar a la fase clínica se deben de hacer pruebas del daño secundario que estos pueden provocar, entre ellas está la prueba de genotoxicidad, en la actualidad la técnica más utilizada es la de micronúcleos (MN).

En el presente trabajo se analizó la actividad genotóxica y citotóxica con y sin reto del compuesto LQM 731, el cual es un derivado amídico halogenado del CAPE, mediante la técnica de micronúcleos en linfocitos humanos *in vitro* con bloqueo de la citocinesis con Cyt-B para obtener CB, las cuales fueron analizadas independientemente en tres concentraciones del compuesto LQM 731 (10, 20, y 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y con un reto de mutágeno MMC (0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), para observar la actividad citoprotectora y antimutagenica que llegara a presentar el compuesto LQM 731.

Se descartó que no existiera diferencias significativas entre los donadores por medio de un análisis estadístico previo de prueba "t"  $\alpha=0.05$ , una vez comprobando que no existieran diferencias se prosiguió a evaluar los resultados obtenidos en los cultivos mediante el análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey.

Se utilizaron cultivos de linfocitos humanos de 2 donadores sanos, uno de sexo masculino, y otro de sexo femenino, de entre 25 y 27 años de edad sin exposición previa a medicamentos, alcohol, agentes tóxicos y tabaco. Estos cultivos se incubaron a  $37^{\circ}\text{C} + 5\% \text{CO}_2$ , durante 44 horas. Se sometieron a un bloqueo de la citocinesis con la ayuda de la Cyt-B, la cosecha celular se realizó a las 72 horas. La cual consistió en un choque hipotónico con KCl 0.075 M, para luego fijar las células con una solución Metanol-Ac.Acético (6:1), se tiñeron con Giemsa durante 12 minutos para su observación al microscopio a 40x y realizarles el conteo celular, determinando la cantidad de CB encontradas en 1000 células totales, y la cantidad de CBMN encontradas en 1000 células binucleadas por cultivo de cada donador, estos se llevaron a cabo por duplicado.

Los resultados obtenidos en el presente estudio demostraron que el compuesto LQM 731 mostró citotoxicidad desde la concentración de 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , demostrada por la cantidad de CB encontradas, las cuales disminuyeron conforme se aumentó la concentración del

compuesto encontrando diferencias significativas con una  $p < 0.05$  contra el control negativo DMSO 100%. Los cultivos de LQM 731 con reto de MMC no mostraron un efecto citoprotector de daño, ya que se disminuyó aún más la cantidad de CB, con respecto al control negativo y positivo encontrando diferencias altamente significativas contra ambos controles, en la dosis más alta de 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$  en los dos donadores.

La actividad genotóxica mostró una tendencia a aumentar el número de micronúcleos de manera dosis dependiente, teniendo diferencias significativas desde la dosis más baja de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  contra el control negativo, demostrando que el compuesto LQM 731 es genotóxico *per se*, pero en menor medida con respecto al control positivo MMC.

En los cultivos de LQM 731, con reto del mutágeno Mitomicina C se encontró un efecto antigenotóxico de daño, desde la dosis más baja de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  del LQM 731, al reducir la cantidad de CBMN, en ambos donadores; de acuerdo a estos resultados, el compuesto LQM 731 podría perfilarse como un compuesto antigenotóxico.

Finalmente se concluye que estos ensayos *in vitro* perfilan a el LQM 731 derivado amídico halogenado del CAPE como un potente compuesto anticancerígeno y que es prudente continuar con otras pruebas de carácter genotóxico, citotóxico y anticancerígeno para poder validarlo como un fármaco efectivo.

## 4. MARCO TEÓRICO

### 4.1 DEFINICIÓN DE CÁNCER




La palabra cáncer es de origen latino y significa “cangrejo”, llamado así por la capacidad tentacular de invasión que disponen las células tumorales y que en algunos casos recuerdan a la forma de este animal (Argiles y cols, 1998).

El término cáncer se utiliza para identificar y agrupar a un conjunto de más de cien enfermedades, todas ellas caracterizadas por un crecimiento celular acelerado e indiscriminado, que con el tiempo provocan la invasión, el daño a tejidos y órganos mediante la diseminación de estas células a través del sistema sanguíneo y/o el sistema linfático (National Cancer Institute, 2011).

Las células sanas normales se dividen periódicamente y de forma regular con el fin de reemplazar a las ya envejecidas o muertas, y mantener así la integridad y el correcto funcionamiento de los distintos órganos.

El proceso de división de las células sanas está regulado por una serie de mecanismos de control que indican a la célula cuándo comenzar a dividirse y cuándo permanecer estática. Cuando se produce un daño celular que no puede ser reparado se produce una autodestrucción celular que impide que el daño sea heredado por las células descendientes (AECC, 2012).

En la actualidad, la terapia contra el cáncer se encuentra mayoritariamente limitada a la radiación y quimioterapia, técnicas altamente invasivas e incómodas para el paciente y que en muchos casos conducen a la alteración de su salud integral (Couvreur y cols, 2002). Los obstáculos más importantes frente a la consecución de una terapia oncológica eficaz son:

-  La distribución no específica dentro del organismo de los fármacos antitumorales administrados.
-  La incapacidad de alcanzar concentraciones lo suficientemente elevadas en el sitio del tumor.
-  La resistencia desarrollada por las células cancerosas a diferentes tipos de quimioterapia.

#### 4.1.1 EPIDEMIOLOGÍA DEL CÁNCER

En México, la campaña de lucha contra el CÁNCER se originó en 1940 como una iniciativa impulsada por la Secretaria de Salubridad y Asistencia Pública. La necesidad de contar con un sistema de información que permitiera conocer la frecuencia y distribución de las diferentes neoplasias malignas llevó a la creación, en 1982, a el Registro Nacional de Cáncer (RNC) como base para evaluar los diversos programas de salud relacionados con este padecimiento (Carrillo y cols, 2011).

En México, las enfermedades crónico-degenerativas son un problema de salud pública, siendo el cáncer la tercera causa de muerte en la población. Específicamente, el cáncer de colon ha incrementado su incidencia en los últimos años y esta situación se ha relacionado principalmente con los cambios en los patrones alimentarios (INEGI, 2010). Un alto consumo de carne roja y grasa saturada, es la causa de un 80% de este tipo de cáncer (Chan y Giovannucci, 2010).

Se estima que del 5%-10% de todos los cánceres son hereditarios, es decir que las personas que heredan una determinada alteración genética tienen un alto riesgo de desarrollar cáncer en alguna etapa de su vida. Estos factores causales pueden actuar juntos o en secuencia para iniciar o promover la carcinogénesis (García y cols, 2007).

La organización mundial de la Salud (OMS) informó recientemente que el cáncer es responsable de aproximadamente del 13 a 15 % de todas las muertes. Para el año 2020 el número de muertes por año será de 10 millones, 47% corresponderá a países desarrollados y el 55 % a países en vías de desarrollo (Compendio de cáncer, 2001) y para el 2050 se espera crezca a 27 millones la carga de nuevos casos de cáncer (García y cols, 2007).

Dentro de los tumores malignos que se presentan con mayor frecuencia son el de cuello uterino 24.4%, piel 13.6%, mama 11%, próstata 6% y estomago 3%.

En los hombres la mayor frecuencia se presenta en cáncer de piel 20%, próstata 17% y estomago 6%. En cambio en las mujeres fue el cáncer cervicouterino 36%, mama 17% y piel 11% (Compendio de cáncer, 2001).

Dentro de los factores epidemiológicos para Latinoamérica se consideran edad, sexo, raza, tabaquismo y consumo de alcohol, encontrándose estos últimos como factores de

riesgo de mayor importancia para el desarrollo de neoplasias, así como de las recurrencias posteriores al tratamiento (Carrillo, 2011).

Diversos estudios epidemiológicos indican que una dieta alta en frutas y vegetales disminuyen el riesgo de desarrollar alguna patología. El efecto protector de estos alimentos se atribuye a la presencia de antioxidantes naturales como los compuestos fenólicos, las vitaminas A, C y E, los isotiocianatos, entre otros. Estas sustancias tienen la habilidad de contrarrestar o inhibir los efectos negativos de las especies reactivas de oxígeno (ERO) y los radicales libres (RL) presentes en este tipo de enfermedades (Antosiewicz y cols., 2008) (Tang y Gudas, 2011).

El cáncer humano en muchas de sus manifestaciones se asocia con la forma de vida, aunque se han identificado neoplasias malignas relacionadas con antecedentes infecciosos, exposición a radiaciones y la actividad hormonal, por lo que continúan las investigaciones enfocadas a instrumentar opciones preventivas específicas y en la búsqueda del incremento de la eficacia de los tratamientos para reducir las recidivas (Compendio de Cáncer, 2001).

#### **4.1.2 ETIOLOGÍA DEL CÁNCER**

La célula cancerosa pierde el control de su propio desarrollo, de modo que se divide en más células a mayor velocidad que el resto de tejidos a los que pertenece, sin cumplir las funciones para las que ha sido creada. Este crecimiento anormal de las células puede llegar a formar masas de tejidos llamadas tumores (El cáncer, 2004).

Cuando las células que constituyen dicho tumor no poseen la capacidad de invadir y destruir otros órganos, hablamos de tumores benignos. Pero cuando estas células además de crecer sin control sufren nuevas alteraciones y adquieren la facultad de invadir tejidos y órganos de su alrededor (infiltración), y de trasladarse y proliferar en otras partes del organismo (metástasis), hablamos de tumores malignos (AECC, 2012).

Una vez que se establecen en un nuevo tejido, las células tumorales originan un segundo núcleo proliferativo o metástasis, en ocasiones se utiliza el término neoplasma como sinónimo de tumor (Argiles, 1998).

Es importante saber diferenciar los tumores benignos, o no cancerosos, de los malignos, o cancerosos. Las diferencias entre los tumores benignos y malignos se pueden ver en la siguiente tabla.

Tabla No. 1 Diferencias entre tumores benignos y malignos (El cancer, 2004)

Tumores benignos	Tumores malignos
Son de crecimiento lento	Algunos son de crecimiento lento, pero con frecuencia son de crecimiento muy rápido
Sólo crecen hasta determinado tamaño	Creced de manera progresiva e invasiva
No destruyen células normales	Destruyen células, tejidos y órganos
Creced de manera ordenada	Creced de manera desordenada
No se propagan a otros tejidos	Se propagan a los tejidos de otros órganos del cuerpo como metástasis
Normalmente no producen efectos secundarios graves	Normalmente no producen efectos secundarios graves. Si no se controla su crecimiento ocasionan la muerte

Los tumores malignos se conocen por su capacidad de invadir y destruir tejidos y órganos tanto cercanos como los que están lejos del tumor original. Las células del cáncer atacan el tejido sano y nunca dejan de multiplicarse. La muerte se produce cuando la propagación del cáncer daña los tejidos y órganos vitales como el hígado, los pulmones o el cerebro, entre otros, de tal manera que estos órganos dejan de funcionar progresivamente.

Las características de las células formadoras de un tumor maligno son:

**DISPLASIA:** Los mecanismos reguladores que mantienen el equilibrio de las células son incapaces de controlar su división, produciendo un cúmulo de células que normalmente dan lugar a un bulto o tumor.

**NEOPLASIA:** Las células presentan variaciones en su forma, tamaño y función. Estas células dejan de actuar como deben y adquieren nuevas propiedades que configuran el carácter maligno denominado comúnmente como cáncer.



**CAPACIDAD DE INVASIÓN:** El cáncer puede extenderse por el organismo, utilizando para ello diferentes vías. Las más comunes son:

- **PROPAGACIÓN LOCAL:** Las células tumorales invaden los tejidos vecinos, infiltrándose en ellos.
- **PROPAGACIÓN A DISTANCIA:** Ocurre cuando algún grupo de células malignas se desprende del tumor original donde se generó para trasladarse a otros lugares del organismo. Fundamentalmente, se propagan por los vasos sanguíneos y linfáticos, para después desarrollar tumores malignos secundarios (Pérez y Santos, 2012)

#### 4.1.3 CICLO CELULAR DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS

El ciclo celular de las células cancerosas es similar al de las células normales. El crecimiento de cada célula se inicia en la denominada fase G<sub>1</sub>, en la que se producen las enzimas necesarias para la síntesis de ADN, ARN y otras proteínas. Tras esta fase, viene un periodo de síntesis de ADN o fase S.

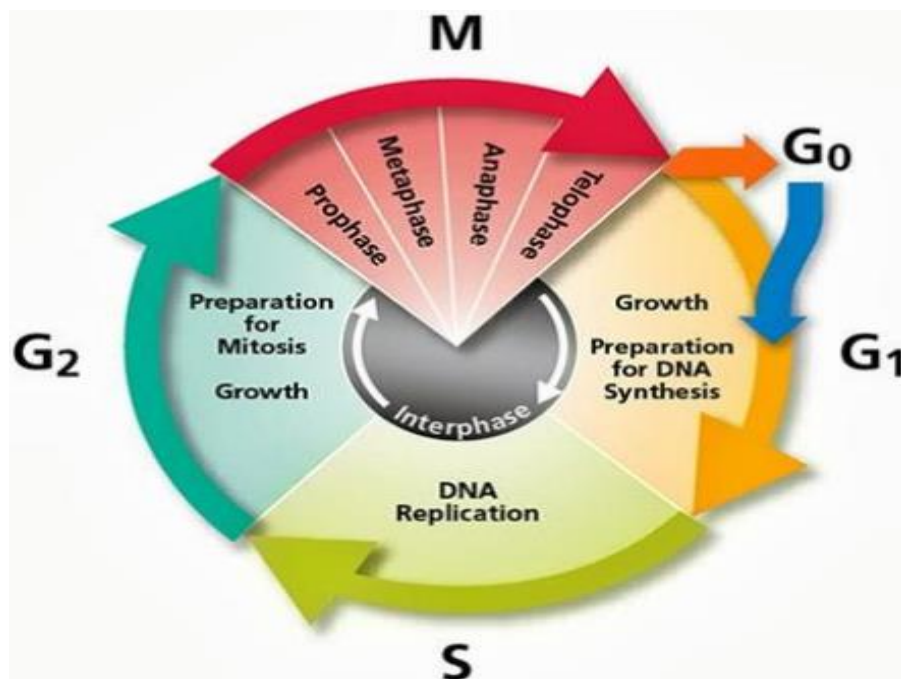


Figura No. 1 Etapas del Ciclo Celular (Paperblog, 2013).

Posteriormente, la célula tumoral entra en el periodo premitótico (Fase G<sub>2</sub>) en la que se sintetiza ARN y proteínas, seguido por la mitosis (Fase M), tras la cual, tiene lugar la

división física, que lleva a la formación de dos células hijas que entran de nuevo en la fase G1. Esta última fase está en equilibrio con el estado de reposo, denominado como fase G0. Las células en fase G0 son relativamente inactivas respecto a la síntesis de macromoléculas, por lo que son insensibles a muchos de los agentes quimioterapéuticos, en especial, a aquellos que afecten a la síntesis de macromoléculas.

La mayoría de los antineoplásicos se agrupan en función de que si dependen o no de que la célula este en una fase distinta a la fase G0, o si la actividad es mayor en alguna de las fases del ciclo citadas previamente (Guillen. 2013).

#### **4.1.4 CARCINOGENESIS**

La carcinogénesis es un proceso de múltiples etapas en el desarrollo de neoplasmas o tumores malignos en el que se han identificado tres grandes estadios, INICIACIÓN, PROMOCIÓN, Y PROGRESIÓN.

La INICIACIÓN toma lugar a nivel del ADN, molécula en la cual los mutágenos introducen mutaciones y con ello se altera la regulación de la expresión de algunos genes importantes para la célula.

Como resultado de ello, las células se adentran en un cambio irreversible caracterizado por una capacidad intrínseca de crecimiento autónomo potenciado. Los agentes que actúan en esta primer etapa pueden ser FÍSICOS - QUÍMICOS o VIRALES.

En la fase de PROMOCIÓN, las células son estimuladas a dividirse y se hacen morfológicamente anormales, llevando a las células a la fase de transformación en donde se potencia el desarrollo de neoplasmas clínica y patológicamente detectables.

La PROGRESIÓN es la etapa mediante la cual la célula iniciada anormal experimenta nuevos cambios genéticos que terminan por conferirle fenotipo maligno lo que finalmente se traduce en el desarrollo del cáncer (Zamorano y cols., 2008).

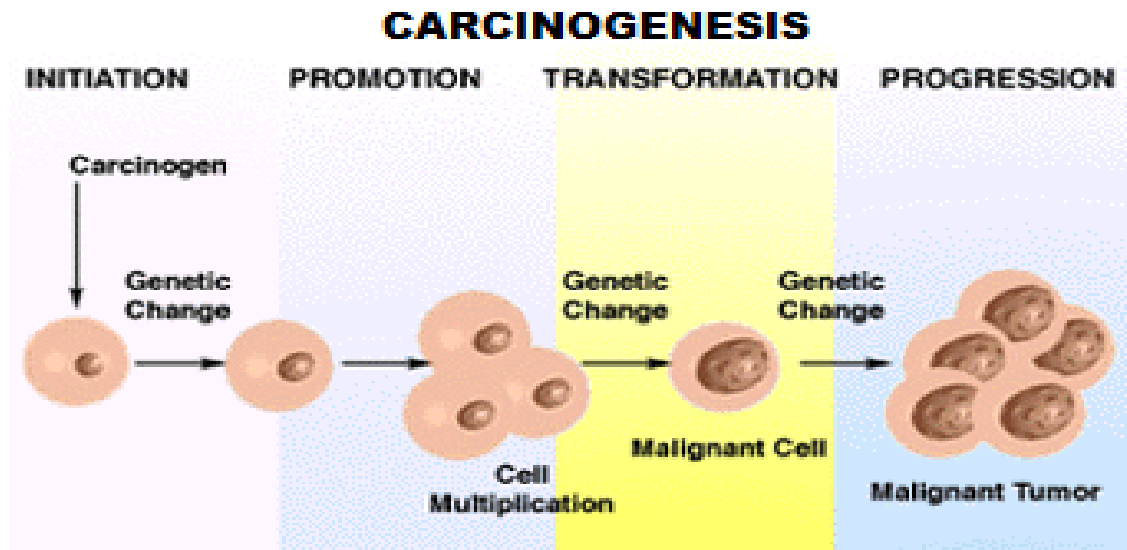


Figura No. 2 Etapas de la carcinogénesis (S.E.H.S.C. 2013).

#### 4.1.5 QUIMIOPREVENCIÓN Y ANTICARCINOGENESIS

El término quimiopreención fue descrito originalmente por Michael Sporn en 1978 para indicar “la potenciación farmacológica o fisiológica mediante las cuales la progresión de una lesión preneoplásica puede ser prevenida, detenida o revertida” (Greenwald y cols., 1995).

La quimiopreención involucra la utilización de agentes químicos naturales o sintéticos para corregir, suprimir o impedir el proceso carcinogénico, evitando así el desarrollo de una neoplasia maligna invasora (Martínez, 2000).

Muchos constituyentes químicos vegetales o fitoquímicos han sido asociados con propiedades protectoras. Las hierbas medicinales constituyen una fuente de muchos de esos compuestos químicos. Se han publicado un gran número de trabajos en los cuales se evidencian diversas capacidades de las infusiones de estas hierbas para quimioprevenir la incidencia de efectos celulares cuando son ensayadas en experimentos *in vitro* e *in vivo* (Zamorano y cols., 2008).

Los quimioprotectores se han detectado frecuentemente cuando se estudia el efecto de sustancias purificadas de extractos de productos naturales a los cuales la medicina

alternativa ha atribuido propiedades terapéuticas. Este es el caso del propóleo y de sus componentes (Beltrán y cols., 2005).

## 4.2 EL PROPÓLEO

El término de propóleo o propolis proviene del griego PRO: “delante de” y POLIS: “ciudad”, lo que significa “delante de la ciudad”. Haciendo alusión a que esta sustancia se encuentra en la entrada y en el interior de la colmena o polis de las abejas (Serrano y cols., 2003)

Se tiene conocimiento del propóleo desde tiempos remotos, ya que en el antiguo Egipto, los sacerdotes lo utilizaban en forma de crema para embalsamar o como parte integrante de ungüentos y bálsamos curativos.

Aristóteles se refiere a esta sustancia como “remedio para las infecciones de la piel, llagas y supuraciones”. En el siglo XI, se emplea para desinfectar las heridas por punta de flecha, pero alcanza su apogeo durante la Guerra de los Boers contra los ingleses en África del Sur, en la que las heridas eran tratadas con mezclas que contenían propóleo, con un excelente resultado según los médicos militares, ya que, además de ejercer acción antiséptica, también era capaz de cicatrizar y regenerar los tejidos dañados (Serrano y cols., 2003).

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

Estudios recientes han demostrado que los propóleos poseen actividad antibacteriana, antiviral, antifúngica, antiinflamatoria, anticancerígena, hepatoprotectora y antioxidante, lo que ha generado gran interés en la industria farmacéutica (Farré y cols., 2004) ;(Bankova, 2005).

#### 4.2.1 COMPOSICIÓN QUÍMICA DEL PROPÓLEO

La composición química de los propóleos y su actividad biológica depende del tipo de vegetación que se encuentra en un radio de 3 a 4 kilómetros alrededor de la colmena (Bosio y cols., 2003).

Esta composición química es variable y compleja, se han descrito cerca de 50 a 200 compuestos, mayoritariamente compuestos fenólicos, como ácidos benzoicos, ácidos cinámicos, ácido caféico o flavonoides entre otros, ácidos etéreos, cumarina, crisina, y sustancias minerales (Serrano y cols., 2003).

Tabla No.2 Composición promedio del propóleo (Farré y cols., 2004).

COMPOSICIÓN	(%)	COMPUESTOS, CARACTERÍSTICAS Y OBSERVACIONES
Resinas	45-55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres.
Ceras	7.55 a 35	Mayoría cera de abeja, también de origen vegetal
Aceites esenciales	5-10	Volátiles
Ácidos grasos	5	La mayoría proceden de la cera y el resto dependen del origen botánico
Polen	5	Proteínas del polen y aminoácidos libres. Predominan arginina y prolina.
Otros compuestos orgánicos y minerales	5	14 oligoelementos Fe y Zn son los más abundantes, otros: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb.. Cetonas Lactonas Quinonas Esteroides Ácido benzoico y ésteres Vitaminas: B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>3</sub> , B <sub>6</sub> . Pequeñas cantidades procedentes principalmente del polen. Azúcares.

#### 4.2.2 PROPIEDADES FÍSICAS DEL PROPÓLEO

Los propóleos son polímeros balsámicos resinosos que elaboran las abejas a partir de diversas resinas de plantas. Estas resinas quedan potenciadas con las enzimas producidas por las glándulas salivales de las abejas y enriquecidas con los residuos de la digestión láctica de los gránulos de polen (Allen, 2013).






El propóleo presenta una consistencia viscosa variable, dependiendo de su origen y de la temperatura. A los 15°C es duro y se torna más maleable a medida que la temperatura aumenta. El punto de fusión varía entre 60 a 70°C y su color varía de amarillo claro a pardo oscuro; presenta además un aroma penetrante, sabor acre y a veces hasta amargo (Hernández y cols., 2005).

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

#### 4.2.3 LA ACCIÓN TERAPÉUTICA DEL PROPÓLEO

El propóleo es un producto de mucho interés tanto para la industria farmacéutica como para la medicina, la odontología, la veterinaria entre otras, debido a todas sus propiedades como antiinflamatorio, inmunoestimulante, hepatoprotector, carcinoestático, antimicrobiano, antiviral, antifúngico, antiprotozoario, anestésico y regenerador tisular (Farré y cols., 2004).

Estas acciones terapéuticas están relacionadas con las estructuras moleculares que forman parte de su composición química (Farré y cols., 2004).

-  Flavonoides: galangina, quercetina, crisina, apigenina y derivados.
-  Ácidos Fenólicos: cafeico, isoferulico, cinámico y benzoico.
-  Derivados del benzaldehído: vainillina e isovainillina.
-  Compuestos terpénicos.
-  Aceites esenciales.

La acción antiinflamatoria del propóleo se debe a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, leucotrienos y de histamina en el foco inflamatorio; su potencia antiinflamatoria local es similar a la del diclofenaco (Apter, 1978).

Otra de las actividades biológicas que poseen los propóleos que se encuentra ampliamente documentada en la literatura es su actividad antioxidante. Esta actividad biológica de los propóleos ha sido atribuida principalmente a la presencia de ácido ferúlico, quercetina, flavonoides, así como al ácido cafeico (Peña, 2008).

La actividad antioxidante se lleva a cabo mediante una transición redox, a través de la cual la molécula antioxidante libera un átomo de hidrógeno que puede ser captado por un radical libre, o permitiendo la formación de ligandos que faciliten la quelación de iones metálicos y la interacción con enzimas.

Los flavonoides y ácidos fenólicos tienen la propiedad de interceptar y reaccionar con agentes oxidantes como enzimas, metales y radicales libres (Vargas y cols., 2014)

La actividad inhibitoria del propóleo frente a los virus de la viruela, la influenza, la enfermedad de New Castle, el herpesvirus, la fiebre del Valle de Rift, la influenza aviaria el reovirus y el virus de la gripe de Hong Kong, se le atribuye al contenido de compuestos fenólicos principalmente el ácido cafeico, así como también esteres de los ácido cafeico y ferúlico (Farré y cols., 2004).

Velázquez y colaboradores, evaluaron la actividad antimicrobiana de varias muestras de propóleo del desierto de Sonora, en donde se utilizaron cepas de bacterias Gram positivas y Gram negativas, encontrando como resultado que en todas las concentraciones de propóleos no tuvieron efecto en las bacterias Gram negativas, mientras que en las Gram positivas fue donde se obtuvo mejor eficacia. Esta actividad fue relacionada con la presencia de compuestos fenólicos, Crisina, Galangina y el CAPE (Vargas y cols., 2014).

El potencial anticariogénico del propóleo ha sido demostrado a través de varios estudios los cuales han revelado la reducción de la incidencia de caries y acumulación de placa dental in vitro e in vivo; sugiriendo que existen dos mecanismos asociados con las propiedades anticariogénicas/ antiplaca del propóleo como son la actividad antimicrobiana contra bacterias cariogénicas y la inhibición de la enzima glucosiltransferasa. A este compuesto se le han atribuido otras características de relevancia en odontología como es la estimulación de la generación de la dentina (esmalte dental); la cual impide la formación de caries como de placa dental y hasta los momentos no se han presentado ninguna contraindicación, reacciones alérgicas, ni toxicidad por sobredosis (Premoli, 2010)

El consumo regular del propóleo con su efecto antibiótico y antifúngico puede lograr una gran inmunidad para el organismo (Guevara, 2010)

En la siguiente tabla se muestran algunos de los componentes químicos del propóleo y propiedad terapéutica.

Tabla No. 3 Propiedades y compuestos químicos del propóleo (Vázquez, 2010).

PROPIEDADES	COMPUESTOS QUÍMICOS
Antimicótico	Pinocembrina, ácido acético y caféico
Antibacterial	Pinocembrina, Kaemferol y ácido caféico
Antiséptico	Ácido Benzóico
Antiviral	Ácido caféico. luteolina y quercetina
Antimutagénica	Ácido ferúlico, ácido cinámico y ácido coumárico
Citotoxicidad e inhibición de tumores	Ácido caféico, fenetil ester, quercetina y crisina
Anestésico local	Pinocembrina
Antihemorrágico	Flavonoides
Curación de heridas	Ácidos fenólicos y flavonoides
Efecto aglutinante	Ácido ferúlico
Estimula la mitosis y aumenta la biosíntesis de las proteínas	Arginina
Curación de úlceras gastroduodenales	Luteolina, apigenina, pinocembrina y galangina
Histaminopectica	Quercetina
Antioxidante	Flavonoides, ácido caféico y fenetil ester
Antiinflamatorio	Flavonoides y ácido caféico
Espasmolítico	Quercetina y Kaemferide
Promueve el desarrollo de colágeno y elastina	Ácido ferúlico

### 4.3 CAPE

#### 4.3.1 ÁCIDO CAFÉICO Y SU DERIVADO TIPO ÉSTER

Los compuestos fenólicos integran una familia de moléculas que presentan uno o más grupos hidroxilos unidos directamente a anillos aromáticos, se utilizan como antioxidantes en diversos ingredientes alimenticios, y están presentes como metabolitos secundarios en plantas, como ésteres o glucósidos. El término “fenólico” abarca un gran grupo de compuestos químicos, los cuales se clasifican de diversas maneras, la clasificación más común se basa en el número de carbonos de la molécula, y los agrupa en: fenoles simples, ácidos fenólicos, ácido hidroxicinámico, coumarinas, flavonoides, lignanos, taninos, entre otros (LeBlanc y cols., 2012).

El ácido cafeico (CA) (figura No. 3) es el principal representante de los ácidos hidroxicinámicos y fenólicos, se encuentra en muchas plantas como derivados simples, tales como glucósidos, amidas, ésteres y ésteres de azúcar, siendo su forma principal la esterificada.



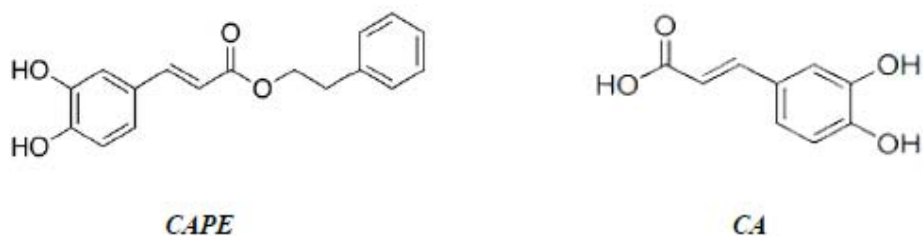


Figura No. 3. Estructuras químicas del ester fenético del ácido cafeico (CAPE) y del ácido cafeico (CA) (Hernández, 2013).

El ester fenético del ácido cafeico (CAPE) con estructura química [2-propenoico ácido, 3 - (3,4-dihidroxifenil) -, 2-fenilo éster] (figura No. 3) es un compuesto polifenólico derivado del ácido cafeico y es el compuesto activo más importante aislado del propóleo (LeBlanc y cols., 2012).

Las propiedades biológicas del CAPE son bastas y variadas entre las cuales podemos encontrar actividad como antibacteriano, antiviral, antifúngico, antiinflamatorio, antioxidante, antitumoral y antiproliferativo (Macías y cols., 2012).

Tabla No. 4 Diversas actividades y objetivos moleculares de CAPE (Ghulam y cols., 2014).

Número	Actividad	Dianas moleculares del CAPE
1	Antioxidante	ROS
2	Anti-inflamatorio	La COX-1,COX-2,NF-B,NFAT y AP-1
3	Anticancerígeno	NF-B
4	Antiviral	VIH1 Integrasa
5	Inmunomodulador	NF-B
6	Antihepatotóxica	CYP2E1
7	Neuroprotector	ROS
8	Antiaterosclerótico	NF-B

#### 4.3.2 ESTUDIOS REALIZADOS CON CAPE

Frenkel y colaboradores en sus estudios evalúan la actividad quimioprotectora de CAPE aplicando tratamientos tópicos del compuesto en ratones, para observar si es capaz de inhibir la promoción tumoral, provocada por el 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, encontrando que a la concentración de 0.5 nmol CAPE suprime en un 50 % la explosión metabólica oxidativa, así como inhibe la actividad enzimática de ornitina descarboxilasa, perfilando a el compuesto como un potente agente quimiopreventivo (Frenkel y cols., 1993).

Su y colaboradores en sus estudios con fibroblastos embrionarios comprueban el efecto tóxico diferencial de CAPE, por el cual el compuesto es citotóxico al tumor y a las células tumorales no, encontrando que CAPE puede ser un compuesto que se fija a células transformadas o en transformación por el reconocimiento fenotípico de las células, suprimiendo así el crecimiento tumoral (Su y cols., 1991).

Chiao y colaboradores demuestran que CAPE induce apoptosis por la pérdida de la regulación del estado redox normal en células transformadas de rata (Chiao y cols., 1995).

Kishimoto y colaboradores, así como Kujumgiev y colaboradores demuestran en sus estudios la actividad antimicrobiana de CAPE contra *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* y *Haemophilus influenzae* en donde el ARN, ADN y proteínas celulares son posibles objetivos de acción de CAPE (Kishimoto y cols., 2005); (Kujumgiev y cols., 1993).

Orsolich y colaboradores encontraron que la presencia local de CA y CAPE, mediante inyección subcutánea en el tejido tumoral, causó un retraso significativo en la formación de tumores y mayor vida útil 29.3 a 51.73%, respectivamente. CA y CAPE, suprimió de forma significativa el carcinoma cervical en células HeLa de manera *in vitro* (Orsolich y cols., 2005).

En estudios de Xiang y colaboradores CAPE ha demostrado ser citotóxico para muchos tipos de células cancerosas, incluyendo las células de cáncer de mama, mientras que no tiene tales efectos contra las células normales (Xiang y cols., 2006)

Omene en sus estudios plantea la hipótesis de que CAPE, que es estructuralmente similar a la clase de ácido hidroxámico de los inhibidores de HDAC, puede mediar sus efectos sobre el cáncer de mama a través de modificaciones epigenéticas, investigando también sus efectos sobre las proteínas histonas, encontrando que CAPE provoca la acumulación de las proteínas histonas acetiladas que sugiere que tiene propiedades inhibitoras de HDAC lo cual se toma como propiedad anticancerígena, y este mecanismo se conserva en los propóleos de origen natural; proporcionando así soporte para el uso de CAPE como agente terapéutico en el cáncer de mama (Omene y cols., 2012.)

En un estudio se evaluó el efecto protector de CAPE contra los cambios producidos por el estrés hipertérmico al que están expuestos los atletas ciclistas de alto rendimiento, Se avaluó el efecto de CAPE sobre los cambios inducidos en la viabilidad celular, la morfología, la producción de su peróxido, y el contenido de su peróxido intracelular en células mononucleares (MNC) de sangre periférica de ciclistas competitivos. Se observó que el efecto de CAPE sobre la inhibición tenía un patrón dependiente de la dosis y que ese efecto protector contra el estrés hipertérmico puede ser causado por la actividad antioxidante de CAPE (Chen y cols., 2009).

#### **4.3.3 ESTUDIOS REALIZADOS CON CAPE EN MÉXICO.**

En México también se han llevado a cabo varios estudios con el compuesto CAPE los cuales abordan el modelo modificado del hepatocito resistente de Semple-Roberts. En donde se induce carcinoma hepatocelular en ratas y se puede estudiar el proceso carcinogénico en sus tres etapas principales: iniciación, promoción y progresión.

Beltrán y colaboradores demostraron que el CAPE en la etapa de iniciación con una sola dosis, modula la bioactivación de dietilnitrosamina (DEN) lo cual protege al hígado, reduce la aparición de lesiones preneoplásicas, modifica la expresión de genes y disminuye en un 43% la aparición de tumores. El posible mecanismo de acción de CAPE planteado involucra la modificación de las isoformas de citocromo P450; CYP2E1, CYP1A1/1A2 y CYP2B1/2B2, a través del metabolito del carcinógeno DEN (Beltrán y cols., 2005).

En la etapa de promoción el CAPE ha demostrado reducir las lesiones preneoplásicas cuando es administrado usando ratas Fischer-344, al igual que al ser administrado en ratas Wistar, perfilándolo como un buen candidato para utilizarse como quimioprotector en seres humanos (Beltrán y cols., 2011).

Carrasco y colaboradores utilizando el modelo de hepatocarcinogénesis inducida en ratas Wistar, demostraron la actividad quimioprotectora de CAPE en las etapas de promoción y progresión, planteando como mecanismo de acción la inhibición de la activación del NF-KB, lo que impide que los tumores presenten resistencia a los fármacos (Carrasco y cols., 2004).

El grupo de investigadores del Dr. Saúl Villa Treviño en el 2003 demuestran también la actividad quimioprotectora de CAPE mediante la inducción de hepatocarcinogénesis con el metabolito DEN dietil nitrosamina, en un grupo de ratas Wistar en donde su posible efecto protector se debe al NF-KB ya que el CAPE inhibe su activación (Carrasco-Legleu y cols., 2003).

Domínguez en sus estudios elucidó los efectos *in vitro* del CAPE en varios modelos celulares, como células HeLa, VERO, JURKAT Y K562, encontrando una inhibición de la proliferación celular, con un efecto dosis dependiente del CAPE, también se determinó la actividad genotóxica del CAPE mediante la técnica de intercambio de cromátides hermanas demostrando una tendencia genotóxica del compuesto menor a la del control positivo ifosfamida (Domínguez, 2008).

#### **4.3.4 RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD DEL CAPE**

Altug y colaboradores, realizaron un estudio en el que proponen que el efecto protector del CAPE en la isquemia cerebral inducida en conejos, se debe principalmente a la acción antioxidante de este compuesto (Altug y cols., 2008).

Esta capacidad antioxidante se encuentra relacionada con la estructura de estos compuestos, principalmente con la presencia de grupos hidroxilo y efectos de conjugación y resonancia (Leopoldini y cols., 2004). Donde sugieren que la propiedad antioxidante se incrementa al aumentar el número de grupos hidroxilo de tipo fenólico en su estructura.

Estudios electroquímicos demuestran que el principio estructural que regula los potenciales redox, y por lo tanto la capacidad antioxidante de los ácidos hidroxicinámicos y sus derivados, se debe a la presencia del grupo fenólico en la estructura de estos compuestos, que en el caso del ácido cafeico y sus derivados, es el grupo catecol (Roleira y cols., 2010).

En un estudio que se realizó para evaluar el efecto de inducción de la Hemo Oxigenasa 1 (HO-1), se determinó que el ácido cafeico y sus derivados podrían ser utilizados de una manera satisfactoria en comparación con la curcumina, para proteger los tejidos contra radicales libres. En este estudio encontraron que la presencia de grupos hidroxilo en la posición *orto* en el anillo aromático mejora notablemente la inducción de HO-1; así como los análogos de éster de ácido cafeico con una cadena lateral larga, tenían un alto potencial para inducir la actividad de la HO-1 en comparación con los análogos de amida de ácido cafeico (Churdsak y Chaiyavat., 2010).

Ardhaouia y sus colegas informaron que la hidrofobicidad de los productos químicos con cadenas laterales largas era mayor que los que tienen cadenas laterales cortas. Por lo tanto, esos productos químicos con propiedades hidrófobas pueden penetrar fácilmente las membranas celulares e inducir la activación de la señal (Ardhaouia y cols., 2004).

Uwai y colaboradores en un análisis de la relación estructura-actividad mostraron que los ésteres del ácido cafeico en diferentes grados conservan su actividad para inhibir el óxido nítrico (NO) inducido por lipopolisacáridos en macrófagos murinos RAW264.7, que se refleja en la concentración efectiva media (CE 50) de cada compuesto. El efecto inhibitorio de estos derivados en la producción de NO en macrófagos RAW264.7 era dependiente de la longitud y el tamaño de la fracción de alquilo, y de la cadena undecílica del ácido cafeico la cual era el inhibidor más potente de la producción de NO.

Además, se demostró que la conexión entre el ácido cafeico y la cadena de alquilo es crítica para la actividad. Derivados de amida y cetona mostraron que no sólo el grupo funcional éster, sino también los grupos funcionales amida y cetona exhiben un efecto inhibitorio sobre la producción de NO (Uwai y cols., 2008).

En los estudios de Natarajan y sus colaboradores, se comprobó que el CAPE es un potente y específico inhibidor de la activación del factor nuclear de transcripción NF-KB, se probaron también un grupo de análogos del CAPE en donde se observó que aunque todos los compuestos eran activos en la inhibición de la activación de NF-KB, hubo marcadas variaciones en su capacidad inhibitoria, encontrando que los compuestos 1 y 6 (Figura No. 4) tienen una inhibición más eficiente que CAPE.

Como resultado del análisis de relación estructura-actividad encontraron que la alteración de la colocación del grupo hidroxilo de 3,4-dihidroxi (CAPE) a 2,5-dihidroxi (compuesto 1) (Figura No. 4) aumenta la potencia de inhibición, ocurriendo lo contrario en la sustitución de los grupos hidroxilo de CAPE con dos éteres de metilo (compuesto 2) y la adición de un tercer grupo hidroxilo (compuesto 3) dando como resultado una pérdida de potencia, con estos análisis sugieren que el número y la colocación de grupos hidroxilo es un determinante importante de la medida de inhibición. En el grupo éster de los análogos, la porción de ácido cafeico se mantuvo constante y la cadena lateral fenetil se varió. Un aumento en la longitud de la cadena de alquilo (compuesto 4) resultó en una pérdida significativa de la inhibición.

Análogos bicíclicos de los dos isómeros de CAPE que diferían en la colocación de los sustituyentes hidroxilo mostraron un cambio drástico en la potencia inhibitoria de los dos análogos; el isómero 5 era completamente ineficaz, mientras que el isómero 6 abolió completamente la unión, esto indica una vez más que la colocación de los grupos hidroxilo juega un papel importante en la inhibición de la activación de NF-KB.

Finalmente en los análogos de amida saturadas, el análogo con tres hidroxilos adicionales (compuesto 7) y el análogo de amida inversa (compuesto 8), el cual carece de un grupo hidroxilo adicional, resultaron ser menos activos que CAPE (Natarajan y cols., 1996).

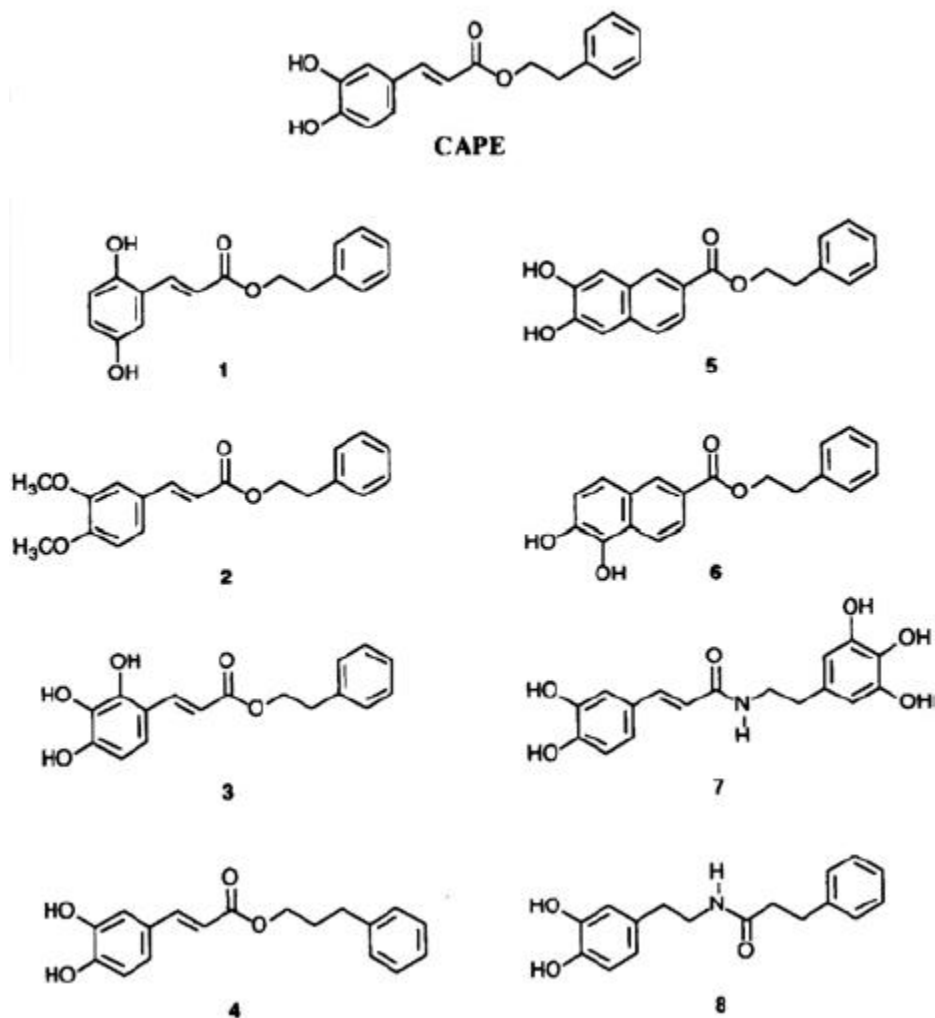


Fig. No. 4. Estudios de relación estructura-actividad de varios análogos de CAPE. Se sintetizaron incluyendo sustituyentes del anillo de catecol (compuestos 1 a 3), grupos éster (compuesto 4), rotacionalmente restringidas variantes (compuestos 5 y 6), y análogos saturados (compuestos de amida 7 y 8) (Natarajan y cols. 1996).

#### 4.3.5 ANÁLOGOS ESTRUCTURALES DEL CAPE

El término "análogo" se refiere a compuestos químicos con una relación estructural próxima a la del compuesto original, incluyendo compuestos que tienen una similitud estructural, pero uno o más átomos en su estructura han sido sustituidos por otros (Fischer y Ganellin. 2006);(Wermuth. 2006).

Uno de los impedimentos para el uso generalizado de CAPE es que su extracción es compleja y con rendimientos muy bajos. De una igual manera, la obtención por síntesis

química, reacción junto con métodos de purificación requieren procedimientos de purificación y los rendimientos oscilan entre 35 y 50%, y actualmente está disponible en el mercado sólo a un alto costo.

Por esta razón, las moléculas con estructura relacionada con el CAPE se han estudiado, en busca de compuestos que retienen la actividad biológica, así como que muestran ventajas de ser barato, y obtenido de forma rápida y fácilmente.

La investigación de compuestos con actividad biológica se apoya en metodologías como la relación cuantitativa estructura actividad (QSAR) que tiene como objetivo predecir y optimizar la actividad biológica, sugerir un modo de acción, que se clasifica de acuerdo a la actividad biológica, determinar las características estructurales de la molécula importantes para la actividad biológica y reducir la parte experimental (Macías y cols. 2012).

Wei y colaboradores propusieron la sustitución del grupo éster por una amida unida a un grupo funcional aromático, modificación que demostró tener mejor efecto antitumoral que moléculas amídicas que tenían como sustituyentes grupos alifáticos y alicíclicos. Finalmente se demostró que la sustitución del grupo éster por una amida disminuyó la citotoxicidad del compuesto (Yang y cols., 2010).

Recientemente, la Fenetil Amida del Ácido Cafeico (CAPA), se encontró que presenta resistencia a la hidrólisis en la circulación, pero se demostró que era más estable en comparación con el CAPE en plasma de rata (Yang y cols., 2010).

La obtención de CAPA se realizó por medio del método de acoplamiento de unión de amida, a partir del ácido cafeico, como se muestra a continuación en la figura No.5.



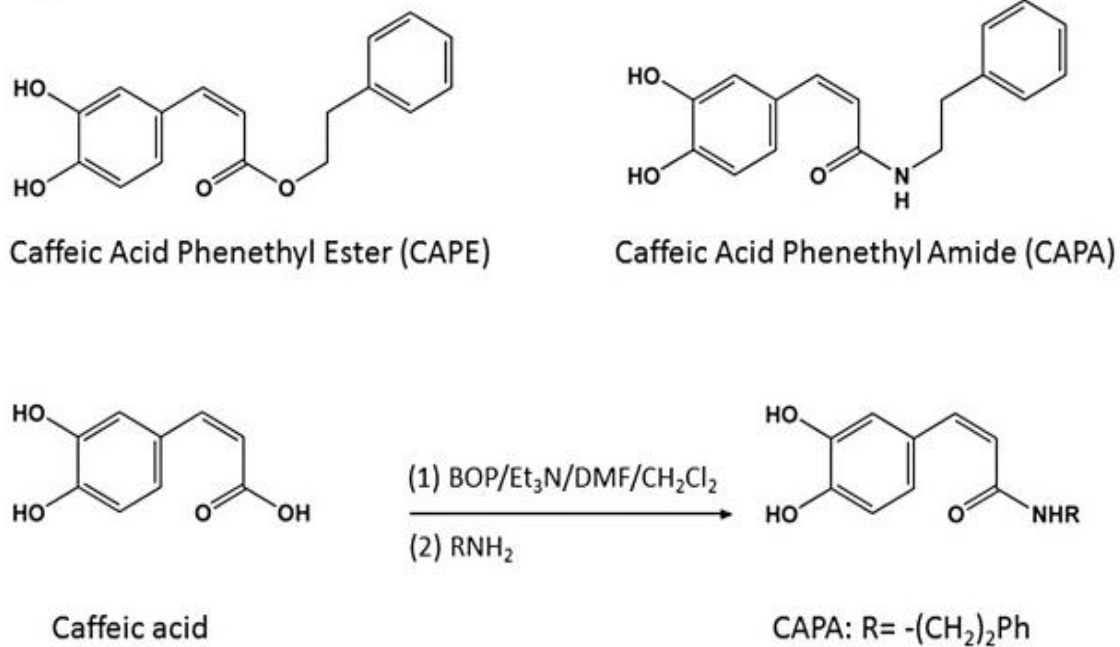


Figura. No. 5. Estructuras de CAPE y CAPA, y el proceso de síntesis de CAPA

(2) Grupo amida RNH<sub>2</sub>, (1) Fosfonio (BOP), Diclorometano (CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>), Trietilamina (Et<sub>3</sub>N), Dimetilformamida (DMF) (Yi Jin-Ho. y cols. 2013).

CAPA muestra una mayor estabilidad estructural que CAPE y disminuye los niveles de glucosa en plasma, ejerce efectos de dilatación de las arterias coronarias en ratas normales y diabéticas. CAPA también mejora la disfunción vascular en ratas diabéticas, lo que sugiere que podría ser un buen candidato para el tratamiento de complicaciones vasculares en pacientes diabéticos (Yi Jin-Ho y cols., 2013).

#### 4.4 MICRONÚCLEOS

El ADN puede ser alterado de manera espontánea o por la acción de diversos agentes. Muchas de esas alteraciones se traducen en roturas de ADN y en pérdida de material genético. Estas anomalías pueden detectarse mediante distintas técnicas moleculares y/o citogenéticas (Fenech, 2007)

Los micronúcleos (MN) son corpúsculos citoplasmáticos esféricos, detectados en interfase, más pequeños y con las mismas características morfológicas que el núcleo celular; se originan por pérdida de fragmentos cromosómicos o cromosomas enteros

durante la división nuclear y tienen valor en el diagnóstico de genotoxicidad (Castillo y cols. 2011).

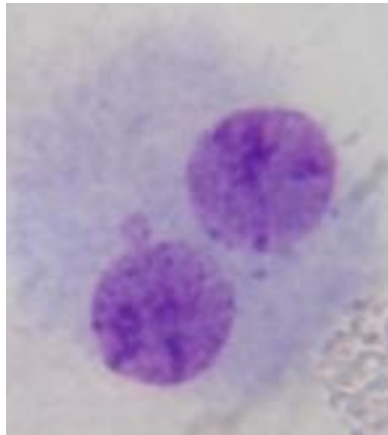


Figura No. 6. Célula binucleada con un micronúcleo.

La formación de un micronúcleo se basa en que en la anafase cualquier fragmento cromosómico que no posea centrómero no podrá integrarse a un núcleo por carecer del elemento indispensable para orientarse en el huso acromático. Después de la telofase, los cromosomas normales, así como los fragmentos que posean centrómeros, dan origen a los núcleos de las células hijas; sin embargo, los elementos rezagados que pueden ser fragmentos o cromosomas completos, quedan incluidos en el citoplasma de las células hijas, y una proporción de ellos se transforma en uno o varios núcleos secundarios; estos núcleos son mucho más pequeños que el núcleo principal y de ahí su nombre de “Micronúcleos” (Zúñiga y Gómez, 2006).

#### 4.4.1 ANTECEDENTES EN LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

Holley y Jolly detallaron la presencia de pequeños cuerpos que se tenían como el núcleo celular en el citoplasma de eritrocitos, a los cuales nombraron como “corpúsculos intraglobulares”, hoy conocidos como cuerpos de Howell-Jolly por los hematólogos Müller y Streffer en 1994. Décadas después, cuerpos similares fueron descritos por J. M. Thoday en la década de 1950, mientras estudiaba el efecto de los rayos X y las partículas alfa en células de *Vicia Faba*, siendo él quien los denominó “fragmentos nucleares” o “micronúcleos”, los cuales siguieron estudiando Carlson en 1938, Sax en 1941 y Koller en 1943; identificaron las mismas estructuras en células vegetales las cuales fueron irradiadas con rayos X. En 1959 Evans y colaboradores fueron los primeros que utilizaron el ensayo de MN para cuantificar la inducción de daño cromosómico *in vitro*, observando

que las radiaciones ionizantes provocaban una relación dosis-respuesta en células de *Vicia faba*.

Matter y Schmidt en 1971 aplicaron la técnica de MN para detectar exposiciones a mutágenos de manera *in vivo*, analizando células de medula ósea de ratón.

En 1976 Countryman y Heddle propusieron por primera vez el uso de la técnica de MN como medida de daño cromosómico en linfocitos humanos. En 1986 el ensayo de genotoxicidad fue mejorado por Fenech y Morley, los cuales implementaron el uso de la Citocalasina- B cuya función es frenar el proceso de división celular cuando la célula solo hubiese sufrido una división mitótica, desarrollando así la técnica del bloqueo de la citocinesis (Fenech, 1993); (Fenech, 2000).

En 1999 el ensayo de MN, fue validado a nivel mundial y considerado como un biomarcador efectivo de daño en el ADN (Zacalain y cols., 2005).

#### **4.4.2 LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS**

Una de las pruebas más empleadas en estudios de genotoxicidad por exposición ambiental u ocupacional en poblaciones humanas, y para determinar el potencial genotóxico de diferentes compuestos, es la evaluación de micronúcleos (MN). Esta prueba *in vitro* o *in vivo* combina facilidad en su realización, sencillez en la evaluación y una alta sensibilidad, características que han llevado a validar y recomendar su uso como prueba de genotoxicidad por instituciones como el Centro Europeo para la Validación de Métodos Alternativos y la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico OECD (Fenech, 2007).

La iniciativa internacional *The Project on Micronucleus Frequency in Human Populations* (HUMN), diseñado por Michael Fenech y Stefano Bonassi busca uniformizar el test de micronúcleos; mediante la comparación de resultados y compilación de datos de frecuencias y variaciones de diferentes laboratorios en todo el mundo para establecer un protocolo estándar (Fenech, 2007) ;(Zacalain y cols., 2005).

En muchos laboratorios, para la observación de micronúcleos se utiliza la técnica estándar de preparación cromosómica de linfocitos cultivados. En esta técnica se emplea






una solución hipotónica, necesaria para abrir las metafases y mejorar la visualización de cromosomas, eliminando además los eritrocitos. Después es seguido por la fijación de células y el lavado varias veces en soluciones de alcohol y ácido acético. Finalmente la muestra se deposita en laminillas por la técnica de goteo (Clouston, 2001);(Murli, 2003).

#### 4.4.3 CRITERIOS DE SELECCIÓN DE MICRONÚCLEOS

Como ya se había mencionado los micronúcleos son morfológicamente idénticos a los núcleos celulares pero más pequeños y deben presentar ciertas características para ser considerados dentro de la prueba de MN (Fenech, 2000); (Fenech, 2003).

El HUMN establece ciertos criterios de selección para considerar una célula apta para el análisis estadístico, citado a continuación:

Criterios de identificación de micronúcleos definidos por el HUMAM-Project (Fenech y cols., 2003).






-  Su tamaño usualmente varía entre 1/16 y 1/3 del diámetro medio del núcleo principal.
-  Los micronúcleos no deben de ser retráctiles al momento de su observación, por lo que pueden ser diferenciados fácilmente de los precipitados de tinción.
-  Los micronúcleos no deben estar enlazados o conectados a los núcleos principales.
-  Los micronúcleos pueden tocar pero no solapar los núcleos principales y la membrana del MN debe ser claramente distinguible.
-  Usualmente tienen la misma intensidad de tinción que el núcleo principal pero ocasionalmente pueden ser más intensos.

#### 4.4.4 TIPOS DE CELULAS UTILIZADAS EN EL ENSAYO DE MICRONÚCLEOS

El ensayo de MN se ha realizado con diferentes tipos celulares como son células germinales (Lähdetie y Parvinen, 1981), hepatocitos (Cllet y cols, 1989), células de hígado fetal (Cole y cols, 1981), linfocitos (Fenech y Morley, 1986); células de bazo (Shindo y cols, 1983), además de exfoliados de células que son obtenidos de la mucosa bucal, bronquio, vejiga; uréter y estómago, entre otros. Para realizar el ensayo de MN en rata, a partir de médula ósea y/o sangre periférica, el principal tipo celular utilizado son los eritrocitos inmaduros (Hayashi y cols., 2000).

Actualmente se investiga la posibilidad de utilizar la prueba de MN de manera *in vitro* en piel reconstruida humana 3D, formada a partir de la epidermis neonatal primaria derivada de queratinocitos de prepucio, este proyecto fue diseñado a raíz de la prohibición de pruebas *in vivo* de cosméticos comercializados en Europa, el cual ha prometido ser un proyecto con una mayor capacidad de predicción que el ensayo *in vitro* estándar de genotoxicidad (Kirsch-Volders y cols., 2011).

Dependiendo de las características de cada estudio y de lo que se desee evaluar, se pueden utilizar diferentes tipos celulares para aplicar el ensayo de micronúcleos. Los linfocitos de sangre periférica, como sistema celular de ensayo, presentan una serie de características que los hacen especialmente apropiados para su utilización en esta técnica, como por ejemplo (Chavez. 2006).

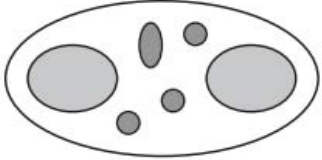
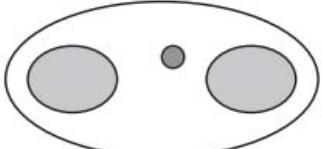
-  Son de fácil disponibilidad y se encuentran en gran número aproximadamente 1 ml de sangre contiene de 1 a 3 millones de linfocitos.
-  Su crecimiento en cultivo es fácil tras ser estimulados con un mitógeno (normalmente fitohemaglutinina).
-  Poseen una amplia distribución en el organismo lo que los hace ser apropiados para reflejar los efectos de una exposición en cualquier área del cuerpo.
-  Los linfocitos circulantes, normalmente, se encuentran en fase de no división (G0). Al cultivarlos en presencia del mitógeno se estimula la división mitótica, lo que permite el estudio de los cromosomas en metafase.
-  Los linfocitos tienen una vida media de unos cuatro años, aunque se pueden encontrar linfocitos que pueden sobrevivir durante varias décadas.

Esta propiedad es interesante, junto con el hecho de hallarse en fase de no división en el torrente circulatorio, porque permite detectar efectos clastogénicos transcurrido algún tiempo desde la exposición, ya que las lesiones en el ADN persisten.

La cantidad basal de micronúcleos varía conforme al tipo celular que se utilice para el ensayo mientras que en células de mucosa bucal se tiene una frecuencia de micronúcleos de entre 0.3 a 4.7% en 1000 células, en linfocitos oscila entre 3 y 23% (Surralles y Natarajan, 1997). La frecuencia basal varía dependiendo de diversos factores como la raza y el sexo encontrando que en las mujeres la frecuencia de MN es de aproximadamente 1.4 veces mayor a la de los hombres debido a la pérdida aleatoria del cromosoma X inactivo, lo que puede retrasarse en la anafase como resultado de centrómero defectuoso o función del cinetocoro (Fenech, 1993) la frecuencia incrementa también cuando se superan los 35 años de edad, existe deficiencia de folato y vitamina B12, por tratamientos médicos y procesos biológicos como la menopausia y osteoporosis (Zalacain y cols., 2005) a medida que aumenta la edad, aumenta también la cantidad de MN independientemente del sexo (Fenech y Morley., 1986).

A continuación se enlistan algunos de los factores que influyen en la frecuencia de micronúcleos.

Tabla No. 5 Factores que influyen en la frecuencia de micronúcleos (Fenech, 2007).

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

#### 4.4.5 AGENTES INDUCTORES DE MICRONÚCLEOS

Se puede determinar el origen de un MN mediante el centrómero, si el micronucleo presenta una marca centromerica significa que fue formado por un cromosoma completo, esto puede traducirse a la acción de un posible agente aneugénico, el cual se ha relacionado con la formación de abortos espontáneos, retraso mental, y carcinogénesis. En cambio si el cromosoma no muestra una marca centromerica significa que se formó de un fragmento acéntrico, producto de una rotura cromosómica, la cual se traduce en la acción de un posible agente clastogénico.

Los agentes formadores de MN se pueden clasificar de dos tipos en base a su mecanismo de acción, existiendo agentes clastogénicos y aneugénicos (Chavez. 2006).

*CLASTOGÉNICOS:* Pueden ser análogos de base y actúan intercalándose en el ADN, inhibiendo su síntesis y ocasionan posteriormente un debilitamiento de enlaces lo que provoca una rotura cromosómica (Beaula, 1991). Cuando un agente clastogénico produce roturas en la fase S del ciclo celular, este se denomina agente S-dependiente y aquellos que no necesitan pasar por la fase S del ciclo celular para generar una rotura en el ADN son denominados agentes S-independientes (Chavez, 2006).

*ANEUGÉNICOS:* Bloquean la formación del huso mitótico, originando el rezago de cromosomas completos los cuales no se incluyen en los núcleos hijos (Yamamoto y Kikuchi, 1980).

Un ejemplo de agente S- dependiente es la Mitomicina C (MMC), la cual es una sustancia utilizada ampliamente en la terapia antitumoral de pulmón, estómago, cabeza, cuello, próstata, mama, y tumores vesicales. Se ha utilizado como un agente citotóxico desde 1960 (Cetina y cols., 2006) pues es capaz de producir la muerte a células que se dividen, al bloquear su replicación. La Mitomicina C es derivado de la bacteria *Streptomyces caespitosus* y cuando es activado actúa como un agente alquilante el cual se une covalentemente a la molécula de ADN (Younghwa y cols., 2001), reaccionando casi exclusivamente con el N<sup>2</sup> de la guanina formando enlaces intra o intercatenarios dando como resultado una rotura de tipo cromatídico, sin embargo, la MMC también es capaz de inducir aneuploidía y producir un retraso en el ciclo de división celular en los cultivos de células de mamíferos.

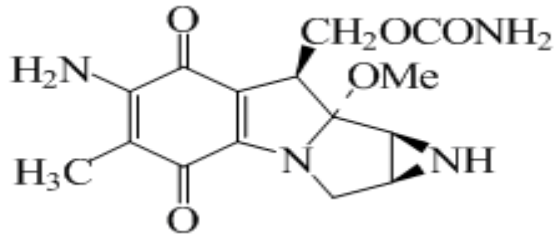


Figura No. 7. Estructura química de la MMC.

La capacidad como agente anéugeno de la MMC parece ser debido al daño que se produce en la estructura trilaminar del cinetocoro, impidiendo la correcta unión de los cromosomas al huso mitótico (Ortiz y cols. 2004).

La MMC es un agente que induce micronúcleos en la primera división celular después de su administración, alcanzando su punto máximo de formación de micronúcleos a las 32 horas.

La MMC aun en dosis bajas muestra una citotoxicidad leve y de expresión tardía. La inducción de MN ocurre en el primer ciclo de la división celular y es independiente del efecto citotóxico (Morales y cols., S/A).

#### 4.4.6 REQUERIMIENTOS DE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

Uno de los requisitos del ensayo de MN es la necesidad de que ocurra la división celular para que el daño genético se pueda manifestar en forma de MN. Al encontrarse generalmente en estado no proliferativo, los linfocitos necesitan de una estimulación durante el cultivo, este estímulo normalmente se realiza con la adición del mitógeno Fitohemaglutinina (PHA), un extracto de la judía *Phaseolus vulgaris*, la cual se encarga de estimular la mitosis en diferentes estirpes celulares, incluidos los linfocitos, haciendo que reingresen a su ciclo celular y puedan dividirse (Ruiz y cols. 2005).

Cada sustancia química puede tener un efecto tóxico potencial en cada estadio del ciclo celular. Las células son más sensibles a los posibles efectos genotóxicos durante las fases en el siguiente orden S, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub> y M, razón por la cual es importante exponer los



cultivos celulares cuando están dividiéndose. Se debe de considerar el periodo entre el tratamiento y la recolección de la muestra, ya que la presencia de MN requiere de un ciclo celular completo (Fenech, 2000).

Los micronúcleos al ser aberraciones inestables tienden a desaparecer a lo largo de las divisiones celulares; por lo que es indispensable conocer si una célula se ha dividido y cuántas veces lo ha hecho.

Para averiguar si las células se han dividido o no, se han descrito diferentes métodos. El método introducido por Pincu y colaboradores, consistía en el marcado de las células con bromodesoxiuridina y timidina tritiada; su baja eficacia y el hecho de que causase daño *per se* determinó que se dejara de utilizar, en 1985 Fenech y Morley como ya se había mencionado propusieron utilizar la citocalasina-B (cyt-B) para inhibir la citocinesis celular (Fenech, 2007).

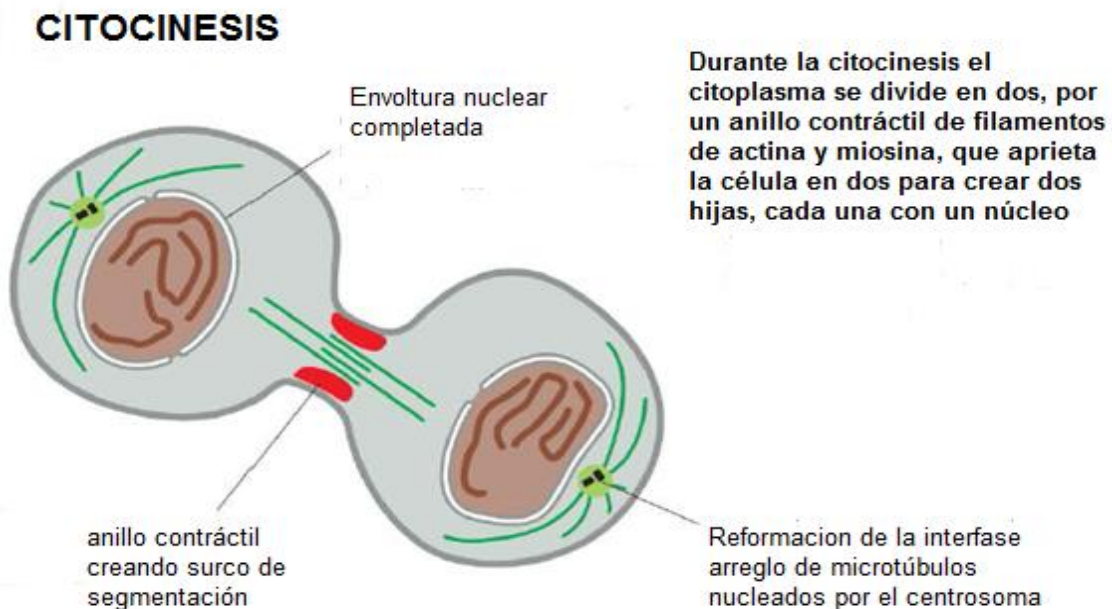


Figura No. 8. Formación de la citocinesis (Fenech, 2007).

La cyt-B, es una sustancia que proviene del hongo *Helminthosporium dematoideum*, la cual impide la polimerización de las fibras de actina y, por lo tanto, del anillo

microfilamentoso requerido para la división del citoplasma después de la telofase. Las células llevarán a cabo todo su ciclo celular normalmente hasta llegar al final de la telofase cuando la célula no se divide y los dos núcleos hijos quedan englobados dentro de una misma membrana citoplasmática. Así, las células que han sufrido una división celular se distinguirán fácilmente por su aspecto binucleado y las que han experimentado más de una división por su aspecto polinucleado (Fenech. 1993); (Kirsch-Volders y cols. 2000).

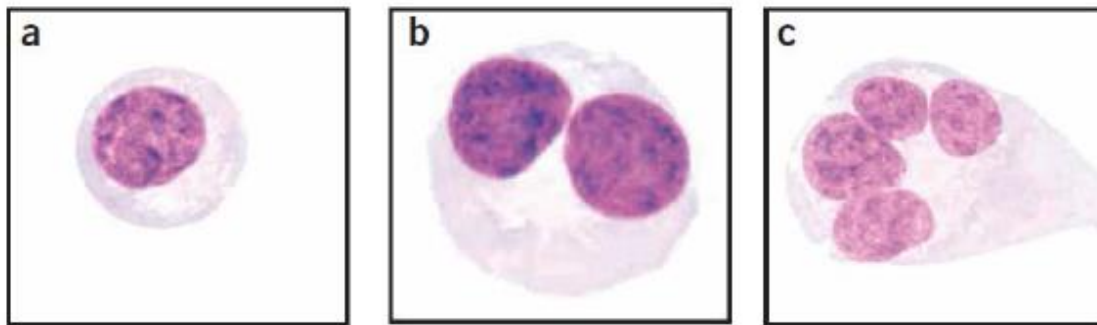


Figura No. 9. Se muestran A) células mononucleadas sin división celular, B) células Binucleadas con una división celular y C) células Polinucleada con más de una división celular (Fenech. 2007).

En un inicio se recomendaba que sólo se contaran los MN obtenidos en células binucleadas, debido a que estas células han sufrido una división nuclear. Por lo que casi no se prestaba atención a las células mononucleadas con MN, sin embargo, estudios recientes han indicado que agentes aneugénicos inducen MN también en células mononucleadas, por lo que esto ayudaría a la evaluación e identificación de agentes aneugénicos y clastogénicos en un mismo estudio (Rosefort y cols., 2004)

Estudios de Antocchia y colaboradores mostraron que parece existir una interacción entre la cyt-B y los agentes aneugénicos, ya que los micronúcleos producidos por estos agentes podrían verse alterados por la acción que la cyt-B ejerce sobre los microfilamentos de actina. Lo cual podría dar resultados poco reproducibles o contradictorios, al subestimar la frecuencia de MN, en ensayos donde se evalúan agentes aneugénicos (Antocchia y cols., 1993).

La prueba de micronúcleos en linfocitos humanos de sangre periférica por bloqueo de la citocinesis con Citocalasina B, es más sensible y precisa para evaluar daño cromosómico

porque permite registrar micronúcleos originados de fragmentos de cromosomas o cromosomas enteros en células que se han dividido una sola vez (Ocampo. 2002).

Uno de los objetivos principales del proyecto HUMN es identificar las variables metodológicas importantes en el rendimiento de la prueba y la puntuación de micronúcleos (MN) de modo que sus efectos de confusión sean una minoría. Esto permitirá una mejor precisión del ensayo para la detección de eventos genotóxicos y, por tanto, aumentar la fiabilidad del método para comparar las tasas de daño al ADN entre individuos y poblaciones e identificar las condiciones de exposición que inducen aumentos en MN (Fenech. 2003).

El HUMN desarrolló una serie de criterios para la selección de células binucleadas en las que puede determinarse la presencia de micronúcleos y puentes nucleoplásmicos (Fenech. 2003)

El ensayo de CBMN debe tener las siguientes características:

- ✎ Las células deben ser binucleadas.
- ✎ Los dos núcleos en una célula binucleada deben tener membranas nucleares intactas y deben de encontrarse dentro del mismo límite citoplasmático.
- ✎ Los dos núcleos en una célula binucleada deben ser aproximadamente del mismo tamaño, con la misma tinción y la misma intensidad de tinción.
- ✎ Los dos núcleos dentro de una célula BN pueden estar unidos por un puente nucleoplásmico, que no sea más ancho que un cuarto del diámetro nuclear mayor.
- ✎ Los dos núcleos principales en una célula BN se pueden tocar, pero idealmente no deben superponerse entre sí. Una célula con dos núcleos superpuestos se puede marcar sólo si los límites nucleares de cada núcleo son distinguibles.
- ✎ El límite citoplasmático o membrana de una célula binucleada debe ser distinguible del límite citoplasmático de células adyacentes.

El ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis se ha ido refinando con el tiempo y además de evaluar la tasa de daño genético mediante los MN (información genotóxica), permite estimar paralelamente el retraso mitótico, que se traduce en información citotóxica, cuantificando el número de células que no se han dividido (mononucleadas), las que se han dividido una vez (binucleadas) y más de una vez (polinucleadas), mediante

el índice de proliferación celular; el cual se encarga de estimar los ciclos de división celular (Surrallés y cols., 1995).

El ensayo de CBMN también permite evaluar la reparación por escisión y si se realiza conjuntamente con una tinción fluorescente, permite detectar la no disyunción (Kirsch-Volders., 1997). En ocasiones son observados, además, puentes nucleoplásmicos entre los núcleos de las células binucleadas. Estos se originan de cromosomas dicéntricos y proveen una medida complementaria del reordenamiento cromosómico (Fenech, 2000).

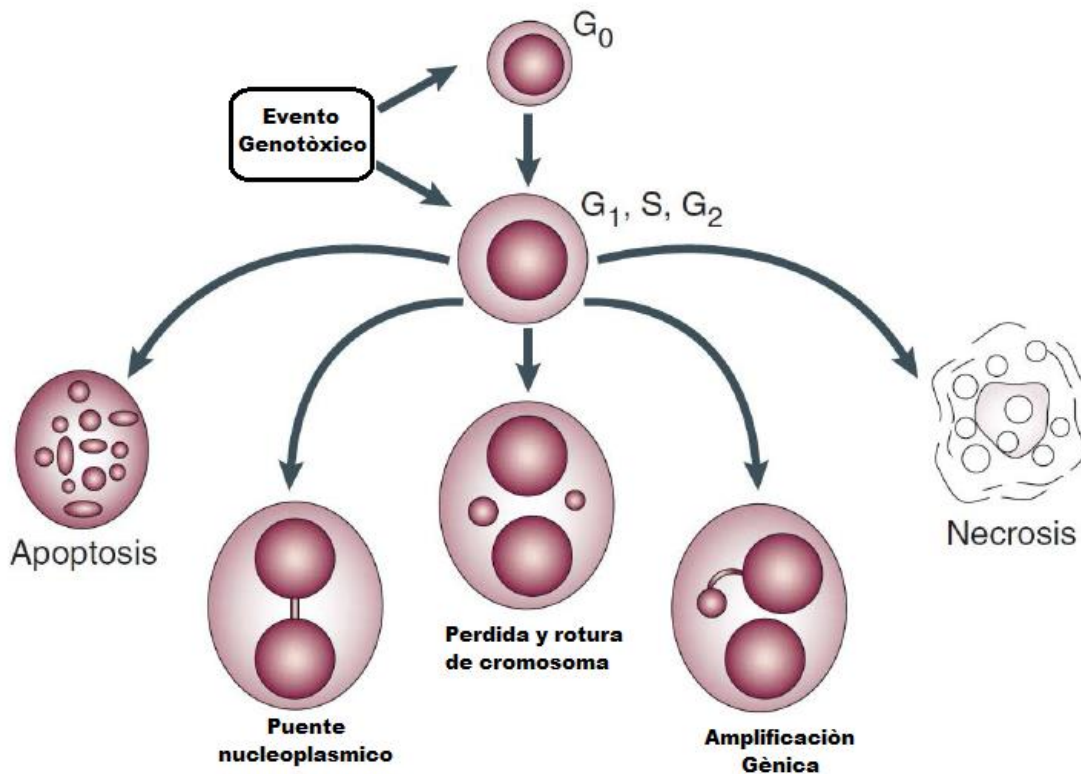


Figura No. 10. Daños al ADN y muerte celular, efectos que pueden detectarse en el ensayo de CBMN (Fenech, 2007).

Aunque en teoría los linfocitos en cultivo se dividan de forma sincronizada, en la práctica no ocurre de forma similar en todas las células del cultivo, por esta razón es que en un mismo cultivo podemos encontrar células mono, bi, y tetra nucleadas, células en vías de apoptosis y necrosis, de estas últimas es importante conocer sus características para que puedan ser eliminadas del recuento celular.

Las células en vías de apoptosis se caracterizan por presentar cromatina condensada, que en etapas tempranas puede manifestarse como cromatina marginal, la cual conforme avanza el proceso apoptótico, culmina en la fragmentación del material nuclear, quedando este disperso en el citoplasma, reflejándose en una tinción más oscura con respecto a la habitual (Zalacain y cols. 2005).

#### 4.4.7 VENTAJAS Y DESVENTAJAS DE LA PRUEBA DE MICRONÚCLEOS

A continuación se enlistan algunas de las muchas ventajas que tiene el ensayo de micronúcleos (Kirsh-Volders y cols., 1997) ;(Fenech, 2003).

##### VENTAJAS

- ✎ Una de sus principales ventajas es que es una prueba que puede detectar varias lesiones en el ADN, en un mismo ensayo. Como son:
  - ✎ Roturas de doble cadena y cadena simple del ADN (Las cuales originan MN).
  - ✎ Formación de puentes nucleoplasmicos, generados por la presencia de cromosomas dicéntricos.
  - ✎ Amplificación génica, mecanismo por el cual el ADN amplificado es eliminado de las células (Se observa cuando un MN es expulsado del núcleo pero sigue unido a él por un puente).
  - ✎ Apoptosis, se mide mediante la frecuencia de núcleos condensados.
- ✎ La prueba de micronúcleos es una técnica simple, de fácil recuento y con un costo reducido.
- ✎ Se puede analizar un gran número de células en poco tiempo.
- ✎ Es una prueba en la que se pueden utilizar diferentes tipos celulares (células sanguíneas, células epiteliales, células uroteliales, etc.).
- ✎ Presenta la posibilidad de dar una estimación de daño, bajo condiciones controladas y sin el uso de animales de experimentación.
- ✎ Es posible evaluar efectos meses después de que haya ocurrido la exposición

En esta prueba, como en todo ensayo, se deben de cuidar aspectos para evitar malas interpretaciones de los resultados obtenidos. A continuación se enlistan algunas de las

desventajas de la prueba de micronúcleos (Fenech y Morley, 1986);(Fenech, 1993); (Surralles y cols., 1995).

### *DESVENTAJAS*

- ✎ Pueden existir varios factores de confusión que modulan la frecuencia de micronúcleos los cuales deben ser considerados en el análisis (Edad, Sexo, Raza, etc.).
- ✎ Por ser un estudio de biomonitorización a veces es difícil interpretar los datos por la variabilidad interindividual, atribuible a un error experimental hasta en un 67%.
- ✎ La variabilidad en los criterios de conteo celular, representa el 45% de la variabilidad total.
- ✎ Las diferencias de protocolo en cuanto a la técnica y manipulación de distintos laboratorios son una fuente importante de variabilidad al comparar resultados.
- ✎ Una técnica de tinción mal realizada o deficiente puede interferir en la estimación de micronúcleos.
- ✎ El tabaquismo y la exposición a agentes genotóxicos involuntariamente, pueden interferir en una evaluación poblacional.



## 5. JUSTIFICACIÓN

Todo el tiempo el ser humano está expuesto a agentes mutagénicos ya sean físicos o químicos los cuales causan daño a nivel celular, desencadenando enfermedades graves como el cáncer, por ello es necesario la investigación y el desarrollo de nuevos fármacos con actividad anticancerígena y con menos efectos adversos; que ayuden en el tratamiento de esta enfermedad. Hay varios estudios que demuestran la efectividad protectora del CAPE frente a algunos tipos de cáncer, por lo que en este estudio se trabajó con el compuesto LQM 731 el cual es un análogo amídico halogenado del CAPE, en donde por medio de la técnica de micronúcleos en células binucleadas, se evaluó si el LQM 731 *per se* ejerce daño citotóxico y si es capaz de reducir el daño provocado por la MMC en un cultivo de linfocitos humanos de manera *in vitro*.

## 6. OBJETIVOS

Determinar si el compuesto análogo amídico halogenado del CAPE (LQM 731) es un citoprotector del daño provocado por la Mitomicina C en un cultivo de linfocitos humanos con la técnica *in vitro* de micronúcleos en células binucleadas.

### 6.1 OBJETIVOS PARTICULARES

-  Determinar la frecuencia de células binucleadas micronucleadas en un cultivo de linfocitos humanos expuesto a diferentes concentraciones del compuesto LQM 731 con y sin reto del mutágeno (Mitomicina C), como medida del efecto genotóxico y antígenotóxico que pudiera presentar el compuesto LQM 731.
-  Determinar como parámetro citotóxico del compuesto LQM 731 la frecuencia de células binucleadas en los diferentes tratamientos de los cultivos celulares.

## 7. HIPÓTESIS

Si el CAPE *per se* ha demostrado efectos citoprotectores en estudios anteriores, entonces su análogo amídico halogenado el compuesto LQM 731 presentara características similares y conservara estas propiedades para revertir el daño causado por el mutágeno MMC en un cultivo de linfocitos humanos de manera *in vitro*.



## 8. MATERIAL Y METODOLOGÍA

### Material Biológico:

- ✎ Linfocitos humanos obtenidos de sangre periférica completa heparinizada extraída por venopunción de 2 donadores:

✎ Donador 1	✎ Donador 2
✎ Sexo masculino	✎ Sexo femenino
✎ Edad 25 años	✎ Edad 27 años
✎ Sano	✎ Sano
✎ No fumador	✎ No fumador

Observaciones: 2 días previos a la toma de muestra los donadores no ingirieron alcohol, medicamentos, ni sustancias tóxicas.




















### Compuestos:

- ✎ Control positivo: Mitomicina C (0.15 µg/mL)
- ✎ Control negativo: DMSO (100%)
- ✎ Compuesto de prueba: LQM 731 proporcionado y sintetizado por el laboratorio de Química Medicinal a cargo del Dr. Enrique Ángeles Anguiano de la FESC-1 UNAM.
- ✎ Citocalasina B (6 µg/mL)

### Soluciones y Reactivos:

- |   |                                   |
|---|-----------------------------------|
| ✎ Alcohol Etílico 95%                         | ✎ Medio de cultivo RPMI 1640      |
| ✎ Alcohol Metílico                            | ✎ NA <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
| ✎ Antibiótico: Estreptomicina-Penicilina (1%) | ✎ Ácido Acético Glacial           |
| ✎ Suero Fetal Bovino (SFB)                    | ✎ Agua inyectable                 |
| ✎ KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>             | ✎ Agua destilada                  |
| ✎ Heparina                                    | ✎ Agua desionizada                |
| ✎ Fitohemaglutinina (PHA)                     |                                   |
| ✎ Colorante Giemsa                            |                                   |
| ✎ KCL 0.075 M                                 |                                   |

### Equipo de laboratorio:

-  Mechero
-  Jeringas de 1, 3, 5, 10 mL desechables
-  Campana de Flujo Laminar
-  Vaso Coplin
-  Frascos de cultivo estériles con tapón
-  Portaobjetos
-  Potenciómetro
-  Pipetas Pasteur
-  Piseta
-  Pinzas
-  Micropipetas 10-100  $\mu\text{L}$  y 100-1000  $\mu\text{L}$
-  Puntas estériles para Micropipetas
-  Microscopio Óptico
-  Centrifuga
-  Vasos de precipitados
-  Algodón
-  Embudo de vidrio
-  Papel filtro
-  Papel aluminio

## METODOLOGÍA

Metodología para el Cultivo Celular.

1. Obtener una muestra de sangre venosa de cada donador por medio de una jeringa previamente heparinizada.
2. Adicionar a cada frasco de cultivo estéril 5 mL de medio de cultivo previamente preparado con PHA, y FBS, más 0.25 mL de sangre.
3. Mezclar e incubar en la estufa a 37° C con 5% de CO<sub>2</sub> por 44 horas, para favorecer la proliferación celular.
4. Transcurridas las 44 horas, adicionar a cada frasco las soluciones correspondientes según la tabla No. 6.

Tabla No. 6 Volúmenes y soluciones agregadas en cada sistema de trabajo.

SISTEMAS	FRASCOS	ANTIBIOTICO	CITOCALACINA B	COMPUESTO LQM 731	DMSO 100 %	MMC
CONTROL -	DMSO 100%	10 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$		30 $\mu\text{L}$	
CONTROL +	MMC 0.15 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$			30 $\mu\text{L}$
Concentración 1	LQM 10 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	20 $\mu\text{L}$		<b>30 <math>\mu\text{L}</math></b>
Concentración 2	LQM 20 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	40 $\mu\text{L}$		<b>30 <math>\mu\text{L}</math></b>
Concentración 3	LQM 30 $\mu\text{g/mL}$	10 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$	60 $\mu\text{L}$		<b>30 <math>\mu\text{L}</math></b>

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

5. La evaluación Genotóxica se realiza sin reto del mutágeno (MMC) en los sistemas de la concentración de LQM 731 y la evaluación **Antigenotóxica** se realiza con reto del mutágeno (MMC) en los sistemas de la concentración de LQM 731.
6. Transcurridas las 72 horas, se procede a realizar la cosecha celular.

Metodología para la Cosecha Celular:

1. Vaciar el contenido celular de cada frasco de cultivo a tubos de ensayo previamente marcados con cada donador.
2. Centrifugar el contenido de los tubos a 3000 rpm durante 10 min y retirar sobrenadante.
3. Adicionar 5 mL de KCL 0.075 M a 37 °C, resuspender el paquete celular e incubar durante 30 minutos a la misma temperatura.
4. Volver a centrifugar durante 5 minutos y desechar sobrenadante.
5. Agregar lentamente y con agitación constante 5 mL de solución fijadora metanol-ácido acético (6:1) recién preparada y a -4°C (Respetar la temperatura).
6. Centrifugar durante 5 minutos desechar sobrenadante y repetir 2 veces más el paso 3 y 4.
7. En la última centrifugación dejar 1 mL de la solución fijadora para resuspender el paquete celular tomar un poco de este con una pipeta Pasteur y realizar preparaciones celulares por goteo (Gotear a una distancia no mayor de 10 cm).
8. Dejar secar, teñir con Giemsa durante 12 minutos y observar al microscopio. La tinción se realiza en un vaso Coplin con 40 mL de agua destilada, 5 mL de colorante Giemsa y 5 mL de buffer de fosfatos a pH 6.8 (Filtrar Previamente el colorante Giemsa en un embudo de vidrio, para evitar precipitados).
9. La evaluación del daño citotóxico y genotóxico se lleva a cabo mediante la observación de las laminillas al microscopio, realizando el siguiente conteo celular:
  - ✂ En 1000 células totales determinar el número de células binucleadas (CB)
  - ✂ En 1000 células binucleadas determinar el número de células binucleadas micronucleadas (CBMN).

## 8.1 DIAGRAMA DE FLUJO EXPERIMENTAL

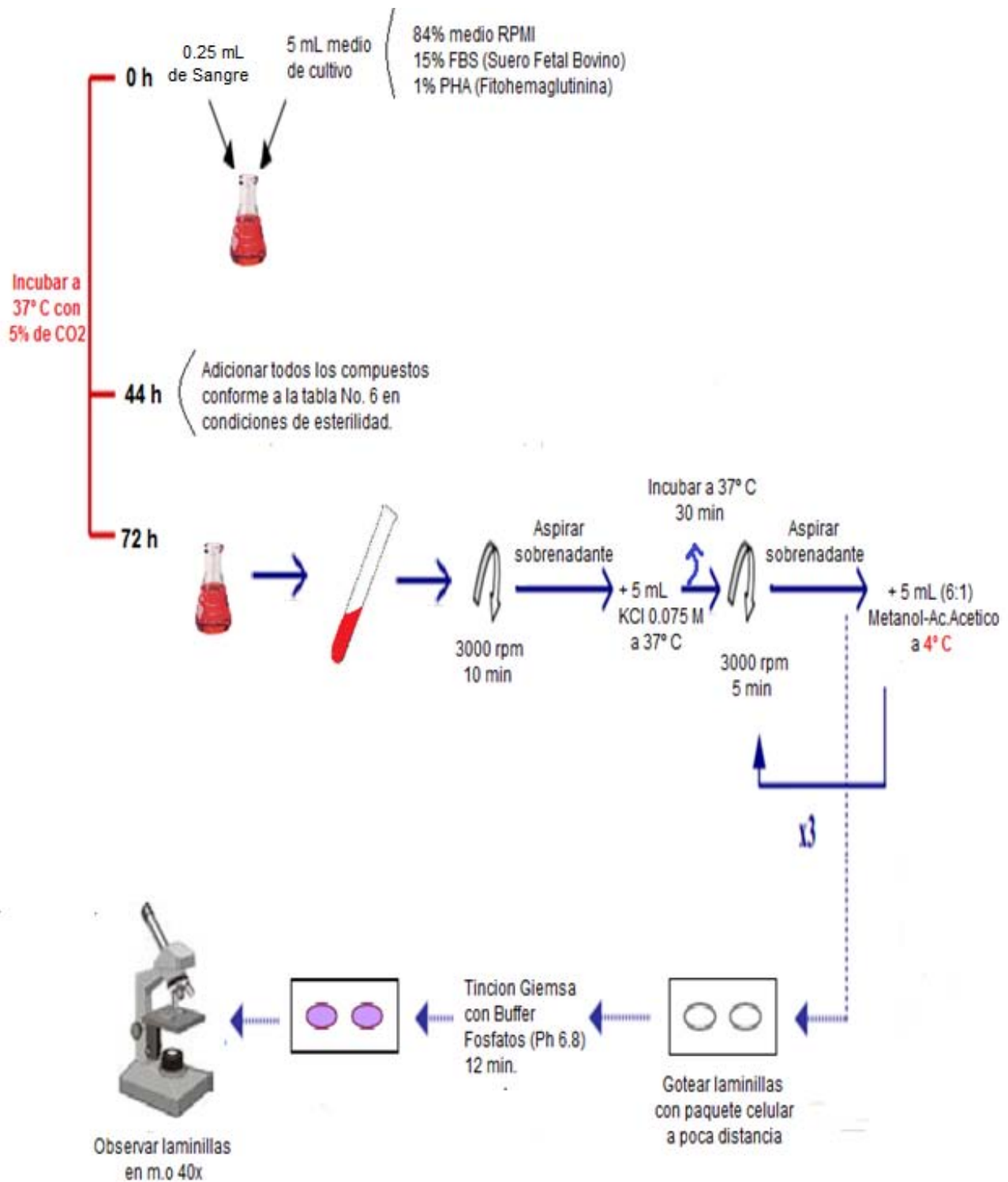


Figura No.11. Protocolo del ensayo de CBMN en linfocitos de sangre periférica.

## 9. RESULTADOS

La tabla No.7 Muestra los resultados de todas las lecturas obtenidas en cada tratamiento del donador 1.

Tabla No. 7 Frecuencia de CB y CBMN en cada tratamiento del donador 1.

ACTIVIDAD CITOTÓXICA CON Y SIN RETO DEL DONADOR 1								
TRATAMIENTO	Control -	Control +	Conc. 1	Conc. 1 + MMC	Conc. 2	Conc. 2 + MMC	Conc. 3	Conc. 3 + MMC
CT	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
CBN	463	345	375	320	281	276	230	181
	429	390	323	328	270	262	257	198
MEDIA	446	367.5	349	324	275.5	269	243.5	189.5
SEM +/-	17	22.5	26	4	5.5	7	13.5	8.5
ACTIVIDAD GENOTÓXICA CON Y SIN RETO DEL DONADOR 1								
CBNT	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
CBMN	1	54	19	13	29	25	40	32
	2	55	23	15	32	23	46	35
MEDIA	1.5	54.5	21	14	30.5	24	43	33.5
SEM +/-	0.5	0.5	2	1	1.5	1	3	1.5

CT= CELULAS TOTALES, CB= CELULAS BINUCLEADAS, CBT= CELULAS BINUCLEADAS TOTALES, CBMN= CELULAS BINUCLEADAS MICRONUCLEADAS.

La tabla No.8 Muestra los resultados de todas las lecturas obtenidas en cada tratamiento del donador 2.

Tabla No. 8 Frecuencia de CB y CBMN en cada tratamiento del donador 2.

ACTIVIDAD CITOTÓXICA CON Y SIN RETO DEL DONADOR 2								
TRATAMIENTO	Control -	Control +	Conc. 1	Conc. 1 + MMC	Conc. 2	Conc. 2 + MMC	Conc. 3	Conc. 3 + MMC
CT	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
CB	427	350	395	347	290	270	250	172
	443	355	315	368	350	281	227	196
MEDIA	435	352.5	355	357.5	320	275.5	238.5	184
SEM +/-	8	2.5	40	10.5	30	5.5	11.5	12
ACTIVIDAD GENOTÓXICA CON Y SIN RETO DEL DONADOR 2								
CBT	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000	1000
CBMN	3	61	25	19	32	24	41	31
	3	50	18	17	30	22	48	33
MEDIA	3	55.5	21.5	18	31	23	44.5	32
SEM +/-	0	5.5	3.5	1	1	1	3.5	1

CT= CELULAS TOTALES, CB= CELULAS BINUCLEADAS, CBT= CELULAS BINUCLEADAS TOTALES, CBMN= CELULAS BINUCLEADAS MICRONUCLEADAS.

La cantidad de células evaluadas en los conteos fueron de 1000 células totales y 1000 células binucleadas de cada laminilla, de las cuales se leyeron por duplicado en cada tratamiento, obteniendo su media y error estándar de la muestra. Para analizar los resultados de este estudio se utilizó el análisis de Varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple Tukey-Kramer, método por el cual se pueden comparar los distintos tratamientos con los controles negativo y positivo, así como entre ellos.

EVALUACION CITOTÓXICA Y GENOTÓXICA CON Y SIN RETO DEL COMPUESTO LQM 731.

DONADOR 1

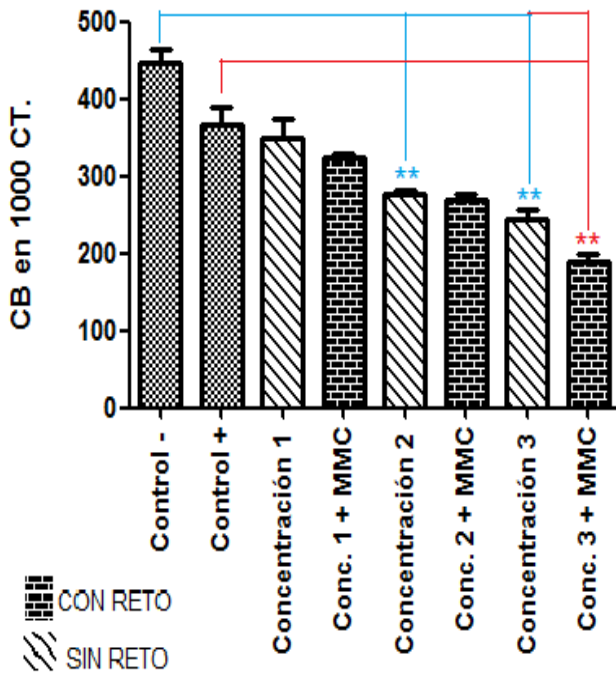


Figura No.12. Evaluación Citotóxica con y sin reto, del donador (1) en cada uno de los sistemas del compuesto LQM 731, con una  $F=24.96$ , y diferencias altamente significativas (\*\*) con una  $p<0.05$ , contra el control negativo y positivo respectivamente.

DONADOR 2

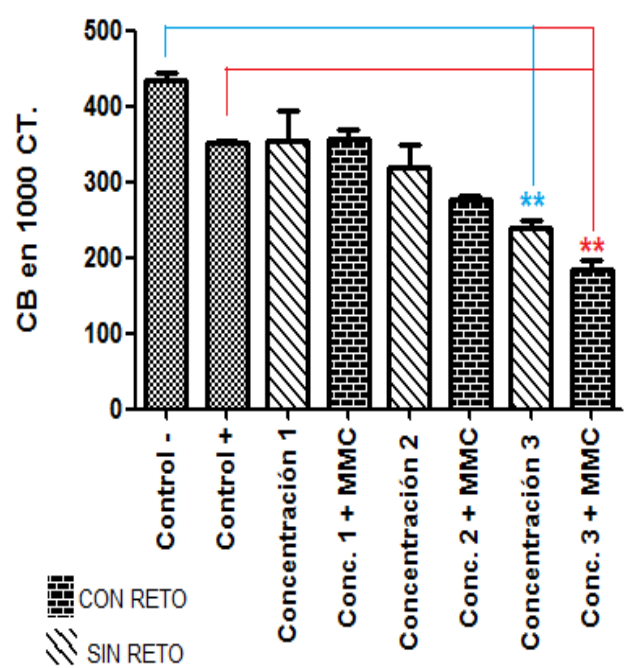


Figura No.13. Evaluación Citotóxica con y sin reto, del donador (2) en cada uno de los sistemas del compuesto LQM 731, con una  $F=14.85$ , y diferencias altamente significativas (\*\*) con una  $p<0.05$ , contra el control negativo y positivo respectivamente.

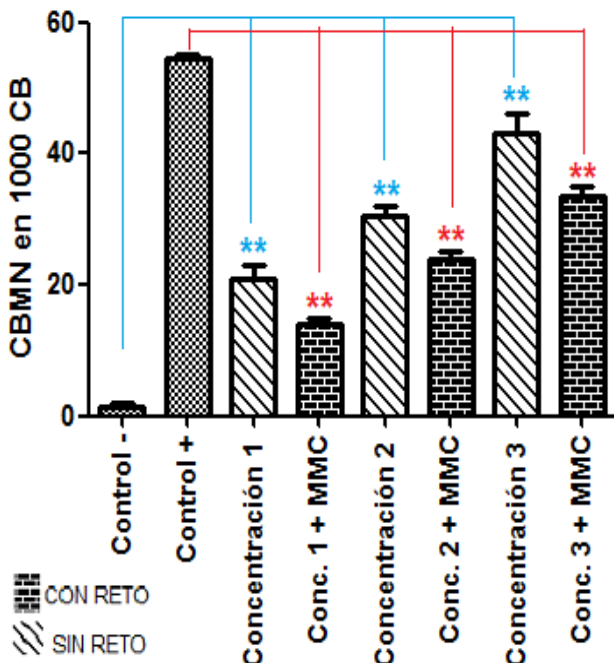


Figura No.14. Evaluación Genotóxica con y sin reto, del donador (1) en cada uno de los sistemas del compuesto LQM 731, con una  $F=195.1$ , y diferencias altamente significativas (\*\*) con una  $p<0.05$ , contra el control positivo y negativo respectivamente.

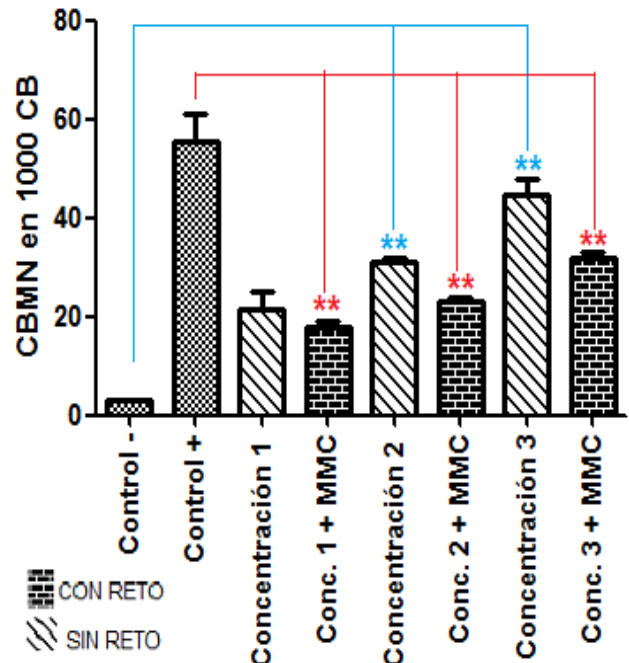


Figura No.15. Evaluación Genotóxica con y sin reto, del donador (2) en cada uno de los sistemas del compuesto LQM 731, con una  $F=35.64$ , y diferencias altamente significativas (\*\*) con una  $p<0.05$ , contra el control positivo y negativo respectivamente.

## 10. DISCUSIÓN

Actualmente existe una gran necesidad de desarrollar nuevos fármacos antineoplásicos, los cuales tengan menos efectos adversos, sean de fácil manufactura no tan costosos, y desarrollen actividad antiproliferativa en células tumorales. La utilización de fármacos naturales y sus análogos cada vez toma más fuerza en este ámbito ya que los pacientes diagnosticados con algún tipo de cáncer implementan dentro de su tratamiento medicina alternativa de este tipo.

Por esta razón es necesario estudiar compuestos naturales en donde a partir de ellos se puedan obtener moléculas efectivas en el tratamiento contra el cáncer, uno de los grupos de investigadores mexicanos dedicados a esta actividad son el Dr. Saúl Villa y colaboradores, Olga Beltrán y colaboradores y el Dr. Enrique Ángeles Anguiano en la FES Cuautitlán; en donde se sintetizaron toda una familia de compuestos análogos del CAPE denominada compuestos CAPA de la serie LQM 700, de donde forma parte el compuesto estudiado en esta tesis, el LQM 731. Por las características químicas de este compuesto se encuentra aún en estudios previos a su patente, pero al ser un derivado amídico halogenado del CAPE se espera tenga actividades biológicas similares.

Ya se han citado con anterioridad estudios sobre la gran cantidad de propiedades que muestra el CAPE tanto en sistemas *in vivo* como de manera *in vitro*, por lo que en este trabajo se evaluaron las propiedades citotóxicas y genotóxicas del compuesto LQM 731 con y sin reto en cultivos de linfocitos humanos.

La técnica de CBMN es utilizada en un cultivo primario de linfocitos humanos porque son células de fácil obtención y cultivo; hay estudios contradictorios sobre la utilización de linfocitos criopreservados, existiendo interferencia entre la cantidad de MN en células binucleadas y la criopreservación (Burrill y cols. 2000), por lo que se optó a realizar el estudio en células recién obtenidas.

Debido a las diferencias que pudieran existir en la inducción de CBMN en relación a la edad y el sexo, en el presente estudio se realizó un análisis estadístico de prueba "t"  $\alpha=0.05$ , el cual demostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los donadores de las muestras de linfocitos, ni en la frecuencia de CB/CT, ni en la cantidad de CBMN/CB. Una vez comprobada la ausencia de diferencias entre donadores se prosiguió a realizar el análisis estadístico ANOVA y prueba de Tukey con los datos de

ambos donadores para determinar la actividad citotóxica, genotóxica y antigenotóxica del compuesto LQM 731.

Los análisis estadísticos mencionados pusieron de manifiesto la validez de los sistemas que fueron utilizados como controles, de los cuales se utilizó a la MMC (0.15 µg/mL) como control positivo por ser un potente antineoplásico el cual ha funcionado muy bien como mutágeno en ensayos de MN según Madrigal-Bujaidar en 1996. En nuestro estudio se observa que obtuvo una disminución de CB con respecto al control negativo, lo que indica que la MMC ejerció su efecto citotóxico, aunque no presentó diferencias estadísticamente significativas contra el control negativo debido a la concentración de MMC utilizada. Como control negativo se utilizó el DMSO al 100% por ser un compuesto que tiene muchas propiedades farmacológicas y es de baja toxicidad; por ello se utilizó también como vehículo del compuesto LQM 731 y de la citocalasina B en nuestro estudio.

Se utilizó al compuesto LQM 731 en 3 concentraciones diferentes de 10 20 y 30 µg/mL, en cultivos aislados para evaluar su actividad citotóxica y genotóxica *per se*, y en otros cultivos con y sin reto del mutágeno MMC para ver si el compuesto era capaz de revertir el daño provocado por la MMC, o si efectuaría un efecto aditivo o sinérgico, en cuanto a la cantidad de CB y CBMN encontradas respectivamente.

Los cultivos donde solo se adiciona LQM 731 mostraron una disminución de CB conforme se aumentó la concentración del compuesto, observando que en el donador 1 el compuesto LQM 731 ejerce citotoxicidad en la dosis de 20 µg/mL al presentar diferencias altamente significativas contra el control negativo, y el donador 2 presenta citotoxicidad hasta la dosis más alta de 30 µg/mL con respecto al control negativo, estos resultados no son significativos entre si ya que como se había mencionado se verificó que no existiera diferencias entre donadores lo cual las excluye de los resultados obtenidos, atribuyéndosele a la citotoxicidad inherente que presenta el compuesto.

La actividad citotóxica es de suma importancia para la determinación de un buen fármaco antineoplásico ya que se espera sea reproducible en células malignas, como lo fue en estudios de Ruiz Sánchez en el 2012 donde el LQM 731 mostró actividad citotóxica en líneas celulares cancerígenas, MDA-MB 231 (cáncer de mama), HeLa (Cancer de cérvix) y PC-3 (cáncer de próstata), evaluadas con la técnica de Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolico (MTT), en donde se presentó un porcentaje de viabilidad celular de 13.70% para cáncer de mama, 22.14% en cáncer de cérvix y 29% para cáncer



de próstata, así como para la técnica de Cristal violeta (CV) en la línea tumoral de cáncer de mama donde se tuvo una viabilidad para el LQM 731 del 30.28%, para el cáncer de cérvix del 23.92% y para cáncer de próstata un porcentaje de 17.94%, demostrando con esto que el LQM 731 presenta citotoxicidad en células de líneas tumorales, independientemente del origen de estas y de la técnica utilizada.

La actividad citotóxica del LQM 731 no ha sido elucidada al 100%, pero si se tienen referencias de la citotoxicidad que ejerce el CAPE en relación a su estructura en donde Xingu Wan y colaboradores en el 2006, realizaron una serie de modificaciones en la estructura base del CAPE, incorporando halógenos que ejercieran un efecto inductivo en el anillo del catecol, haciendo que disminuyera la densidad electrónica en todo el sistema conjugado de la molécula.

La primera sustitución fue por un flúor en los compuestos análogos identificados como 3e, 3b, y 3f, en donde se observó un mejor efecto citotóxico de los 3 análogos, en una línea celular de cordón umbilical (HUVEC), demostrando así que los sustituyentes si influyen en el efecto tóxico del compuesto (Ruiz, 2012).

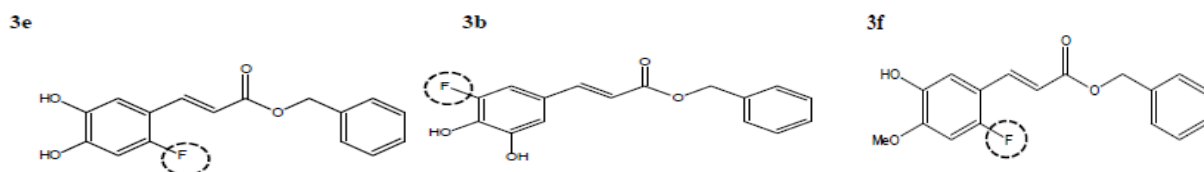


Figura No.16. Sustituciones halogénicas realizadas en los análogos de CAPE (Ruiz, 2012).

En los cultivos donde se adiciono el LQM 731 con reto del mutágeno MMC se observó que el compuesto no ejerce una capacidad citoprotectora en todas las concentraciones utilizadas en el cultivo, por el contrario se observa una actividad aditiva con la MMC al disminuir aún más la cantidad de CB en los cultivos encontrando diferencias altamente significativas en la dosis de 30  $\mu\text{g/mL}$  contra el control positivo y el control negativo, lo que indicaría que a esta concentración el LQM 731 y la MMC ejercen su máxima capacidad citotóxica, ya que la MMC además de actuar como un agente alquilante al ser activado, es una droga antimetabólica y su mecanismo de acción consiste básicamente en la formación de enlaces irreversibles entre las dos cadenas del ADN, impidiendo así la duplicación (Villarreal y cols., 2009).

En la evaluación genotóxica de los cultivos en donde solo se adicionó LQM 731 se observó un aumento de CBMN directamente proporcional a la concentración, conforme se

aumentó ésta, aumentaron también la cantidad de MN en células binucleadas, observando que en el donador 1 el LQM 731 ejerció genotoxicidad *per se* desde la dosis más baja de 10 µg/mL a diferencia del donador 2 que desarrolló esta actividad hasta la dosis de 20 µg/mL ambos con diferencias altamente significativas contra el control negativo; es importante indicar que el efecto clastogénico nunca es igual o mayor que el provocado por la MMC, esta actividad genotóxica también podría ser atribuida al compuesto ya que al ser el LQM 731 un análogo amídico halogenado del CAPE, este último ya había presentado en el estudio de Domínguez, tener un cierto efecto genotóxico en el cultivo de células de sangre periférica en donde se sugiere que el CAPE *per se* muestra un aumento del número de ICH y disminuye tanto el índice de replicación como el mitótico, así como también mostró actividad antígenotóxica al ser retado contra un mutágeno como la ifosfamida (Domínguez, 2008).

En los cultivos de LQM 731 retados con el mutágeno MMC, se observa que la MMC muestra todo su efecto mutagénico (genotóxico) ya que es el cultivo con la mayor inducción de MN, en comparación con los cultivos del LQM 731 y del control negativo, así como también se observó una gran actividad antígenotóxica por parte del compuesto, al reducir el daño provocado por el mutágeno en cada uno de los cultivos, desde la concentración más baja, en ambos donadores, obteniendo diferencias altamente significativas contra el control positivo, lo cual nos habla de una capacidad inhibitoria de daño al reducir la cantidad de CBMN desde la dosis más baja de 10 µg/mL.

De acuerdo a todos los análisis estadísticos anteriores se puede concluir que el compuesto LQM 731 podría perfilarse como un compuesto antimutagénico, ya que fue capaz de disminuir la cantidad de CBMN, en los cultivos de reto con MMC, aunque habría de considerar que en la evaluación citoprotectora ejerció cierta actividad aditiva con la MMC, al ser los 2 compuestos citotóxicos los cuales disminuyeron aún más la cantidad de CB en los cultivos de ambos donadores, la actividad citotóxica *per se* del LQM 731 puede justificarse al ser un compuesto análogo amídico halogenado del CAPE el cual ya había presentado citotoxicidad en estudios anteriores, pero al mismo tiempo esta citotoxicidad podría ser benéfica al ser reproducible en cultivos de células tumorales; aun así sería pertinente desarrollar más estudios y pruebas al compuesto para poder utilizarlo como una buena alternativa citoprotectora y antitumoral.

Se recomendaría también implementar evaluaciones posteriores del compuesto, en un mayor número de personas, para tener un parámetro de comparaciones estadísticas más

amplio de daño y efecto del compuesto, así como utilizar otro control positivo que no interfiera en la evaluación citotóxica del compuesto.

Como ya se había mencionado la citocalasina B es un compuesto que impide la formación del anillo microfilamentoso requerido para la división del citoplasma después de la telofase, el momento óptimo para su adición en el cultivo es crucial para el ensayo ya que al aumentar el tiempo de exposición a ésta, existe el riesgo de que también aumente la proporción de células multinucleadas que surgen de células binucleadas que intentan dividirse de nuevo, por lo que el tiempo estimado es generalmente 44 horas, después de la estimulación con PHA; la proporción de células Binucleadas en 1000 células totales puede tener como un máximo el 80%, encontrando un rango ideal entre 30 y 60% dependiendo del tipo de cultivo (Fenech, 2007). En nuestro estudio se obtuvo un rango de 43-46% de células binucleadas en 1000 células totales encontrándose dentro del rango de aceptación.

Son muchas las ventajas por la cual es viable utilizar la técnica de MN pero además de ellas podemos concluir que es una técnica de bajo costo, muy fácil y rápida de realizar a comparación de otras técnicas, mejora la sensibilidad del ensayo al contarse solo micronúcleos que se observan en células que solo han sufrido una división celular, así como incrementar su potencia estadística ya que se cuentan miles de células y no solo cientos, es una técnica que puede detectar aberraciones cromosómicas que responden a alteraciones de tipo estructural (Marzin. 1997);(Norppa y Falck. 2003) no obstante sería prudente complementar este estudio con algunos otros como la técnica de hibridación in situ con sondas centroméricas de marca fluorescente (FISH), ya que la prueba de MN solo determina la presencia de éstos pero no elucida su origen los cuales pueden ser fragmentos cromosómicos o cromosomas completos.

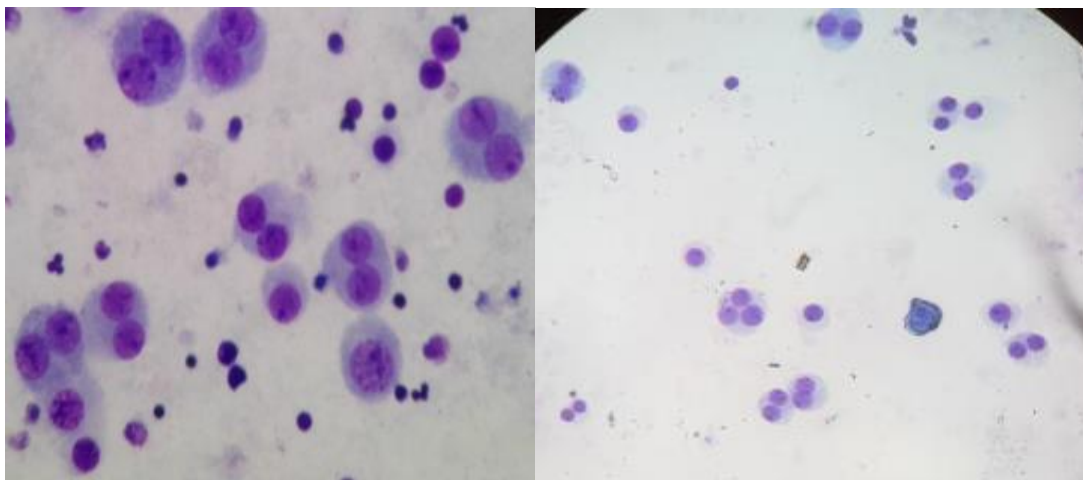
## 11. CONCLUSIONES

- ✘ Se comprobó que no existe diferencias significativas entre los 2 donadores en cuanto a su sexo y edad.
- ✘ Se logró evaluar la actividad genotóxica y citotóxica del compuesto de manera satisfactoria por medio de la Técnica de MN en células Binucleadas, la cual es validada internacionalmente como una prueba de genotoxicidad.
- ✘ Se determinó que el compuesto LQM 731 ejerce citotoxicidad en células linfocíticas de ambos donadores, encontrando diferencias altamente significativas contra el control negativo, desde la dosis de 20 µg/mL, así como no presentar capacidad citoprotectora ya que disminuyó la cantidad de CB en los cultivos de reto con MMC.
- ✘ El compuesto LQM 731 derivado amídico halogenado del CAPE mostró actividad antigenotóxica en linfocitos humanos de 2 donadores, de sexo opuesto, al disminuir el daño provocado por el mutágeno MMC, al igual que mostró un ligero daño genotóxico, comparado con el provocado por la MMC, desde la concentración más baja.

## 12. ANEXOS

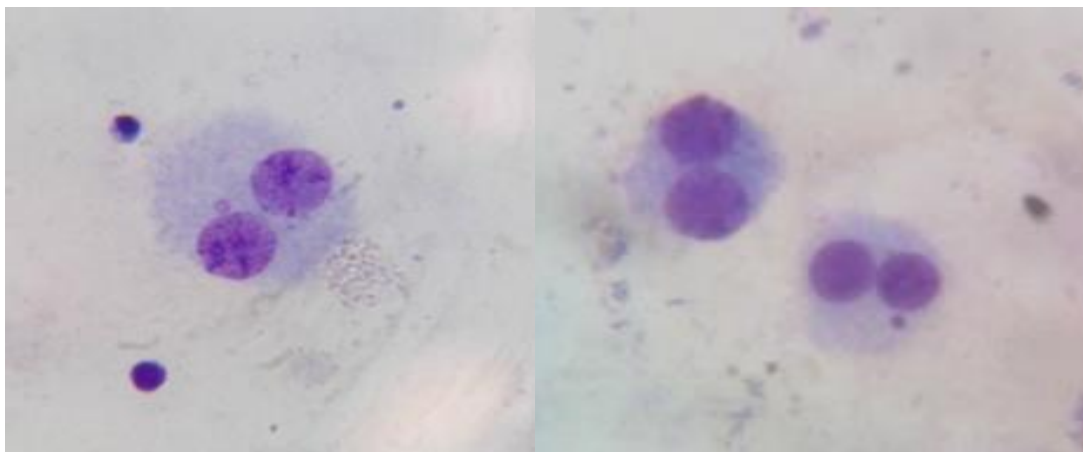
Figura No.17. Microfotografías de CB y CBMN obtenidas en los distintos sistemas a diferentes concentraciones de LQM 731.

CULTIVO CON DMSO AL 100 % (control negativo)



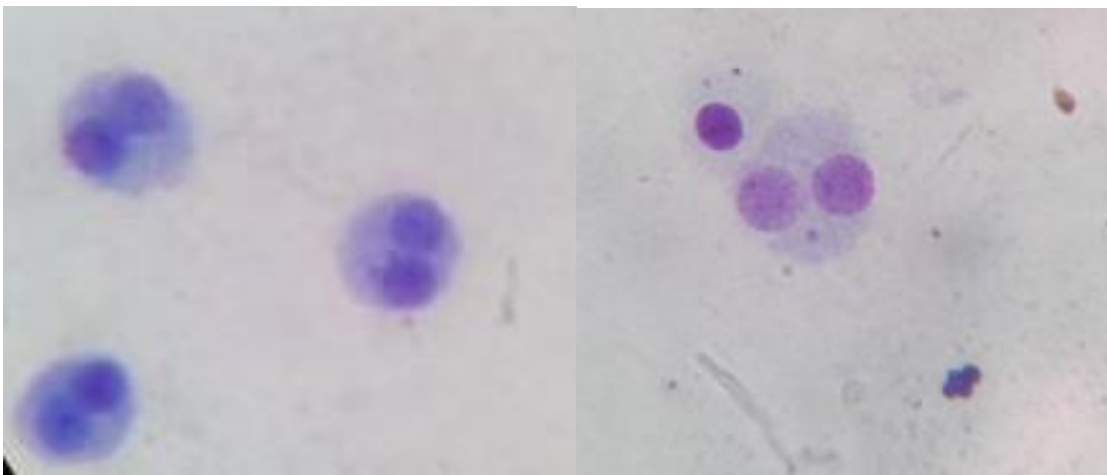
Se observan en ambas fotografías células mononucleadas y binucleadas con un citoplasma bien definido, no se observa la presencia de Micronúcleos.

CULTIVO CON EL COMPUESTO LQM 731 EN UNA CONCENTRACIÓN DE 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$



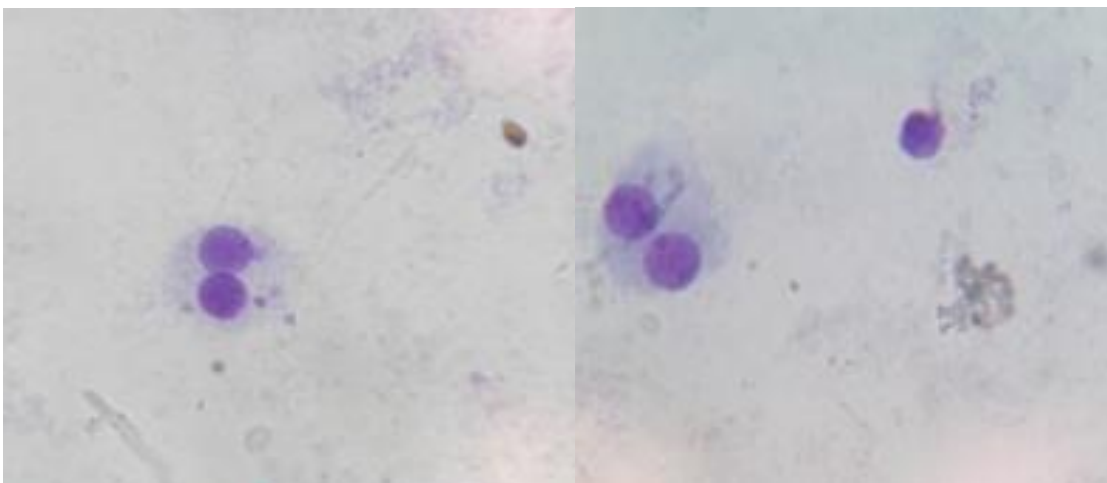
Se pueden observar en ambas fotografías Células binucleadas con Micronúcleos.

CULTIVO CON EL COMPUESTO LQM 731 EN UNA CONCENTRACIÓN DE 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$



Se puede observar en ambas laminillas células Binucleadas con Micronúcleos.

CULTIVO CON EL COMPUESTO LQM EN UNA CONCENTRACIÓN DE 30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



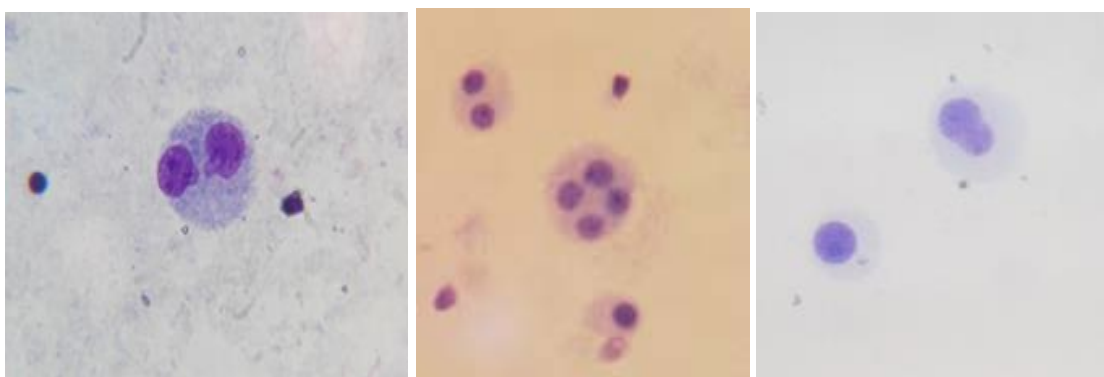
Se observan células binucleadas con un número mayor de Micronúcleos en ambas fotografías.

CULTIVO CON MITOMICINA C, A UNA CONCENTRACION DE 0.15  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (Control Positivo).

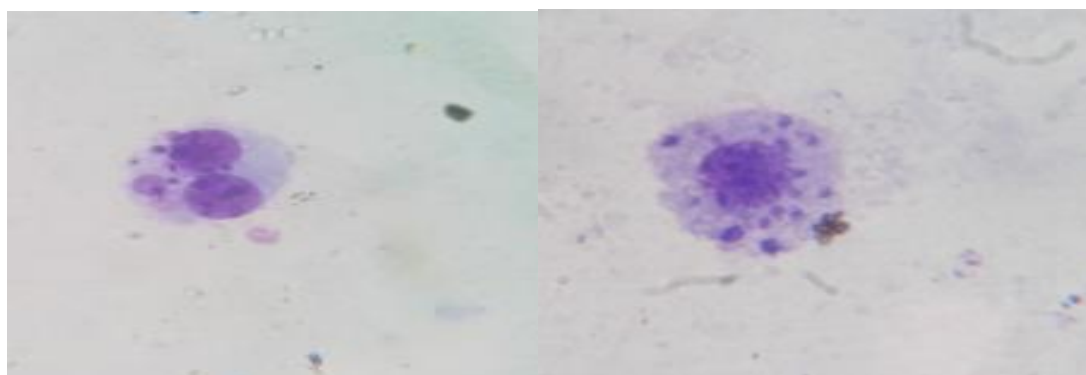


Se observan células binucleadas con varios micronúcleos.

Figura No.18. Microfotografías de Daño celular obtenidas en algunos cultivos.



Fotografía A) Célula Binucleada con amplificación génica. B) Célula Mononucleadas, Binucleada, y Tetranucleadas. C) Célula Mononucleada y Célula en división nuclear.



D) Célula con varios micronúcleos. E) Célula en necrosis.

Estas imágenes fueron encontradas en una minoría por lo que no entraron en la estadística.

### 13. BIBLIOGRAFÍA

1. A.E.C.C. 2012. Asociación Española Contra el Cáncer. Consultado en página web:<https://www.aecc.es/sobrelcancer/elcancer/Paginas/Origendelaenfermed.aspx>
2. Allen Sisniega C.A. 2013. Propóleo para infecciones. Consultado en la web: <http://medicinadelnuevomilenio.blogspot.mx>.
3. Altug M.E. Serarsian Y. Bal R. Kontas T. Ekici F. Melek I.M. Asian H. Duman T. 2008. Caffeic acid phenethyl ester protects rabbit brains against permanent focal ischemia by antioxidant action. A biochemical and planimetric study. B.R. Vol. 1201. pp. 135-145.
4. Álvarez M. S. 2012. Organoleptic Characterization and Physical-Chemistry of Propolis of the Department of liberty. Universidad Nacional Agraria La Molina, Perú. [http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologist/v10\\_n1/pdf/a04v10n1.pdf](http://sisbib.unmsm.edu.pe/bvrevistas/biologist/v10_n1/pdf/a04v10n1.pdf).
5. Antoccia, A., Tanzarella, C., Modesti, D. y Degrassi, F. 1993. Ensayo de micronúcleos con bloqueo de citocinesis y detección del cinetocoro en fibroblastos humanos tratados con colchicina. M.R. Vol.287. pp. 93-99.
6. Antosiewicz J., Ziolkowski W., Kar S., Powolny A.A., Singh S.V. 2008. Role of reactive oxygen intermediates in cellular responses to dietary Cancer chemopreventive agents. Planta Medicinal. No. 74. pp. 1570-1579.
7. Apiter. 1978. Propóleo-D. 1er. Edición. Montevideo-Uruguay.
8. Ardhaouia M, Falcimaigne A, Engasser JM, Moussou P, Pauly G, Ghou M. 2004. Síntesis enzimática de nuevos ésteres aromáticos y alifáticos de flavonoides usando lipasa de *Cándida antártica* como biocatalizador. Biocatal. Biotransfor. No. 22. Pp. 253-259.
9. Argilés Josep M. Josep Ma. Argilés Huguet, Francisco J. López-Soriano. 1998. El cáncer y su prevención. Edición Universitat Barcelona. pp. 180.
10. Bankova V. 2005. Recent trends and important developments in propolis research. E.B.C.A.M. No.2. pp. 29-32.
11. Beaula KD. y Subramanyam S. 1991. Genetoxic evaluation of Ara-C by multiple parameters. M.R. Vol.263. pp 185-196.
12. Beltran-Ramirez O. y cols. 2005. Mecanismo de quimioprevención del ester fenético del ácido caféico (CAPE) en la iniciación de un modelo de hepatocarcinogénesis: alteración de los CYP450. Cinvestav-IPN, México, DF.
13. Beltran-Ramirez O. y cols. 2011. Efecto preventivo del CAPE en el desarrollo de carcinoma hepatocelular en ratas. R.H.J.M. Vol. 78.No.4. pp. 219-224.
14. Bosio K., y cols. 2003. *In vitro* activity of propolis against *Streptococcus pyogenes*. L.A.M. Vol.31. pp.174-177.
15. Burrill, W. y cols. 2000. El uso de linfocitos criopreservados en la evaluación de la radiosensibilidad entre individuos con el ensayo de micronúcleos. I.J.R.B. Vol. 76 pp.375-382.
16. Carrasco Legleu C.E.Y. Sánchez Pérez L. Marquez Rosado S. Fattel Fazenda E. Arce Popoca S. Hernández García y S. Villa Treviño. 2003. A single dose of caffeic acid Phenethyl ester prevents initiation in a medium term rat hepatocarcinogenesis model. W.J.G. Vol.12. pp. 6779-6785.
17. Carrasco C. y cols. 2004 Chemoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester on promotion in a medium term rat hepatocarcinogenesis assay. I.U.A.C. Vol. 108 pp.488-492.



18. Carrillo Rivera Jorge, Elías Simón Nacif, M Gabriela Gil Romero, M Rachele Rodríguez Flores. 2011. Cáncer oral en México. Revisión bibliográfica y presentación de caso clínico. Vol. 7. No. 3. pp. 104-108. Consultado en la página web: <http://www.medigraphic.com/pdfs/cirugiabucal/cb-2011/cb113f.pdf>.
19. Castillo E., Guevara Fujita M.L., Ricardo Fujita. 2011. Optimización del test de micronúcleos en linfocitos cultivados usando una metodología de gradiente y frotis. R.P.B. Vol.18. No.2. pp. 261 – 263.
20. Cetina L. y cols. 2006. Radiosensibilizantes en cáncer cervicouterino. Instituto Nacional de Cancerología. México. Vol.1. pp. 4-29.
21. Chan A.T., Giovannucci E.L. 2010. Primary prevention of colorectal cancer gastroenterology. No. 138. pp. 2029-2043.
22. Chavez M. 2006. Aplicación de Técnicas de Citogenética Molecular para la detección de aneuploidía y clastogenicidad en células humanas expuestas a arsénico. Universitat Autònoma de Barcelona, España.
23. Chen Y.J y cols. 2009. Caffeic Acid Phenethyl Ester, an Antioxidant from Propolis, Protects Peripheral Blood Mononuclear Cells of Competitive Cyclists against Hyperthermal Stress. J.F.S. Vol. 74. No 6.
24. Chiao C. y cols. 1995. Apoptosis and altered redox state induced by CAPE in transformed rat fibroblasts cells. C.R. Vol.55. No.16. pp. 3576-2583.
25. Churdsak Jaikang y Chaiyavat Chaiyasut. 2010. Caffeic acid and its derivatives as Hemo oxygenase 1 inducer in Hep G2 cell line. J.M.P.I. Vol. 4. No 10. pp. 940 -946. Consultado en la web: <http://www.academicjournals.org/JMPRI>.
26. Cluet I, Fournier E, Melcion C, Cordier A. 1989. *In vivo* micronucleus test using mouse hepatocytes. M.R. 216:321-326.
27. Clouston H.J. 2001. Lymphocyte culture. In Rooney D.E. Ed. Human Cytogenetics; Constitutional Analysis-A Practical Approach 3rd ed. Chap. 2, pp 33-54. Oxford University Press. USA.
28. Cole R, Taylor J, Cole J, Arlett C. 1981. Short-term test for transplacentally active carcinogens. 1 Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts. M.R. Vol.122 pp.347-357.
29. Compendio de cáncer /RHNM/2001/Morbilidad/mortalidad/Secretaria de Salud/Dirección General de Epidemiología/registro Histopatológico de neoplasias Malignas. 2001. Consultado en la página web: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm>.
30. Couvreur P., Barratt T., Fattal E., Legrand P., y Vauthier C. 2002. Nanocapsule technology: A review. C.R.T.D.C.S. Vol.19. No.2. pp. 99-134.
31. Domínguez R.M. 2008. Efecto del ester fenético del ácido caféico (CAPE) sobre la proliferación y apoptosis en varias líneas celulares *in vitro*. Tesis de maestría en ciencias. ENMH-IPN
32. El cáncer. 2004. Información en línea. Consultado en la página web: [http://www.cáncer.gov.co/documentos/Cartillas/El\\_cáncer.pdf](http://www.cáncer.gov.co/documentos/Cartillas/El_cáncer.pdf) 2004
33. Farré R., y cols. 2004. El propolis y la salud. A.P. Vol.45 pp.21-43
34. Fenech M. y Morley A. 1986. Cytokinesis blocks micronucleus method in human lymphocytes. Effect of *in vivo* ageing and low dose X irradiation. M.R. Vol. 161. Pp. 193-198.
35. Fenech M. 1993. The cytokinesis-block micronucleus technique and its application to genotoxicity studies in human populations. E.H.P. Vol.101. pp.101-107

36. Fenech M. 2000. The in vitro micronucleus technique. M.R. Vol. 455 No.70 pp.81-95.
37. Fenech M. 2003. Proyecto HUMN: descripción detallada de los criterios de puntuación para la citocinesis-bloque de ensayo de micronúcleos utilizando cultivos aislados de linfocitos humanos. M.R. Vol 534 No. 70. pp. 65-75
38. Fenech M. 2007. Cytokinesis-block micronucleus cytochrome assay. Nature Protocols. Vol.2 No.5 pp.1084-1104.
39. Fischer J. y Ganellin C.R. 2006. Analogue based Drug Discovery. Weinheim. Wiley VCH. USA.
40. Frenkel K. y cols. 1993. Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. C.R. Vol.53 No.6 pp.1255-1261.
41. Garcia M., Jernal A., Ward EM., Center MM., Hao Y., Siegel RL., Thun MJ. 2007. Global Cáncer Facts and Figures. Atlanta GA. American Cancer Society. USA.
42. Ghulam M. y cols. 2014. Caffeic Acid Phenethyl Ester and Therapeutic Potentials. Hindawi Publishing Corporation. BioMed Investigación Internacional. Pakistán. Consultado en la web: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/145342>.
43. Greenwald P, Kelloff G, Burch-Whitman C, Kramer B. 1995. Chemoprevention. C.J.C. Vol. 45. pp. 31-49.
44. Guevara Guerra. G. 2010. Un gran regalo la apiterapia. QualityMed y Kibela S.A. 1era. Edición. Guayaquil-Ecuador.
45. Guillen Ponce Carmen. 2013. Qué es, como funciona y tipos de quimioterapia, Servicio de Oncología Médica. H.U.R.C. Madrid. España. Pp. 3-16.
46. Hayashi M, McGregor J, Gatehouse D, Adler I, Blakey D, Detinger S, Krishna G, Monta T, Russo A, Sutou S. 2000. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring. E.M.M. Vol.35 pp.234-252.
47. Hernández Calderón M.LL. 2013. Evaluación del efecto antígenotóxico del compuesto LQM 731, análogo del éster fenético del ácido cafeico (CAPE), mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa). Tesis de licenciatura. FESC-UNAM.
48. Hernández S. M. y cols. 2005. Características Organolépticas y Físico-Químicas de Propóleos de la Provincia de Ñuble, VIII Región-Chile. Archivos Latinoamericanos de Nutrición. ISSN 0004-0622. Vol. 55. No. 4. Caracas.
49. INEGI. 2010. Instituto Nacional de Estadística Geográfica e Informática. Causas de Defunción. Defunciones generales totales por principales causas de mortalidad. Consultado en la página web: [www.inegi.gob.mx](http://www.inegi.gob.mx)
50. Kirsch Volders M, Elhajouji A, Cundari E, Van Hummelen P. 1997. The in vitro micronucleus tests a multi endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction. M.R. Vol. 392 pp. 19-30.
51. Kirsch-Volders M, Sofuni T, Ardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate J, Lorge E, Norppa H, Surrallés J, Hude W, Wakata A. 2000. Report from the in vitro micronucleus assay working group. E.M.M. Vol.35 pp.167-172.

52. Kirsch-Volders M. y cols. 2011. In vitro genotoxicity testing using the micronucleus assay in cell lines, human lymphocytes and 3D human skin models. M.R. Vol.26. No.1. pp. 177-184.
53. Kishimoto N. y cols. 2005. "In vitro antibacteriana, anti-mutagénica y antiinfluenza actividad del virus de ésteres del ácido cafeico fenetilo, B.C., Vol. 10 No. 4 pp.155-161.
54. Kujumgiev A. y cols. 1993. Actividad Antibacterial de propóleo, algunos de sus componentes y sus análogos. Pharmazie. Vol. 48 No.10, pp 785-786.
55. Lähdetie J, Parvinen M. 1981. Meiotic micronuclei induced by X-rays in early spermatids of the rats. M.R. Vol.81 pp.103-115.
56. LeBlanc M.Luc. Paré Aurélie F. François Jacques Jean-, Hébert Martin J. G. . Surette Marc E. Touaibia Mohamed. 2012. Synthesis and Antiradical/Antioxidant Activities of Caffeic Acid Phenethyl Ester and Its Related Propionic, Acetic, and Benzoic Acid Analogues. J. M. Vol. 17. pp 14637-14650.
57. Leopoldini M. Marino T. Russo N. Toscano M. 2004. Antioxidan properties of phenolic compounds. H Atom versus Electron transfer mechanism. J.P.C.A. Vol.108. pp. 4916-4922.
58. Macías P.J.R., Beltrán R., Villa T. S. 2012. Searching for Analogues of the Natural Compound, Caffeic Acid Phenethyl Ester, with Chemoprotective Activity. A compendium of Essays on Alternative Therapy. Review.
59. Madrigal-Bujaidar E, Cassani-Galindo M. 1996. Efecto mutagénico de la Mitomicina C en cultivos de linfocitos humanos. R.B. Vol.21. pp. 538-544.
60. Manrique A.J. 2000. Producción del propóleo. FONAIAP divulga. No 66. Brasil. Consultado en la web: [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/FonaiapDivulga/fd66/texto/propole.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/FonaiapDivulga/fd66/texto/propole.htm).
61. Martínez Peñalver I. 2000. Quimioprevención del cáncer. R.C.O. Vol.16. No. 1. Pp.67.
62. Marzin D. 1997. The position of the *in vitro* micronucleus test within the battery of screening for genotoxic potential determination and the regulatory guidelines. M.R. Vol.392. pp. 175-181.
63. Morales Ramírez P. y cols. S/A. Inferencia de algunos parámetros farmacocinéticas de la Mitomicina C, mediante el análisis de su cinética de inducción de eritrocitos policromáticos micronucleados. XIII Congreso Técnico Científico ININ-SUTIN.
64. Murli H. 2003. Screening Assay for Chromosomal Aberrations in CHO Cells with Argentin 23. Final Report. en Covance. N.I.C. Virginia. Vol.8 pp 1-15.
65. Natarajan K. y cols. 1996. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF-kappa-B. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. Vol. 93. No. 17. pp. 9090-9095.
66. National Cancer Institute. 2011. Diccionario del cáncer. Consultado en la página web: <http://www.cancer.gov/diccionario>.
67. Norppa H. y Falck G.C. 2003. What do human micronuclei contain? Mutagenesis. Vol. 18. pp. 221-233.
68. Ocampo A.P. Hoyos L.S. Carvajal S.M. 2002. Medición del daño genético inducido por el bazuco en linfocitos humanos empleando la prueba de micronúcleos con citocalasina B. A.B. Vol.24. No.77 pp.59-66.

69. Omene C. y cols. 2012. Fenetil éster del ácido cafeico (CAPE) derivado de propóleo, un producto de abeja, inhibe el crecimiento de las células madre del cáncer de mama. I.N.D. Pub Med. Vol. 30. pp.1279-1288.
70. Orsolíc N.S. Terzić Z. Mihaljević L. Sver y I. Basic. 2005. Effects of local administration of propolis and its polyphenolic compounds on tumor formation and growth. B.P.B. Vol.28. Pp. 1928-1933.
71. Ortiz, R., Medina, H., Rodríguez, L., González, H., Cortés, E. 2004. Spontaneous and mitomycin C-induced micronuclei in peripheral blood reticulocytes from severely malnourished rats. E.M.M. Vol.43 pp.179-185.
72. Paperblog. 2013. Interfase subfase de crecimiento 2 G2. Disponible en la web:<http://es.paperblog.com/interfase-subfase-de-crecimiento-2-g2-2106035>.
73. Peña Raúl C. 2008. Estandarización en propóleos: antecedentes químicos y biológicos. R.I.C.I.A. Vol. 35. No. 1. Pp. 17-26.
74. Premoli G. 2010. Uso del propóleo en odontología. Rev.Biblio. Acta Odontológica Venezolana. Vol. 48. No. 2.
75. Pérez B., Santos A., 2012. Diseño de nanomedicinas magnéticas como nueva herramienta antitumoral. Tesis. Universidad de Granada. Granada España.
76. Roleira F.M.F. Sique C. Orru E. Garrido E:M. Garrido J. Milhazes N. Podda G. Paiva Martins F. Reis S. Carvalho R.A. Tavares da Silva E.J. Borges F. 2010. Lipophilic phenolic antioxidants. Correlation between antioxidant profile, partition coefficients and redox properties. B.M.C. Vol. 18. Pp. 5816-5825.
77. Rosefort Christiane. Fauth Evelyne. Heinrich Zankl. 2004. Micronuclei induced by aneugens and clastogens in mononucleate and binucleate cells using the cytokinesis block assay. Mutagenesis. Vol.19. No. 4. Pp. 277-284.
78. Ruiz Álvarez V. y cols. 2005. Efecto Inmunomodulador de la fitohemaglutinina de *Phaseolus vulgaris*. Rev. Cubana Invest. BioMed. Vol. 24. No. 1. Pp. 5-13.
79. 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.
80. S.E.H.S.C. (Southwest Environmental Health Sciences Center). 2013. SW Hazardous Environmental Exposure. Carcinogenesis. College of pharmacy/ NIEHS. The University of Arizona. USA.
81. Serrano J y cols. 2003. Actividad antitumoral del propóleo. Departamento técnico dietéticos intersa. Rev. Natura Medicatrix. Vol. 21. No.2.
82. Shindo Y, Hirano F, Maeda H, Takeda U. 1983. The micronucleus test with mouse spleen cells. Mutat Res 121: 53-57.
83. Su ZZ. y cols. 1991. Suppression of adenovirus type 5 E1A-mediated transformation and expression of the transformed phenotype by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). Molecular Carcinogenesis. Vol.4. No.3. Pp. 231-242.
84. Surrallés J. Natarajan A.T. 1997. Human lymphocytes Micronucleus assay in Europe. An international survey. Mutat Res. Vol. 392. No. 1-2. Pp. 165-174.
85. Surrallés, J., Xamena, N., Catalán, J., Norppa, H. y Marcos, R. 1995. La inducción de micronúcleos por cinco insecticidas piretroides en sangre entera y cultivos de linfocitos humanos aislados. Mutation Res., 341, 169-84.
86. Tang X.H., Gudas L.J. 2011. Retinoids, retinoic acid receptors, and cáncer. Annual Review in Pathology. No. 28. Pp. 345-364.
87. Uwai K. Osanai T. Imaizumi S. Kanno M. Takeshita M. y Ishikawa M. 2008. Inhibitory effect of the alkyl side chain of caffeic acid analogues on

- lipopolysaccharide induced nitric oxide production in RAW264.7 macrophages. B.M.C. Vol. 16. pp. 7795-7803.
88. Vargas Sánchez R.D y cols. 2014. Mecanismos involucrados en la actividad antioxidante y antibacterial del propóleo. Rev. Cien. Biolo. Salud. Vol.16. No.1. Pp.32-37.
  89. Vázquez J.C. 2010. Caracterización botánica de los propóleos producidos en distinto origen geográfico en la región apícola i - cuenca del salado, provincia de Buenos Aires. Tesis. Universidad Politécnica de Valencia. Valencia.
  90. Villarreal M.A. y cols. 2009. Resultados de la aplicación de mitomicina-C transoperatoria versus postoperatoria en cirugía de pterigión. Rev. Mex. Oftalmol. Vol. 83. No. 6. Pp. 385-389.
  91. Wermuth C.G. 2006. Similarity in drugs reflections on analogue design. Drug Discov. Today. Vol.11. Pp. 348-354.
  92. Xiang D. y cols. 2006. Fenetil éster del ácido cafeico induce la detención del crecimiento y la apoptosis de las células de cáncer de colon a través de la señalización del factor de beta-catenin/células T. Medicamentos contra el cáncer. Pub Med.Vol.17. Pp. 753-762.
  93. Yamamoto KI. y Kikuchi Y. 1980. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. Mutant Res. 71 pp. 127-131.
  94. Yang J, Marriner GA, Wang X, Bowman PD, Kerwin SM, Stavchansky S. 2010. Síntesis de una serie de fenetil amidas del ácido cafeico (CAPA) derivados fluorados. Comparación de los efectos citoprotectores con el éster fenetil del ácido cafeico (CAPE). B.M.C. Vol.18. pp. 5032-5038.
  95. Yi Jin-Ho. y cols. 2013. Amida de ácido cafeico fenetil mejora la homeostasis de la glucosa y atenúa la progresión de la disfunción vascular en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina. D.C. No.12 pp. 99.
  96. Younghwa N, Ven-Shun L, Yuka N, Kenneth B, Harold K. 2001. Synthesis, DNA cross-linking activity, and cytotoxicity of dimeric Mitomycin. J.M.C. Vol.44 pp. 3453-3462.
  97. Zacalain M. y cols. 2005. El ensayo de micronúcleos como medida de inestabilidad genética inducida por agentes genotóxicos. An. Sist. Sanit. Navar. Vol. 28. No. 2. pp. 227-236.
  98. Zamorano Ponce E., Lagos Muñoz P., Rivera Caamaño P., Fernández Romero J. 2008. Un modelo experimental inducible en ratón para conducir estudios en quimioprevención y anticarcinogenesis. Teoria. Vol. 17, No. 1, Pp. 71-86.
  100. Zúñiga G.G. y Gomez Meda BC. 2006. La prueba de micronucleos. La ciencia y el Hombre. R,D,C,T,U,V, Vol. 19 No.1. pp. 5-9.