



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN

EVALUACIÓN DE LA CAPACIDAD GENOTÓXICA Y
ANTIGENOTÓXICA DEL COMPUESTO LQM738
ANÁLOGO DEL CAPE MEDIANTE LA TÉCNICA DE
ELECTROFORESIS UNICELULAR EN GEL, EN
RATONES CD1.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A:

LÁZARO CRUZ VARGAS

ASESORA: DRA. SANDRA DÍAZ 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

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

Evaluación de la capacidad genotóxica y antigenotóxica del compuesto LQM738 análogo del CAPE mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel, en ratones CD1

Que presenta el pasante: Lázaro Cruz Vargas

Con número de cuenta: 404006099 para obtener el Título de: Químico Farmacéutico Biólogo

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 01 de septiembre de 2014.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo	
VOCAL	Dra. Patricia Ramírez Noguera	
SECRETARIO	QFB. Sara Hernández Matilde	
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).

HMI/iac

El presente trabajo fue realizado con el apoyo del proyecto **PAPIIT IT202512** titulado: *Estudio antigenotóxico, antiproliferativo e inhibidor de las lesiones precancerosas de un grupo de análogos de éster fenético de ácido cafeico (CAPE) desarrollado en la FES-Cuautitlán.* La investigación se realizó a cargo de la Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo.

CRÉDITOS

El compuesto LQM738 fue desarrollado y sintetizado en el **Laboratorio de Química Medicinal** de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán a cargo del **Dr. Enrique Ángeles Anguiano**

El trabajo experimental fue desarrollado en el **laboratorio 9 de Toxicología Celular de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria** de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán con la dirección de la **Dra. Sandra Díaz Barriga Arceo**, en colaboración con la **Unidad de Aislamiento y Bioterio** de la misma facultad a cargo del **M. en C. Crisóforo Mercado Márquez**.

El análisis microscópico mediante el equipo de epifluorescencia Axioimager por medio del software Comet Imager 2.1 fue realizado en el **Instituto de Ciencias de la Salud** de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo con la colaboración de la **Dra. María del Carmen Alejandra Hernández Ceruelos**.

DEDICATORIAS

En primer lugar a mi madrecita “doña chata”, a mis hermanos Leonel, Adolfo y Eliel mis tíos María y David: por seguir trabajando en convertirme en una persona de provecho con firmes convicciones, de valores universales como siempre lo han hecho por mí. Les agradezco infinitamente su apoyo en todo momento para llegar hasta aquí. A mis cuñadas y suegros de quienes he recibido su apoyo.

A mi querida Dra. Sandra Díaz, de quien uno solo recibe apoyo incondicional pues es un amor y sobre todo un verdadero ejemplo a seguir, ¿no es así L521? A las maestras Rosalba, Maritere, Alejandra a mi jurado, al Sr. Pablo, a Llasbeth y Karina que sin su valioso tiempo y esfuerzo no habría terminado. MUCHAS GRACIAS. A todos los compañeros con quien he compartido y enfrentado este periodo maravilloso en la Universidad.

Es para mí un honor dedicar este trabajo a quien se ha convertido en el amor de mi vida y me ha regalado dos grandes sonrisas que iluminan nuestra vida, a ti Zhaila que si bien no es nada fácil, también he llegado al final. Te amo y te agradezco por haberme elegido para despertar a tu lado todos los días que para mí es un verdadero placer tenerte a mi lado. Fabi, Mate que no sea yo un ejemplo a seguir sino un punto al cual superar, nada me daría más gusto que leer las dedicatorias de su tesis, no importa que no aparezca mi nombre.

Y por último pero no menos importante en donde quiera que estés: lo logré papá, lo logré. PD. Te amo papá.

AGRADECIMIENTOS

A ti querida Universidad por convertirme de un ser común en uno de sangre azul y piel dorada, pues a pesar del recorte de presupuestos, de la falta de inversión en la educación superior por parte de las autoridades, aún te das el lujo de creer en los sueños de quienes habitamos tus butacas, de quienes gozamos y nos estremecemos con un el GOYA, de quienes nos maravillamos y compartimos el trabajo que se hace en los laboratorios, en esos *labos* que parecen prisiones por pasar más tiempo en ellos que una jornada laboral normal,

A ti por no desechar a tus hijos pues a pesar de estar atrasados en una materia, a pesar de las críticas a tu sistema yo te vanaglorio por permitir a esas personas concluir con sus estudios mediante la apertura de grupos, oyentes y extras.

A ti por tener a profesionales entregados a ti en cuerpo y lo que le sigue, quienes comparten tus ideales al grado de acoger a personas y proporcionarles los medios para desarrollar investigación de calidad.

A ti por tener y ofertar la mayor pluralidad de conocimientos, al estar comprometida Por Mi Raza al grado de hacer hablar al Espíritu, pues en verdad aquí es donde se construye el futuro.

A ti por enseñarme a ser no un ciudadano pues ese solo vale un voto cada seis años, sino un pensador libre, de firmes ideales, crítico y analista.

ÍNDICE

	ABREVIATURAS	
	ÍNDICE DE FIGURAS	
	ÍNDICE DE TABLAS	
I	RESUMEN	1
II	MARCO TEÓRICO	2
II.1	Cáncer	2
II.1.1	Protooncogenes	3
II.1.2	Genes supresores de tumor (ST)	4
II.1.3	Carcinogénesis	4
II.1.4	Carcinógenos	6
II.1.5	Antitumorales	8
II.2	CAPE	10
II.2.1	Panorama histórico	10
II.2.2	CAPE en México	11
II.3	Ensayo de electroforesis unicelular en gel (SGCE) o ensayo cometa	13
II.3.1	Mecanismo de formación de cometas	14
II.3.2	Medición del daño	14
III	JUSTIFICACIÓN	18
IV	OBJETIVOS	19
V	HIPÓTESIS	20
VI	DIAGRAMA DE FLUJO	21
VII	MATERIAL Y MÉTODOS	22
VIII	RESULTADOS	26
IX	DISCUSIÓN	34
X	CONCLUSIONES	40
XI	PERSPECTIVAS	41
XII	REFERENCIAS	42
XIII	ANEXOS	46

ABREVIATURAS

μL	<i>Micro litro</i>
μM	<i>Milimolar</i>
<i>BrET</i>	<i>Bromuro de etidio</i>
<i>CAPE</i>	<i>Éster fenético del ácido caféico</i>
<i>CD1</i>	<i>Línea celular de ratón</i>
<i>CM</i>	<i>Células muertas</i>
<i>CV</i>	<i>Células vivas</i>
<i>CYP2E1</i>	<i>Isoforma del citocromo P450</i>
<i>DEN</i>	<i>N-dietilnitrosamina</i>
<i>DMSO</i>	<i>Dimetil sulfóxido</i>
<i>ADN</i>	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
<i>DSB</i>	<i>Rupturas de doble cadena</i>
<i>HeLa</i>	<i>Línea celular -cáncer de cérvix</i>
<i>HO-1</i>	<i>Hemoxygenasa 1</i>
<i>IP</i>	<i>Intra-peritoneal</i>
<i>IκBα</i>	<i>Inhibidor del factor de transcripción NF-κB</i>
<i>LMP</i>	<i>Agarosa de bajo punto de fusión</i>
<i>mA</i>	<i>Miliampers</i>
<i>mg/Kg</i>	<i>Miligramos por kilogramo</i>
<i>mg/mL</i>	<i>Miligramos por mililitro</i>
<i>mM</i>	<i>Milimolar</i>
<i>MDA-MB-231</i>	<i>Línea celular -cáncer de mama</i>
<i>MMC</i>	<i>Mitomicina C</i>
<i>MMS</i>	<i>Metilmetanosulfonato</i>
<i>NA</i>	<i>Agarosa de normal punto de fusión</i>
<i>NA01</i>	<i>N-[2 clorobencil]cinamida</i>
<i>OMS</i>	<i>Organización mundial de la salud</i>
<i>PA01</i>	<i>N-[(2 clorofenil)metil]-Benzenacetamida</i>
<i>PBS</i>	<i>Solución amortiguadora de Fosfatos libre de Ca^{+2} y Mg^{+2}</i>
<i>PPC-3</i>	<i>Línea celular -cáncer de próstata</i>
<i>QSAR</i>	<i>Quantitative Structure-Activity</i>
<i>ARN</i>	<i>Ácido ribonucleico</i>
<i>SCGE</i>	<i>Electroforesis unicelular en gel</i>
<i>ST</i>	<i>Gen supresor de tumor</i>
<i>TL</i>	<i>Longitud de la cauda</i>
<i>TM</i>	<i>Momento de la cauda</i>
<i>V</i>	<i>Volts</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del cáncer en múltiples etapas. Tomada de Strachan, et al. 2006	2
Figura 2. Etapas del desarrollo tumoral. Modificado de: Weinberg, 1996.	5
Figura 3. Estructura molecular del éster fenilico del ácido cafeico (CAPE)	10
Figura 4. Estructura molecular del derivado análogo del CAPE, NA01 (N-[2 clorobencil]cinamida). Tomado de: Paniagua, 2010.	12
Figura 5. Estructura molecular del derivado análogo del CAPE, PA01 (N-[2 clorofenil]metil]-Benzenacetamida). Tomado de: Macías, 2012.	12
Figura 6. Imágenes de cometas obtenidos de linfocitos asilados utilizando la versión alcalina. a) controles mostrando igualmente una pequeña migración que corresponde al daño basal b) tratados con radiación gamma donde se observa la formación típica de un cometa cabeza y cola. Tomado de Zuñiga 2009	14
Figura 7. Clasificación visual esquemática utilizada por Kobayashi et al. 1995. Se muestra la clasificación de las 5 clases de cometas. Tomada de Zúñiga, 2009	15
Figura 8. Ejemplo de pantalla del software del analizador de imagen Comet Imager 2.1. Tomada de Hernández, 2013.	16
Figura 9. Ejemplo de hoja de cálculo obtenida de la cuantificación del daño en las células. Fotografía Lázaro Cruz Vargas, 2014.	17
Figura 10. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en las células de hígado de ratón CD1 a 3h post-administración.	26
Figura 11. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en las células de hígado de ratón CD1 a 18h post-administración.	27
Figura 12. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en las células de riñón de ratón CD1a 3h post-administración.	28
Figura 13. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en las células de riñón de ratón CD1 a 18h post-administración.	29
Figura 14. Daño causado al ADN de las células de hígado de ratón CD1 en los distintos tratamientos a 3h post-administración, expresado en pixeles.	30
Figura 15. Daño causado al ADN de las células de hígado de ratón CD1 en los distintos tratamientos a 18h post-administración, expresado en pixeles.	31
Figura 16. Daño causado al ADN de las células de riñón de ratón CD1 en los distintos tratamientos a 3h post-administración, expresado en pixeles.	32
Figura 17. Daño causado al ADN de las células de riñón de ratón CD1 en los distintos tratamientos a 18h post-administración, expresado en pixeles.	33
Figura 18. Estructura molecular del compuesto #80 Zou, et al. 2010	38
Figura 19. Estructura molecular compuesto LQM738	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cuatro formas de activación de protooncogenes. (Strachan et al., 2006)	3
Tabla 2. Algunos genes ST y sus funciones (tomada de Griffiths, 2005 y Pierce, 2005)	4
Tabla 3. Agentes carcinógenos según Mendoza del Pino. Modificado de Mendoza del Pino, et al. 2010.	7
Tabla 4. Resumen de Antitumorales. Tomado de Rang y Dale, 2012	8
Tabla 5. Distribución de lotes.	23
Tabla 6. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de hígado de ratón CD1 a 3h post-administración, evaluada mediante la técnica de azul de Tripán.	26
Tabla 7. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de hígado de ratón CD1 a 18h post-administración, evaluada mediante la técnica de azul de Tripán.	27
Tabla 8. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de riñón de ratón CD1 a 3h post-administración, evaluada mediante la técnica de azul de Tripán.	28
Tabla 9. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de riñón de ratón CD1 a 18h post-administración, evaluada mediante la técnica de azul de Tripán.	29
Tabla 10. Resultados de la evaluación obtenida de los momentos de la cauda (expresados en pixeles) en células de hígado de ratón CD1 a 3h post-administración.	30
Tabla 11. Resultados de la evaluación obtenida de los momentos de la cauda (expresados en pixeles) en células de hígado de ratón CD1 a 18h post-administración.	31
Tabla 12. Resultados de la evaluación obtenida de los momentos de la cauda (expresados en pixeles) en células de riñón de ratón CD1 a 3h post-administración.	32
Tabla 13. Resultados de la evaluación obtenida de los momentos de la cauda (expresados en pixeles) en células de riñón de ratón CD1 a 18h post-administración.	33
Tabla 14. Evaluación de la prueba de normalidad por el método Kolmogorov y Smirnov de células hepáticas 3h post-administración.	35
Tabla 15. Evaluación de la prueba de normalidad por el método Kolmogorov y Smirnov de células hepáticas 18h post-administración.	46
Tabla 16. Evaluación de la prueba de normalidad por el método Kolmogorov y Smirnov de células renales 3h post-administración.	46
Tabla 17. Evaluación de la prueba de normalidad por el método Kolmogorov y Smirnov de células renales 18h post-administración.	46

I. RESUMEN

Los años venideros son inciertos sin embargo se pronostica un incremento en el diagnóstico y muertes por cáncer, siendo éste un padecimiento heterogéneo de trastornos que se originan a partir de una serie de cambios que conducen a la inmortalización y transformación de una célula, de un tejido. Pese al panorama incierto, los esfuerzos para combatirlo tampoco han cesado, así pues el compuesto LQM738 fue ideado y creado por químicos de la FES-Cuautitlán como un análogo estructural del éster fenetílico del ácido cafeico (CAPE), para mejorar las propiedades que este último presenta como quimioprotector en los procesos de hepatocarcinogénesis.

En el trabajo que aquí se presenta se estudió la capacidad genotóxica y antigenotóxica del compuesto LQM738 de forma aguda en ratones jóvenes CD1 mediante electroforesis unicelular en gel, como parte de los estudios preclínicos para perfilarlo como agente quimioprotector. Para ello se establecieron dos horarios de trabajo; el primero a 3 horas post-administración con 6 lotes de trabajo, cada uno con 5 ratones a los cuales se les administró el siguiente tratamiento: *control negativo*, Dimetilsulfoxido (DMSO) al 80%; *control positivo*, Mitomicina C (MMC) 0.2mg/Kg; *control LQM738 dosis 1*, LQM738 a 20mg/Kg; *control LQM738 dosis 2*, LQM738 a 40mg/Kg; *reto dosis 1*, MMC + LQM738 a 20mg/Kg; *reto dosis 2*, MMC + LQM738 a 40mg/Kg. El segundo horario de trabajo a 18h post-administración también con 6 lotes con el mismo tratamiento descrito anteriormente. Finalmente un *lote blanco*: al cual no se le administro absolutamente nada. Se determinó la viabilidad celular que en todos los casos fue mayor al 85%, mediante la técnica de exclusión con el colorante supravital azul de tripán. Posterior a esta evaluación se realizó el ensayo cometa en su versión alcalina con $\text{pH} > 13$ a células de hígado y riñón. Se efectuó el análisis de los cometas mediante el software Comet Imager 2.1, los datos arrojados se analizaron con ANOVA y Turkey-Kramer $P < 0.05$ mediante el programa GraphPad InStat versión 3.1, además de la evaluación de la prueba de normalidad por el método Kolmogorov y Smirnov y el análisis de datos anómalos por Q de Dixon. Así finalmente tenemos que la capacidad genotóxica del compuesto LQM738 después de 3h de la administración de una dosis de 20mg/Kg no presenta daño al ADN tanto en hígado como en riñón; a una dosis de 40 mg/Kg en células hepáticas no hay daño genotóxico sin embargo en células renales si presenta ligera genotoxicidad. Con respecto a la antigenotoxicidad el LQM738 después de 3h de haber sido administrado, reduce el daño provocado al ADN por MMC hasta en un 88.42% en células hepáticas y un 57.6% en renales a una dosis de 20mg/Kg. La dosis de 40mg/Kg no es efectiva para reducir el daño que causa MMC.

En el segundo horario de trabajo, se encontró que el compuesto LQM738 no es genotóxico y no es posible precisar alguna actividad antigenotóxica.

II. MARCO TEÓRICO

II.1 CÁNCER

El cáncer es “una alteración genética de la regulación de los procesos de la multiplicación y diferenciación celulares, mediada por la acción de agentes mutágenos exógenos o propiciada por la herencia de mutaciones en ciertos genes claves del ciclo celular”. El nacimiento y la muerte celular está controlada genéticamente y si la mutación somática crea una variante que prolifera con mayor rapidez, la clona mutante tenderá a hacerse cargo del organismo. Por consiguiente el cáncer puede considerarse como un proceso evolutivo natural (Strachan, *et al.* 2006)

El cáncer comienza en una célula por ello es monoclonal, y se requieren en promedio de seis a siete mutaciones sucesivas para convertir una célula normal en un carcinoma invasor. La posibilidad de que una célula aislada sufra seis mutaciones independientes es insignificante, lo que sugiere que el cáncer debe ser cada vez más raro. Sin embargo, dos mecanismos generales pueden permitir que la progresión ocurra:

- Algunas mutaciones incrementan la proliferación celular y crean una población blanco de células expandida para la siguiente mutación.
- Algunas mutaciones afectan la estabilidad de la totalidad del genoma a nivel del ADN o cromosómico, e incrementan el índice total de mutaciones.

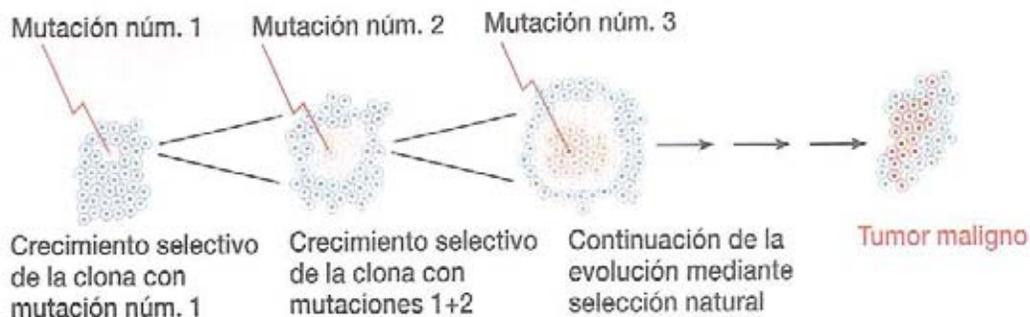


Figura 1 Evolución del cáncer en múltiples etapas. Tomada de Strachan, et al. 2006

Cada mutación sucesiva proporciona a la célula una ventaja en el crecimiento, de manera que forma una clona expandida, que en consecuencia presentan un blanco más grande para la mutación siguiente.

Si se considera los genes que son blancos de estas mutaciones, para desarrollar el cáncer se puede distinguir dos clases:

PROTOONCOGENES: estos estimulan la división celular como hecho fundamental para mantener la vida, sin embargo pueden sufrir alteraciones en su estructura por cambios en la secuencia de los ácidos nucleicos (mutaciones) o por pérdida de algunos segmentos del

cromosoma (deleciones) o por traslado de un sector cromosómico a otro cromosoma (translocaciones) (Martín de Civetta, *et al.* 2011).

GENES SUPRESORES DE TUMOR (ST): los productos de los genes ST inhiben acontecimientos que conducen al cáncer.

II.1.1 PROTOONCOGENES

La forma mutada de un protooncogen puede sobre expresar la proteína normal o bien expresar una proteína anormal que se mantiene activa independientemente de las señales reguladoras, por lo que el resultado neto es una ganancia de función. Esto conduce, según el caso, a la proliferación descontrolada o a una apoptosis reprimida y en definitiva a la aparición del cáncer. En la actualidad se conocen un poco más de 100 protooncogenes que codifican para:

- Factores de crecimiento secretados
- Receptores de superficie celular
- Componentes de sistemas de transducción de señal intracelular
- Proteínas nucleares de enlace de ADN, inclusive factores de transcripción
- Componentes de la red de ciclinas, cinasas dependientes de ciclinas e inhibidores de cinasa que rigen la progresión a través del ciclo celular

En la tabla 1 se muestran los mecanismos de activación de los oncogenes.

Tabla 1. Cuatro formas de activación de protooncogenes. (Strachan, et al.2006)

Mecanismo de activación	Oncogen	Tumor
Amplificación	ERBB2	Cáncer de mama, ovario, gástrico, pulmonar de célula no pequeña, de colon.
	NMYC	Neuroblastoma
Mutación de punto	HRAS	Cáncer de vejiga, pulmón, colon, melanoma.
	KIT	Tumores estromáticos gastrointestinales, mastocitosis
Reordenamiento cromosómico que crea un nuevo gen quimérico	BCR-ABL	Leucemia Mieloide Crónica
Translocación a una región de cromatina con actividad transcripcional	MYC	Linfoma de Burkitt

II.1.2 GENES SUPRESORES DE TUMOR (ST)

En general los genes ST codifican proteínas que regulan el ciclo celular, fundamentalmente paralizando o inhibiendo la proliferación celular. A diferencia del mecanismo de los oncogenes, en los cuales la carcinogénesis resulta de la ganancia de función genética; en este caso el mecanismo de actuación es la pérdida de función de estos genes, para inactivar funcionalmente un gen ST ambos alelos deberán estar afectados, por mutación o delección. Frecuentemente una mutación inactiva uno de los alelos, mientras que una delección afecta el otro alelo como un segundo evento. Afectando el control del crecimiento y subsecuentemente el desarrollo del tumor (Yokota y Sugimura, 1993). Los estudios moleculares han identificado hasta la fecha más de 17 genes supresores implicados directamente en el cáncer humano. Ellos codifican para una serie de proteínas que actúan en distintos puntos de las rutas de señalización de control y apoptosis:

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

Tabla 2 Algunos genes ST y sus funciones. Tomada de Griffiths, 2005 y Pierce, 2005

Gen	Localización celular del producto	Función
NF1	Citoplasma	Activador de GTPasa
p53	Núcleo	Factor de transcripción, regula la apoptosis
RB	Núcleo	Factor de transcripción
WT-1	Núcleo	Factor de transcripción

II.1.3 CARCINOGENÉISIS

Es un proceso evolutivo que tiene una serie de pasos sucesivos, donde se destaca la existencia de un largo período de latencia entre la exposición de un carcinógeno y el desarrollo de la neoplasia. Comprende una serie de fases en los que intervienen factores genéticos y ambientales está comprendida en tres etapas.

- **Iniciación:** ocurren alteraciones intracelulares, heredables e irreversibles.
- **Promoción:** expresión reversible de la población iniciada.
- **Progresión:** establecimiento irreversible de lesión con capacidad de invasión.

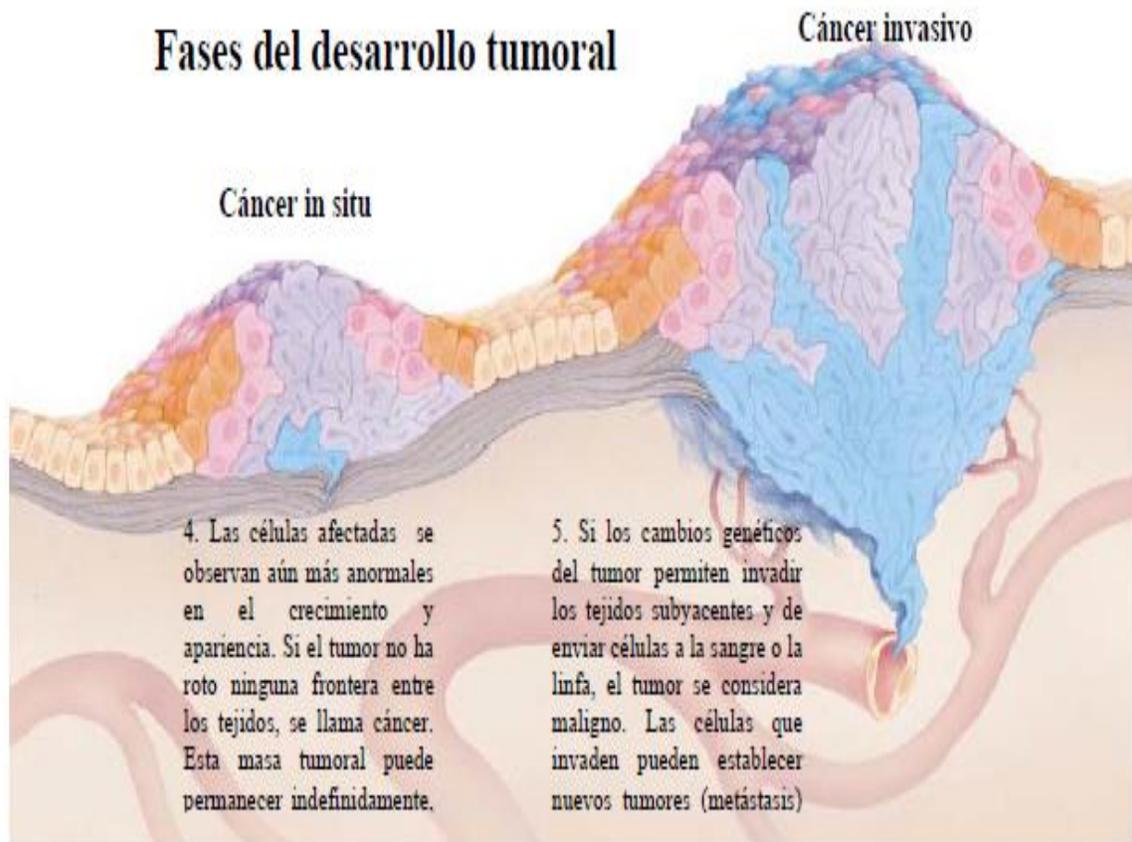
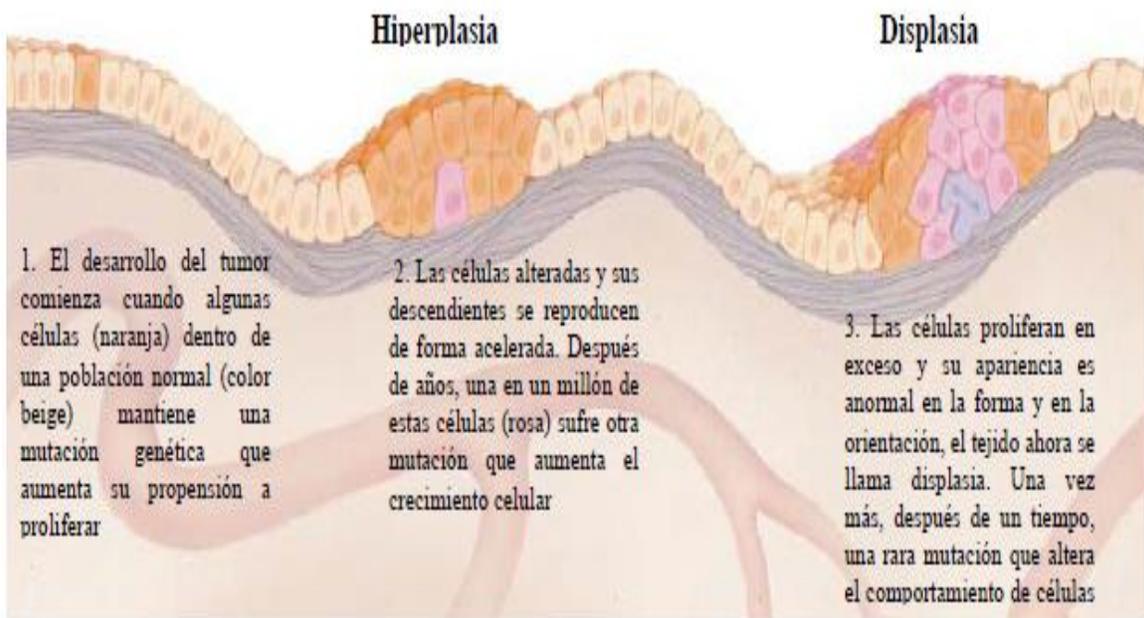


Figura 2. Etapas del desarrollo tumoral. Modificado de Weinberg, 1996.

Pero esta carcinogénesis se puede traducir en la historia de la enfermedad cancerosa en sus cuatro fases:

- Fase de *inducción*: 15-30 años (iniciación)
Iniciación y Promoción → asintomática
- Fase “*in situ*”: 5-10 años (promoción)
Asintomática
Diagnóstico precoz
- Fase de *invasión*: 1-5 años (progresión)
Sintomático
- Fase de *diseminación*: 1-5 años (progresión)
Sintomática
Tratamiento paliativo

Podemos afirmar que, para la acción preventiva, son de gran importancia estos conocimientos científicos, pues ellos brindan la posibilidad al personal sanitario de actuar con mayor seguridad. Si el profesional conoce; sabe que tiene entre 15 y 30 años para evitar la actuación de los factores de riesgo y de 5 a 10, según los diagramas de diagnóstico precoz, para detectar la enfermedad. En las dos últimas fases es más corto el periodo de tiempo y, además, se acelera todo el proceso de la carcinogénesis hasta la muerte. (Mendoza del Pino, *et al.* 2010).

II.1.4 CARCINÓGENOS

Un carcinógeno se define como cualquier agente o factor químico, físico o viral que causa cáncer o incrementa la incidencia del mismo (Schwab, 2001). Así un factor de riesgo o factor de exposición es algún fenómeno de naturaleza física, química, biológica, psicológica o social que afecta al genotipo, el fenotipo o alguna enfermedad anterior al efecto que se está estudiando, que por la variabilidad de su presencia o ausencia está relacionada con el cáncer o puede ser la causa de su aparición (Mendoza del Pino, *et al.* 2010).

Tabla 3. Agentes carcinógenos según Mendoza del Pino. Modificado de Mendoza del Pino, et al.2010.

Agente	Naturaleza	Ejemplo
Exógenos	Físicos	Radiaciones UV (solar) Radiaciones ionizantes Radón Bombas atómicas
	Químicos Inorgánicos	Carbonilo de níquel Cromo, níquel, cobalto Plomo Argón y otros
	Orgánicos	Alquitrán de hulla Petróleo Humo de tabaco Contaminación atmosférica Aminas aromáticas Colorantes azoicos Nitrosaminas Alcohol y otros
	Biológicos Virus	Epstein-bar
Endógenos	Genético congénito hereditario Predisposición genética	Cáncer de mama Cáncer de estómago Cáncer de colon Cáncer de endometrio Cáncer de próstata Cáncer de pulmón Cáncer de tiroides
	Padecimientos previos de determinadas afecciones (alteraciones cromosómicas)	Síndrome de Down Ataxia – telangiectaxia Xeroderma pigmentoso
	Adquirida o secundaria	Hiperplasia endometrial Cicatrices Nevus Inflamaciones crónicas

II.1.5 ANTITUMORALES.

Los fármacos denominados antitumorales son moléculas capaces de interferir en el proceso de desarrollo de ciertos tumores malignos y por lo tanto presentan la posibilidad de ser administrados para combatir dicho mal. Sin embargo estos fármacos poseen un estrecho margen terapéutico, elevada toxicidad y pueden inducir la aparición de resistencia en las células tumorales (Kalant, 2003). La tabla 4 muestra un resumen de antitumorales por grupo y mecanismo de acción. Estos fármacos se pueden dividir en las siguientes categorías generales:

Fármacos citotóxicos: cualquier fármaco que puede matar o lesionar las células ej.

Alquilantes y compuestos relacionados que actúan formando enlaces covalentes con el ADN e impidiendo de esta manera su replicación.

Antimetabolitos, que bloquean o interrumpen una o más vías metabólicas que intervienen en la síntesis de ADN

Antibióticos citotóxicos, es decir, sustancia de origen microbiano que impide la división de las células de los mamíferos

Derivados de plantas, la mayoría afecta de manera específica a la función de los microtúbulos y, por lo tanto, a la formación del huso mitótico

Hormonas, las más importantes son los esteroides, principalmente los glucocorticoides, estrógenos y andrógenos, y fármacos que suprimen la secreción de hormonas o que antagonizan su acción.

Anticuerpos monoclonales, se suelen utilizar solo en determinados tipos de cáncer.

Inhibidores de las proteínas cinasas, habitualmente tirosina cinasa y otras cinasas que actúan como transductores de señales de crecimiento en células de división rápida. Son de uso limitado (Rang, *et al.*2012).

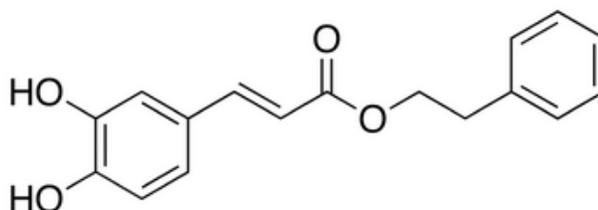
Tabla 4. Resumen de Antitumorales. Tomado de Rang, et al. 2012

Tipo	Grupo	Ejemplo	Principal mecanismo
Fármacos alquilantes afines	-Mostazas nitrogenadas	-Ciclofosfamida, isofosfamida, clorambucilo, melfalán.	Enlaces cruzados entre cadenas de ADN
	-Nitrosourea		
	-Compuestos de platino	-Lomustina, carmustina -Carcoplatino, cisplatino, oxaliplatino	
	-Otros	-Busulfano, treosulfán, tiotepa, dacarbacina.	

Antimetabolitos	-Antagonistas de folato -Vía de las pirimidinas -Vía de las purinas	-Metotrexato, raltitrexed, pemetrexed -Fluorouracilo, capecitabina, citarabina, gemcitabina Fludarabina, cladribina, mercaptopurina, tioguanina.	Bloqueo de la síntesis de ADN y/o RNA
Antibióticos citotóxicos	Antraciclinas -Otros	-Daunorrubicina, epirubicina doxorubicina, idarrubicina - Bleomicina, dactinomicina, mitomicina	Múltiples efectos sobre la síntesis de ADN y acción de topoisomerasas
Derivados de plantas	-Taxanos -Alcaloides de vinca -Captotecinas -Otros	-Paclitaxel, docetaxel -Vinblastina, vincristina, vindesina, vinorelbina -Irinotecán, topotecán -Etoposido	Ensamblaje de microtúbulos ; evita la formación del huso. Inhibición de la topoisomerasa
Hormonas/ antagonistas	-Hormona /análogos -Antagonistas -Inhibidores de la aromataasa	-Dietilestilbestrol, megestrol etinilestradiol, noretisterona -Tamoxifeno, toremifina, fulvestrant, bicalutamida -Anastrozol, exemastina, letrozol	Actúan como antagonistas fisiológicos o como inhibidores de la síntesis de hormonas para interrumpir el crecimiento tumoral dependiente de dichas hormonas.
Inhibidores de proteína cinasas	-Inhbibidores de tirosina cinasas -Inhibidores de las pan cinasas	-Dasatinib, erlotinib, imatinib, nilotinib, sunitinib -Sorafenib	Inhibición de las cinasas implicadas en la transducción de señales de receptores de factores de crecimiento.
Anticuerpos monoclonales	Anti-EGF, EGF-2 Anti-CD20/CD52 Anti-VEGF	Panitumumab, trastuzumab Rituximab, alemtuzumab Bevacizumab	-Bloqueo de la proliferación celular -Inhibición de la producción de linfocitos -Prevención de la angiogénesis

II.2 CAPE

El ácido 2-propenoico,3-(3,4-dihidroxifenil)-,2-fenetil éster, mejor conocido como CAPE, es un compuesto polifenólico derivado del ácido cafeico (figura. 3) de apariencia sólida, color blanco, cuya fórmula molecular es C₁₇H₁₆O₄ y presenta un peso molecular de 284.31g/mol (Domínguez, 2008)



CAPE

Figura 3 Estructura molecular del éster fenético del ácido cafeico (CAPE). Tomado de Domínguez, 2008.

II.2.1 PANORAMA HISTÓRICO

Grundberger en 1988 aísla al ácido cafeico como constituyente responsable de muchas propiedades del propóleo e identifica al éster fenético del ácido cafeico como la sustancia biológicamente activa, e informa del efecto citotóxico significativo de CAPE contra diversas líneas tumorales; se han desarrollado investigaciones para revelar las propiedades de la molécula, se le han descrito actividades como citotóxico y antitumoral (Grundberger, *et al.* 1988; Su, *et al.* 1991; Rao, *et al.* 1993), antiinflamatorio (Frenkel, *et al.* 1993), actividad inhibitoria contra VIH-1 integrasa, ciclooxigenasa y lipoxigenasa, también se ha reportado como bloqueador de la activación del factor nuclear NF- κ B por el factor de necrosis tumoral y bloquear por completo la producción de especies reactivas de oxígeno (Nagaoka, *et al.* 2002), prevención del cáncer hepático (Carrasco, *et al.* 2004), induce la expresión del gen HMOX1 para regular la hemooxigenasa-1 que juega un papel más importante en la actividad citoprotectora que la actividad antioxidante directa (Wang, *et al.* 2010). A pesar de todas estas propiedades, el CAPE se hidroliza fácilmente en plasma, y un estudio reveló que se elimina rápidamente al ser administrado por vía intravenosa en ratas.

Debido a la “simplicidad” de la estructura, algunos investigadores se han dado a la tarea de sintetizar compuestos análogos de CAPE manteniendo en algunos casos el grupo éster como es el caso del trabajo realizado por Nagaoka, *et al.* 2002; Wang, *et al.* 2006 y Wang, *et al.* 2010. En otros casos se cambió el grupo funcional éster por un grupo amida, como es

el caso reportado por Zou, *et al.* 2010, quienes evaluaron más de 20 aza-derivados en 9 líneas tumorales, obteniendo buenos resultados pues aun se conserva la capacidad citotóxica, que en algunos casos es mejor que la descrita por CAPE. Las amidas se asocian con mayor energía hidrolítica de activación en comparación con los ésteres de ahí que el grupo de colaboradores de Yang sintetizaran derivados fluorados de la amida fenética del ácido cafeico (CAPA por sus siglas en inglés) obteniendo las siguientes propiedades biológicas: antioxidante contra peroxidación de lípidos, agente antiinflamatorio potencial a través de su inhibición de la 5-lipoxigenasa, actividad depuradora de radicales e inhibición de α -glicosilasa; las concentraciones mayores a 40 μ M de CAPE y CAPA son citotóxicas y dieron menor viabilidad de células HUVEC, hay citoprotección significativa en la concentración de 1 a 40 μ M, el mecanismo de acción aun es desconocido pero se correlaciona con la presencia de catecol y grupos hidroxilo libres. CAPA es menos tóxico que CAPE pero sin diferencia significativa, es más estable en plasma y mantiene la actividad citoprotectora (Yang, *et al.* 2010)

II.2.2 CAPE en México

En el 2003 el grupo del Dr. Villa Treviño demostró que el CAPE posee un efecto quimioprotector en la hepatocarcinogénesis experimental inducida por Dietilnitrosamina (DEN) en ratas Wistar, los resultados sugieren que CAPE ejerce una actividad quimioprotectora contra la inducción de lesiones preneoplásicas, promoción y progresión del proceso de hepatocarcinogénesis (Carrasco, 2003).

Beltrán, 2005. Trato de elucidar si el mecanismo de acción del CAPE como quimioprotector involucra la modificación de las isoformas del citocromo p450 (CYP) que pueden estar participando en el metabolismo de DEN. Para esto se utilizó el modelo del hepatocito resistente y el CAPE se administró 12h antes de la iniciación, obteniendo como resultado que una sola dosis disminuye en un 70% la posibilidad de que las ratas desarrollen tumores, sugiriendo que un posible mecanismo quimioprotector es a través del metabolito del carcinógeno DEN pues CAPE modificó la actividad de algunos CYP que podrían estar involucrados CYP2E1, CYP1A1/1A2 y CYP2B1/2B2.

Domínguez en 2008 determinó el comportamiento de la proliferación celular en las líneas HeLa, Vero, Jurkat y K567 mediante ensayos de MTT, en este estudio se observó una marcada disminución de la proliferación celular dependiente de la concentración de CAPE, de la línea celular y del tiempo de incubación. CAPE demostró ser capaz de inducir apoptosis en las líneas tratadas siendo las células Jurakt y las células mononucleares de sangre periférica las que mostraron un mayor porcentaje de apoptosis, 55 % y 65%

respectivamente, además que mostró tener efecto genotóxico mucho menor que el control positivo (ifosfamida).

Paniagua en 2010 estudió el compuesto N[2-clorobencil]cinamida (NA01) que es uno de los compuestos obtenidos por diseño computarizado en el Laboratorio de Química Medicinal de la FES-Cuautitlán . Este nuevo compuesto es ya una amida y no un éster (ver figura 4). Se estudio mediante SCGE demostrando que NA01 presenta ligera actividad genotóxica en cultivo de linfocitos humanos, sin embargo, este daño es mucho menor al que produce MMS empleado como control positivo, por otra parte en cuanto a la evaluación de su citotoxicidad, NA01 a dosis de 10 y 100µg/mL no produjeron muerte celular mayor al 5%.

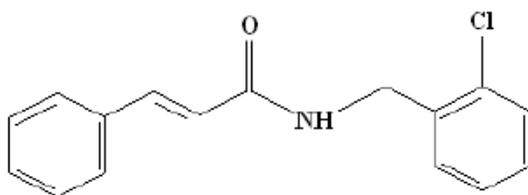


Figura 4. Estructura molecular del derivado análogo del CAPE, NA01 (N-[2 clorobencil]cinamida). Tomado de Paniagua, 2010.

Otro de los análogos del CAPE diseñado y sintetizado en FES-Cuautitlán fue el PA01 cuya estructura se muestra en la figura 5

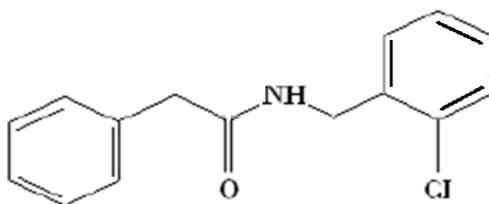


Figura 5. Estructura molecular del derivado análogo del CAPE, PA01 (N-[(2 clorofenil)metil]-Benzenacetamida). Tomado de Macías, et al. 2012.

Ruiz en 2012 evaluó una serie de 30 compuestos nuevos de la serie LQM700 derivados análogos del CAPE. El experimento consistió en poner a prueba dichos compuestos a la concentración de 100µM en tres líneas celulares neoplásicas: MDA-MB 231 (cáncer de mama), HeLa (cáncer de cérvix) y PPC-3 (cáncer de próstata), además de emplear un

cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica (linfocitos) y células de tejido sano (fibroblastos). Por otra parte se evaluó la citotoxicidad de los compuestos mediante la técnica de Bromuro de 3(4,5 dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólico (MTT) y cristal violeta (CV).

Hernández en 2013 evaluó el efecto antigenotóxico del compuesto LQM731, análogo del éster fenílico del ácido cafeico (CAPE), mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel, demostrando que este compuesto posee actividad antigenotóxica al disminuir en células de hígado el daño al ADN causado por MMC en un 91.7 % empleando una dosis de 20mg/Kg y un 90.2% en células de riñón a la misma dosis a un tiempo de 3h post-administración.

II.3 Ensayo de electroforesis unicelular en gel (SCGE) o ensayo cometa

El ensayo cometa o electroforesis unicelular alcalina, es un método sensible y relativamente sencillo para detectar daño en el ADN a nivel de células individuales (Singh et al. 1988), asimismo detecta rupturas de ADN de cadena sencilla y enlaces cruzados, con el enfoque de una sola célula en pruebas citogenéticas.

Fue desarrollado para medir rompimientos en la cadena del ADN en células expuestas a radiación ionizante, utilizando una técnica en la cual embebían las células en un gel de agarosa obteniendo un halo de ADN fragmentado alrededor del núcleo. Posteriormente se optimizó el método efectuando la lisis en una solución neutra y empleando un campo eléctrico débil para atraer a los fragmentos de ADN hacia la carga positiva (Östling, 1984) Por ultimo en ADN se tiñó con bromuro de etidio para visualizar los núcleos con los cometas (Tice, 2000)

La electroforesis alcalina ($\text{pH} \geq 13$) desenrolla al ADN y separa las proteínas asociadas, incrementando la movilidad y visualización de los fragmentos de ADN, debido a esto, se pueden observar rupturas de cadena sencilla y doble; lesiones en los sitios sensibles al álcali y en sitios de reparación retardada del ADN; ofreciendo mayor sensibilidad para detectar agentes genotóxicos (Fairbairn, *et al.* 1995, Rojas, *et al.* 1999). Así el ADN migra fuera de la célula bajo la influencia de un campo eléctrico, donde el ADN no dañado migra más lento (figura 6a) y permanece encerrado dentro del núcleo cuando es aplicada una corriente eléctrica, mientras que un patrón de migración con la apariencia de un cometa (figura 6b) indica que el ADN de la cauda está dañado.

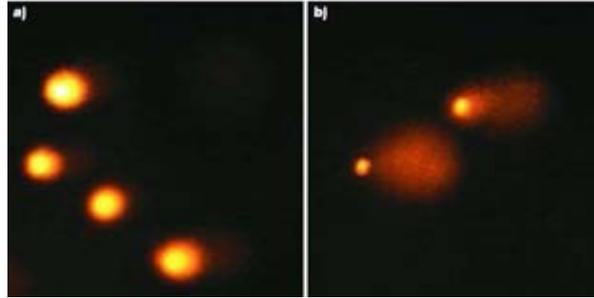


Figura 6 Imágenes de cometas obtenidos de linfocitos asilados utilizando la versión alcalina. a) controles mostrando igualmente una pequeña migración que corresponde al daño basal b) tratados con radiación gamma donde se observa la formación típica de un cometa cabeza y cola. Tomado de Zuñiga, 2009

II.3.1 Mecanismos de formación de cometas

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

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

II.3.2 Medición del daño

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

- Semicuantitativa: a través de evaluaciones visuales, para estimar en la imagen la longitud de la cauda y ancho del nucleoide o cabeza con un micrómetro para después calcular diversos parámetros y/o la clasificación en 5 categorías dependiendo de la migración de ADN observada como se ilustra en la figura 7.

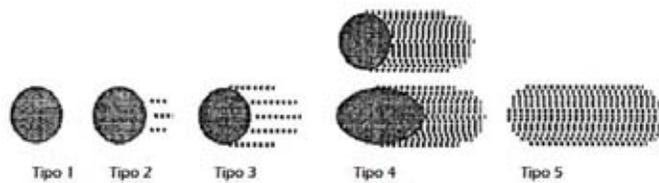


Figura 7. Clasificación por Kobayashi, *et al.* 1995 en Zúñiga, 2009

- Cuantitativa: para evaluar el daño al ADN en estudios de genotoxicidad se ha tomado como criterio de daño el *momento de la cola* (momentum de la cauda TM por sus siglas en inglés) (Anderson, *et al.* 2003, Schabath, *et al.* 2003) que es el porcentaje de ADN en la cola que es producto de la distancia de migración y de la densidad de ADN (Olive, *et al.* 1990, 1992; Muller, *et al.* 1994) el momento de la cola incorpora una medida tanto del tamaño más pequeño de ADN que migra fuera del núcleo (longitud de la cola del cometa) y el número de rupturas (representado por la intensidad de ADN en la cola). Con la ayuda de un software analizador de imagen (figura 8) es posible determinar: la intensidad, área total, largo de la cauda, largo del cometa, tamaño de la cabeza, momentum de la cauda (TM), la longitud de la cola (TL) y momentum de la cauda de Olive. (Hartmann, *et al.* 2003; Rojas, 2008).

Una vez finalizada la cuantificación del daño en las células se obtiene una hoja de cálculo (figura 9) en donde se tienen los datos de todos los parámetros obtenidos de cada una de las células medidas por individuo, además de algunas medidas estadísticas de tendencia central, dispersión y variabilidad de estos mismos parámetros por individuo.

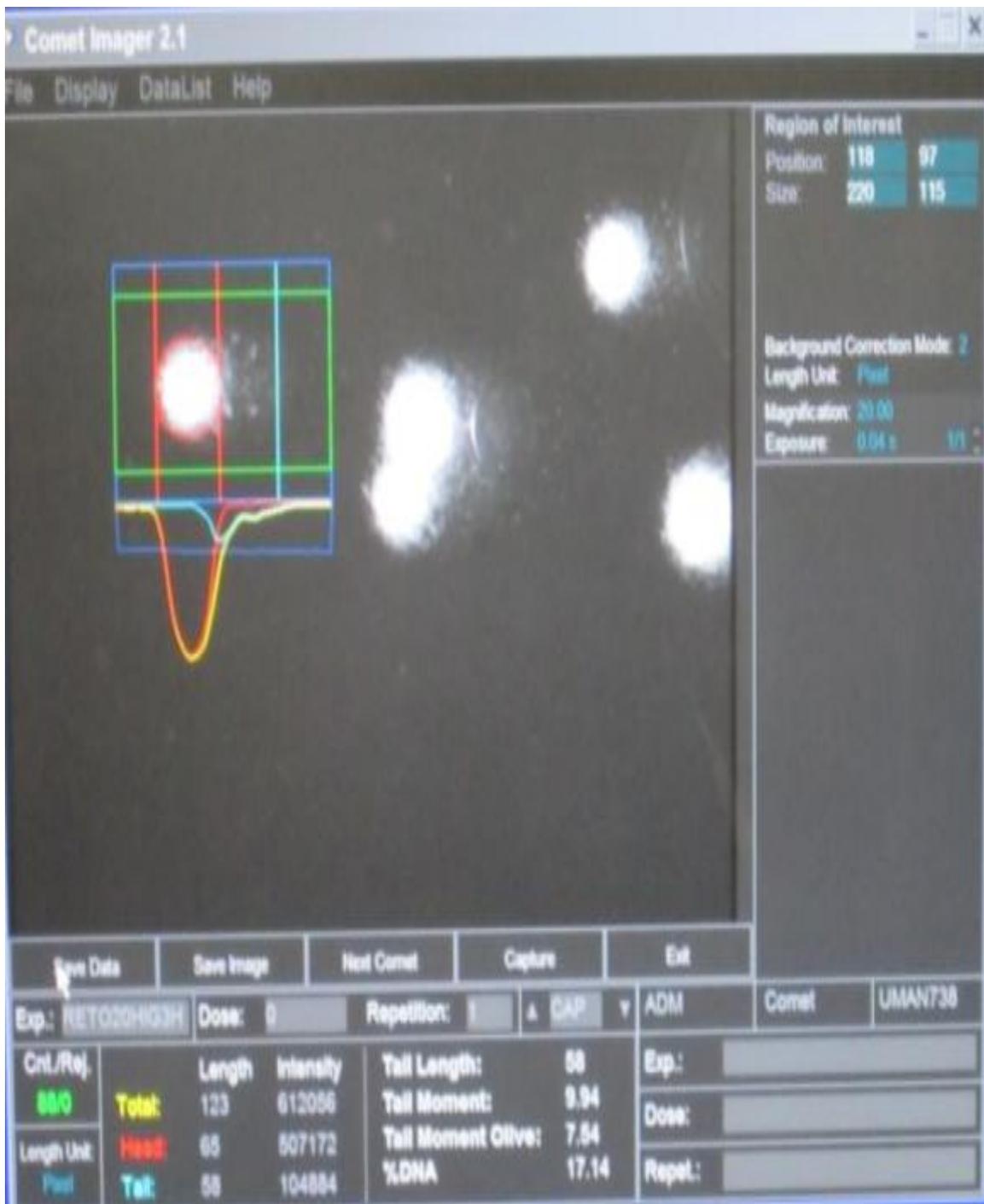


Figura 8. Ejemplo de pantalla del software del analizador de imagen Comet Imager 2.1 Tomada de Hernández, 2013.

Microsoft Excel window: CORRECCIONBLANCORINON3H-0-1

Menu: Inicio, Insertar, Diseño de página, Fórmulas, Datos, Revisar, Vista

Formulas bar: C19

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	
1	Comet Imag	Measur	ements	V2.1.SR-	00 2	#####											
2																	
3	Experiment:	CORRECC	IONBLANCO	RINON3H,	Dose:	0, Reptet.:1											
4																	
5	Length unit:	Pixel															
6																	
7	Nr.	Dose	Repet.	Id.	Image	Tail Moment	Head Size	Tail Length	Total Length	Head Intensi	Tail Intensity	Total Intensi	Head Area	Tail Area	Total Area	Remark	Me Tail M
8	1	0	1	1	1 CAP	6.23525808	41	35	76	151568	32855	184423	1320	1272	2592	Auto	4.810
9	2	0	1	2	2 CAP	18.9456758	39	59	98	116609	55156	171765	1195	1848	3044	Auto	9.312
10	3	0	1	3	3 CAP	59.9191656	43	142	185	62956	45958	108914	1452	3758	5210	Auto	23.20
11	4	0	1	4	4 CAP	6.97115115	35	29	64	78703	24906	103609	962	892	1854	Auto	4.807
12	5	0	1	5	5 CAP	5.064775	37	24	60	86418	23115	109533	1075	763	1838	Auto	4.009
13	6	0	1	6	6 CAP	23.6726756	41	67	108	63675	34790	98465	1320	2195	3514	Auto	12.01
14	7	0	1	7	7 CAP	11.3039785	41	51	92	67614	19254	86868	1320	1376	2696	Auto	6.427
15	8	0	1	8	8 CAP	1.73861408	45	20	65	81496	7759	89255	1589	633	2223	Auto	2.347
16	9	0	1	9	9 CAP	9.78790836	41	47	88	73022	19207	92229	1320	1621	2942	Auto	6.664
17																	
18	Mean:					19.8496654	46.26	63.62	109.79	239504.61	48943.73	288448.34	1703.43	2114.91	3818.69		9.353
19	No.:					100	100	100	100	100	100	100	100	100	100		
20	Stdd.:					39.8262846	5.44878821	79.2827417	78.9031237	85080.2786	57064.9385	102527.1767	33.0429856	2907.24011	2925.32197		18.3
21	Median:					4.97423489	47	34.5	79.5	258357	32860.5	291844.5	1734	1111	2762.5		3.942
22	1.Quart.:					0.62540827	43	13	60	192196	14767	256483.5	1452	415.5	2202.5		1.305
23	3.Quart.:					20.0578756	49	73.5	119	285728.5	68004.5	329124	1886	2627	4306.5		9.262
24	Q.-Dist.:					19.4324674	6	60.5	59	93532.5	53237.5	72640.5	434	2211.5	2104		7.957
25	Min.:					0	35	0	45	57064	0	86868	962	0	1589		

Figura 9. Ejemplo de hoja de cálculo obtenida de la cuantificación del daño en las células. (Fotografía: Cruz, 2014)

III. JUSTIFICACIÓN

En el marco del día mundial de la lucha contra el cáncer (4 febrero de 2014) se da a conocer “un pronóstico oscuro en el mundo, pues se diagnosticarán casi 22 millones de casos de cáncer en la década del 2030 frente a los 14 millones reportados en el 2012, esto debido a un fuerte incremento de la enfermedad en los países en desarrollo, en ese mismo lapso las muertes por cáncer pasarán del 8.2 millones a 13 millones por año, tendencia que va a la par con el aumento del envejecimiento de la población y con la adopción reciente de hábitos y reposos como fumar, todo ello de acuerdo al reporte de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer de la OMS. Para los expertos el mayor impacto serán los países con menores recursos, muchos de ellos mal equipados para este incremento en los números del cáncer”*. Frente a todo este panorama los esfuerzos por combatirlo tampoco han cesado, si bien la era de la quimioterapia anticancerígena comenzó por los años 40’s, empleándose inicialmente derivados del gas mostaza, en la década de los 60’s, les siguieron el descubrimiento de la 6-mercaptopurina, vincristina, en 1988 Grundberger identifica al Éster Fenético del Ácido Cafeico (CAPE) como la sustancia biológicamente activa contenido en el propóleo de las abejas, el cual posee una plétora de actividades biológicas importantes tales como: potente inhibidor selectivo en el crecimiento de las células neoplásicas que no afecta a las células normales (linfocitos); sin embargo se hidroliza fácilmente en plasma, aislarlo de la colmena es una tarea compleja con poca utilidad y en la síntesis química del CAPE los rendimientos son muy bajos, con todo esto se han desarrollado amidas análogas estructurales que semejan e incluso algunos mejoran la actividad de CAPE.

En la FESC el grupo del Dr. Enrique Ángeles se ha encargado de sintetizar compuestos CAPA análogos del CAPE desde hace ya algunos años, el compuesto LQM738 fue evaluado *in vitro* por Ruíz en 2012 y resultó ser selectivamente citotóxico, en particular para la línea celular PC-3 que obtuvo una concentración inhibitoria 50 (IC₅₀) de 25.04µM y para la línea MDA-MB-231 una concentración de 35.52µM, esto con un tiempo de exposición de 24h utilizando la técnica de MTT. El compuesto es NO citotóxico para el cultivo primario de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) dando una IC₅₀ de 153.6µM, con estos resultados se puede decir que el LQM738 mostró ser un buen candidato para emplearse como fármaco contra el cáncer de mama y próstata, así que como parte de los estudios preclínicos para los nuevos compuestos con interés terapéutico se plantea continuar con la evaluación *in vivo*. Por esta razón aquí estudiamos el efecto genotóxico y antigenotóxico del compuesto LQM 738, mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel, en ratones CD1.

*Tomado de: OMS alerta sobre ola de cáncer en el mundo - 04/02/14.
<http://www.youtube.com/watch?v=SADC-LXGDeo&sf=Relevancy#l>

IV. OBJETIVO GENERAL

Determinar la capacidad genotóxica y antigenotóxica, del compuesto LQM738, empleando la técnica de electroforesis unicelular en gel en la versión alcalina pH>13 en células de hígado y riñón de ratones machos jóvenes de la cepa CD1.

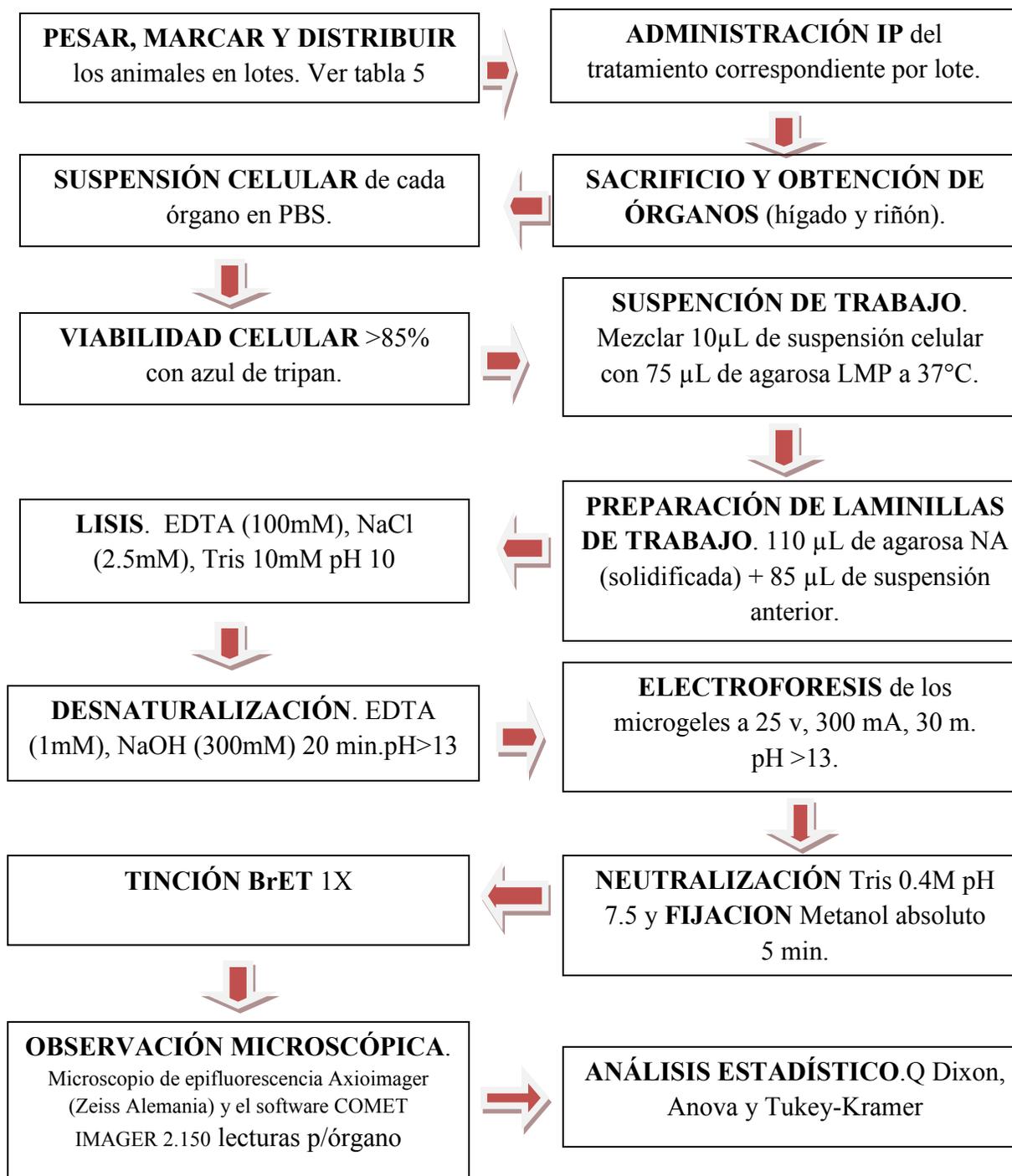
OBJETIVOS PARTICULARES

- Inducir daño genotóxico agudo en un modelo *in vivo* (ratones machos de la cepa CD1) empleando Mitomicina C a una dosis de 2mg/Kg como agente mutagénico, para demostrar por medio del ensayo cometa la acción del compuesto LQM738.
- Evaluar la genotoxicidad aguda del compuesto LQM738 a 3 y 18 horas de exposición, a dos diferentes dosis (20 y 40mg/Kg) administrados por vía intraperitoneal.
- Evaluar la antigenotoxicidad del compuesto LQM738 a 3 y 18 horas de exposición, a dos diferentes dosis (20 y 40 mg/Kg), después de haber inducido daño en el ADN por Mitomicina C (MMC).

V. HIPÓTESIS

Dada la vasta cantidad de evidencias que comprueban la acción quimioprotectora del éster fenílico del ácido cafeico y diversos derivados análogos, se espera que siendo el compuesto LQM738 un análogo más, éste presente una igual o mayor actividad que el CAPE evaluándola como acción antígenotóxica además de no presentar genotoxicidad *per se* el compuesto.

VI. DIAGRAMA DE FLUJO



VII. MATERIAL Y MÉTODOS

MATERIAL

Equipos y materiales

Balanza analítica.
Baño seco.
Cajas de Petri.
Cámara de electroforesis.
Cámara de Neubauer.
Charolas de plástico, desechables.
Contador.
Cubreobjetos de 24 x 50 mm.
Equipo de disección.
Fuente de poder.
Horno de microondas.
Jeringas desechables de 1, 3, 5 y 10ml.
Material de cristalería para preparación de soluciones.
Micropipetas de 5, 10 y 100 µl con puntas.
Microscopio de epifluorescencia
Microscopio óptico.
Papel secante.
Placas de hielo.
Portaobjetos de 76 x 26 mm.
Potenciómetro.
Termómetro.
Tubos Eppendorf.
Vasos Copplin.

Material biológico

Ratones machos jóvenes (25-30g),
cepa CD1

Reactivos

Ácido clorhídrico.
Agarosa de bajo punto de fusión (LMP).
Agarosa de normal punto de fusión (NA).
Agua desionizada.
Azul de tripan.
Bromuro de etidio.
Cloruro de sodio.
Dimetilsulfóxido.
EDTA (sal disódica).
Hidróxido de sodio.
Hielo frapé
Metanol absoluto.
Mitomicina C.
LQM 738.
PBS pH=7.4.
Triton X-100.
Trizma base.

MÉTODOS

Metodología experimental

Preparación del reactivo de prueba LQM738

Ver anexo 2 *Preparación de soluciones*

PESAR, MARCAR Y DISTRIBUIR los animales en lotes.

Cada lote de trabajo estuvo constituido por 5 animales: mismos que fueron pesados y marcados cada uno con marcador indeleble empleando la técnica de anillos en la cola iniciando desde la base.

La distribución usada se observa en la tabla 5 obteniéndose un total de 13 lotes.

Tabla 5. Distribución de lotes

LOTE	ANIMALES	TIEMPO (h)	TRATAMIENTO	DOSIS
BCO	5	-	-	-
DMSO80%	5	3	DMSO	-
	5	18		
MMC(0.2mg/mL)	5	3	MMC	2 mg/Kg
	5	18		
LQM 738 (20mg/Kg)	5	3	LQM 738	20 mg/Kg
	5	18		
LQM 738 (40mg/Kg)	5	3	LQM738	40 mg/Kg
	5	18		
MMC + LQM 738 (20mg/Kg)	5	3	MMC + LQM 738	2 mg/Kg + 20 mg/Kg
	5	18		
MMC + LQM 738 (40mg/Kg)	5	3	MMC + LQM 738	2 mg/Kg + 40 mg/Kg
	5	18		

ADMINISTRACIÓN IP del tratamiento correspondiente por lote.

Se realizaron los cálculos necesarios para determinar la dosis que se debe administrar a cada animal de acuerdo al esquema de la tabla anterior, a su peso y teniendo muy en cuenta que el volumen máximo que se puede administrar a un ratón vía IP es de 0.3mL.

Todo el trabajo con animales se desarrolló en las instalaciones de la Unidad de Aislamiento y Bioterio de la FES-Cuautitlán a cargo del Dr. Crisóforo Mercado, siguiendo las normas que esta unidad establece para ello, en base al CICUAE de la FESC.

SACRIFICIO Y OBTENCIÓN DE ÓRGANOS (hígado y riñón).

Tras haber transcurrido el tiempo de tratamiento (3 o 18h) el animal se sacrificó por dislocación cervical, se examinó visulamente órganos internos y se extrajo una porción al azar de hígado y riñón.

SUSPENSIÓN CELULAR de cada órgano en PBS.

Los órganos se colocaron por separado en cajas Petri con PBS frío y sobre hielo picado, se cortaron con tijeras para obtener trozos pequeños y disgregar los tejidos succionando con jeringa de 3mL hasta obtener una suspensión celular homogénea. Se empleó la metodología para ensayo cometa de Martínez, *et al.* 2012 modificada.

VIABILIDAD CELULAR: >85% con azul de tripán.

Se mezcló en un portaobjetos 5µL de suspensión celular y 5µL de azul de tripán, la mezcla se coloca en una cámara de Neubauer y observa al microscopio óptico a 40x donde se realiza el conteo en cuatro cuadrantes periféricos. Las células vivas (CV) se observan ligeramente amarillentas, mientras que las células muertas (CM) se tiñen de color azul.

$$\%CV = \frac{CV}{CV + CM} \times 100$$

PREPARACIÓN DE LAMINILLAS DE TRABAJO: 110µL de agarosa AN (solidificada) + 85µL de suspensión celular.

Si se obtiene una viabilidad > 85%, se mezclan 10µL suspensión celular con 75µL de agarosa LMP a 37°C se homogenizan perfectamente en un tubo eppendorf y se colocan los 85µL de esta nueva mezcla en un portaobjetos previamente preparado con una capa de agarosa (AN) solidificada y se protege con un cubreobjetos largos (24 x 50mm), se deposita en bloque de hielo hasta que solidifique el agarosa LMP. Se retira cuidadosamente el “cubre”, se colocan 75µL más de agarosa LMP a 37°C cubriéndolos de nueva cuenta y descansándolos una vez más en bloque de hielo; al solidificar se separa el cubreobjetos.

LISIS: EDTA (100mM), NaCl (2.5mM), Tris 10mM pH 10

Los portaobjetos que ya cuentan con las tres capas de agarosa bien solidificada, se les retiró el cubreobjetos y fueron colocados en vasos Copplin con solución de lisis durante 12h manteniéndolos en oscuridad y en refrigeración.

DESNATURALIZACIÓN: EDTA (1mM), NaOH (300mM) 20min. ELECTROFORESIS de los microgeles a 25v, 300mA, 30 minutos. pH >13.

Al cabo de las 12h las laminillas de trabajo son colocados en la caja electroforética y cubiertas con el buffer de electroforesis durante 20 minutos, para expresar los sitios alcali lábiles, pasado este tiempo se comenzó la corrida electroforética a 25v, 300mA, 30 minutos en oscuridad.

NEUTRALIZACIÓN Tris 0.4M pH 7.5 y FIJACIÓN Metanol absoluto 5min.

Con la ayuda de unas pinzas se retiraron los portaobjetos de la cámara, se lavaron con solución de neutralización 3 veces cada una por 1min. Posteriormente se sumergieron en metanol absoluto por 5min. Se dejaron secar y guardaron para su posterior observación.

TINCIÓN. BrET 1x

Se colocaron 50µL de bromuro de etidio 1x sobre el portaobjetos de trabajo, se cubrieron con cubreobjetos largos para expandir el bromuro a lo largo del portaobjetos, se retiró el exceso de solución con papel secante.

OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA. 50 lecturas p/órgano

Finalmente se analizaron los cometas en el microscopio de epifluorescencia Axio Imager A1 marca Zeiss con el software Comet Imaging versión 2.1. Las lecturas fueron tomadas siempre del centro de cada portaobjetos hasta cubrir 50 por órgano y por tratamiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO. Q Dixon, Anova y Tukey-Kramer

Se utilizó el programa estadístico GraphPad InStat versión 3.1 realizándose el ANOVA y la comparación de medias entre los lotes de trabajo, con la prueba de Turkey-Kramer $P < 0.05$. Además de la prueba contraste de Dixon o contraste Q para determinar si existían algún dato anómalo.

VIII. RESULTADOS

EVALUACIÓN CITOTÓXICA

Viabilidad celular: debe encontrarse por encima del 85% (franja roja en figuras 10-13) para la validación del ensayo cometa.

Tabla 6. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de hígado de ratón CD1 a 3h post-administración, evaluada mediante la técnica de azul de Tripán.

Lote	Media	Error std
BCO	96.2	1.2700
DMSO 80%	94.4	1.5900
MMC (0.2 mg/ml)	95.2	0.7100
LQM 738 (20mg/Kg)	96.0	1.5600
LQM 738 (40mg/Kg)	95.3	0.6700
MMC + LQM 738 (20mg/Kg)	95.7	0.9100
MMC + LQM 738 (40mg/Kg)	95.5	1.1200

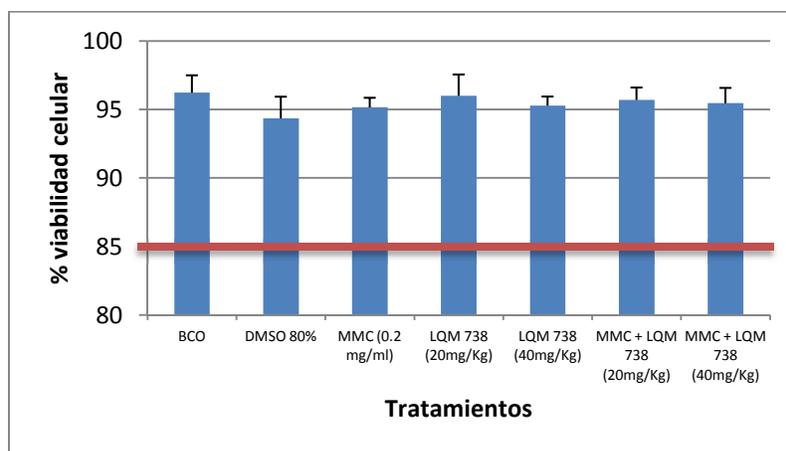


Figura 10. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en las células de hígado de ratón CD1 a 3h post-administración.

Tabla 7. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de hígado de ratón CD1 a 18h post-administración, evaluada mediante la técnica de azul de Tripán.

Lote	Media	Error std
BCO	96.0	1.00000
DMSO 80%	91.1	0.35000
MMC (0.2 mg/ml)	93.7	1.09000
LQM 738 (20mg/Kg)	92.6	2.00000
LQM 738 (40mg/Kg)	93.5	1.72000
MMC + LQM 738 (20mg/Kg)	93.7	1.28000
MMC + LQM 738 (40mg/Kg)	95.4	1.00000

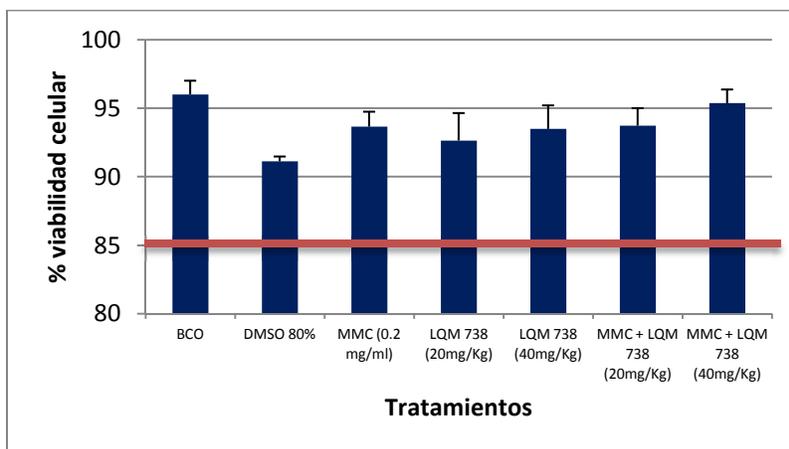


Figura 11. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en las células de hígado de ratón CD1 a 18h post-administración.

Tabla 8. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de riñón de ratón CD1 a 3h post-administración, evaluada mediante la técnica de azul de Tripán.

Lote	Media	Error std
BCO	90.7	1.1300
DMSO 80%	90.3	1.6600
MMC (0.2 mg/ml)	88.6	1.3600
LQM 738 (20mg/Kg)	94.4	0.7800
LQM 738 (40mg/Kg)	90.7	1.3800
MMC + LQM 738 (20mg/Kg)	93.4	1.3800
MMC + LQM 738 (40mg/Kg)	89.4	5.3500

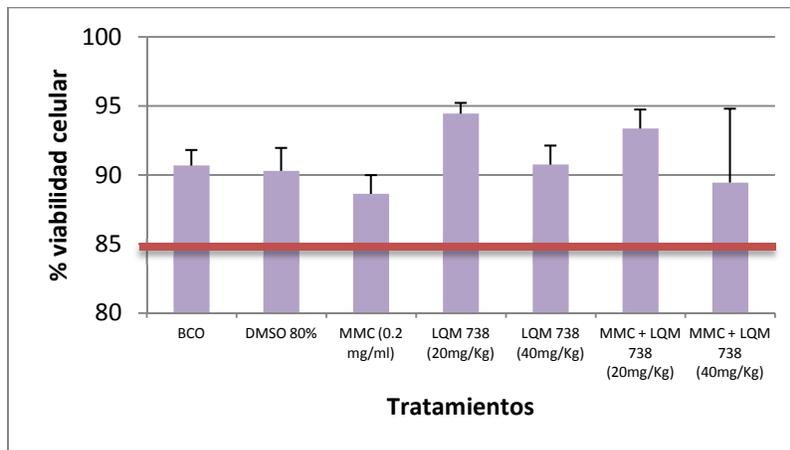


Figura 12. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en las células de riñón de ratón CD1a 3h post-administración.

Tabla 9. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en células de riñón de ratón CD1 a 18h post-administración, evaluada mediante la técnica de azul de Tripán.

Lote	Media	Error std
BCO	96.0	1.0000
DMSO 80%	88.0	2.3400
MMC (0.2 mg/ml)	88.9	2.6000
LQM 738 (20mg/Kg)	88.5	4.4400
LQM 738 (40mg/Kg)	91.4	1.0500
MMC + LQM 738 (20mg/Kg)	91.5	1.5800
MMC + LQM 738 (40mg/Kg)	96.0	0.7100

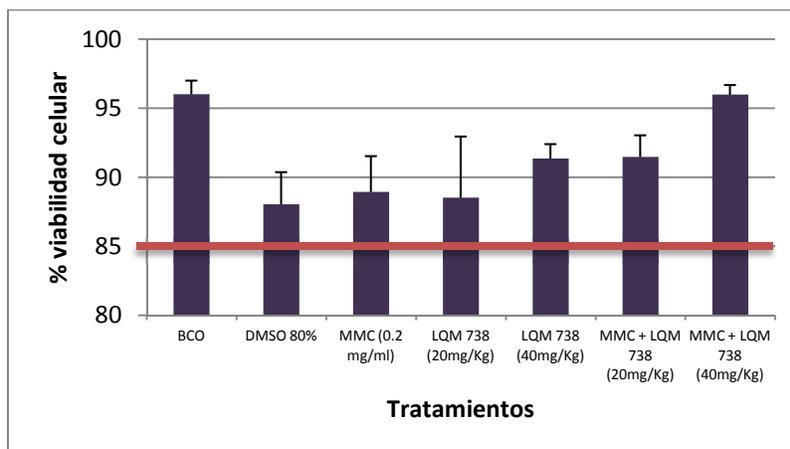


Figura13. Porcentaje de viabilidad celular obtenido en las células de riñón de ratón CD1 a 18h post-administración.

Tabla 10. Resultados de la evaluación obtenida de los momentos de la cauda (expresados en pixeles) en células de hígado de ratón CD1 a 3h post-administración

	BCO.	DMSO80%	MMC 0.2mg/mL	LQM738 20mg/Kg	LQM738 40mg/Kg	MMC+LQM738 20mg/Kg	MMC+LQM738 40mg/Kg
1	1.55	1.19	110.26	9.59	7.52	4.7	23.8
2	1.6	2.76	112.9	19.28	8.46	8.23	25
3	1.81	7.01	121.1	44.59	9.83	20.64	98.55
4	9.88	8.04	163.89	51.33	15.72	23.24	141.98
5	17.39	9.34	220.99	62.82	50.04	27.69	152.29
Promedio	6.446	5.668	145.828	37.522	10.382	16.9	88.324
Q min	0.003	0.192	0.023	0.182	0.022	0.153	0.009
Q max	0.474	0.159	0.515	0.215	0.807	0.193	0.080
desv std	7.080	3.514	47.266	22.324	3.682	9.932	61.742
error std	3.166	1.571	21.138	9.983	1.646	4.441	27.612

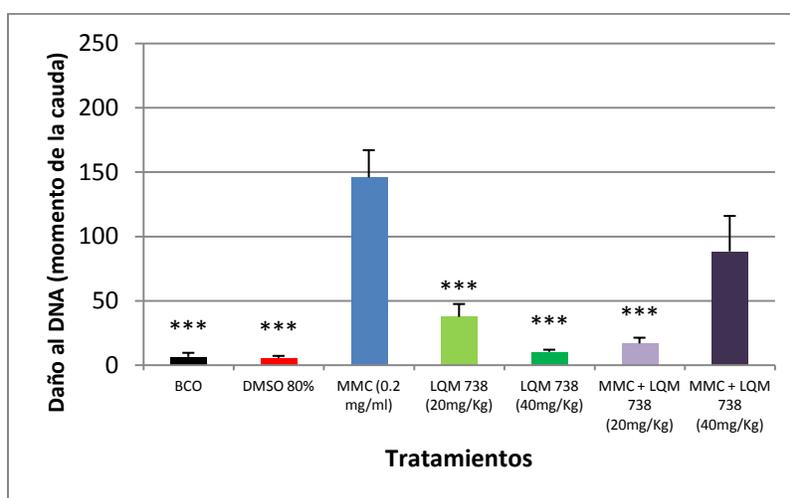


Figura 14. Daño causado al ADN (expresado en pixeles) de las células de hígado de ratón CD1 en los distintos tratamientos a 3h post-administración.

*** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control positivo (ANOVA, Tukey-Kramer P<0.001).

Tabla 11. Resultados de la evaluación obtenida de los momentos de la cauda (expresados en pixeles) en células de hígado de ratón CD1 a 18h post-administración

	BCO.	DMSO80%	MMC 0.2mg/mL	LQM738 20mg/Kg	LQM738 40mg/Kg	MMC+LQM738 20mg/Kg	MMC+LQM738 40mg/Kg
1	1.55	2.21	0.18	1.1	3.97	1.13	1.32
2	1.6	2.36	2.67	2.3	4.94	1.47	3.25
3	1.81	3.63	10.51	2.55	9.37	2.49	7.1
4	9.88	4.72	13.18	2.64	10.02	2.79	8.27
5	17.39	5.71	21.9	24.86	22.33	4.43	11.68
promedio	6.446	3.726	9.688	2.14	10.126	2.462	6.324
Q min	0.003	0.042	0.114	0.050	0.052	0.103	0.186
Q max	0.474	0.282	0.401	0.935	0.670	0.496	0.329
desv std	7.080	1.508	8.684	0.712	7.319	1.298	4.109
error std	3.166	0.674	3.883	0.318	3.273	0.580	1.838

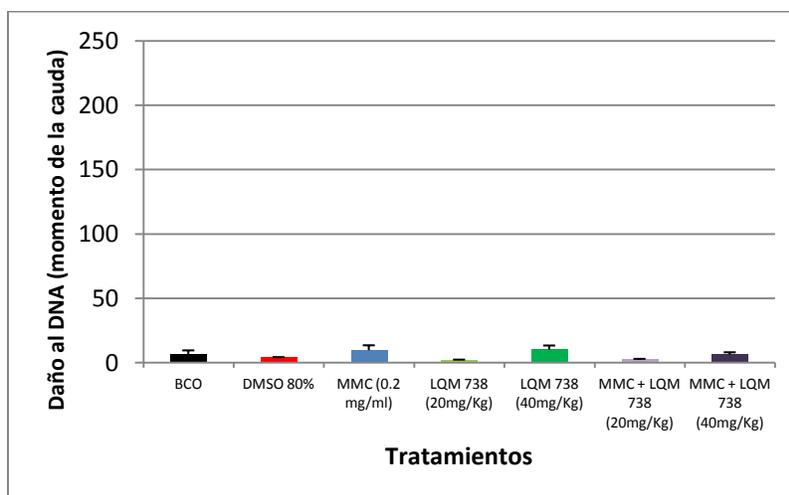


Figura15. Daño causado al ADN (expresado en pixeles) de las células de hígado de ratón CD1 en los distintos tratamientos a 18h post-administración.

Tabla 12. Resultados de la evaluación obtenida de los momentos de la cauda (expresados en pixeles) en células de riñón de ratón CDI a 3h post-administración

	BCO.	DMSO80%	MMC 0.2mg/mL	LQM738 20mg/Kg	LQM738 40mg/Kg	MMC+LQM738 20mg/Kg	MMC+LQM738 40mg/Kg
1	1.6	4.5	122.08	26.4	50.16	25.24	76.27
2	9.88	6.68	187.03	46.25	81.35	63.15	92.1
3	13.78	14.09	196.92	61.78	81.93	65.75	100.95
4	17.39	25.28	209.53	100.27	128.5	112.96	101.07
5	25.9	32.76	219.15	124.56	149.35	129.25	201.61
promedio	13.71	16.662	186.942	71.852	98.258	79.27	92.591
Q min	0.340	0.077	0.669	0.202	0.314	0.364	0.126
Q max	0.350	0.264	0.099	0.247	0.210	0.156	0.802
desv std	8.992	12.120	38.256	40.026	39.971	41.817	11.667
error std	4.021	5.420	17.108	17.900	17.875	18.701	5.217

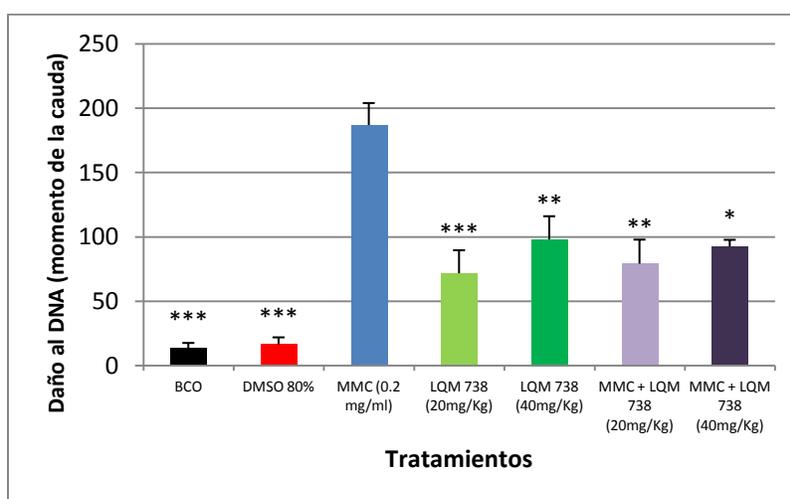


Figura 16. Daño causado al ADN (expresado en pixeles) de las células de riñón de ratón CDI en los distintos tratamientos a 3h post-administración.

*** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control positivo (ANOVA, Tukey-Kramer $P < 0.001$).

**Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control positivo (ANOVA, Tuckey-Kramer $P < 0.01$).

*Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control positivo (ANOVA, Tukey-Kramer $P < 0.05$).

Tabla 13. Resultados de la evaluación obtenida de los momentos de la cauda (expresados en pixeles) en células de riñón de ratón CD1 a 18h post-administración

	BCO.	DMSO80%	MMC 0.2mg/mL	LQM738 20mg/Kg	LQM738 40mg/Kg	MMC+LQM738 20mg/Kg	MMC+LQM738 40mg/Kg
1	1.6	0.55	1.27	4.48	10.44	3.78	1.96
2	9.88	3.32	5.84	5.72	13.78	7.11	3.45
3	13.78	4.54	18.25	12	16.26	9.03	5.28
4	17.39	4.84	25.38	15.48	17.12	9.96	10.04
5	25.9	11.56	50.63	23.59	43.12	16.26	20.91
promedio	13.71	4.962	20.274	12.254	14.404	9.228	8.328
Q min	0.340	0.251	0.092	0.064	0.102	0.266	0.078
Q max	0.350	0.610	0.511	0.424	0.795	0.504	0.573
desv std	8.992	4.058	19.500	7.779	2.995	4.587	7.662
error std	4.021	1.815	8.721	3.479	1.339	2.051	3.426

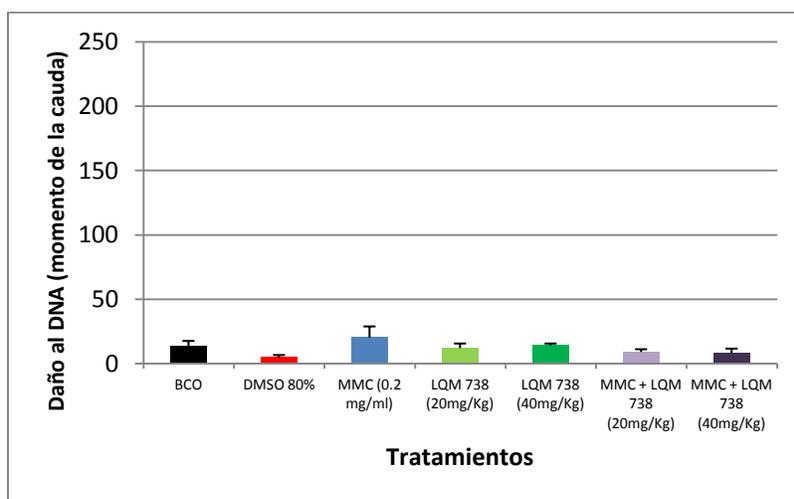


Figura 17. Daño causado al ADN (expresado en pixeles) de las células de riñón de ratón CD1 en los distintos tratamientos a 18h post-administración.

IX. DISCUSIÓN

El compuesto LQM738 tiene un peso molecular de 432.72gr/mol y una fórmula condensada $C_{22}H_{16}O_2NCl_3$; pertenece a la serie LQM700 y es un derivado amídico halogenado del éster fenílico del ácido cafeico (CAPE). Fueron desarrollados con las técnicas de Química computacional empleando paquetes que relacionan la estructura química con la actividad biológica mediante el método QSAR (Quantitative Structure-Activity) y los métodos de modelación molecular y sintetizado por el grupo de investigación del Dr. Enrique Angeles Anguiano en el laboratorio de Química Medicinal de FESC UNAM.

En el presente trabajo se evaluó la capacidad genotóxica y antigenotóxica del LQM738 mediante la técnica de electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa), en ratones machos jóvenes de 24-26g de peso de la cepa CD1. La viabilidad celular mayor al 85% durante la técnica del ensayo cometa es de crucial importancia, pues es así como se valida la técnica siendo que con viabilidades menores al 70% se han obtenido incremento en la migración del ADN ocasionando falsos positivos (Henderson et. al., 1998). En el trabajo experimental la viabilidad se evaluó por la técnica de exclusión con el colorante supravital azul de Tripán. Los resultados mostraron una viabilidad promedio en todos los experimentos del 94.7% en hígado y de 91.4% en riñón. Tomando en cuenta la recomendación en el sentido de que una viabilidad menor al 70-80% en los controles es inadecuada, los resultados obtenidos nos aseguran que las condiciones de manejo de las muestras no causaron muerte celular y que por consiguiente no cuantificamos resultados falsos positivos.

Si bien el compuesto LQM738 se perfila como un agente con posibilidad de llegar a mercado, es necesario hacer notar que su solubilidad es muy reducida (< 20% en agua), por lo tanto fue ineludible emplear el disolvente DMSO el cual presenta excelentes propiedades de solvatación y un perfil de toxicidad favorable, incluso es utilizado como ingrediente activo en la industria farmacéutica y algunas formas farmacéuticas lo emplean como componente de la fórmula final. Todo lo descrito hace que el DMSO fuera la mejor opción como disolvente y se tomara como control negativo a una dosis (80:20 DMSO:H₂O). Al evaluar la viabilidad para todos los tratamientos en que fue utilizado el DMSO mostraron un resultado mayor al 88%.

En lo que respecta al resto de los lotes de trabajo la viabilidad se encuentra por encima del 85%, cabe resaltar que se presenta una viabilidad menor en riñón que en hígado, pero sin que sea estadísticamente significativa.

Genotoxicidad

En el presente estudio se empleó el ensayo cometa como bioindicador de daño al ADN en la versión alcalina con un pH > 13 el cual nos permite evaluar sitios álcali-lábiles, rupturas de cadena sencilla y sitios no reparados en la cadena de ADN (Tice y col., 2000) para

realizar la observación de los cometas se empleó el microscopio de epifluorescencia Axio Imager A1 marca Zeiss mediante el software Comet Imaging 2.1; se observaron 50 células por órgano de manera consecutiva partiendo del centro del microgel hacia los extremos y se evaluó el tail moment (momento de la cauda) como indicador del daño al ADN expresado en pixeles.

La confianza dentro de los trabajos experimentales nos la proporcionan las herramientas estadísticas por lo que en el presente estudio se estableció trabajar con 5 animales por lote, de las 250 lecturas realizadas por lote se obtuvo el promedio por ratón, quedándonos así tan solo con 5 medias para cada lote y estos valores a su vez son los que se emplearon para aplicar la estadística con el programa GraphPad InStat versión 3.1 realizándose el ANOVA y la comparación de medias entre lote de trabajo, con la prueba de Turkey-Kramer $P < 0.05$. El número de individuos de estudio no fue elegido al azar sino que para poder ejecutar una distribución normal se requieren mínimo de 5 sujetos de estudio, por otra parte también se realizó la prueba de Q de Dixon a los promedios antes de ingresarlos al programa de estadística. El test Q, como también se le conoce, se emplea para eliminar legítimamente valores sospechosos que se encuentran en los extremos que son considerados atípicos (Miller & Miller, 2002).

Se ordenaron los promedios de menor a mayor por cada lote, con el fin realizar la prueba Q de Dixon, en las tablas 10, 11, 12 y 13 los valores que se encuentran en color rojo se encontraron atípicos para un intervalo de confianza del 95% por ello al realizar el análisis estadístico complementario no se emplearon estos valores. ANOVA asume que los datos se muestran en las tablas 10, 11, 12 y 13 siguen una distribución gaussiana. Esta hipótesis se puso a prueba utilizando el método Kolmogorov y Smirnov obteniendo los siguientes resultados para los datos de la tabla 10

Tabla 14 Evaluación de la prueba de normalidad por el método Kolmogorov y Smirnov de células hepáticas 3h post-administración.

Group	KS	P	Passed test?	normality
BCO	0.3435	0.0541	Yes	
DMSO 80%	0.2486	>0.10	Yes	
MMC (0.2 mg/ml)	0.2995	>0.10	Yes	
LQM 738 (20mg/Kg)	0.2242	>0.10	Yes	
LQM 738 (40mg/Kg)	0.3572	0.0359	No	
MMC + LQM 738 (20mg/Kg)	0.2467	>0.10	Yes	
MMC + LQM 738 (40mg/Kg)	0.2474	>0.10	Yes	

Al menos una columna no pasó la prueba de normalidad con $P < 0.05$. El lote que no cumple es el de 40mg mismo que presenta el valor anómalo y por ello se eliminó. Esto mismo se realizó para los resultados de las tablas 11, 12 y 13 (ver anexo1) pues en cada una de ellas se encuentra al menos un valor anómalo.

Resultados obtenidos en el ensayo genotóxico de células hepáticas a 3h post-administración:

El análisis de varianza para la tabla 10 nos mostró que existe diferencia altamente significativa entre el lote BCO y MMC (0.2mg/Kg) ($P < 0.001$) lo cual indica que los ratones adquiridos se encuentran sanos y que el mutágeno empleado MMC está dañando al ADN y se pone de manifiesto al observar los cometas con caudas grandes; obtener un valor para $P > 0.05$ indica que no hay diferencia significativa y esto es lo que ocurre entre el lote BCO y el DMSO 80% por lo que se infiere que el vehículo empleado DMSO 80% no interfiere en el tratamiento y esto se corrobora comparando DMSO 80% contra MMC (0.2mg/Kg) con una valor de $P < 0.001$ que indica ser altamente significativa la diferencia, así pues en resumen se esperaba que el lote blanco no presentara daño, que el control negativo presentara nulo o muy poco daño y que el control positivo estuviese un alto daño, y esto es lo que ocurre realmente en nuestras condiciones de trabajo.

La genotoxicidad del compuesto LQM738 en células hepáticas en sus dos concentraciones evaluadas nos refiere que no presenta actividad genotóxica *per se*, pues no hay diferencia significativa entre los lotes del LQM738 a 20mg/Kg contra el lote BCO y el DMSO80% ($P > 0.05$), el mismo valor de P se obtuvo para los lotes LQM738 a 40mg/Kg frente a lote blanco y control negativo. Mientras que con respecto al control positivo el valor de $P < 0.001$ lo que representa que es altamente significativa la diferencia para ambas concentraciones, lo cual indica que no daña al ADN de células sanas.

Resultados obtenidos en el ensayo genotóxico de células renales a 3h post-administración:

Lo que respecta a los datos de la tabla 12 que corresponden a muestras de riñón a 3h post-administración; tiene la misma tendencia en los lotes BCO, MMC y DMSO80% que los evaluados para hígado 3h. Al evaluar la genotoxicidad del compuesto LQM738 a una dosis de 20mg/Kg contra el lote BCO y DMSO80% no hay diferencia significativa; lo que se traduce que el compuesto no daña al ADN como MMC quien si ejerce un daño. A una dosis de 40mg/Kg la diferencia con respecto al blanco y el DMSO80% es poco significativa ($P < 0.05$) y con respecto al control positivo es altamente significativa ($P < 0.001$), pese a ello, en la figura 16 se observa un mayor daño a esta dosis, lo que nos indica que a una dosis mayor si comienza a presentarse daño genotóxico en células renales, no así para células

hepáticas pues en la figura 14 se muestra un menor daño. Esta concentración se puede establecer como límite superior para posteriores investigaciones.

Al cabo de 18 horas post-administración se encontró para ambos órganos evaluados que los lotes DMSO80% y MMC no presentan diferencia estadísticamente significativa con respecto al lote BCO ($P>0.05$). De la misma manera los lotes LQM738 20mg/Kg y LQM738 40mg/Kg no tienen ningún efecto genotóxico tras 18 horas de administración pues muestran un valor de $P>0.05$ con respecto al lote basal (BCO).

Antigenotoxicidad

El modelo propuesto para evaluar la capacidad antigenotóxica del LQM738 es primero administrar al ratón vía intraperitoneal el mutágeno y posteriormente a los 30 minutos administrar ahora el agente en estudio que se sospecha con propiedades antimutagénicas a una concentración x , finalmente sacrificar al animal para procesar células hepáticas y renales empleando la metodología para ensayo cometa al cabo de y horas desde la primera administración y su posterior reciprocidad con los controles.

Se emplearon 4 lotes de estudio cada uno con 5 individuos, se determinaron dos horarios de sacrificio (a 3 y 18 horas desde la primera administración) y se establecieron dos concentraciones a evaluar (20 y 40mg/Kg). Por lo tanto el primer lote se evaluó a una dosis de 20mg/Kg del LQM738 y se sacrificó al finalizar 3 horas desde la primera administración con MMC 2mg/Kg. El segundo lote fue a la misma dosis del compuesto en estudio y se amplió el tiempo de sacrificio hasta 18 horas. Para el tercero y cuarto lote se empleó la dosis de 40mg/Kg del LQM738 con tiempos de sacrificio a 3 y 18 horas respectivamente.

El primer lote (MMC + LQM738 20mg/Kg) para células hepáticas después de 3h de la administración muestra una diferencia estadísticamente significativa ($P<0.001$) con respecto al lote MMC (figura 14), lo que indica una reducción del daño del 88.41% (valores obtenidos empleando 100% el daño producido por el control positivo). Para el tercer lote (MMC + LQM738 40mg/Kg) no hay diferencia estadísticamente significativa frente a MMC sin embargo si presenta una disminución de daño de tan solo un 39.43%. Lo cual sugiere que la dosis de 20mg/Kg puede ser empleada como concentración media para una posterior evaluación dosis-respuesta.

En la evaluación de células renales (figura 16) a 3h el primer lote (MMC + LQM738 20mg/Kg) frente a lote MMC manifiesta diferencia estadísticamente significativa ($P<0.01$) y una reducción de daño del 57.59%. Para el tercer lote (MMC + LQM738 40mg/Kg) ($P<0.05$), con una reducción de daño de 38.81%, con lo anterior se establece que a una dosis mayor (40mg/Kg) la antigenotoxicidad es menor que a la dosis de 20mg/Kg para ambos órganos.

En cuanto a la evaluación a 18 horas post-administración no se observa ninguna diferencia significativa del segundo y cuarto lote (MMC + LQM738 20mg/Kg y MMC + LQM738 40mg/Kg respectivamente) con respecto a los controles (BCO, DMSO80%, MMC) por lo que se sugiere este tiempo como límite superior para desarrollar pruebas farmacocinéticas y farmacodinámicas.

Como se menciona anteriormente el compuesto LQM738 forma parte de la serie LQM700 al igual que el LQM731 mismo que fue evaluada su capacidad antigenotóxica en un sistema *in vivo* bajo el mismo esquema del presente trabajo Hernández, 2013. Es posible comparar que el compuesto LQM731 tiene una antigenotoxicidad ligeramente mayor al 738 para las dosis de 20mg frente a MMC registrando una reducción de daño de 91.7% del 731 contra un 88.41% del 738 en células hepáticas y una diferencia considerable para la dosis de 40mg: el 731 registra 89.7% por 39.43% del 738.

En células renales a 20mg el 731 reporta 90.2% de reducción contra 57.59% del 738 y para la dosis de 40mg el primero reporta 88.1% por 38.81 del segundo. Por todo lo anterior el compuesto LQM731 y el LQM738 aun no son descartados como agentes quimioprotectores.

Zou y su grupo de colaboradores en 2010 sintetizaron y evaluaron la actividad biológica de tres series de azaderivados del ácido cafeico, en la que demuestran que el compuesto #80 que cuenta con 9 enlaces entre el anillo del catecol y el fenol es más citotóxicos contra las líneas celulares KB, BEL7404, K562, Eca109 con una IC_{50} de 0.2, 2.0, 1.7 y 1.1 μ M respectivamente. Al comparar las estructuras moleculares del compuesto #80 de Zou (figura 18) que es quien presenta los mejores resultados, con la del LQM738 (figura 19) nos damos cuenta que no presenta gran diferencia más que en la parte de unión, pues si bien no son los mismos sustituyentes en la porción del catecol ambos compuestos cuenta con sustituyentes electrodonadores, lo cual le confiere a ambas estructuras una gran densidad electrónica. Debido al gran parecido de las estructuras sugerimos que resulta factible que el mecanismo por el cual ejerce su efecto el LQM738 sea similar al que presenta el compuesto 80 de Zou, quedando de lado la neutralización de radicales libre y la capacidad antioxidante que están directamente relacionados con la presencia de radicales hidroxilos adyacentes en el grupo del catecol puesto que el LQM738 carece de ellos.

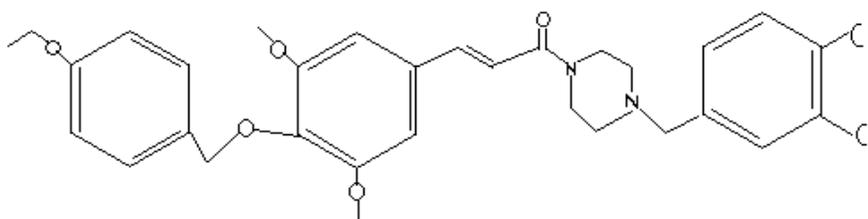


Figura 18. Estructura molecular compuesto #80 de Zou, et al. 2010

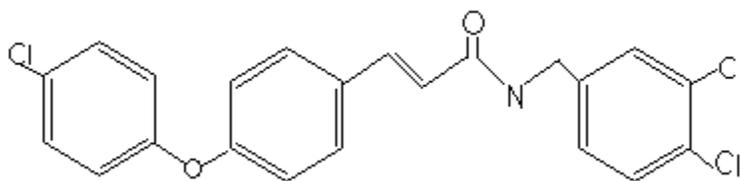


Figura 19. Estructura molecular compuesto LQM738

Zou refiere a fin de determinar el posible mecanismo implicado en la citotoxicidad, en la línea celular K562 tratadas con el compuesto #80 que fue escogido para su posterior análisis biológico. Los resultados muestran una relación dependiente de la concentración y del tiempo tanto para la viabilidad celular como para la tasa de apoptosis mediante el ensayo de MTT y análisis de citometría de flujo, respectivamente. Con el tratamiento del compuesto 80 en 8.0 μM durante 72 h, la viabilidad de las células K562 se redujo a $37.9 \pm 1.4\%$ del control y 20.4% de las células apoptóticas. Las células apoptóticas en ambas etapas temprana y tardía se detectó a 48 h de tratamiento del compuesto 80, mientras que sólo se observó apoptosis en etapa tardía a las 72 h. Simultáneamente, los niveles de expresión de la proteína apoptótica caspasa-3 se detectaron por Western blot después de 48 h de tratamiento con el compuesto 80. Estos resultados indican que el compuesto 80 suprime la viabilidad de las células K562 por, al menos en parte la inducción de apoptosis de las células.

X. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados mostrados anteriormente se concluye que:

La capacidad genotóxica del compuesto LQM738 se logró establecer con el ensayo electroforesis unicelular como sigue:

A una dosis de 20mg/Kg no presenta significativa genotoxicidad tanto en hígado como en riñón.

A una dosis de 40 mg/Kg en células hepáticas no hay daño significativo sin embargo en células renales si presenta leve genotoxicidad.

La capacidad antigenotóxica del compuesto LQM738 se presenta de la siguiente manera:

El compuesto reduce el daño provocado al ADN por MMC hasta en un 88.42% en células hepáticas y un 57.6% en renales a una dosis de 20mg/Kg.

XI. PERSPECTIVAS

- Si bien el LQM738 presenta actividad antigenotóxica y citotoxicidad aguda sobre algunas líneas neoplásicas, se sugiere realizar estudios crónicos y sub-crónicos con la finalidad de corroborar la efectividad en exposición prolongada.
- Determinar DL_{50} del compuesto.
- Siguiendo el esquema de Zou, *et al.* 2010. Ampliar la parte de unión a 9 enlaces y volver a evaluar el nuevo agente contra líneas como HeLa, PC-3 y el resto que empleo Zou; pues el compuesto #80 no presenta actividad frente a HeLa y PC-3, mientras que Ruiz reporta buena actividad del LQM738 frente a estas líneas celulares, así se pondría de manifiesto la importancia de los sustituyentes en la molécula.

XII. REFERENCIAS

Anderson M., Agurell E., Vaghef H. Bolcsfoldi G. and Hellman B. (2003). Extended-term cultures of human T-lymphocytes and the Comet assay: a useful combination when testing for genotoxicity in vitro? *Mutation Research*. 540, 43-55

Beltrán R. O. (2005). Mecanismo de quimioprevención del CAPE: alteración de los CYP450. Tesis de Maestría. Biología celular. CINVESTAV.

Burdock, G. A. (1998). Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). *Food and Chemical Toxicology* 36: 347-363.

Carrasco Legleu C.E. (2003) Efecto protector del éster fenético del ácido caféico in vivo e in vitro en hepatocitos de rata Wistar tratados con carcinógenos. Tesis de Maestría. Biología celular. CINVESTAV

Carrasco Legleu C. E., Martínez Rosado L., Fattel Fazedra S, Arce Popoca E., Perez Carron J.L. (2004). Chemoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester on promotion in a medium-term rat hepatocarcinogenesis assay. *International Journal Cancer* 108: 488-492

Domínguez, R.M. (2008). “Efecto del éster fenético del ácido caféico (CAPE) sobre la proliferación y apoptosis en varias líneas celulares in vitro”. Tesis de Maestría. Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía. IPN.

Fairbairn W., Olive P. and O'Neill K. (1995) The comet assay: a comprehensive review. *Mutation Research* 339, 37-45.

Frekel K., Wei H., Bhimani R., Ye J., Zadunaisky J. A., Huang M. T., Ferrato T., Conney A. H. and Grunberger D. (1993) Inhibition of tumor promoter-mediated processes in mouse skin and bovine lens by caffeic acid phenethyl ester. *Cancer Research* 53, 1255-1261.

Griffiths Anthony J. F. (2005) Introduction to genetic analysis. 8° ed. Freeman and Company, U.S.A.

Grundberger D., Banerjee R., Eisinger K., Oltz E. M., Efros L., Caldwell M., Estevez V. and Nakanishi K. (1988) Preferential cytotoxicity on tumor cells by caffeic acid phenethyl ester isolated from propolis. *Experientia* 44, 230-232

Hartmann A., Agurell E., Beevers C., Brendler-Schwaab S., Burlinson B., Clay P., Collins A., Smith A., Speit G., Thybaud V., & Tice R.R. (2003). Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. *Mutagenesis* 18:1, 45-51

Hernández Calderón M. LL. (2013) Evaluación del efecto antígenotóxico del compuesto LQM731, análogo del éster fenético del ácido caféico (CAPE), mediante el ensayo de

electroforesis unicelular en gel (ensayo cometa). Tesis de Licenciatura QFB. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán. UNAM

Hernderson, L., Wolfreys, A., Fedyk, J., Bouiner, C. and Windebank, S. (1998). "The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and citotoxins". *Mutagenesis* 13 (1) 89-94

Kalant, H. (2003). *Principios de Farmacología Médica*. 6a ed. Editorial Oxford. México D.F.

Macías P. J.R., Beltrán R, O., Villa T, S. (2012). "Searching for Analogues of the Natural Compound, Caffeic Acid Phenethyl Ester, with Chemprotective Activity". A compendium of Essays on Alternative Therapy, Dr. Arup Bhattacharya. Tomado de <http://www.intechopen.com/books/a-compendium-of-essays-on-alternative-therapy/searching-for-analoguesof-the-natural-compound-caffeic-acid-phenethyl-ester-with-chemprotective-act>. Fecha de consulta: mayo de 2012.

Martínez García N, López Santillán I, Montejano Rodríguez R, Almaguer Vargas G, Zúñiga Pérez C y Hernández Ceruelos A. (2012) Antigenotoxicidad de la decocción de la raíz de *Jatropha dioica* evaluada mediante el ensayo cometa. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental* 28(2) 64

Martín de Civetta, M.T, y Civett, J.D (2011). *Carcinogenesis, Salud Pública de México* 53(5) 405-414

Mendoza del Pino, M. V., Abadal Hernández Y. y Arraz Pozo J.C. (2010) *La oncología en la atención primaria de salud*. Ed. Editorial Universitaria. La Habana Cuba.

Miller J.N. & Miller J.C.(2002) *Estadística y Quimiometría para Química Analítica*. 4ª edición. Ed. Pearson Educación. Madrid España.

Muller W. U., Bauch T., Streffer C., Niedereichholz F. and Bocker W. (1994) Comet assay studies of radiation-induced DNA damage and repair in various tumor cell lines. *International Journal Radiation Biological* 65, 315-319

Nagaoka, T., Banskota, A. H., Tezuka, Y., Saiki, I, & Kadota, S. (2002). Selective Antiproliferative Activity of Caffeic Acid Phenethyl Ester Analogues on Highly Liver-Metastatic Murine Colon 26-L5 Carcinoma Cell Line, *Food and Chemical Toxicology* 10, 3351–3359

Organización Mundial de la Salud OMS alerta sobre ola de cáncer en el mundo - 04/02/14. Tomado de: <http://www.youtube.com/watch?v=SADC-LXGDeo&sf=Relevancy#1>

Olive P. L., Banath J. P. and Durand R. E. (1990). Heterogeneity in radiation induced DNA damage and repair in tumor and normal cells using the "Comet" assay. *Radiation Research* 122, 86-94

Olive P. L., Wlodek D., Durand R. E. and Banath J. P. (1992). Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Experiment Cell Research* 198, 259-267

Östling O and Johanson K. J. (1984). Microelectrophoretic study of radiationinduced DNA damages in individual mammalian cells. *Biochemistry and Biophysics Research* 123, 291-298

Paniagua García M. L. (2010). Evaluación de la capacidad genotóxica del compuesto polifenólico derivado del CAPE (éster fenético del ácido cafeico) mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel *in vitro*. Tesis Licenciatura QFB. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

Pierce Benjamín A. (2005). *Genética con un enfoque conceptual*. 2a ed. Medica Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Rang H.P. & Dale M.M. (2012) *Farmacología*. Ed. Elsevier. Barcelona, España

Rao C. V., Desai D., Simi B., Kulkarni N., Amin S., and Reddy B. S. (1993) Inhibitory effect of caffeic acid esters on azoxymethane-induced biochemical changes and aberrant crypt foci formation in rat colon. *Cancer Research* 53, 4182-4188.

Rojas E., López M. C. y Valverde M. (1999). Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *Journal Chromatographic* 722, 225-254

Rojas Olivares, F.C. (2008). Evaluación de la capacidad genotóxica del compuesto tiomorfolínico LQM 319 mediante el ensayo de electroforesis unicelular en gel *in vivo*. Tesis de Licenciatura QFB. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

Ruiz Sánchez M. B. (2012). Evaluación *in vitro* de la citotoxicidad de compuestos derivados del Ester Fenético del Ácido Caféico (CAPE), en diferentes líneas celulares de cáncer. Tesis Licenciatura QI. Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán UNAM.

Schabath M. B., Spitz M. R., Grossman H. B., Zhang K., Dinney C. P., Zheng P. J. and Wu X. (2003). Genetic instability in bladder cancer assessed by the Comet assay. *Journal Natl. Cancer Inst.* 95, 540-547

Schwab, M. (2001). *Encyclopedia Reference of Cancer*. Ed.Springer. Alemania 157.

Strachan Tom & Read AndrewP. (2006) *Genética humana*. 3ª edición. Ed. Mc Graw Hill. México

Singh N.P., McCoy M.T., Tice R.R. and Schneider E.L. (1988) A simple technique for quantitation of low levels of ADN damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184-191

Su Z.Z., Grunberger D. and Fisher P.B. (1991) Suppression of adenovirus type 5 E1A-mediated transformation and expression of the transformed phenotype by caffeic acid phenethyl ester (CAPE). *Molecular Carcinogenesis* 4, 231-242.

Tice R., Agurell E., Anderson D., Burlinson B., Hartmann A., Kobayashi H., Miyamae Y., Rojas E., Ryu J. and Sasaki Y.F. (2000). Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo. *Genetic Toxicology Testing. Environmental and Molecular Mutagenesis* 35, 206-221.

Wang, X., Stavchansky, S., Bowman, P. D. and Kerwin, S. M. (2006). Cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and catechol ring-fluorinated CAPE derivatives against menadione-induced oxidative stress in human endothelial cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 14, 4879–4887.

Wang, X., Stavchansky, S., Kerwin, S. M. and Bowman, P. D. (2010). Structure – activity relationships in the cytoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) and fluorinated derivatives: Effects on heme oxygenase-1 induction and antioxidant activities. *European Journal of Pharmacology* 635(1-3), 16–22.

Weinberg Robert A. 1996. How Cancer Arises. *Scientific American*. 275. 62-67

Yang, J., Marriner, G. A., Wang, X., Bowman, P. D., Kerwin, S. M. and Stavchansky, S. (2010). Synthesis of a series of caffeic acid phenethyl amide (CAPA) fluorinated derivatives: Comparison of cytoprotective effects to caffeic acid phenethyl. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18(14), 5032–5038.

Yokota J. and Sugimura T. (1993) Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor gene. *The FASEB Journal* 7, 920-925.

Zou, H., Wu, H., Zhang, X., Zhao, Y., Stöckigt, J., Lou, Y. and Yu, Y. (2010). Synthesis, biological evaluation, and structure – activity relationship study of novel cytotoxic aza-caffeic acid derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 18(17), 6351–6359.

Zuñiga Venegas L.A. (2009) Optimización metodológica del ensayo cometa y sus aplicaciones en biomonitorización humana. Tesis Doctoral Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Biociencias. Departamento de Genética Microbiología. Grupo de Mutagénesis.

XIII. ANEXOS

Anexo 1 Tablas que muestran la evaluación de la prueba de normalidad por el método Kolmogorov y Smirnov

Tabla 15 Evaluación de la prueba de normalidad por el método Kolmogorov y Smirnov de células hepáticas 18h post-administración.

Group	KS	P	Passed normality test?
BCO	0.34	0.05	Yes
DMSO 80%	0.21	>0.10	Yes
MMC (0.2 mg/ml)	0.19	>0.10	Yes
LQM 738 (20mg/Kg)	0.45	0.001	No
LQM 738 (40mg/Kg)	0.30	>0.10	Yes
MMC + LQM 738 (20mg/Kg)	0.20	>0.10	Yes
MMC + LQM 738 (40mg/Kg)	0.17	>0.10	Yes

Tabla 16 Evaluación de la prueba de normalidad por el método Kolmogorov y Smirnov de células renales 3h post-administración.

Group	KS	P	Passed normality test?
BCO	0.34	0.05	Yes
DMSO 80%	0.27	>0.10	Yes
MMC (0.2 mg/ml)	0.22	>0.10	Yes
LQM 738 (20mg/Kg)	0.19	>0.10	Yes
LQM 738 (40mg/Kg)	0.25	>0.10	Yes
MMC + LQM 738 (20mg/Kg)	0.22	>0.10	Yes
MMC + LQM 738 (40mg/Kg)	0.40	0.007	No

Tabla 17 Evaluación de la prueba de normalidad por el método Kolmogorov y Smirnov de células renales 18h post-administración.

Group	KS	P	Passed normality test?
BCO	0.34	0.05	Yes
DMSO 80%	0.17	>0.10	Yes
MMC (0.2 mg/ml)	0.19	>0.10	Yes
LQM 738 (20mg/Kg)	0.19	>0.10	Yes
LQM 738 (40mg/Kg)	0.39	0.01	No
MMC + LQM 738 (20mg/Kg)	0.23	>0.10	Yes
MMC + LQM 738 (40mg/Kg)	0.25	>0.10	Yes

Anexo 2 Preparación de soluciones empleadas en el ensayo cometa

Agarosas

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

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

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

Solución Stock de lisis

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

Con el NaOH poner el pH=10m de esta manera todos los compuestos se solubilizarán.
c.b.p. 890 ml de agua desionizada.

Esterilizar por filtración a temperatura ambiente.

Solución lisis de trabajo

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

Buffer de electroforesis

Solución "A"

Compuesto	Concentración	Gramos para 500 ml
NaOH	10 N	200

Solución "B".

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

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

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

Esta solución debe ser preparada al momento de la electroforesis.

Procedimiento de preparación

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

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

Solución de neutralización

Compuesto	Concentración	Gramos
TRIS	0.4 M	48.5

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

Solución colorante fluorescente

Preparar una solución stock de bromuro de etidio a 20 $\mu\text{g/ml}$ (10X)

mg de bromuro de etidio	Volumen
10	50 ml

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