

INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

**ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
Y HOMEOPATIA**

**SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

**EFFECTO DEL ÉSTER FENETÍLICO DEL
ÁCIDO CAFEÍCO (CAPE) SOBRE LA
PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS EN
VARIAS LINEAS CELULARES IN VITRO.**

T E S I S

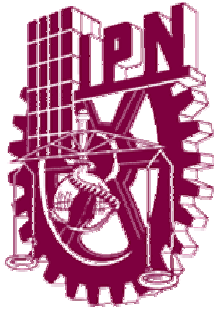
**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN LA ESPECIALIDAD
DE BIOMEDICINA MOLECULAR**

PRESENTA:

MARITERE DOMINGUEZ ROJAS



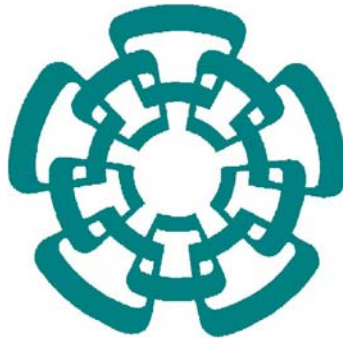
MEXICO, D.F. 2008



El presente trabajo se realizó en los laboratorios de Microbiología Molecular en la Sección de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Nacional de Medicina y Homeopatía del IPN y en el laboratorio de Citogenética L-521 de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlan, UNAM.

La realización del trabajo experimental a cargo de Maritere Domínguez Rojas fue posible gracias al financiamiento parcial de los PROYECTOS SIP 20060975 y SIP20070313 y a que se contó con los apoyos económicos procedentes de:

BECA DE ESTUDIOS DE MAESTRÍA otorgada por el CONACYT, y por parte del IPN de las becas: INSTITUCIONAL y la del PROGRAMA PARA LA FORMACIÓN DE INVESTIGADORES (PIFI), otorgadas por la Secretaría de Posgrado e Investigación.



El presente trabajo contó con la valiosa asesoría de los Doctores Fernando Enríquez Rincón y Saúl Villa Treviño del Centro De Investigación Y Estudios Avanzados Campus Zacatenco.

INDICE

I. LISTA DE FIGURAS	III
II. LISTA DE TABLAS	V
III. RESUMEN	VI
IV. ABSTRACT	VII
V. INTRODUCCION	1
V.1. Cáncer	1
V.1.1 Biología molecular del desarrollo y progresión del cáncer	1
V.1.1.1 Genes tumorales	2
V.1.1.2 Genes promotores de tumor: los oncogenes	2
V.1.1.3 Genes de supresión tumoral	5
V.1.1.4 Genes reparadores de errores replicativos del DNA	7
V.2. Apoptosis	9
V.2.1 Características morfológicas y bioquímicas	10
V.2.2 Mecanismos moleculares durante la apoptosis	11
V.2.2.1 Vía Extrínseca	13
V.2.2.2 Vía Intrínseca	14
V.2.2.3 Caspasas	15
V.2.2.4 Papel de la mitocondria	17
V.2.2.5 Apoptosis y cáncer	18
V.3. Antitumorales	20
V.3.1 Antitumorales de origen natural	22
V.4 CAPE	23
V.4.1 Propóleo	23
V.4.2 Ester fenilico del acido cafeico (CAPE)	24
V.4.3 Modelo de hepatocarcinogénesis química	25
VI. ANTECEDENTES	27
VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	28
VIII. HIPOTESIS	29
IX. OBJETIVOS	30
IX.1. Objetivo general	30
IX.2. Objetivos particulares	30

X.	MATERIALES Y METODOS.....	31
	X.1. Líneas celulares	31
	X.2. Cuantificación de proliferación celular	32
	X.3. Detección de Apoptosis	33
	X.3.1 Tinción de anexina V-FITC/yoduro de propidio	33
	X.4. Intercambio de cromátidas hermanas	35
XI.	RESULTADOS	39
	XI.1. Determinación de la proliferación celular a diferentes concentraciones del CAPE	39
	XI.2. Ensayo de apoptosis por la tinción con anexina V-FITC.....	43
	XI.3. Resultados de la prueba de intercambio de cromátidas hermanas	51
	XI.3.1 Ensayo Genotóxico	51
	XI.3.1.1 Frecuencia de ICH.....	51
	XI.3.1.2 Índice Mitótico	52
	XI.3.1.3 Cinética de proliferación celular: índice de replicación	53
	XI.3.2 Ensayo Antigenotóxico	54
	XI.3.2.1 Frecuencia de ICH.....	54
	XI.3.2.2 Índice Mitótico	56
	XI.3.2.3 Cinética de proliferación celular: índice de replicación	57
XII.	DISCUSION.....	59
XIII.	CONCLUSIONES.....	68
XIV.	PERSPECTIVAS	69
XV.	BIBLIOGRAFIA	70

I. LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fases del desarrollo tumoral	8
Figura 2. Cambios morfológicos durante la apoptosis	11
Figura 3. Vía extrínseca de la apoptosis	13
Figura 4. Vía intrínseca de la apoptosis.....	14
Figura 5. Estructura Tridimensional de las caspasas 9 y 3 respectivamente....	15
Figura 6. Proteolisis y activación de las caspasas	16
Figura 7. Esquema representativo de las 12 caspasas descritas en humanos ...	17
Figura 8. Estructura química del CAPE	23
Figura 9. Representación de un análisis por citometria de flujo con células marcadas con yoduro de propidio y anexina-FITC	34
Figura 10. Esquema que muestra la tinción diferencial entre las cromátidas hermanas al adicionar BrdU en tres ciclos celulares.	37
Figura 11. Representación de los intercambios entre cromátidas hermanas	37
Figura 12. Diagrama de flujo del procedimiento experimental esquemático	38
Figura 13. Efecto en el porcentaje de inhibición de la proliferación en células HeLa pre-tratadas con CAPE	40
Figura 14. Efecto en el porcentaje de inhibición de la proliferación en células VERO pre-tratadas con CAPE	40
Figura 15. Efecto en el porcentaje de inhibición de la proliferación en células JURKAT pre-tratadas con CAPE	42
Figura 16. Efecto en el porcentaje de inhibición de la proliferación en células K562 pre-tratadas con CAPE	42
Figura 17. Efecto de las diferentes concentraciones de CAPE en la inducción de apoptosis en células JURKAT	44
Figura 18. Efecto de las diferentes concentraciones de CAPE en la inducción de apoptosis en células células mononucleadas de sangre periférica.....	46
Figura 19. Efecto de las diferentes concentraciones de CAPE en la inducción de apoptosis en células HeLa.....	49
Figura 20. Efecto de las diferentes concentraciones de CAPE en la inducción de apoptosis en células VERO.....	50
Figura 21. Frecuencia de ICH en los tratamientos con CAPE	52

Figura 22. Índice Mitótico de los tratamientos con CAPE.....	53
Figura 23. Índice de Replicación de los tratamientos con CAPE.....	54
Figura 24. Porcentaje de inhibición de ICH del CAPE retado con ifosfamida	55
Figura 25. Índice Mitótico del ensayo de antigenotoxicidad.....	56
Figura 26. Índice de Replicación del ensayo de antigenotoxicidad	57
Figura 27. Metafase en primera división.....	58
Figura 28. Metafase en segunda división	58
Figura 29. Metafase en tercera división	58

II. LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Descripción de Oncogenes	4
Tabla 2. Descripción de Genes Supresores de tumor	6
Tabla 3. Fármacos antineoplásicos.....	20
Tabla 4. Compuestos antitumorales provenientes de plantas	22
Tabla 5. Composición promedio del propóleo	23
Tabla 6. Resultados del porcentaje de inhibición de la proliferación en células HeLa y VERO pre-tratadas con las diferentes concentraciones de CAPE a 24 y 48 hrs. de incubación.....	39
Tabla 7. Resultados del porcentaje de inhibición de la proliferación en células JURKAT y K562 pre-tratadas con las diferentes concentraciones de CAPE a 24 hrs. de incubación	41
Tabla 8. Resultados del ensayo de Anexina V- FITC en células JURKAT tratadas con las diferentes concentraciones de CAPE.....	43
Tabla 9 Resultados del ensayo de Anexina V- FITC en células mononucleadas de sangre periférica tratadas con las diferentes concentraciones de CAPE .	45
Tabla 10. Resultados del ensayo de Anexina V- FITC en células HeLa tratadas con las diferentes concentraciones de CAPE	47
Tabla 11. Resultados del ensayo de Anexina V- FITC en células VERO tratadas con las diferentes concentraciones de CAPE.....	48
Tabla 12. Frecuencia de ICHs por metafase en cultivo de linfocitos.....	51
Tabla 13. Índice Mitótico observado en cultivos de linfocitos humanos	52
Tabla 14. Índice Replicación observado en cultivos de linfocitos humanos....	53
Tabla 15. Índice de inhibición del CAPE retado un ifosfamida.....	55
Tabla 16. Índice Mitótico observado en cultivos de linfocitos humanos	56
Tabla 17. Índice Replicación observado en cultivos de linfocitos humanos....	57

III. RESUMEN

Los medicamentos que actualmente se proponen en el tratamiento de tumores presentan complicaciones en su uso, tales como un estrecho margen terapéutico, su elevada toxicidad y que pueden inducir la aparición de resistencia de las células tumorales. Por esta razón se ha promovido internacionalmente la búsqueda de nuevas moléculas antitumorales de origen natural. Una molécula que ha mostrado actividad antitumoral es el éster fenílico del ácido caféico (CAPE), que es el principio activo más importante del propóleo.

En estudios previos *in vivo*, empleando el modelo de hepatocarcinogénesis inducida en rata, se observó que en los animales tratados con CAPE se obtuvo una disminución en el tamaño de los nódulos tumorales. Por lo anterior, en el presente trabajo, decidimos investigar el mecanismo por el cual esta sustancia pudiera estar protegiendo contra los efectos carcinogénicos a nivel celular. Para tal fin se plantearon los siguientes objetivos: 1) determinar el comportamiento de la proliferación celular en las líneas HeLa, Vero, Jurkat y K562 pre-tratadas con CAPE, 2) determinar la probable actividad pro-apoptótica del CAPE mediante la prueba de anexina en líneas HeLa, Vero, Jurkat y células mononucleares de sangre periférica y 3) determinar la probable actividad genotóxica del CAPE. Las técnicas para investigar los objetivos mencionados son, respectivamente: estimación de la proliferación celular mediante ensayos de MTT; la capacidad inductora de apoptosis del CAPE se evaluó con la tinción de anexina V-FITC/yoduro de propidio y la genotoxicidad se valoró usando la técnica de intercambio de cromátidas hermanas en células normales de sangre periférica. Se probaron concentraciones de 2.5, 5, 7.5 y 10 µg/ml.

En este estudio, se observó una marcada disminución de la proliferación celular dependiendo de la concentración de CAPE, de la línea celular y del tiempo de incubación. El CAPE demostró ser capaz de inducir apoptosis en las líneas tratadas siendo las células Jurkat y las células mononucleares de sangre periférica las que mostraron un mayor porcentaje de apoptosis, 55% y 65% respectivamente. Por último se determinó la actividad genotóxica y antigenotóxica, encontrando que el CAPE *per se* muestra un efecto genotóxico mucho menor al del control positivo (ifosfamida), aumentando la frecuencia de ICH y disminuyendo los índices mitótico y de replicación, sin embargo al retarlo con un mutágeno conocido como la ifosfamida en el ensayo de antigenotoxicidad el CAPE mostró tener un efecto de inhibición del daño producido por el mutágeno. Los resultados de esta investigación apoyan la validez del potencial antitumoral que el CAPE ha presentado en otros modelos ya que inhibió la proliferación de las líneas celulares, presentó inducción de apoptosis sobre las mismas, mostró poseer actividad antigenotóxica al retarlo con un mutágeno y evidenció que no posee efecto genotóxico relevante. Lo anterior sugiere que se debería proseguir con la fase experimental para describir el mecanismo molecular por el cual el CAPE ejerce su acción. Por lo tanto es necesario seguir estudiando modelos tanto *in vitro* como *in vivo* para determinar el mecanismo de acción de esta molécula para eventualmente poder implementar su uso estableciendo las indicaciones y las dosis pertinentes de administración y que finalmente sea un medicamento útil en el tratamiento contra el cáncer.

IV. ABSTRACT

Nowadays, there is availability of a variety of anti-tumoral drugs, they unfortunately started to show serious inconveniences, such as: covering just a narrow therapeutic window, high levels of toxicity and causing drug resistance during long treatments. Because of the above reasons, an international interest started to develop research focused on discovery of new anti-tumoral drugs, preferently from natural sources. A molecule that has shown anti-tumoral activity is the phenethyl caffeic acid (CAPE) which is the most important active component from propoleum.

Researchers have found that when the tumors induced *in vivo* with hepatocarcinogenesis rat model, are treated with CAPE, these treatments diminished the size of cancer nodules. Because of the above, this work was designed to investigate the mechanism this substance would use, to apparently protect the cell against the carcinogenic events occurring in cancer. To reach this goal the following objectives were proposed: 1) determinate cell proliferation in cell lines like Hela, Vero, Jurkat and K562 in pretreatment assays using CAPE; 2) determinate the probable pro-apoptotic activity elicited by CAPE in the above mentioned cell lines, but also in peripheral blood mononuclear cells and 3) determinate whether there is any genotoxic activity elicited by CAPE. To set up experiments for pursuing the mentioned objectives the following methods were chosen: MTT assay to determinate cell proliferation; annexin V-FITC to evaluate the capacity of CAPE to induce apoptosis. To establish genotoxicity the methodology was the sister exchange chromatide technique in normal peripheral blood cells. Concentrations of CAPE used in all techniques were 2.5, 5, 7.5 and 10 µg/ml.

Results in this study observed a remarkable inhibition of cell proliferation increasing with the concentration of CAPE. Levels depended on the cell line, the concentration and incubation period. CAPE showed to be able to induce apoptosis in the treated cell lines, being Jurkat together with mononuclear blood cells the ones showing the highest rates of apoptosis 55% and 65% respectively.

The genotoxic and antigenotoxic activities were determined last, and the results showed that CAPE elicits a low genotoxic effect, down bellow than the one from the positive control (ifosfamide) this phenomenon was apparent due to the elevated frequency of SCE and at the same time the mitotic and replication indexes were diminished by treatments. Even more, when CAPE was challenged by the use of a mutagenic substance (ifosfamide) in the anti-genotoxicity assay, it displayed the capacity to counteract the damage normally produced by this mutagen.

Results from this research work further support the anti-tumoral potential that CAPE has shown in several other models of study, since it was able to inhibit proliferation of cell lines, immortalized and transformed, it also showed apoptosis induction over the same cell lines and displayed antigenotoxic activity over the challenge with a mutagen. Besides CAPE showed that the genotoxic effect that is capable to elicit, is not relevant to be considered a deleterious, instead it is sufficient to suggest that it may have something to do with the mechanisms that causes SCE events to occur.

All the above results suggest that it would be wise to proceed with experimental protocols to describe the molecular mechanisms by which CAPE is capable to display such anti-tumoral activity. Therefore it becomes necessary to keep using *in vivo* and *in vitro* models of study that help determine the mechanism of this molecule, in order to be able to proceed with implementation of its medical use against cancer.

V. INTRODUCCIÓN

V.1. CANCER

Después de un cuarto de siglo de avances, las investigaciones acerca del cáncer han generado una amplia y compleja información, revelando que el cáncer es una enfermedad que involucra cambios dinámicos en el genoma (Hanahan y Weinberg, 2000). Es claro que el cáncer es una enfermedad multifactorial que puede aparecer en diversos órganos, pero con una característica común, la mayoría de los tumores surgen debido a que las células que les dan origen albergan una o más mutaciones genéticas que les permiten proliferar fuera de su crecimiento normal y sin las restricciones que obedecen las células normales (Garrett 2001)

V.1.1 BIOLOGÍA MOLECULAR DEL DESARROLLO Y PROGRESIÓN DEL CANCER

El origen del cáncer es clonal, es decir una célula del tejido presenta cambios mutacionales a nivel genético que conducen a su inmortalización y transformación.

Profundizando más acerca de los cambios genéticos que se presentan en el cáncer, encontramos que en las células tumorales existen dos tipos de inestabilidad genética generada a partir de vías diferentes: la inestabilidad en el DNA (mutaciones puntuales, o deleciones / inserciones de secuencias microsáltélites) y la inestabilidad a nivel cromosómico (translocaciones, deleciones, duplicaciones, aneuploidías o inversiones) (Lengauer, 1998)

En las células tumorales, se producen varias mutaciones somáticas y éstas se acumulan a un ritmo significativamente mayor que en las células normales, es decir presentan una propiedad denominada "fenotipo mutador". Esta capacidad de las células tumorales de acumular mutaciones es fundamental para el desarrollo del cáncer, así como para el rápido desarrollo de resistencia ante tratamientos citotóxicos contra el cáncer. El fenotipo mutador puede ser causado por una serie de mecanismos alterados, tales como defectos en la regulación del ciclo celular, resistencia a la apoptosis, alteración en las vías específicas de reparación del DNA, o altas frecuencias de errores en la replicación atribuibles a la DNA polimerasa. (Bielas, *et al.*, 2006; Sandal, 2007)

Las mutaciones en las células tumorales que constituyen ya el tumor propiamente dicho abarcan una amplia gama de alteraciones estructurales en el genoma, incluidas las alteraciones en el número de copias de cromosomas o alteraciones cromosómicas que abarca millones de pares de bases, como translocaciones, deleciones o amplificaciones, así como pequeños cambios en las secuencias de nucleótidos, tales como mutaciones puntuales que afectan a un solo nucleótido en una posición crítica de un gen relacionado con el cáncer (Sugimura, *et al.*, 1992). Estos diferentes tipos de alteraciones a menudo coexisten dentro de un mismo tumor.

En las células tumorales no solo se han encontrado cambios genéticos si no que también muestran varias modificaciones a su metabolismo en comparación con las células normales. Al parecer, en todos los tipos de células tumorales estudiadas, las vías metabólicas estimuladas anormalmente son la glicólisis, glutaminólisis, síntesis de ácidos nucleicos, síntesis de lípidos y de colesterol, sin embargo, el comportamiento metabólico puede variar según el tipo de tumor.

V.1.1.1 GENES TUMORALES

Existen genes implicados en funciones celulares muy críticas como es la regulación del ciclo celular, la replicación y la reparación del DNA, cuyas mutaciones hacen más susceptibles a las células para que se transformen en neoplásicas. Estos son los llamados genes tumorales de los cuales se identifican tres tipos: Oncogenes, genes supresores de tumor y genes relacionados con la reparación de errores replicativos en el DNA. (McMahon, 1994)

V.1.1.2 GENES PROMOTORES DE TUMOR: LOS ONCOGENES

Se denomina oncogén a la forma mutada de un gen normal o protooncogén, el cual codifica para una proteína normal, que actúa sólo cuando recibe señales reguladoras específicas. Estas moléculas, generalmente relacionada con la proliferación (comúnmente receptores o reguladores de la transcripción) celular o con la apoptosis, al sobreexpresarse se convierten en oncogenes. La forma mutada u oncogén puede sobreexpresar 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.

De entre los genes que integran el genoma humano se han caracterizado unos 100 protooncogenes, generalmente son genes dominantes y se ha observado que sólo es necesaria la mutación de un alelo para producir alteraciones en el crecimiento y la diferenciación normal (Munnes, *et. al.*, 1998). Se han identificado protooncogenes que codifican proteínas muy diversas:

- 1) Factores estimuladores del crecimiento celular
- 2) Receptores de factores de crecimiento o de hormonas
- 3) Proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales
- 4) Factores de transcripción que controlan la expresión de genes que codifican a su vez proteínas implicadas en la señalización, el control del ciclo celular o la apoptosis
- 5) Proteínas responsables de la activación directa del ciclo celular o de la inhibición de apoptosis

La activación de un oncogén puede contribuir al desarrollo del cáncer de dos maneras: mediante la activación de los procesos de proliferación celular y mediante el bloqueo de los procesos de senescencia y muerte celular. La activación de un oncogén es el resultado de una o varias mutaciones en un protooncogén que alteran estructural y funcionalmente su producto, estas alteraciones pueden ser a nivel génico en donde el gen puede sufrir mutaciones que afecten los exones de modo que se altere la estructura de sus productos y con ello su actividad biológica (proteínas truncadas, proteínas mal plegadas, etc) o la mutación puede ocurrir sobre *enhancers* cercanos a la región del promotor de modo que el producto normal se expresa en cantidades anormalmente altas. Otra forma de alteración es a nivel cromosómico en donde puede ocurrir un rearrreglo del cromosoma, que traslada al oncogén desde una localización distante a un sitio próximo a un promotor o un *enhancer* muy activo de la transcripción, lo que conduce a aumentar su tasa de expresión o alterar el marco de lectura. (Gibas, 2000; Marshall, 2002).

Tabla 1. Descripción de Oncogenes.

* Los tipos de cáncer listados en esta Tabla son aquellos asociados predominantemente con cada oncogen pero esta lista no es exhaustiva. (Cooper, 1995, Vogelstein, 1998)

Oncogen	Función	Cáncer
abl	Actividad tirosina quinasa	Leucemia mielógena crónica
abl/bcr	Nueva proteína causada por fusión	Leucemias mielógena crónica y linfocítica aguda
alk	Codifica un receptor tirosina quinasa	Linfomas
ALK/NPM	Proteína nueva creada por fusión	Linfomas de células grandes
aml1	Codifica un factor de transcripción	Leucemia mieloide aguda
aml1/mtg8	Proteína nueva creada por fusión	Leucemias agudas
axl	Codifica un receptor tirosina quinasa	Cánceres hematopoéticos
bcl-2, 3, 6	Bloquea la apoptosis (muerte celular programada)	Leucemias y linfomas de células B
bcr/abl	Proteína nueva creada por fusión	Leucemias mielógena crónica y linfocítica aguda
c-myc	Proliferación celular y síntesis de ADN	Leucemia; carcinomas del colon, estómago, seno, pulmón, y cervix; neuroblastomas y glioblastomas
erbB	Tirosina quinasa	Glioblastomas y carcinomas de células escamosas
erbB-2	Tirosina quinasa	Carcinomas del seno, ovario, y glándula salivaria
fos	Osteosarcoma	2
HER2/neu	Proteína nueva creada por fusión	Carcinomas del seno y el cervix
int-2	Codifica un factor de crecimiento de fibroblasto	Carcinomas del seno y células escamosas
jun	Factor de transcripción para API	Sarcoma
MSH2	Reparo de discordancia en el ADN	Cáncer colorectal hereditario no poliposis
myb	Codifica un factor de transcripción con un dominio de unión al ADN	Leucemias y carcinomas del colon
N-myc	Proliferación celular y síntesis del ADN	Neuroblastomas, retinoblastomas, y carcinomas del pulmón
ost	Factor de intercambio de nucleótido de guanina	Osteosarcomas
raf	Serina/treonina quinasa	Varios tipos de cáncer
RAR/PML	Proteína nueva creada por fusión	Leucemia aguda premielocítica
rasH	Transducción de señales celulares	Carcinoma de la vejiga urinaria
rasK	Transducción de señales celulares	Carcinoma del pulmón, vejiga urinaria, y ovarios
rasN	Transducción de señales celulares	Carcinoma del seno
ros	Tirosina quinasa	Sarcoma
ski	Factor de transcripción	Carcinomas
Src	Tirosina quinasa	Sarcomas

V.1.1.3 GENES DE SUPRESIÓN TUMORAL

La célula cuenta con moléculas que vigilan la secuencia normal de los acontecimientos genéticos que permiten su proliferación. Estos son los genes supresores de tumor. Cuando los productos de los mismos no son funcionales o están ausentes, la célula pierde la protección que le brindan normalmente, lo cual conduce a la aparición de la célula tumoral y el desarrollo del cáncer (Knudson, 1993)

En general los genes de supresión tumoral 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 una función genética, en este caso el mecanismo de actuación es la pérdida de función de estos genes, afectando el control del crecimiento y subsecuentemente el desarrollo del tumor (Yolota y Sigimura, 1993)

Para inactivar funcionalmente un gen de supresión tumoral 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. Al igual que los protooncogenes, los genes supresores de tumor codifican proteínas que actúan en distintos puntos de las rutas de señalización de control y de la apoptosis:

- 1) Factores inhibidores del crecimiento celular, receptores de factores inhibidores o de hormonas que frenan el crecimiento celular
- 2) Proteínas citoplasmáticas que intervienen en los sistemas de transducción de señales.
- 3) Proteínas que frenan el ciclo celular o producen apoptosis (Sherr, 2000; Sherr, 2004).

Tabla 2. Descripción de Genes Supresores de tumor.

Supresor de Tumor	Función	Cáncer *
APC	Controla la función de factores de transcripción específicos	Carcinomas familiar adenomatosa y colorectal no heredada
BRCA1, 2	Reparo al daño del ADN	Cánceres hereditarios del seno y ovarios
CDKN2A	Lugar del gen que codifica p16 y p14ARF	Tumores cerebrales
DCC	Función aún desconocida	Carcinomas colorectales
DPC4 (SMAD4)	Regula la señalización de los receptores de factores de crecimiento	Tumores colorectales, neoplasia pancreática
MADR2/JV18 (SMAD2)	Regula la señalización de los receptores de factores de crecimiento	Cáncer colorectal
MEN1	Codifica la proteína menina que interactúa con los factores de transcripción y previene la transcripción de ciertos genes	Neoplasia múltiple endocrina tipo 1
MTS1	Inhibidor de quinasas dependientes de ciclina	Melanomas
NF1	Proteína activadora del RAS GTPasa	Neurofibromatosis tipo 1
NF2	Proteína activadora del RAS GTPasa	Neurofibromatosis tipo 2
p53	Codifica un factor de transcripción para p21 que detiene el ciclo celular en la fase G1	Carcinomas de la vejiga urinaria, seno, colorectal, del esófago, pulmón, próstata, y ovarios; tumores del cerebro, sarcomas, linfomas, y leucemias
PTEN	Fosfatasa lípida que regula la sobrevivencia celular	Síndrome Cowden; mayor riesgo de cánceres de tiroides y del seno
Rb	Altera la actividad de ciertos factores de transcripción que juegan papeles importantes en la división celular	Retinoblastoma, sarcomas; carcinomas de la vejiga urinaria, seno, esófago, próstata, y pulmón
VHL	Puede marcar las proteínas para la degradación	Carcinomas de células renales
WRN	Reparo del ADN	Síndrome de Werner
WT1	Represor transcripcional	Tumores de Wilms (cáncer del riñón pediátrico)

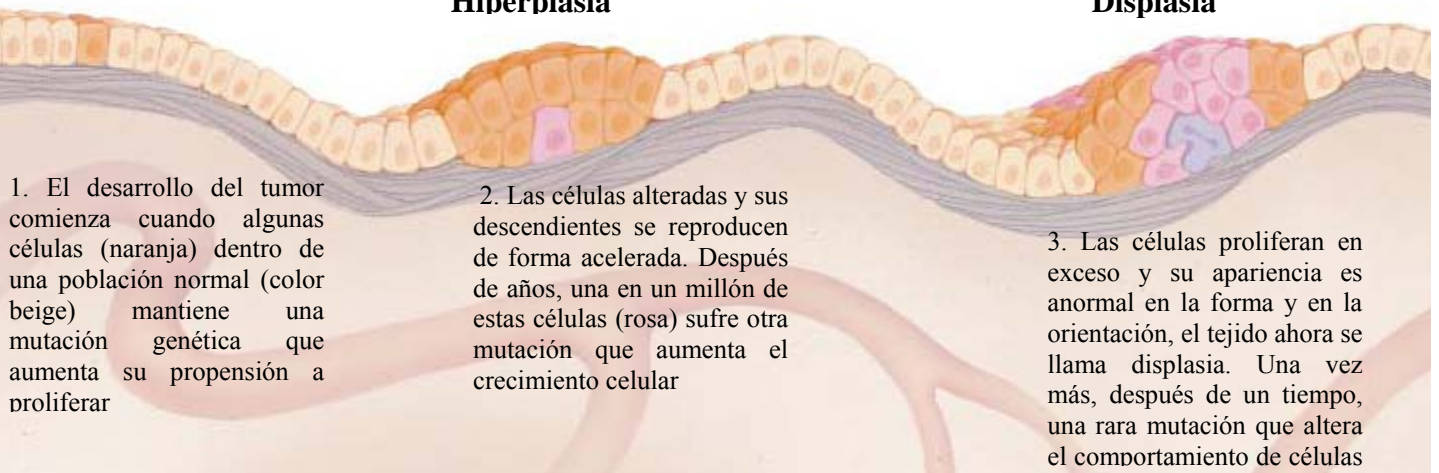
* Los tipos de cáncer listados en esta columna son aquellos que están asociados predominantemente con cada supresor de tumor pero esta lista no es exhaustiva. (Cooper, 1995, Vogelstein, 1998)

V.1.1.4 GENES REPARADORES DE ERRORES REPLICATIVOS DEL DNA

Son los genes responsables de mantener la integridad del genoma y la fidelidad de la información que transfieren, en la traducción del DNA. El genoma humano codifica para aproximadamente 60,000 proteínas necesarias para la función celular normal y por lo tanto requiere una constante replicación del DNA. La tasa basal de errores de replicación espontáneos del DNA se ha estimado en más de 10,000 eventos/día. Por otro lado, la exposición a carcinógenos o un defecto subyacente en los mecanismos de reparación, aumentan significativamente los errores de replicación y facilitan la acumulación de alteraciones en el DNA necesarias para que ocurra la transformación maligna (Sherr ,2000; Sherr ,2004).

Hiperplasia

Displasia



1. El desarrollo del tumor comienza cuando algunas células (naranja) dentro de una población normal (color beige) mantiene una mutación genética que aumenta su propensión a proliferar

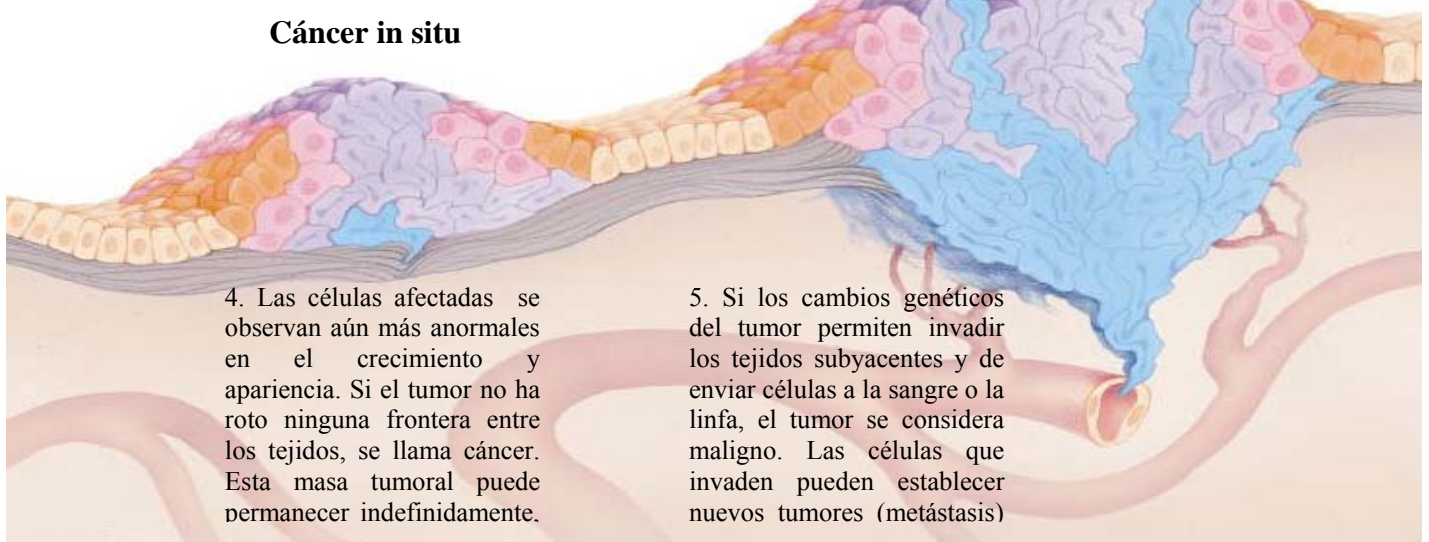
2. Las células alteradas y sus descendientes se reproducen de forma acelerada. Después de años, una en un millón de estas células (rosa) sufre otra mutación que aumenta el crecimiento celular

3. Las células proliferan en exceso y su apariencia es anormal en la forma y en la orientación, el tejido ahora se llama displasia. Una vez más, después de un tiempo, una rara mutación que altera el comportamiento de células

Fases del desarrollo tumoral

Cáncer invasivo

Cáncer in situ



4. Las células afectadas se observan aún más anormales en el crecimiento y apariencia. Si el tumor no ha roto ninguna frontera entre los tejidos, se llama cáncer. Esta masa tumoral puede permanecer indefinidamente.

5. Si los cambios genéticos del tumor permiten invadir los tejidos subyacentes y de enviar células a la sangre o la linfa, el tumor se considera maligno. Las células que invaden pueden establecer nuevos tumores (metástasis)

Figura 1. Fases del desarrollo tumoral. Tomado de: Weinberg, 1996

V.2. APOPTOSIS

Desde el embrión hasta el organismo adulto fisiológicamente sano, millones de células mueren sin dejar cicatrices ni activar la respuesta inflamatoria. Este fenómeno no tiene lugar de una forma aleatoria, sino que se trata de un proceso activo, bien definido genéticamente, en el que las células están programadas para morir en un momento pre-determinado de su existencia. Así, los episodios que rodean el proceso de muerte celular programada, entran a formar parte de los procesos fisiológicos necesarios para el funcionamiento normal de un organismo.

En la última década, hemos sido testigos de un crecimiento exponencial de los trabajos de investigación realizados sobre los procesos que rodean a la muerte celular y al parecer se ha llegado al consenso de dividirlos en dos grandes grupos: necrosis y muerte celular programada (Zhang, *et al.*, 2004; Kanduc, *et al.*, 2002)

El término necrosis considera los procesos repentinos y catastróficos, en los que la degeneración celular es pasiva sin requerimientos de energía en forma de ATP. Aparece frecuentemente como consecuencia de un daño traumático o por la exposición a toxinas. En ella tiene lugar la pérdida aguda de la regulación y de la función celular que conlleva un proceso osmótico desmesurado y finaliza con la lisis de la membrana celular, liberando el contenido intracelular. Este fenómeno también conduce a las células vecinas hacia la muerte, atrayendo, al mismo tiempo, a las células inflamatorias, lo que hace que en las áreas donde se observan células necróticas sea frecuente encontrar nuevas células que desarrollan este tipo de muerte celular, además de originar una reacción inflamatoria y una cicatriz fibrosa que deforma el tejido y el órgano afectado. El segundo tipo de muerte celular se conoce como apoptosis o muerte celular programada. En este proceso las células programan su autodestrucción sin desencadenar reacciones de inflamación ni dejar cicatrices en los tejidos. La apoptosis por tanto se considera una muerte fisiológica natural, que el sistema inmune desarrolló como un mecanismo de eliminación de células no deseadas, dañadas o reconocidas como ajenas y que desempeña un papel protector frente a posibles enfermedades (Jordán, 2003)

V.2.1 CARACTERISTICAS MORFOLOGICAS Y BIOQUIMICAS

Los procesos apoptóticos se caracterizan por cambios morfológicos como:

1. Aumento brusco de la densidad intracelular. El retículo endoplasmático se dilata, formando vesículas y fusionándose con la membrana plasmática, eliminando así su contenido al medio extracelular. Esta rápida, pero selectiva, salida de fluidos e iones intracelulares se encuentra mediada por transportadores iónicos (cotransportador cloro-potasio-sodio, que inhibe la pérdida de agua y sodio de las células afectadas).
2. Las células se retraen y pierden el contacto con células vecinas. Se han descrito reducciones en el volumen celular de incluso el 30%.
3. Incremento moderado, pero sostenido, de la concentración citoplasmática de calcio libre ($[Ca^{2+}]_i$), diferencia clara frente a los procesos de necrosis, donde su aumento es drástico.
4. Cambios en la composición de la membrana celular. Se observa translocación de glicolípidos de la cara interna de la membrana como la fosfatidil serina a la superficie celular que van a actuar como señal de reconocimiento, permitiendo la unión de fagocitos que procesan a los cuerpos apoptóticos resultantes y de esta manera, evitan la liberación del contenido celular y la posible reacción inflamatoria.
5. Alteración en la conformación de elementos del citoesqueleto. Como consecuencia aparece una deformación celular, resultado de la actividad de las proteasas, modificándose la transcripción y el transporte intracelular retrógrado de factores de crecimiento y de proteínas.
6. Activación de la síntesis de determinadas proteínas necesarias en las rutas metabólicas de los procesos de muerte celular.
7. Fragmentación nuclear por las endonucleasas endógenas que procesan el DNA en fragmentos oligonucleosomales de entre 180-200 pb. Esto produce el característico patrón de DNA escalera cuando se analiza en electroforesis y se utiliza como marca bioquímica en el reconocimiento de la apoptosis.

8. La membrana plasmática comienza a tener circunvoluciones y adquiere una apariencia vesicular característica. Como resultado de las grandes invaginaciones aparecen los cuerpos apoptóticos. Estos son cuerpos membranosos impermeables a los colorantes vitales, mantiene sus mitocondrias intactas y contiene cuerpos densos granulares que corresponden a fragmentos nucleares, los cuales, también se producen por las grandes invaginaciones de la membrana nuclear (Jordán, 2003, Kanduc, *et al.*, 2002).

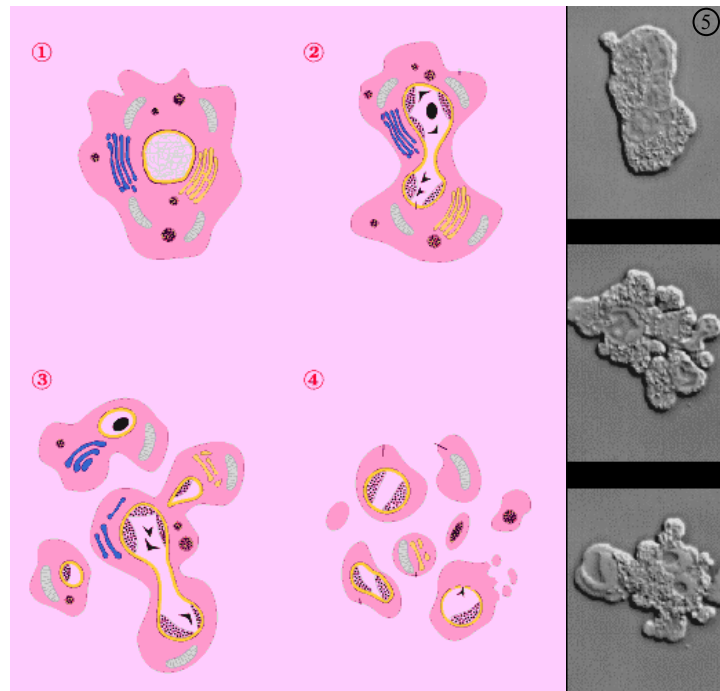


Figura 2. **Cambios morfológicos durante la apoptosis.**
1. Célula normal, 2. Condensación, 3. Fragmentación, 4. Necrosis secundaria, 5. Micrografía que muestran los cambios morfológicos durante el proceso de muerte.¹

V.2.2 MECANISMOS MOLECULARES DURANTE LA APOPTOSIS

Desde el punto de vista molecular podemos considerar 3 fases dentro de la apoptosis: iniciación, ejecución y degradación celular. Las dos primeras pueden ser reversibles gracias a mecanismos bloqueadores o reguladores.

Iniciación

Aunque los mecanismos de activación que conducen el inicio de la muerte celular programada no son del todo conocidos, existen múltiples factores inductores de la apoptosis, algunos de ellos relacionados con la alteración de las condiciones ambientales como: la pérdida de factores tróficos o de crecimiento, aumento de iones de calcio, radicales libres, virus, radiaciones, quimioterapia u otros fármacos, pudiendo utilizar cada factor una o varias de las vías de inducción de apoptosis como:

¹ Imagen tomada de: www.molbiol4masters.org/Apoptosis.htm

a) Activación de receptores especializados de la membrana celular

Se lleva a cabo en elementos del sistema inmune, en el que la propia célula activa directamente su destrucción. Los receptores que median la apoptosis pertenecen a la gran familia de receptores de Factor de Necrosis Tumoral (TNF), entre los mejor caracterizados se encuentra: CD 95 (Fas o Apo1), TNFR1 (p55 o CD120a) y DR3 (Nagata, 1997)

b) Alteración mitocondrial

Existe otra vía de activación que tienen a la mitocondria como elemento central en el proceso. Las proteínas inhibidoras más representativas son la bcl-2 y la bcl-xl y ejercen la protección sobre las membranas mitocondriales previniendo la tumefacción osmótica (Gottlieb, 2000).

c) Pérdida del contacto intercelular o del anclaje con la matriz extracelular

Una de las señales reguladoras más importantes para la muerte celular procede de la conexión con células vecinas (integridad de las uniones intercelulares tipo desmosomas y cadherinas) o con la matriz extracelular (uniones tipo integrina).

d) Alteraciones graves en el DNA

Cualquier daño del DNA puede ser detectado por las proteínas p53 y ATM

e) Vía perforina-granzima B

Es la utilizada por los linfocitos citotóxicos. La perforina produce canales en la membrana celular por lo que la granzima B se introduce en el interior de la célula diana para activar directamente la procaspasa 3 (Green D.R., 1998)

f) Vía esfingomilinasas

Diferentes estímulos como la radiación gamma, activarían las esfingomilinasas, capaz de degradar la esfingomielina hasta cerámica, que es uno de los inductores de la apoptosis.

Ejecución

Las caspasas juegan un doble papel en el desarrollo apoptótico, actúan tanto como mediadores de señales, así como efectores bioquímicos. Estas participan en la apoptosis como una cascada de señalización organizada: eliminan los contactos con las células circundantes, reorganizan el citoesqueleto, entorpecen la replicación y reparación del DNA, interrumpen el “splicing” de los mensajeros, destruyen el DNA, alteran la estructura nuclear, inducen señales para atraer la fagocitosis y desintegran la célula empaquetando su contenido en cuerpos apoptóticos (Shulze-Osthoff, *et al*, 1998)

Degradación celular

Se han identificado algunas moléculas en la superficie de los macrófagos y células apoptóticas como mediadores importantes en el proceso de reconocimiento y adhesión para la desintegración de los cuerpos apoptóticos (Zhang, *et al.*, 2004; Green D.R., 2005)

V.2.2.1 VIA EXTRINSECA

La vía extrínseca inicia con la señal pro apoptótica que se desencadena por la unión de Fas con su ligando. FasL (CD95L) es un trímero que al unirse con Fas (CD95 o APO-1) induce la trimerización de este. Esta unión provoca el reclutamiento del complejo DISC al dominio citoplasmático de Fas. DISC contiene proteínas adaptadoras que permiten la unión de la pro-caspasa 8 favoreciendo su auto activación, la caspasa 8 puede entonces activar a las caspasas efectoras 3, 6 y 7, además puede activar a Bid y esta inducir la liberación del citocromo C y Apaf-1 de la mitocondria para formar el apoptosoma y activar también la vía intrínseca (Adams J.M., 2003; Shi Y., 2004)

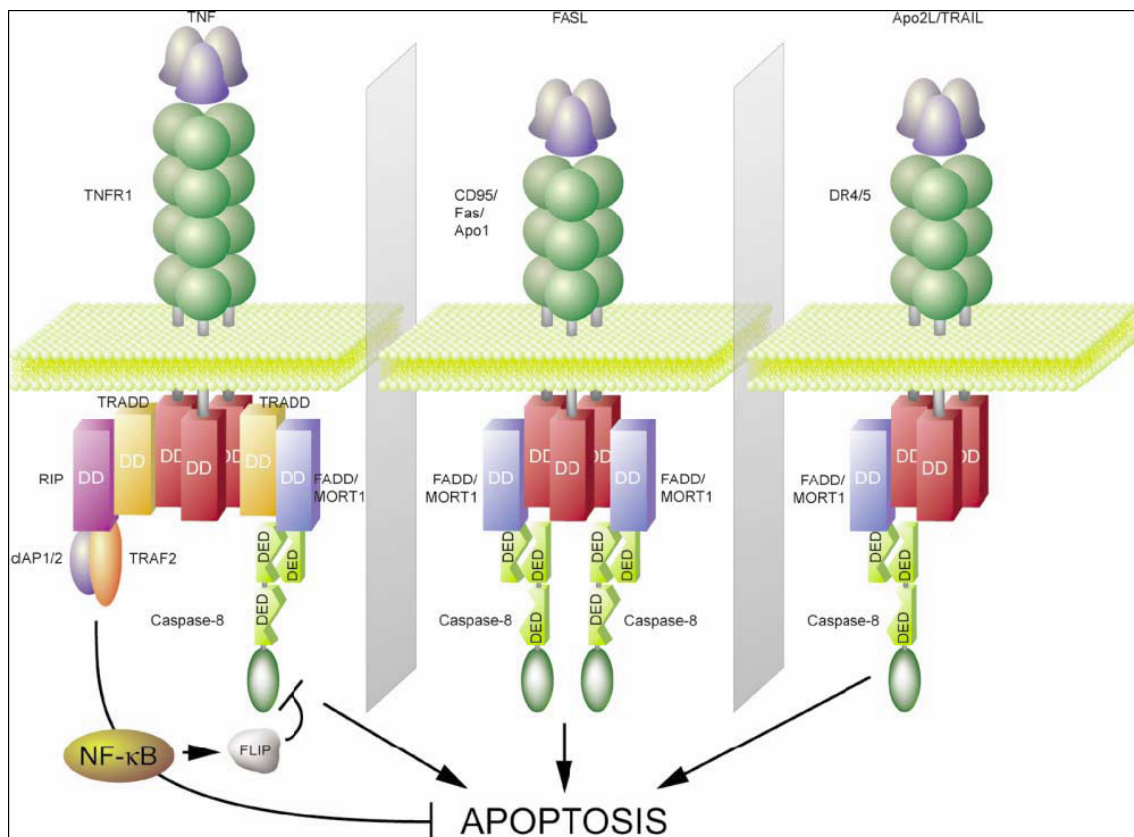


Figura 3. **Vía extrínseca de la apoptosis.** La distinta composición del DISC (complejo señalizador inductor de muerte) dentro de la célula que recibe señales de varios receptores de muerte como: TNFR1, CD95, y DR4/5. Tomada de: Nika N. D. and Stanley J. K., 2004

V.2.2.2 VIA INTRINSECA

La vía intrínseca o mitocondrial se activa por estrés y otras señales que provocan la translocación a la mitocondria de miembros proapoptóticos. Lo anterior provoca la liberación de citocromo C al citosol, lo cual se acompaña de pérdida del potencial de membrana mitocondrial y desestabilización de la membrana externa de la mitocondria. En el citosol el citocromo C se une a Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor-1) que es una molécula adaptadora que en presencia de ATP y forma el complejo conocido como *apoptosoma* (Yoshida H,1998), el cual activa a la pro-caspasa 9, la cual puede activar a las caspasas 3, 6 y 7, estas son las principales responsables de los cambios morfológicos y bioquímicos que ocurren en la célula apoptótica ya que entre sus sustratos se encuentran proteínas del cito esqueleto, de la membrana nuclear y las encargadas de la reparación del DNA entre otras (Adams J.M.,2003; Shi Y., 2004)

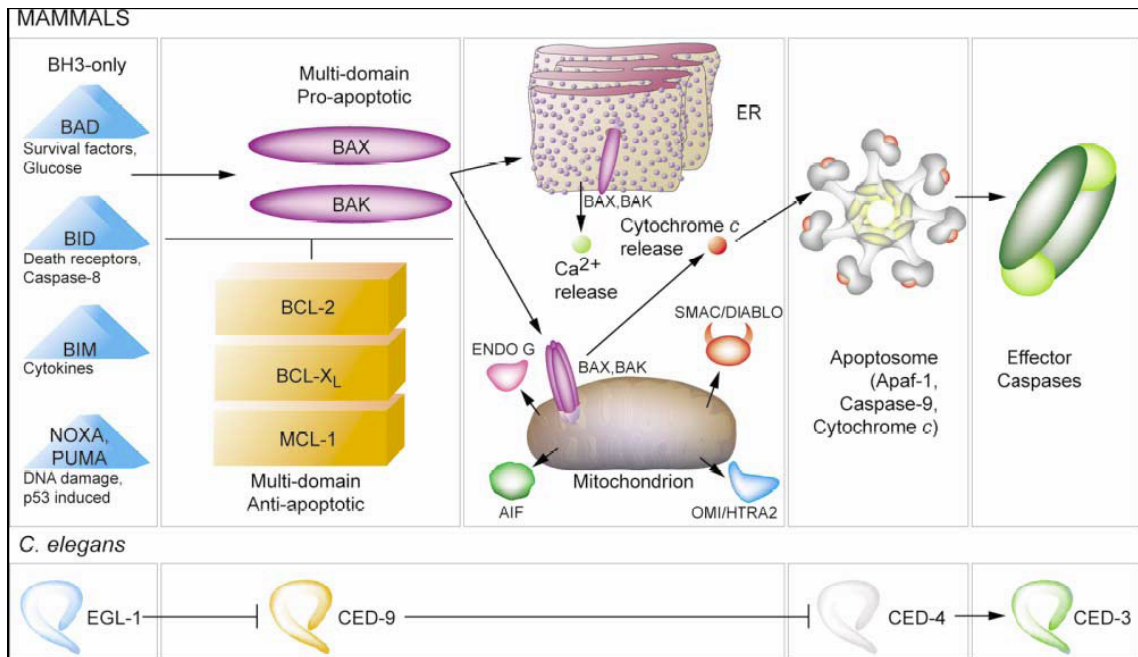


Figura 4. **Vía intrínseca de la apoptosis.** Tomada de: Nika N. Danial and Stanley J. K. , 2004

V.2.2.3 CASPASAS

Las caspasas son proteasas que cortan selectivamente después de un residuo de ácido aspártico, tienen un sitio activo muy conservado. Las caspasas actúan como una cascada de señalización y como sustrato final tienen a proteínas que van a producir los cambios morfológicos de la muerte celular. Actualmente se han descrito 12 miembros en humano (Salvesen G.S., 2002).

Las caspasas se sintetizan en forma de zimógenos y para realizar su función requieren de activación proteolítica. La estructura tridimensional de las caspasas indica su función y sus mecanismos de activación: consta de un pre-dominio N- Terminal, una subunidad larga (17-21 KDa) y otra pequeña (10-13 KDa), que a veces están unidas por un pequeño conector. (Wolf B.B. and Green D.R., 1999).

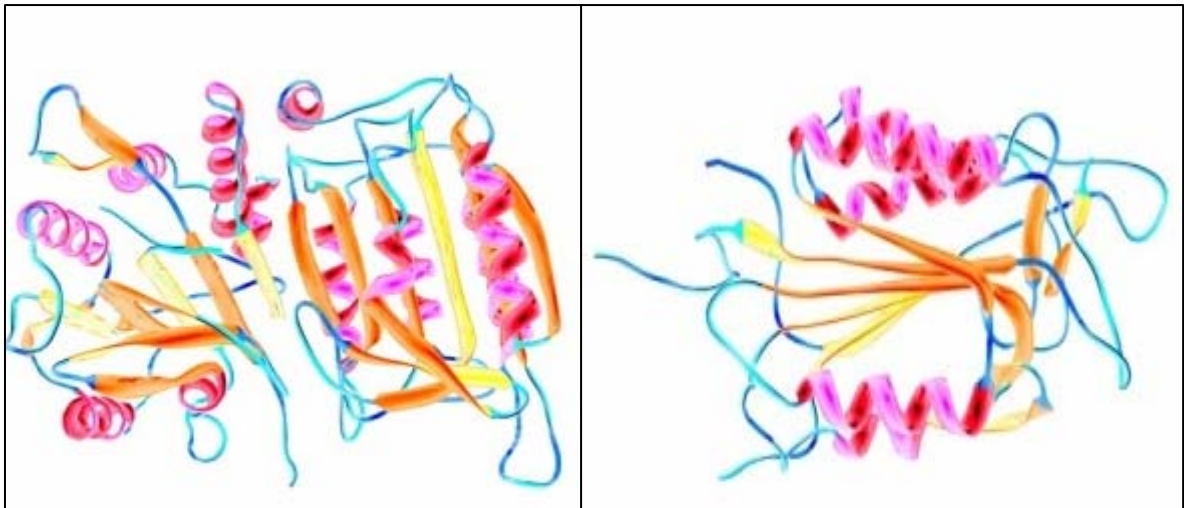


Figura 5. Estructura Tridimensional de las caspasas 9 y 3 respectivamente²

Las caspasas deben sufrir proteólisis para ser activas. Esta proteólisis se da en dos fases: la primera proteólisis divide la cadena en la subunidad grande y la subunidad pequeña; la segunda proteólisis elimina el pre-dominio N-terminal. Esta activación da lugar a un heterotetrámero activo formado por el ensamblaje de dos subunidades grandes y dos pequeñas, conteniendo dos sitios activos de catálisis con una secuencia altamente conservada dentro de un residuo cisterna. Esta forma activa, a su vez llevará a cabo la proteólisis de sus sustratos específicos después de un residuo de aspártico (Salvesen G.S., 2002; Shi Y., 2004)

² Imagen tomada por el Dr. Mark J. Winter en Science Photo Library

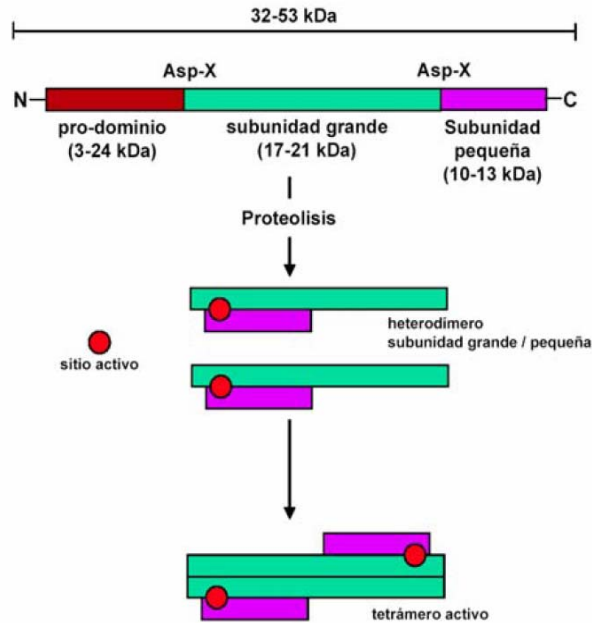


Figura 6. **Proteólisis y activación de las caspasas.** La proteólisis se da en dos fases: la primera proteólisis divide la cadena en la subunidad grande y la subunidad pequeña; la segunda proteólisis elimina el pre-dominio N-terminal.

La activación de las caspasas es fundamental para el proceso de muerte celular por apoptosis. Existen tres tipos de caspasas:

1. Caspasas inflamatorias: participan en procesos de activación de citocinas (caspasas-1,-4,-5 y -14) (Li H., *et al.*, 1997)
2. Caspasas iniciadoras: son activadas en respuesta a señales de stress o daño celular o cuando la célula recibe una señal que activa sus mecanismos de apoptosis (caspasas-8, -9, -10 y -12) (Cohen M.G., 1997)
3. Caspasas efectoras: sufren proteólisis para su activación misma que se lleva a cabo por las caspasas iniciadoras. Son las responsables de la proteólisis directa de otros sustratos que producirán el cambio morfológico en las células. La principal caspasa efectora es la caspasa-3, aunque también ejercen funciones efectoras las caspasas-6 y -7. La caspasa-3 es responsable de la condensación de la cromatina, la fragmentación del DNA y la formación de cuerpos apoptóticos mediante la activación y proteólisis de otros sustratos (Srinivasula, *et al.*, 1998; Adams J.M., 2003)

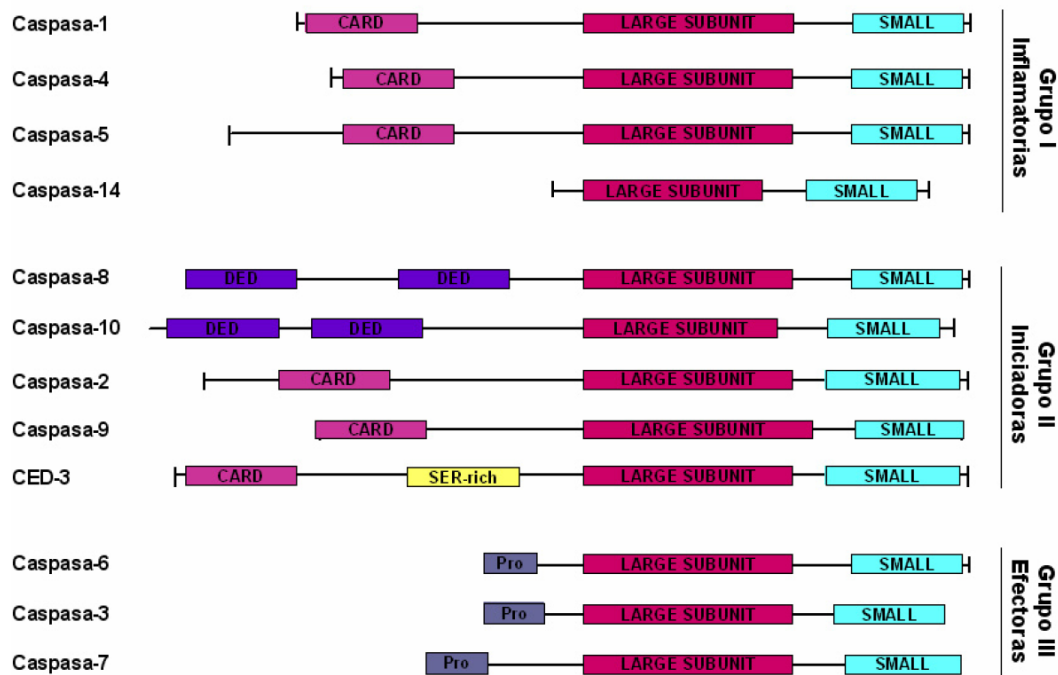


Figura 7. Esquema representativo de las 12 caspasas descritas en humanos. Las caspasas se dividen en tres grupos: inflamatorias, iniciadoras y efectoras.

V.2.2.4 PAPEL DE LA MITOCONDRIA

La mitocondria es el punto donde convergen las distintas rutas apoptóticas, provenientes de distintos estímulos apoptóticos y a partir de ahí las células “deciden” si se produce o no la muerte programada, es decir la fase de muerte mitocondrial es un punto de no retorno. Aunque hay que destacar que no todas las rutas apoptóticas involucran la mitocondria, como es el caso de la apoptosis inducida a través de la vía del receptor Fas (Carew J.S. y Huang P., 2002)

Entre los candidatos más importantes que llevan a cabo la regulación de esta fase, están los factores apoptogénicos liberados por la mitocondria tales como:

- El citocromo C que participa en la activación de caspasas a través de la formación del apoptosoma
- Las procaspasas -2,-3 y -9, las cuales pueden activarse una vez liberadas (Nguyen M, et al, 1993; Mannick J.B., *et al.*, 2001)
- Las proteínas de choque térmico hsp10 y hsp60, las cuales facilitan la activación de caspasa-3
- Factor inductor de apoptosis (AIF). Es una flavoproteína que al liberarse de la mitocondria se transloca al núcleo donde se ha demostrado que provoca la condensación y ruptura del DNA en fragmentos de alto peso molecular. Además, a nivel de membrana activa a la flipasa e inhibe a la translocasa. Esto hace que los restos

fosfatidilserina que en células normales se encuentre en la cara interna de la membrana se expongan ahora al exterior (Susin, *et al.*, 2000)

e) Smac/Diablo es un complejo inhibidor de las proteínas inhibidores de apoptosis (IAPs) las cuales tienen la habilidad de inhibir caspasas activas; por tanto el complejo Smac/Diablo previene la inactivación de las caspasas (Roberts D. L., *et al.*, 2001)

f) Omi/HtrA2, posee un homólogo (HtrA) en bacterias. Funciona también como inhibidor de IAPs, mediante inactivación por procesamiento proteolítico, ya que se trata de una serin-proteinasa (Gray C.W., *et al.*, 2000)

g) Endonucleasa G, tras liberarse de la mitocondria se transloca al núcleo donde parece estar involucrada en la fragmentación del DNA junto con exonucleasas y DNasa I, produciendo el patrón de escalera típico de apoptosis (Ishihara Y. y Norio Shimamoto, 2006)

Es importante señalar la razón por la cual la célula utiliza tantas proteínas mitocondriales como factores apoptóticos, el hecho de que estén confinados en la mitocondria y que sus sustratos se localizan en el citoplasma supone una garantía de que únicamente van a ejercer su acción mortal cuando son liberados durante el proceso apoptótico.

V.2.2.5 APOPTOSIS Y CÁNCER

Como se discutió anteriormente la carcinogénesis es un proceso en el que una serie de cambios secuenciales en el genotipo celular transforma una célula normal en célula tumoral única. La acumulación de mutaciones en varios genes que controlan el crecimiento y la supervivencia celular, contribuyen de manera importante en la transformación. Entre estos procesos se incluye la apoptosis. Aquellas mutaciones que inactiven la vía proapoptótica favorecen la progresión tumoral. En condiciones normales cuando la mutación es irreparable la célula afectada entra en un programa de apoptosis. No obstante si la célula escapa del control de la regulación fisiológica de la apoptosis, se anula la posibilidad de que cambios deletéreos induzcan a la célula a morir, por lo tanto hay oportunidad de que cambios adicionales produzcan una división descontrolada que terminará produciendo crecimiento del tumor y más adelante metástasis. (Wickremasinghe G. y Hoffbrand V., 1999)

Se podría describir el cáncer, como una enfermedad en la que no sólo interfieren una excesiva proliferación de células, sino también, la disminución de la capacidad de las mismas para morir y en la cual los genes que regulan la apoptosis (por ejemplo: familia bcl-2 o Apo-1) son tan importantes en la patogénesis molecular y genética de la neoplasia, como los oncogenes (c-myc, ras, ABL) y los genes de supresión tumoral (p53) (Budd R.C., 1992)

La apoptosis en los tumores aún puede estar regulada por los mecanismos de autocontrol propios de los tejidos normales o bien estos pueden perder dicha regulación. La apoptosis puede ser inducida por diversos factores presentes en las neoplasias, como la isquemia leve, el estrés oxidativo, la citotoxicidad linfocitaria, los factores de necrosis tumoral, las interacciones o pérdida de la relación entre las células epiteliales y la matriz extracelular, la radioterapia, las drogas citotóxicas o por la expresión de nuevos oncogenes (Fukuda S. and Pelus L.M., 2006). La resistencia a la apoptosis en los tumores puede explicar, en parte, la baja respuesta de esos tumores a la quimioterapia. Se suponía que la quimioterapia destruye al tumor directamente por necrosis, pero se ha visto que las células generalmente utilizan la vía de la apoptosis. Actualmente se estudian posibles terapias génicas para superar dicha resistencia a la apoptosis (Royds J.A. and Lacopetta B., 2006; Elmore S., 2007)

Resumiendo podemos decir que, la apoptosis es un proceso de vital importancia en la homeostasis tisular que está involucrada en otros diferentes procesos fisiológicos y en algunos procesos patológicos, entre los que destaca el cáncer.

La importancia de la apoptosis en las neoplasias se basa en:

1. Su papel en la eliminación de células pre-neoplásicas
2. Ser funcional en los tumores ya establecidos, como resultado de procesos intrínsecos en las células tumorales o por factores externos que tienen lugar en el tejido tumoral
3. Ser necesaria la respuesta terapéutica adecuada de las diferentes armas farmacológicas antitumorales.

Es evidente que un mejor entendimiento de la forma en que se comporta la apoptosis en las neoplasias, ampliaría los conceptos establecidos acerca de la cinética celular tumoral, que ha estado basada durante mucho tiempo en los índices de proliferación celular y a su vez, aportaría métodos para conocer el pronóstico del tumor lo cual puede influir en las decisiones de las modalidades terapéuticas que se deberán emplear (Royds J.A. y Lacopetta B., 2006; Elmore S., 2007)

V.3. ANTITUMORALES

Los fármacos denominados antitumorales o antineoplásicos se definen como aquellas moléculas capaces de interferir en el proceso de desarrollo de ciertos tumores malignos (cáncer) y por lo tanto presentan la posibilidad de ser administrados para combatirlos (Kuckinsk, 2000)

Los fármacos anti-neoplásicos poseen características especiales que los hacen diferentes a otros grupos farmacológicos, son fármacos con un estrecho margen terapéutico, elevada toxicidad y pueden inducir la aparición de resistencia en las células tumorales.

Según la clasificación que propone Martínez (2002), de donde se ha tomado la Tabla 3 de acuerdo con su función dentro de la célula, los fármacos antineoplásicos se podrían clasificar como:

1. **Antineoplásicos que actúan sobre el ADN.** Afectan a la integridad de las cadenas de ácidos nucleicos, fundamentalmente al ADN, impidiendo la replicación celular normal.
2. **Antineoplásicos hormonales.** Es un amplio grupo de fármacos que actúan sobre tumores cuyo crecimiento depende del estímulo hormonal.
3. **Antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario.** Los fármacos de este grupo potencian la acción del sistema inmunitario, ya que éste es capaz de reconocer y destruir las células.
4. **Antineoplásicos que actúan sobre la cinética celular.** Actúan interfiriendo en el proceso de la mitosis y por tanto, impiden la reproducción celular,

Tabla 3. **Ejemplos de fármacos antineoplásicos** (Martínez, 2002).

Grupo de Antineoplásicos	Fármacos
Antineoplásicos que actúan sobre el ADN	Alquilantes : ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida, melfalán, altretamina, dacarbazina, etc
	Complejos de platino: carboplatino y cisplatino:
	Antimetabolitos: citarabina, metotrexato, mercaptopurina, fluorouracilo
Antineoplásicos hormonales	Antagonistas de estrógenos: tamoxifeno, toremifeno, aminoglutetimida
	Antagonistas de andrógenos: fosfestrol
	Progestágenos: gestonorona y megestrol
	Análogos de LH-RH: buserelina, goserelina, leuprorelina
Antineoplásicos que actúan sobre el sistema inmunitario	Aldesleukina y Aldesleukina
Antineoplásicos que actúan sobre la cinética celular	Antibióticos citostáticos: daunorubicina, mitoxantrona, bleomicina, mitomicina, etc
	Inhibidores de la mitosis: vinblastina, vincristina, docetaxel, paclitaxel, etc

Otra clasificación que es posible realizar para clasificar a los fármacos antineoplásicos es aquella que se establece de acuerdo con la actividad que ejercen sobre la cinética celular:

1. **Agentes fase específicos (ciclo dependientes y fase dependientes).** Son fármacos que actúan sobre una fase concreta del ciclo celular.
2. **Agentes ciclo específicos pero fase inespecíficos (ciclo dependientes y fase independientes).** Son fármacos que destruyen las células que están dentro del ciclo celular, independientemente de la fase en que se encuentren.
3. **Agentes ciclo inespecíficos y fase inespecíficos.** Son efectivos tanto para células en fase de división como en la fase de reposo (Kuckinsk, 2000).

V.3.1 ANTITUMORALES DE ORIGEN NATURAL

Hacia finales de 1950, comenzó una intensiva revisión de plantas, microorganismos y animales (estrellas de mar, corales, etc), respecto a su actividad antitumoral. Ello debido, principalmente, a que el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos (INC) promovió y fundó un gran programa de detección selectiva. Desde el comienzo de dicho programa se ha ensayado la actividad antitumoral, un gran número de extractos de diversos orígenes. Se han mostrado con actividad reproducible, alrededor del 4 % de los extractos ensayados. Durante más de unos veinticinco años se han experimentado unas 114,000 muestras vegetales, estando representadas 40,000 especies.

Las moléculas antitumorales aisladas suelen ser productos naturales nuevos que se extienden en un amplio margen de tipos estructurales. No obstante, varios de ellos, de hecho, son principios naturales ya conocidos anteriormente, pero que, probablemente, no habían sido sometidos a ensayos rigurosos respecto a su actividad biológica, especialmente a su potencial antitumoral.

Tabla 4. **Compuestos antitumorales provenientes de plantas.** (Farre, 2004)

Clase	Compuesto	Fuente
Monoterpenos	Alamandina	<i>Allamnada catártica</i>
	4-Ipomeanol	<i>Ipomea batatas</i>
Sesquiterpenos	Bacarina	<i>Baccharis megapotamica</i>
	Elefantopina	<i>Elephantopus elatus</i>
	Helenalina	<i>Helenium autumnale</i>
Diterpenos	Gnidina	<i>Gnidia lomprantha</i>
	Taxodiona	<i>Taxodium distichum</i>
	Taxol	<i>Taxus brevifolia</i>
Cuasinósidos/Simarubólidos	Bruceantina	<i>Brucea antidysenterica</i>
	Glaucarubinona	<i>Simatrouba glauca</i>
Lignanós	α - y β - Peltatina	<i>Podophyllum pletratum</i>
	Podofilotoxina	<i>Podophyllum hexamdrum</i>
		<i>Podophyllum pletratum</i>
Quinonas	Jacaranona	<i>Jacaranda caucana</i>
	Lapachol	<i>Steganotaenia suaveolens</i>
Alcaloides	Emetina Vinblastina Vincristina Colchicina	<i>Cyclea peltata</i> <i>Chataranthus lanceus</i> <i>C. roseus</i> <i>M. serrata</i>

V.4. CAPE

V.4.1 PROPÓLEO

Además de los antitumorales procedentes de plantas, existen otros de orígenes diversos, por ejemplo los derivados de productos apícolas como es el propóleo.

El propóleo es una resina cérea, de composición compleja y consistencia viscosa que las abejas elaboran a partir de partículas resinosas de diferentes vegetales y que utilizan en la construcción, reparación y protección de la colmena. El propóleo ha sido ampliamente utilizado desde la antigüedad con diversas finalidades, actualmente se investigan las acciones, efectos y posibles usos del propóleos en biología y medicina, destacando su utilización como suplemento dietético y en la industria farmacéutica (Farre R., *et al.*, 2004).

Se han aislado más de 180 componentes asociados al propóleo. Sus principales componentes son resinas y bálsamos que contienen flavonoides y ácidos fenólicos o sus ésteres (50%); poseen ceras de naturaleza muy variable (7.5-35%) que afectarán a los correspondientes componentes restantes; aceites volátiles (10%); polen (5%) e impurezas (4.4-19.5%). El propóleo contiene además pequeñas cantidades de terpenos, taninos, restos de las secreciones de las glándulas salivales de las abejas y otros posibles contaminantes (Krell R, 1996; Durk E, 1997)

El propóleo es un producto de interés en medicina y en la industria farmacéutica, al cual se le atribuyen efectos tales como: anti-inflamatorio, inmuno-estimulante, hepato-protector, carcino-estático, anti-microbiano, antiviral, antifúngico, antiprotozoarios, anestésico y de regeneración tisular (Krell R, 1996; Durk E, 1997; Farre R., *et al.*, 2004)

Tabla 5. **Composición promedio del propóleo**

Composición	(%)	Compuestos, características y observaciones
Resinas	45-55	Flavonoides, ácidos fenólicos y ésteres
Ceras	7.55 a 35	Mayoría cera de abeja, también de origen vegetal
Aceites esenciales	5-10	Volátiles
Ácidos grasos	5	La mayoría proceden de la cera y el resto depende del origen botánico
Polen	5	Proteínas del polen y aminoácidos libres. Predominan arginina y prolina.
Otros compuestos orgánicos y minerales	5	14 Oligoelementos Fe y Zn son los más abundantes, otros: Au, Ag, Cs, Hg, K, Sb. Cetonas, lactosas, quinonas, esteroides, ácido benzoico y ésteres, vitaminas, azúcares.

V.4.2 Ester fenílico del ácido caféico (CAPE).

El éster fenílico del ácido caféico (CAPE), es un componente del propóleo, que se encuentra en forma de polvo blancuzco, su fórmula molecular es $C_{17}H_{16}O_4$, con un peso molecular de 284.31

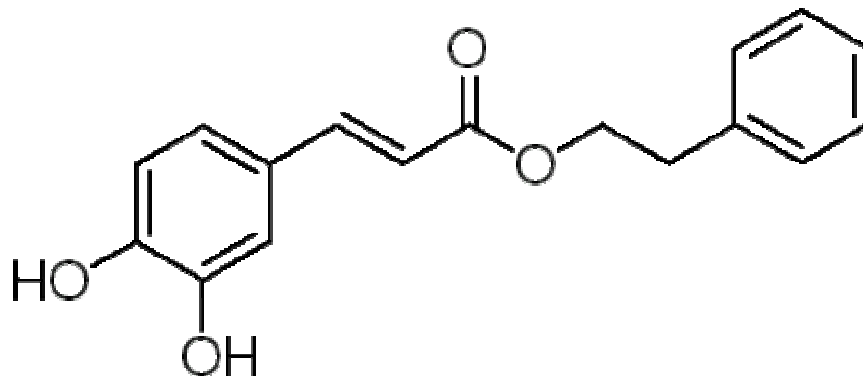


Figura 8. Estructura química del CAPE

Al CAPE se le han atribuido prácticamente las mismas propiedades antes mencionadas para el propóleo incluyendo la acción antitumoral. Existen numerosas referencias a cerca de estas propiedades biológicas, para esta investigación es importante mencionar algunos de los trabajos que reportan la actividad antitumoral del CAPE.

K. Natarajan y colaboradores en 1996 demostraron que el CAPE es un potente inhibidor específico de la activación de NF- κ B en células U937, esta propiedad ha sido ampliamente estudiada con el fin de explicar los mecanismos de inflamación e inmunomodulación que ejerce el CAPE en varios modelos. En el 2005 Wen-Xing Zhao y colaboradores determinaron que en concentraciones bajas el CAPE inhibe la proliferación celular y la síntesis de colágeno en células hepáticas de rata (HSC) mientras que a concentraciones mayores es capaz de inducir apoptosis a los hepatocitos en forma dosis dependiente.

Dong Wang y colaboradores en 2005 reportan que el CAPE inhibió la proliferación en células HCT116 e indujo la interrupción del ciclo celular y apoptosis, usando concentraciones de CAPE de 80, 40, 20, 10, 5, 2.5 mg/L. Para el 2006 Hsing-Chun Kuo y colaboradores reportan que el CAPE posee un potencial antitumoral en células de glioma C6, el CAPE inhibió del crecimiento de estas células tumorales dosis y tiempo dependiente, aumento el porcentaje de células en fase G_0/G_1 y indujo una

significativa disminución dosis dependiente en el crecimiento tumoral de xenoinjertos en ratones desnudos.

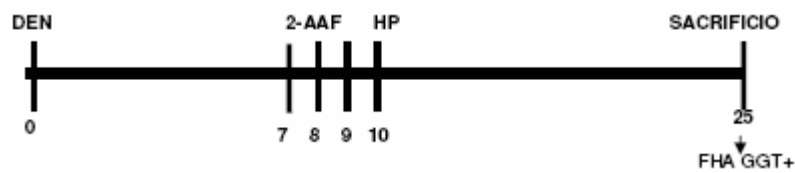
Como se puede apreciar el CAPE posee actividad antitumoral en diversos modelos tanto *in vivo* como *in vitro*, sin embargo es necesario seguir estudiando dicha actividad del CAPE para poder explicar el mecanismo molecular con el cual ejerce su acción.

V.4.3 MODELO DE HEPATOCARCINOGENESIS QUIMICA

Los modelos de carcinogénesis química como el de piel de ratón y el de hígado de rata, han contribuido a identificar tres etapas en el proceso de desarrollo del cáncer: la *iniciación*, la *promoción* y la *progresión*. La iniciación explica que el ADN es la principal biomolécula blanco de los carcinógenos (mutágenos químicos, virus y radiaciones ionizantes). Las células iniciadas presentan un daño genético permanente y heredable, además de una inestabilidad genética que las hace susceptibles para adquirir aberraciones cromosómicas. La promoción explica que la aparición de las lesiones pretumorales (nódulos, papilomas, polipos, etcétera) es a través de la proliferación de las células iniciadas. La progresión explica el desarrollo del cáncer a partir de lesiones pre-tumorales. Durante ésta etapa las células pre-tumorales sufren cambios estructurales en la cromatina, acumulan mutaciones, modifican el perfil de expresión genético y el metabolismo celular. Así, el cáncer es el resultante de un proceso de selección de células aberrantes que lograron sobrevivir adquiriendo un control autónomo para expandirse (Pere, *et al.*, 2006)

El modelo en rata, conocido como del “hepatocito resistente”, tiene como ventaja poder separar operacionalmente las 3 etapas de la carcinogénesis. Con la administración de dietilnitrosamina a las ratas, es posible estudiar la *iniciación* de las células hepáticas. Con la admistración del 2-acetilaminofluoreno y una hepatectomía parcial, se induce la promoción de las células iniciadas para formar focos de hepatocitos alterados o nódulos pretumorales. Las células de los nódulos tienen el daño genético suficiente que les permite conducirse autónomamente hacia una progresión tumoral (Perez, *et al.*, 2006)

El CAPE ha sido probado como agente quimiprotector del cáncer en el modelo modificado del hepatocito resistente de Semple-Roberts que induce hepatocarcinogénesis química. En este modelo se administra una dosis de 200 mg/kg de N-dietilnitrosamina (DEN) como carcinógeno al día cero, luego se administra una dosis diaria de 20 mg/kg de 2-acetilaminofluoreno (2AAF) como promotor en los días 7,8 y 9 del tratamiento, se realiza una hepatectomía parcial al día 10 y finalmente las ratas se sacrifican al día 25 para observar la presencia de focos de hepatocitos alterados GGT + (FHA-GGT+), los cuales se consideran posibles lesiones preneoplásicas.



Esquema de tratamiento del modelo de hepatocito resistente.

En este modelo se han observado resultados realmente prometedores, ya que al usar el CAPE en ratas Wistar macho en una sola dosis de 20 mg/kg 12 horas antes de la administración de DEN, hay una inhibición del 84% de las lesiones preneoplásicas y al aplicarlo durante la etapa de promoción en varias dosis, se alcanza una inhibición del 90% de las mismas (Carrasco, 2003; Carrasco, 2004; Beltrán, 2005)

VI. ANTECEDENTES

Las diversas actividades biológicas encontradas en el CAPE han sido estudiadas a nivel mundial en modelos tanto *in vivo* como *in vitro* entre estas actividades se encuentra el efecto antitumoral que ha mostrado poseer. Sin embargo el mecanismo antitumoral del CAPE aún está siendo elucidado. Uno de los grupos de investigación que ha aportado estudios sistemáticos que proponen explicación acerca del mecanismo de acción del CAPE, es el grupo del Dr. Saúl Villa Treviño.

En el 2003 el grupo del Dr. Villa Treviño, demuestran que el CAPE posee un efecto quimioprotector en la hepatocarcinogénesis experimental inducida por N-dietilnitrosmina (DEN) en ratas Wistar, los resultados de este trabajo sugieren que el CAPE ejerce una actividad quimioprotectora contra la inducción de lesiones preneoplásicas, promoción y progresión del proceso de hepato-carcinogénesis. Una probable explicación del mecanismo de quimioprotección sería a nivel del NF- κ B ya que el CAPE previene su activación (Carrasco-Legleu, *et al.*, 2003) lo que impediría que los tumores presenten resistencia a fármacos, con estos resultados obtenidos del modelo del hepatocito resistente y la evaluación de marcadores enzimático este grupo de investigación postulan a el CAPE como un agente quimioprotector que podría utilizarse al inicio y durante el proceso carcinogénico en hígado.

Para el 2005 Beltran y colaboradores presentan un trabajo que trató de dilucidar si el mecanismo de acción del CAPE como quimioprotector involucra la modificación de las isoformas de citocromos (CYP) que pueden estar participando en el metabolismo de N-dietilnitrosmina (DEN). Para esto se uso el modelo del hepatocito resistente y el CAPE se administro 12 horas 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 metabolismo del carcinógeno (DEN) pues el CAPE modifico la actividad de algunos CYP que podrían estar involucrados en su metabolismo, como el CYP1A1/1A2 y el CYP2B1/2B2.

Con los resultados obtenidos por Carrasco y Beltran, el grupo de investigación encabezado por el Dr. Saúl Villa Treviño ha explicado los posibles mecanismos por los cuales el CAPE ejerce su acción quimioprotectora.

VII. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Es importante el estudio *in vitro* de productos de origen natural para evidenciar sus propiedades antitumorales, es necesario sustentar los mecanismos de acción de estas sustancias, no solo *in vivo*, sino tanto a nivel celular como molecular.

El presente trabajo enfrenta el reto de evidenciar los efectos antitumorales del éster fenílico del ácido caféico (CAPE) a nivel de biología celular.

Por lo anterior, se decidió evaluar tres parámetros de comportamiento: la proliferación, la apoptosis y genotoxicidad, en líneas celulares derivadas de tumores humanos, lo que permitirá proponer evidencia que apoye algún mecanismo que pueda explicar algunos de los efectos antitumorales del éster fenílico del ácido caféico (CAPE).

VIII. HIPOTESIS

Dado que se ha observado actividad antitumoral del CAPE en estudios *in vivo* que emplean el modelo de hepatocarcinogénesis inducida en rata, suponemos que los efectos que el CAPE es capaz de inducir *in vitro*, podrían ayudar a explicar el mecanismo por el cual este compuesto presenta dicha actividad contra neoplasias.

IX. OBJETIVOS

IX.1. Objetivo general

Determinar el mecanismo que da lugar a la actividad antitumoral del CAPE, para apoyar su posible uso como sustancia de origen natural con utilidad en el tratamiento antitumoral.

IX.2. Objetivos particulares

Para elucidar algunos de los efectos *in vitro* del CAPE en modelos celulares, fue necesario:

1. Determinar el comportamiento de la proliferación celular en líneas: HeLa, VERO, JURKAT y K562 pre-tratadas con CAPE.
2. Determinar la probable actividad apoptótica del CAPE mediante la prueba de anexina en líneas: HeLa, VERO, JURKAT y células mononucleadas de sangre periférica.
3. Determinar la probable actividad genotóxica del CAPE usando la técnica de intercambio de cromátidas hermanas en células normales de sangre periférica.

X. MATERIALES Y METODOS

X.1. LÍNEAS CELULARES

En la realización del presente trabajo se utilizaron cuatro líneas celulares entre las que encontramos a la línea celular de cáncer cérvico uterino HeLa (HPV-18), esta línea crece en monocapa y se mantuvo y propagó en medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con 10 % de SFB, 2mM de L-Glutamina, 25 mM de HEPES, 100µg/ml de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina; mantenidas en humedad con 5% de CO₂-95% de aire a 37°C. Se propagaron los subcultivos seriadamente después de cosecharlos con tripsina al 0.5% / 0.53 mM EDTA 4Na. También se empleó células epiteliales de riñón de mono en este caso fueron las células VERO, las cuales se propagaron en medio modificado Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) suplementado con los mismos componente y las mismas concentraciones que el medio utilizado para las células HeLa.

Como modelo de linfocitos T se utilizaron células JURKAT, estas células derivan de leucemia, crecen en suspensión y se mantuvieron y propagaron en medio RPMI 1640 suplementado con 10 % de SFB, 2mM de L-Glutamina, 25 mM de HEPES, 100µg/ml de estreptomicina y 100 U/ml de penicilina; mantenidas en humedad con 5% de CO₂-95% de aire a 37°C. También se emplearon células mononucleadas de sangre periférica que se aislaron de un individuo sexo femenino en condiciones saludables por el método de Ficoll-Histopaque que se fundamenta en la separación de las células por medio del gradiente de densidad. Para llevarlo a cabo primero se obtuvo una muestra de sangre por punción venosa, por medio de una jeringa, la sangre se vació a un tubo falcon de 15 ml y se centrifugo a 3000 rpm por 15 minutos a temperatura ambiente. Se obtuvieron las células blancas y se resuspendieron en un tubo que contenía 5 ml de PBS frío, en otro tubo se agrego 3 ml del reactivo de Ficoll frío y procedió a agregar el PBS que contiene las células blancas por la pared despacio al tubo con Ficoll, se centrífuga a 1500 rpm por 15 minutos en frío. Por ultimo se toma el alo de células blancas y se lava en dos ocasiones con PBS frio a 1500 rpm por 5 minutos y el resultado final se resuspende en 1 ml de PBS para realizar el conteo con azul de tripano y mantenerlas en medio RPMI 1640 suplementado con los mismos componente y las mismas concentraciones que el medio utilizado para las células JURKAT.

X.2. CUANTIFICACIÓN DE LA PROLIFERACION CELULAR

Se utilizó el Kit Vybrant MTT Cell proliferation assay el cual usa el colorante Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, (MTT) como índice de la integridad de la membrana mitocondrial interna. Las deshidrogenasas mitocondriales transforman el MTT de color amarillo en un derivado del formazán insoluble de color violeta que absorbe a una longitud de onda de 570 nm.

Para determinar la capacidad de la proliferación celular que presenta el CAPE sobre células tumorales se realizó el ensayo de MTT, se utilizaron cuatro líneas celulares: HeLa, VERO, JURKAT, K562. Como control de proliferación se utilizó medio de cultivo conteniendo suero fetal bovino al 10 %, como control negativo se utilizaron las células sin tratamiento y el control del vehículo dado que el CAPE requiere ser disuelto en DMSO al 0.1%. Las células HeLa y VERO que crecen en monocapa se cultivaron hasta obtener una confluencia del 70-80 %, posteriormente se tripsinizaron para poder realizar conteo y observación de viabilidad celular por medio de tinción con azul de tripan. Se colocaron 10,000 células por pozo en una placa de 96 empleando medio sin suero fetal bovino. La placa se incubó a 37°C /5% CO₂ por dos horas para que las células se adhirieran y entonces se agregaron las distintas concentraciones de CAPE que fueron 2.5, 5, 7.5 y 10 µg/ml y se incubó por 24 o 48 horas en presencia del mismo.

Las Líneas JURKAT y K562 que son células que crecen en suspensión, se cultivan hasta obtener una confluencia del 70-80 %, se realiza el conteo y viabilidad celular y se colocan 50,000 células por pozo en una placa de 96 en medio sin suero fetal bovino para evitar inducción de proliferación debida a factores del mismo. A continuación se agregaron las distintas concentraciones de CAPE: 2.5, 5, 7.5 y 10 µg/ml. El tiempo de incubación para las cuatro líneas celulares en un primer ensayo fue de 24 hrs. Después de la incubación se retiró el medio de cultivo y se les agregó 100 µl de medio de cultivo fresco, se adicionaron 10 µl del reactivo de MTT 12 mM a cada pozo. Se incubó a 37°C durante 4 horas. Posteriormente se adicionaron 100 µl de la solución de SDS-HCl y se incubó nuevamente a 37°C durante 4 hr en una cámara húmeda.

Por último la placa se analizó en un lector de elisa a una longitud de onda de 570 nm. Los ensayos se realizaron por duplicado a 24 hr de incubación y otros a 48 hr de incubación, posteriormente cada experimento se repitió una vez más para observar la reproducibilidad del experimento y para coleccionar datos que permitieran llevar a cabo un análisis estadístico.

X.3. DETECCIÓN DE APOPTOSIS

X.3.1 TINCIÓN DE ANEXINA V-FITC/YODURO DE PROPIDIO

En las células normales la distribución de los fosfolípidos en la membrana plasmática es asimétrica, la membrana interna contiene fosfolípidos aniónicos como fosfatidilserina y la externa fundamentalmente fosfolípidos neutros. En una célula apoptótica se produce una traslocación de los residuos de fosfatidilserina de membrana interna a membrana externa, exponiendo de esta manera los residuos de la fosfatidilserina al exterior.

La Anexina-V es una proteína de unión a fosfolípidos dependiente de calcio, la cual tiene una gran afinidad de unión a los residuos de fosfatidilserina. Por tanto la anexina puede unirse a los residuos de fosfatidilserina de las células apoptóticas al ser estos accesibles por estar en el exterior. De esta manera se puede discriminar entre células apoptóticas y células normales.

Para detectar la apoptosis hemos usado el kit de detección de apoptosis con la tinción de anexina V-FITC y yoduro de propidio (Calbiochem), en el cual la anexina-V está conjugada con isotiocianato de fluoresceína (FITC). Dado que la membrana de las células necróticas se permeabiliza, estas pueden unir también anexina, para distinguirlas de las apoptóticas se utiliza un colorante de unión a DNA, el yoduro de propidio. Sólo las células con la membrana permeabilizada (necróticas) podrán tomar este fluorocromo.

De esta manera distinguimos:

- a. Células viables: no unen anexina y excluyen yoduro de propidio
- b. Células en apoptosis temprana: unen anexina y excluyen yoduro de propidio
- c. Células en apoptosis tardía: unen anexina e incorporan yoduro de propidio
- d. Células necróticas: unen anexina e incorporan yoduro de propidio, o solo incorporan yoduro de propidio

La tinción con anexina V-FITC y yoduro de propidio se realizó de la siguiente manera, las cuatro líneas celulares se sembraron en placas de 24 pocillos. Las concentraciones de CAPE que se utilizaron fueron: 2.5, 5, 7.5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ y el tiempo de incubación fue de 24 h. Después de la incubación se colocó todo el volumen de los pozos en un tubo para citómetro de flujo (Falcon de 5 ml) se centrifugó a 2000 rpm por 2 min a 4°C, el pellet celular se resuspendió en 500 μl de medio fresco sin suero. Se adicionaron 10 μl del buffer de unión y 1 μl de anexina por tubo se incubó 15 min a temperatura ambiente y en la oscuridad. Se centrifugó a 2000 rpm por 2 min a 4°C para retirar el sobrenadante por inversión del tubo y se adicionaron 0.5 ml del buffer de unión frío se agregaron 10 μl del reactivo conteniendo PI (Propidium Iodide) y las reacciones se dejaron incubar en hielo y en la oscuridad por 10 min. Por ultimo las células se lavaron con 300 μl de PBS frío antes de analizar en el citómetro de flujo y posteriormente se colectaron las últimas células para microscopía.

La señal del FITC (fluorescencia verde) se detecto a 518 nm, el log de esta fluorescencia se representó en el eje de las X. La señal del yoduro de propidio se detecto a 620 nm y log de esta se represento en el eje de las Y.

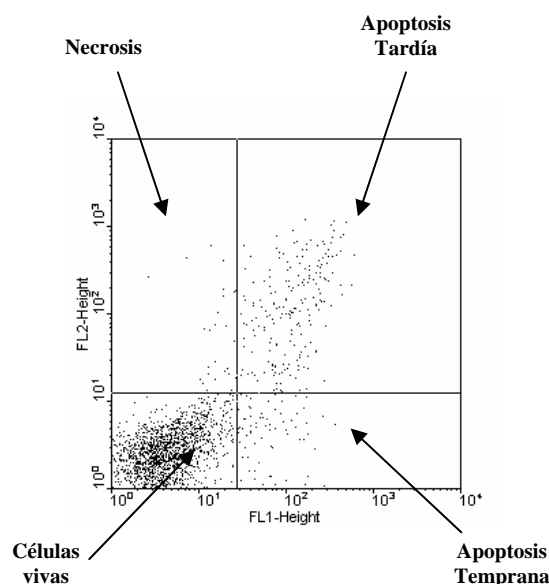


Figura 9. Representación de un análisis por citometría de flujo con células marcadas con yoduro de propidio y anexina-FITC

De esta forma la gráfica de puntos que se obtiene se puede dividir en cuatro cuadrantes: en el cuadrante inferior izquierdo aparecen las células viables, en el inferior derecho aparecen las células en apoptosis temprana, en el superior derecho apoptosis tardía y en el superior izquierdo necrosis.

X.4 INTERCAMBIO DE CROMATIDAS HERMANAS

La prueba de intercambio de cromátidas hermanas (ICH) es ampliamente utilizada en el análisis citogenético por su sensibilidad para detectar agentes que inducen daño genético y por lo tanto no deben ser administrados como fármacos en el tratamiento de las enfermedades. Los ICH son intercambios recíprocos entre cromátides de un mismo cromosoma. En esta prueba las células se replican durante dos generaciones o más en presencia de una base análoga, 5-bromo-desoxiuridina (5-BrdU), que sustituye a la timina durante la replicación celular. Se efectúa un tratamiento con el colorante Hoechst 33258, el cual no se incorpora al DNA normal, pero si a aquel cuyas dos cadenas han sido sustituidas por la 5-BrdU y finalmente se lleva a cabo una tinción con el colorante de Giemsa; el resultado de dicha tinción es que una cromátida aparece oscura y la otra clara, facilitando su observación, en caso de que existan, segmentos intercambiados tratándose de un ICH.

La prueba de ICH se realizó de la siguiente manera: se obtuvo una muestra de sangre por punción venosa, por medio de una jeringa heparinizada. En un tubo estéril se adicionaron 5 ml del medio de cultivo RPMI 1640, 4 gotas de fitohemaglutinina y 10 gotas de sangre. El contenido del tubo se mezcló bien y se incubó en la estufa a 37°C durante 24 hrs. Transcurrido este tiempo se agregaron 45 µl de 5-BrdU a una concentración de 1 mg/ml, además de las diferentes concentraciones de CAPE que fueron: 2.5, 5, 7.5 y 10 µg/ml. Los tubos se incubaron nuevamente hasta completar 71 horas. Una vez transcurrido ese tiempo se agregaron 50 µl de colchicina a una concentración de 0.1 mg/ml en cada tubo. Se mezcló bien el contenido de los tubos y se continuó con la incubación por una hora más.

Para la obtención de las preparaciones cromosómicas se centrifugaron los tubos a 3000 rpm durante 10 min y se retiró el sobrenadante. Se resuspendió el paquete celular y se adicionaron 8 ml de KCl 0.075 M a 37°C, los tubos se incubaron durante 30 minutos a 37°C. Se centrifuga nuevamente durante 5 minutos y se desechó el sobrenadante, el paquete celular se resuspendió en 5 ml de solución fijadora de metanol-

ácido acético (3:1) recién preparada y fría con agitación constante; se deja reposar por alrededor de 15 min. Se repitió el procedimiento anterior dos veces más. Después de la última centrifugación se dejó un volumen de 0.5 ml de solución para hacer una suspensión celular adecuada y se realizaron las preparaciones cromosómicas por goteo sobre portaobjetos limpios y fríos. Las preparaciones se secaron al aire y se dejaron madurar antes de la tinción.

Para la tinción diferencial en cada laminilla se colocaron 4 o 5 gotas de la solución de trabajo Bis-benzimida Hoechst y se colocó encima un cubreobjetos para expandirlas. Las laminillas se mantuvieron en LA oscuridad por 20 minutos. Una vez pasado el tiempo alrededor del cubreobjetos se colocaron unas gotas de buffer de diferenciación que contiene citrato trisódico y fosfato de sodio monohidratado. Las laminillas se expusieron a luz UV por una hora y quince minutos, a una distancia no mayor de 2cm de la lámpara.

Se retira el cubreobjetos por inmersión con agua desionizada. Las laminillas se sumergen en una solución doble de salina-citrato a 60°C por 15 minutos, después se enjuagaron con agua caliente y luego agua fría. Por último se tiñeron con Giemsa en buffer de fosfatos pH 6.8 durante 10 minutos.

La observación al microscopio se realizó de la siguiente manera:

1. Intercambio de cromátidas hermanas (ICH)

Para obtenerlo se procedió a localizar 25 metafases que se encontraran en segunda división celular, observando en cada metafase el número de intercambios de cromátidas hermanas en el objetivo de inmersión (100x), para cada uno de los diferentes tratamientos

2. Índice mitótico (IM)

Se realizó contando el número de metafases que se encontraron en un total de 1000 células también por cada uno de los tratamientos

3. Índice de replicación

Se obtiene al contar el número de metafases en primera, segunda y tercera división celular en un tota de 100 metafases por cada tratamiento.

$$I.R. = \frac{(M_1x1)(M_2x2)(M_3x3)}{100}$$

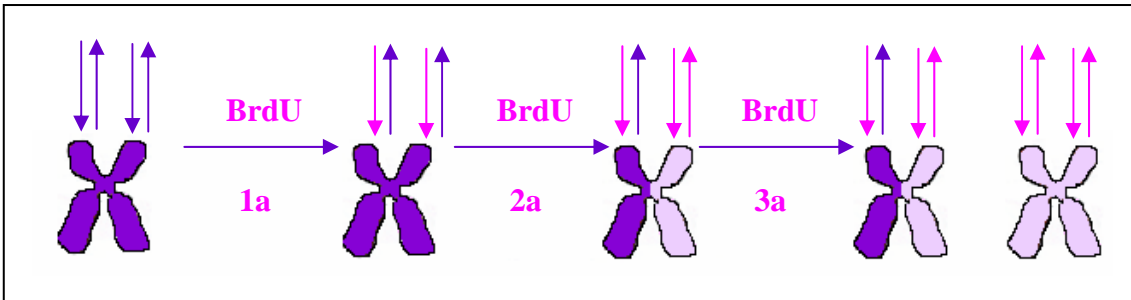


Figura 10. Esquema que muestra la tinción diferencial entre las cromátidas hermanas al adicionar BrdU en tres ciclos celulares (Morales-Ramírez, 1988)

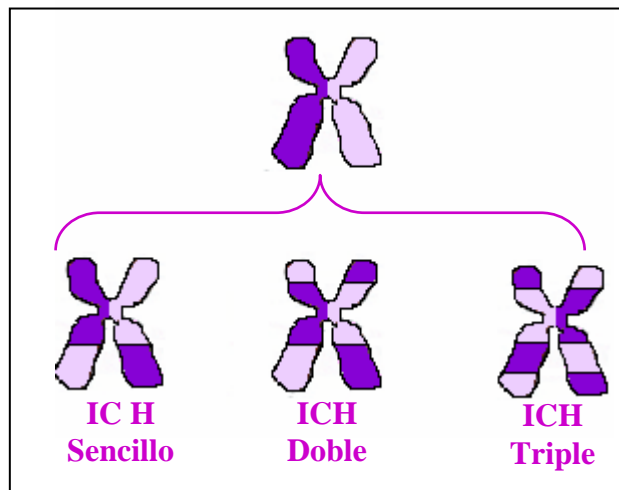
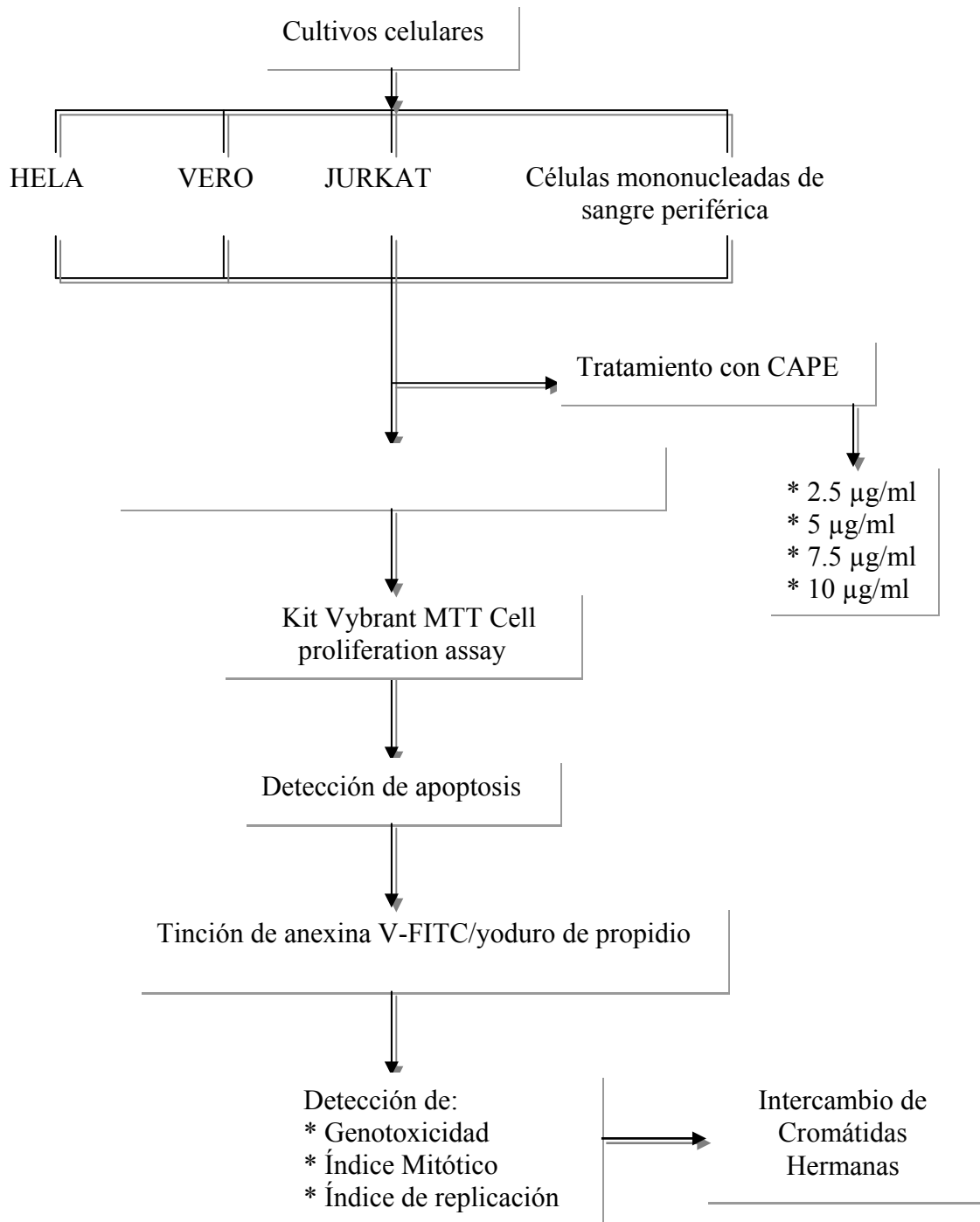


Figura 11. Representación de los intercambios entre cromátidas hermanas (ICH) (Morales-Ramírez, 1988)

Figura 12. Diagrama de flujo del procedimiento experimental



XI. RESULTADOS

XI.1 Determinación de la proliferación celular a diferentes concentraciones del CAPE

En la Tabla 6 se presentan los resultados de la proliferación celular con el ensayo de MTT para las líneas celulares HeLa y VERO a 24 y 48 h de incubación con las diferentes concentraciones de CAPE usadas. Como se puede observar ambas líneas celulares presentaron una inhibición de la proliferación en distintos porcentajes, los cuales variaron dependiendo la concentración y el tiempo de incubación.

Tabla 6. Resultados del porcentaje de inhibición de la proliferación en células HeLa y VERO pre-tratadas con las diferentes concentraciones de CAPE a 24 y 48 hrs. de incubación.

Línea Celular	Tiempo de Incubación	% Inhibición de la proliferación			
		2.5 µg/ml de CAPE	5 µg/ml de CAPE	7.5 µg/ml de CAPE	10 µg/ml de CAPE
HeLa	24 hrs	0	0	7	9
HeLa	48 hrs	0	0	18	38
VERO	24 hrs	0	0	5	48
VERO	48 hrs	6	12	41	67

Las concentraciones de 2.5 y 5 µg/ml de CAPE no mostraron ningún efecto en la proliferación celular en las células HeLa en los dos tiempos de incubación usados, mientras que las concentraciones de 7.5 y 10 µg/ml desde las 24 hrs mostraron efecto 7 y 9 % de la inhibición de la proliferación celular y a las 48 h este efecto se incremento a un 18 % y 38 % respectivamente (Figura 12).

Para la línea celular VERO nuevamente se observa que las concentraciones de 2.5 y 5 µg/ml de CAPE a las 24 h de incubación no muestran un efecto en la proliferación celular, mientras que a las 48 h el efecto es de un 6 % y 12% respectivamente. El efecto con mayor porcentaje de inhibición de la proliferación celular se obtuvo con la concentración de 10 µg/ml en esta línea siendo de un 48% a las 24 h y de un 67% a las 48 h (Figura 13).

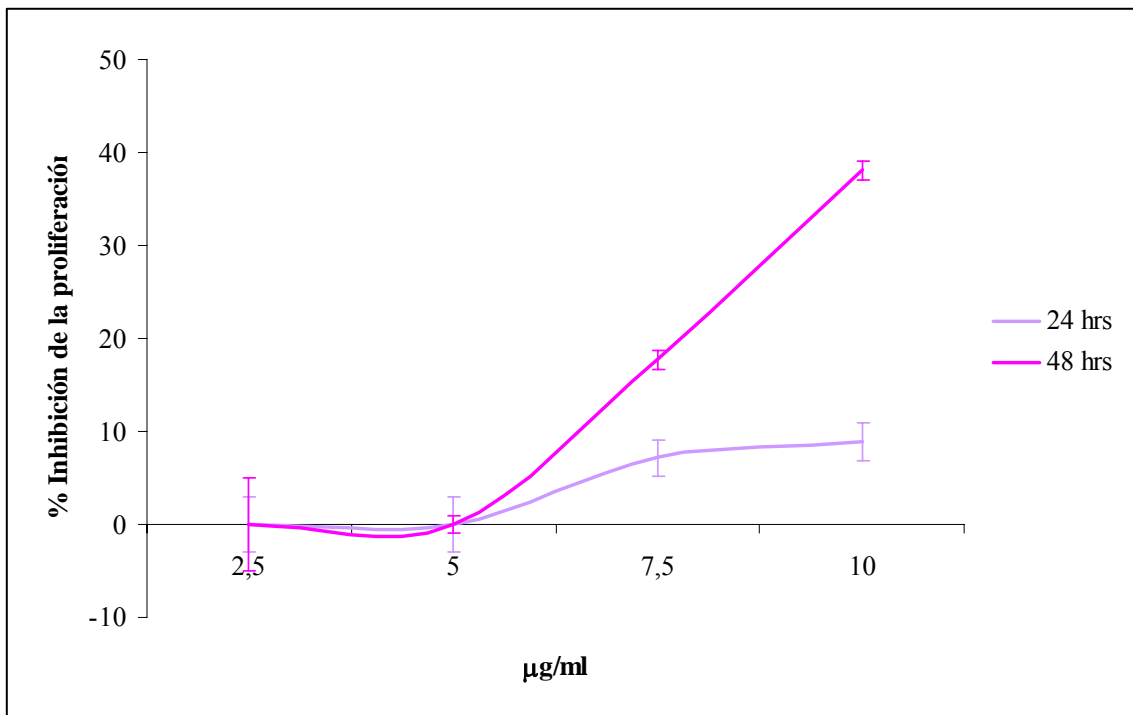


Figura 13. Efecto en el porcentaje de inhibición de la proliferación en células HeLa pre-tratadas con CAPE.

Las células HeLa se trataron con las diferentes concentraciones de CAPE (2.5, 5,7.5 y 10 µg/ml) a dos tiempos de incubación que fueron 24 hrs y 48 hrs en placas de 96 pozos.

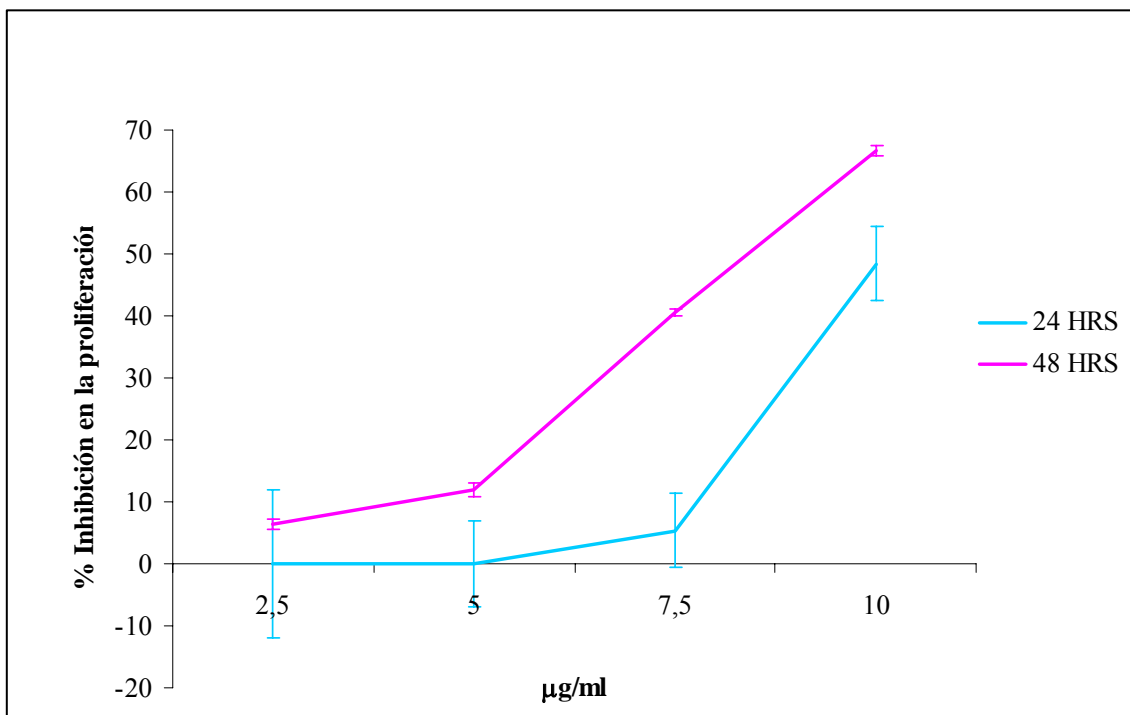


Figura 14. Efecto en el porcentaje de inhibición de la proliferación en células VERO pre-tratadas con CAPE.

Las células VERO se trataron con las diferentes concentraciones de CAPE (2.5, 5,7.5 y 10 µg/ml) a dos tiempos de incubación que fueron 24 hrs. y 48 hrs. en placas de 96 pozos.

En la Tabla 7 se presentan los resultados de la proliferación celular OBTENIDOS para las líneas celulares JURKAT y K562 a 24 h. de incubación, como se muestra en ella, las tres concentraciones de cape usadas presentaron valores que van desde el 15% y hasta el 44% de inhibición de la proliferación en general los valores del porcentaje de inhibición de las K562 inician a un valor de 35, mas alto que el valor de 15 con el que inician las JURKAT.

Tabla 7. Resultados del porcentaje de inhibición de la proliferación en células JURKAT y K562 pre-tratadas con las diferentes concentraciones de CAPE a 24 hrs. de incubación.

Línea Celular	Tiempo de Incubación	% Inhibición de la proliferación		
		5 µg/ml de CAPE	7.5 µg/ml de CAPE	10 µg/ml de CAPE
JURKAT	24 hrs.	15	24	43
K562	24 hrs.	35	42	44

La concentración de 10 µg/ml es la que presenta un porcentaje mayor en la inhibición de la proliferación celular para ambas líneas celulares usadas, siendo mínima la diferencia que presentan ambas líneas celulares. Sin embargo en las dos concentraciones menor que son la de 5 y 7.5 µg/ml se observa una diferencia mayor entre las líneas celulares empleadas, para la células JURKAT el porcentaje de inhibición de la proliferación fue de 15 % y 24% para las concentraciones de 5 y 7.5 µg/ml respectivamente, mientras que para las células K562 el porcentaje de inhibición de la proliferación fue de 35 % y 42% para las concentraciones de 5 y 7.5 µg/ml respectivamente mayor que el presentado por las cedulas JURKAT (figuras14 y 15).

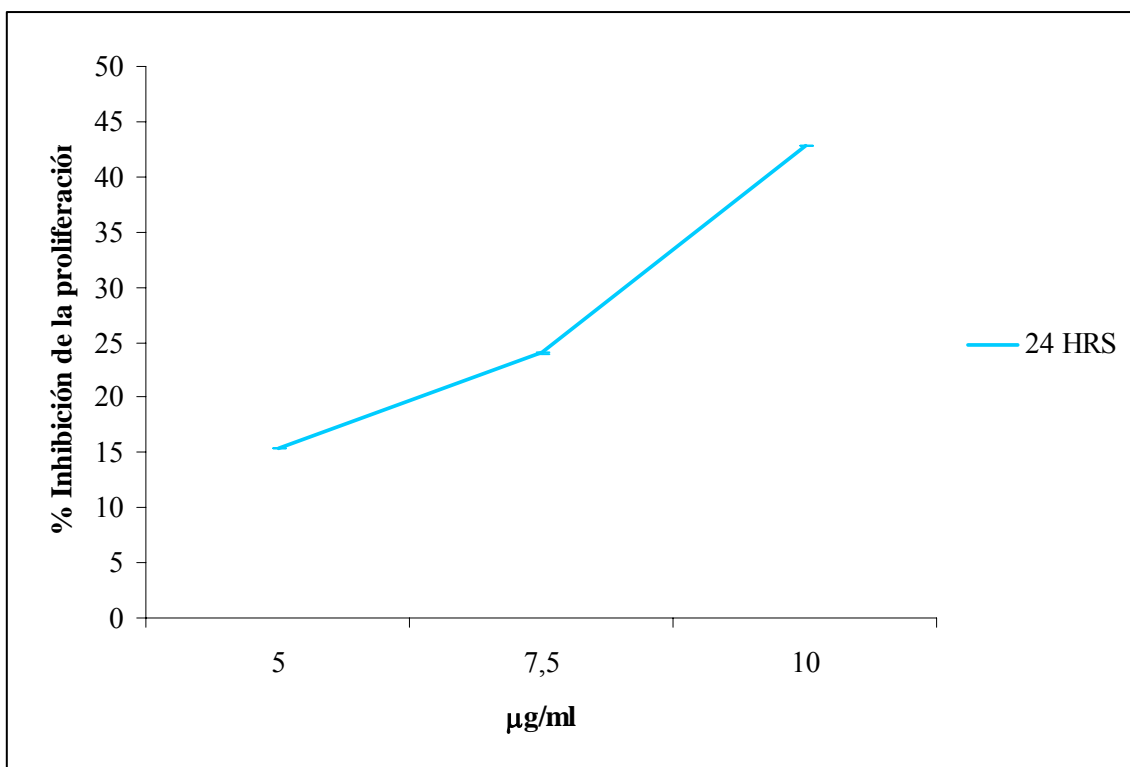


Figura 15. Efecto en el porcentaje de inhibición de la proliferación en células JURKAT pre-tratadas con CAPE.

Las células JURKAT se trataron en placas de 96 pozos con diferentes concentraciones de CAPE (2.5, 5, 7.5 y 10 µg/ml) y se incubaron por 24 h.

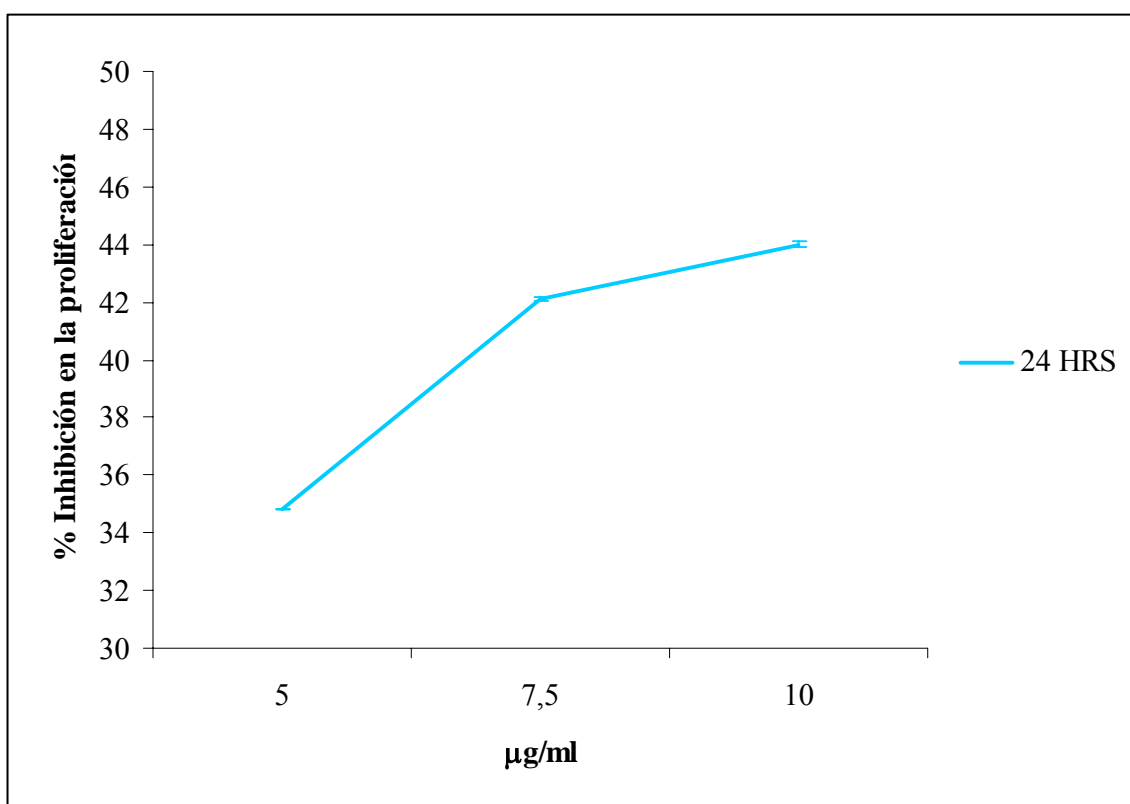


Figura 16. Efecto en el porcentaje de inhibición de la proliferación en células K562 pre-tratadas con CAPE.

Las células K562 se trataron con las diferentes concentraciones de CAPE (2.5, 5, 7.5 y 10 µg/ml) e incubadas a 24 hrs en placas de 96 pozos.

XI.2. Ensayo de apoptosis por la tinción con anexina V-FITC

Una vez que los resultados con MTT no parecían mostrar un aumento, pero sí una inhibición de la proliferación celular, se decidió realizar ensayos de apoptosis empleando la tinción con anexina V-FITC. Para este ensayo se utilizaron las líneas celulares ya descritas: HeLa, VERO, JURKAT y células mononucleadas de sangre periférica. Fue necesario tripsinizar las líneas HeLa y VERO debido a que crecen en monocapa, una vez que se evaluó su viabilidad por medio de azul de tripano se colocaron 300,000 células por pozo en una placa de 24 pocillos, con medio sin suero fetal bovino. Se dejaron incubar a 37°C / 5%CO₂ durante dos horas para permitir que adhirieran y se revisaron al microscopio invertido para comprobar que había una buena densidad de la monocapa aproximadamente del 80%. Posteriormente se agregan las diferentes concentraciones de CAPE. Para este ensayo se usó como control positivo Actinomicina D a una concentración de 3µM, ya que se tenía referencia de que es capaz de inducir muerte celular vía apoptosis en las líneas celulares usadas en el laboratorio. Como control negativo se tenían las células sin tratamiento y el control de vehículo fue DMSO al 0.1%. La placa se dejó incubar 24 h para posteriormente realizar el ensayo de apoptosis y la lectura al citómetro de flujo.

Los resultados que se obtuvieron para las células JURKAT en este ensayo se muestran en la Tabla 8 en donde se puede apreciar que el efecto de apoptosis va en aumento con la concentración de CAPE empleada (Figura 16).

Tabla 8. **Resultados del ensayo de Anexina V- FITC en células JURKAT tratadas con las diferentes concentraciones de CAPE**

Tratamiento	% Células viables	% Apoptosis temprana	% Apoptosis tardía	Apoptosis TOTAL	% Necrosis
Control (-)	76	8	16	24	0
Control (+)	6	2	88	90	4
2.5 µg/ml CAPE	53	7	31	38	9
5 µg/ml CAPE	42	4	37	41	17
7.5 µg/ml CAPE	42	9	43	52	6
10 µg/ml CAPE	27	3	52	55	18

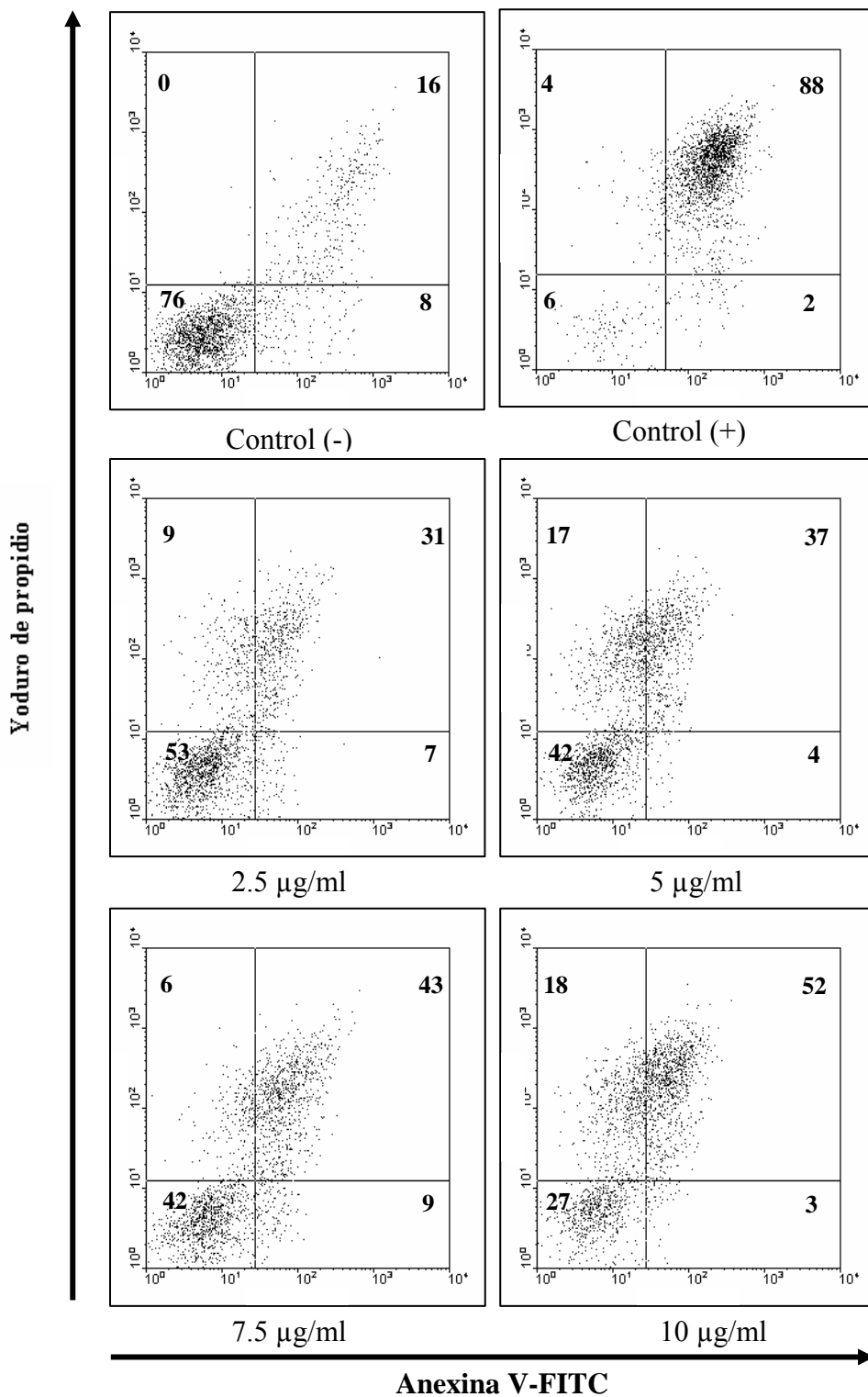


Figura 17. Efecto de las diferentes concentraciones de CAPE en la inducción de apoptosis en células JURKAT.

Controles de inducción de apoptosis cuantificada por citometría de flujo usando la tinción de anexina V-FITC/Yoduro de propidio. Células JURKAT sin tratamiento, tratadas con 3µM de actinomicina D. Concentraciones de CAPE usadas 2.5, 5, 7.5 y 10 µg/ml disueltas en DMSO 0.1%.

En lo que se refiere a las células mononucleares de sangre periférica los resultados que se obtuvieron se muestran en la Tabla 9, para esta célula es importante mencionar que al llevarse a cabo un procedimiento de extracción estas células sufren estrés y daño por que es muy importante realiza la viabilidad celular con azul de tripano.

Tabla 9. Resultados del ensayo de Anexina V- FITC en células mononucleares de sangre periférica tratadas con las diferentes concentraciones de CAPE

Tratamiento	% Células viables	% Apoptosis temprana	% Apoptosis tardía	Apoptosis TOTAL	% Necrosis
Control (-)	70	20	7	27	3
Control (+)	25	31	42	73	2
2.5 µg/ml CAPE	50	23	19	42	5
5 µg/ml CAPE	46	25	24	49	5
7.5 µg/ml CAPE	33	15	37	52	15
10 µg/ml CAPE	31	19	46	65	4

En la Tabla 9 se puede apreciar el efecto del cape, en el cual el porcentaje de apoptosis va incrementándose de acuerdo con el aumento de la concentración. La sumatoria del porcentaje de apoptosis temprana y tardía para la concentración de 10 µg/ml es de un 65 % lo que sugiere que más de la mitad de las células tratadas sufrieron apoptosis y para la concentración menor se presenta un porcentaje de apoptosis del 42 % (Figura 17)

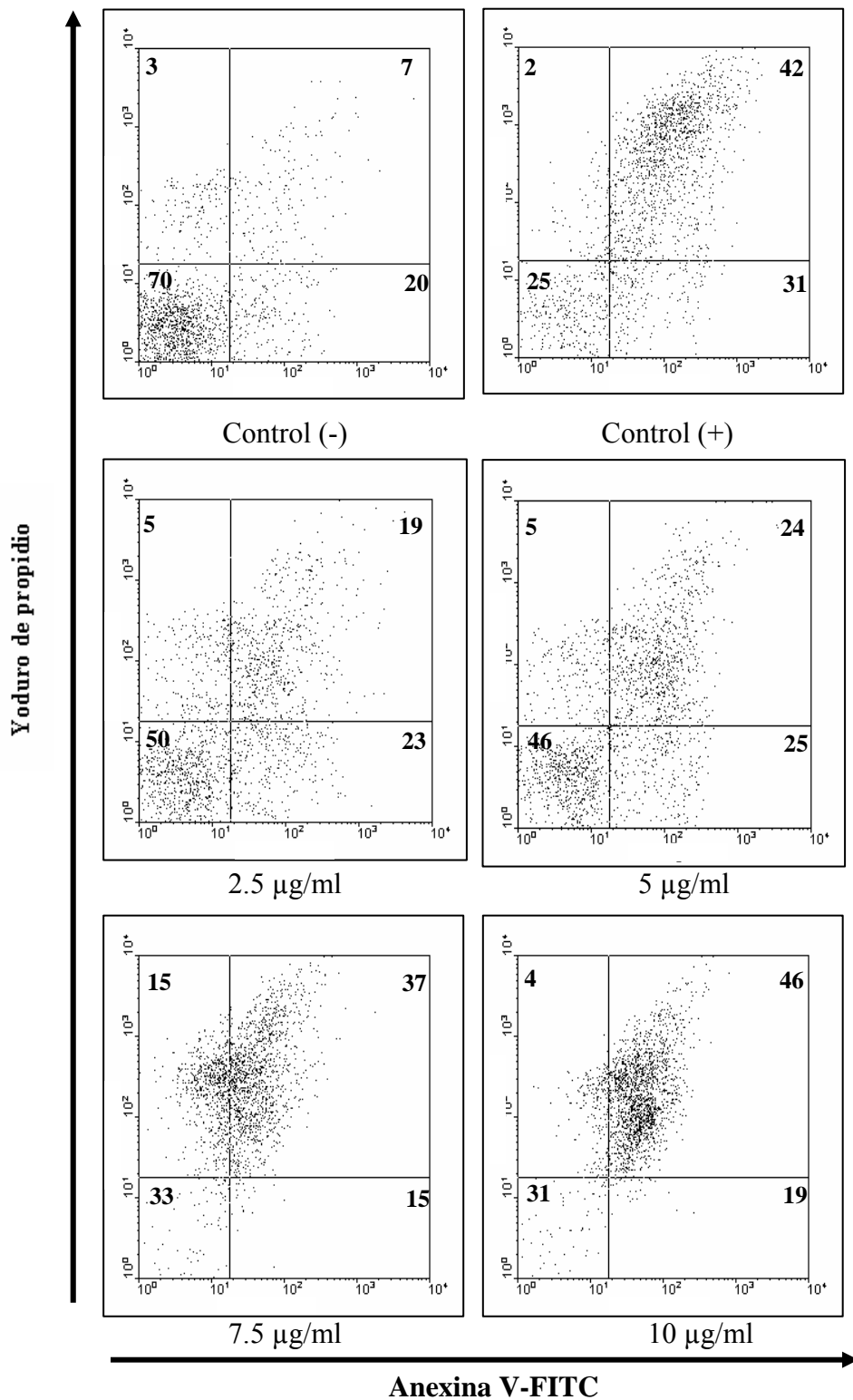


Figura 18. Efecto de las diferentes concentraciones de CAPE en la inducción de apoptosis en células mononucleares de sangre periférica.

Controles de inducción de apoptosis cuantificada por citometría de flujo usando la tinción de anexina V-FITC/Yoduro de propidio. Células JURKAT sin tratamiento, tratadas con 3µM de actinomicina D. Concentraciones de CAPE usadas 2.5, 5, 7.5 y 10 µg/ml disueltas en DMSO 0.1%.

Los resultados que se obtuvieron para las células HeLa tratadas con las distintas concentraciones de CAPE se muestran en la Tabla 10. Como se puede apreciar el porcentaje de apoptosis es menor que el obtenido con las dos líneas celulares anteriores, que fueron JURKAT y células mononucleares de sangre periférica que presentaron una apoptosis total a la concentración de 10 µg/ml de 55 y 65% respectivamente mientras que el porcentaje de apoptosis total que presentaron las células HeLa fue del 17% (Figura 18)

Tabla 10. Resultados del ensayo de Anexina V- FITC en células HeLa tratadas con las diferentes concentraciones de CAPE

Tratamiento	% Células viables	% Apoptosis temprana	% Apoptosis tardía	Apoptosis TOTAL	% Necrosis
Control (-)	90	4	3	7	3
Control (+)	69	25	4	29	2
2.5 µg/ml CAPE	85	7	4	11	4
5 µg/ml CAPE	81	8	5	13	6
7.5 µg/ml CAPE	77	11	4	15	8
10 µg/ml CAPE	76	12	5	17	7

En cuanto a los resultados que se obtuvieron para las células VERO tratadas con las distintas concentraciones de CAPE se presentan en la Tabla 11, como se puede apreciar el porcentaje de apoptosis es menor que con las dos anteriores líneas celulares y muy similar al presentado por las células HeLa (Figura 19)

Tabla 11. Resultados del ensayo de Anexina V- FITC en células VERO tratadas con las diferentes concentraciones de CAPE

Tratamiento	% Células viables	% Apoptosis temprana	% Apoptosis tardía	Apoptosis TOTAL	% Necrosis
Control (-)	93	3	1	4	3
Control (+)	71	25	3	28	1
2.5 µg/ml CAPE	79	9	5	14	7
5 µg/ml CAPE	83	9	4	13	4
7.5 µg/ml CAPE	81	10	4	14	5
10 µg/ml CAPE	74	15	6	21	5

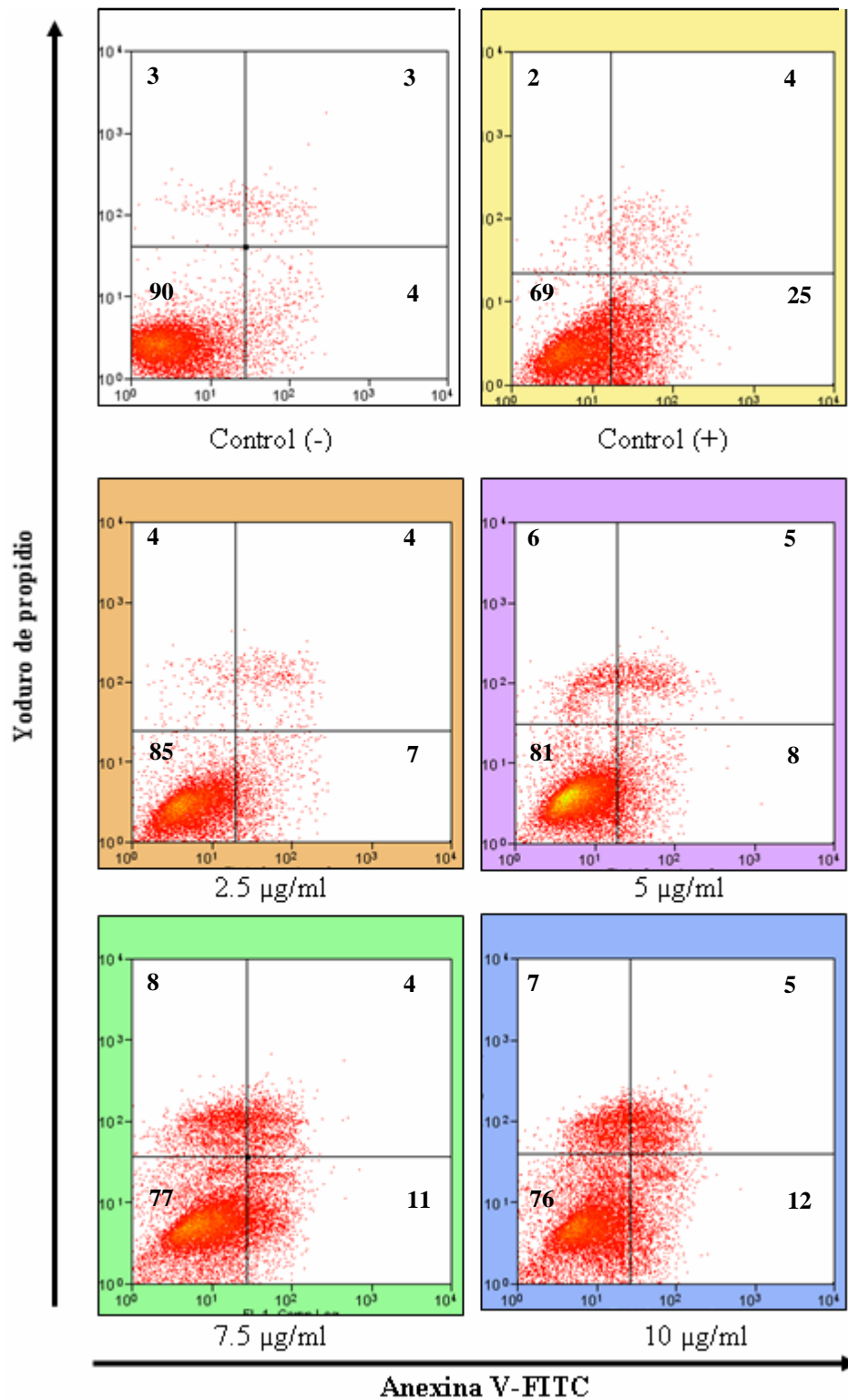


Figura 19. Efecto de las diferentes concentraciones de CAPE en la inducción de apoptosis en células HeLa.

Controles de inducción de apoptosis cuantificada por citometría de flujo usando la tinción de anexina V-FITC/Yoduro de propidio. Células JURKAT sin tratamiento, tratadas con 3µM de Actinomicina D. Concentraciones de CAPE usadas 2.5, 5, 7.5 y 10 µg/ml disueltas en DMSO 0.1%.

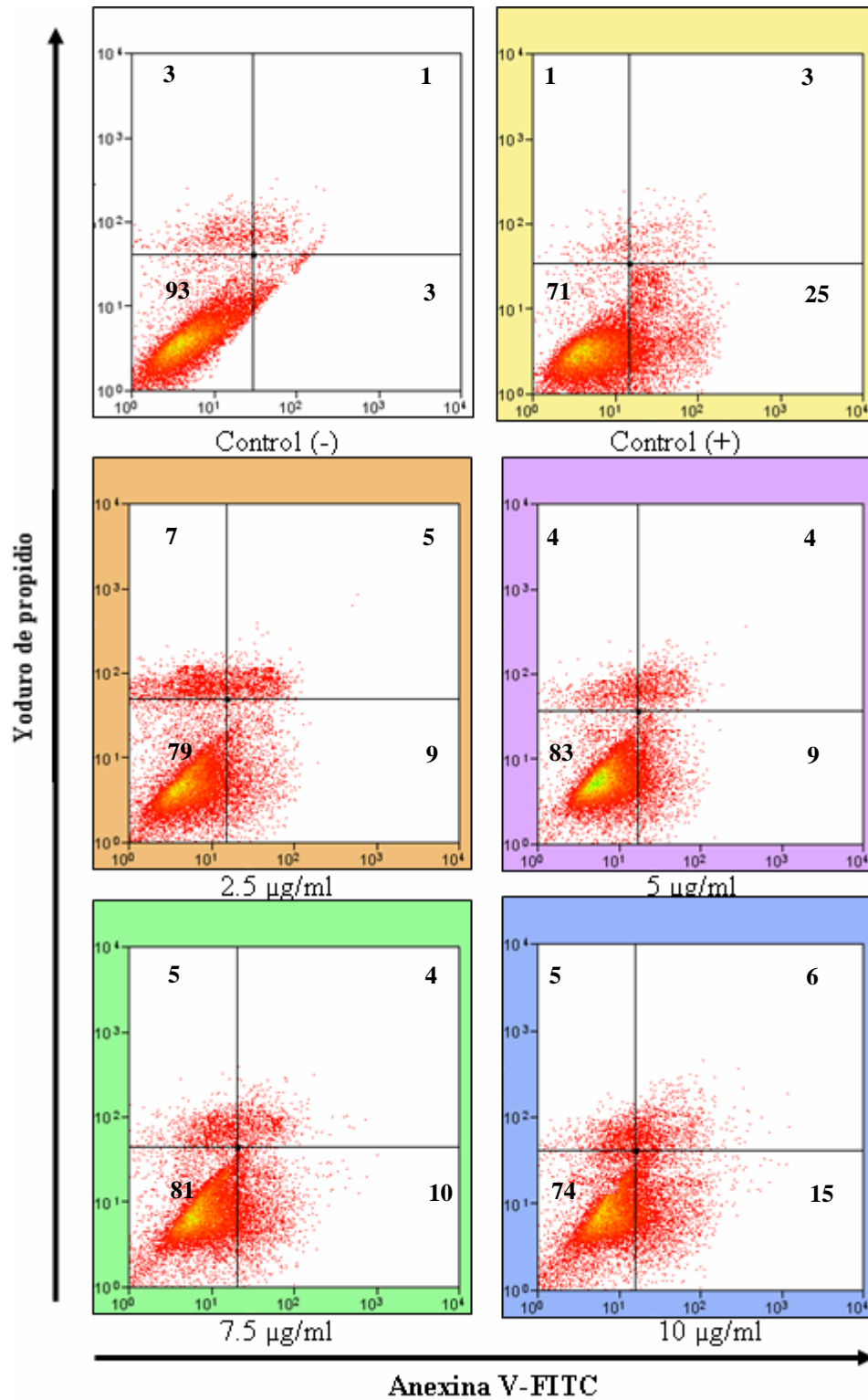


Figura 20. Efecto de las diferentes concentraciones de CAPE en la inducción de apoptosis en células VERO.

Controles de inducción de apoptosis cuantificada por citometría de flujo usando la tinción de anexina V-FITC/Yoduro de propidio. Células JURKAT sin tratamiento, tratadas con 3µM de actinomicina D. Concentraciones de CAPE usadas 2.5, 5, 7.5 y 10 µg/ml disueltas en DMSO 0.1%.

XI.3. Resultados de la prueba de intercambio de cromátidas hermanas

XI.3.1 Ensayo de Genotóxicidad

XI.3.1.1 Frecuencia de ICH

En la Tabla 12 se presentan las frecuencias de ICH por metafase (media \pm desviación estándar) obtenidas en el ensayo de genotóxicidad. Se realizó un control del vehículo que fue DMSO al 0.01%, el cual presentó 2.52 intercambios por metafase muy similar al control negativo que fue de 2.6 intercambios por metafase, lo cual se considera dentro del rango aceptable para las condiciones de este estudio y se tomó como parámetro basal, por tanto fue posible comparar el número de intercambios inducidos por el CAPE. La sustancia mutagénica utilizada como control positivo fue la ifosfamida a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$, dicha sustancia indujo un aumento de 12.3 intercambios por metafase, que es estadísticamente significativo con respecto a los demás tratamientos. En la Tabla 12 se muestra la frecuencia de ICH después de exponer los cultivos a diferentes concentraciones del CAPE. En el gráfico correspondiente (Figura 21) se aprecia como las frecuencias de ICH tienen diferencias estadísticamente significativas con respecto al control positivo evaluado estadísticamente por un análisis de varianza y una prueba de Tukey en donde se obtiene un coeficiente de variación de 2.34 y una F de 1270.17.

Tabla 12. Frecuencia de ICHs inducidos por diferentes concentraciones de CAPE, en cultivo de linfocitos humanos de donador femenino sano.

Tratamiento	X de ICH \pm Desviación estándar	
Control positivo	12.3	\pm 0.11
Control negativo	*2.6	\pm 0.11
Control del vehículo	*2.52	\pm 0.2
2.5 $\mu\text{g/ml}$ de CAPE	*2.8	\pm 0.11
5 $\mu\text{g/ml}$ de CAPE	*3.24	\pm 0.06
7.5 $\mu\text{g/ml}$ de CAPE	*3.5	\pm 0.03
10 $\mu\text{g/ml}$ de CAPE	*3.8	\pm 0.0

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control positivo, ANOVA, Tukey's $\alpha = 0.05$

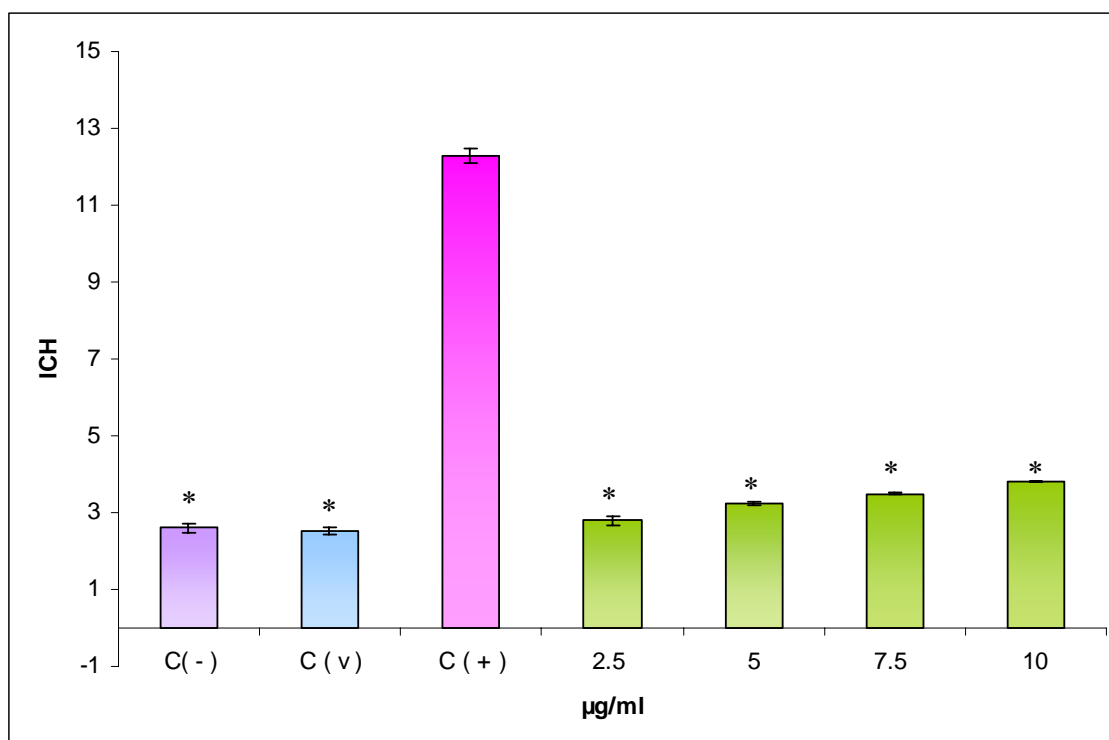


Figura 21. **Frecuencia de ICH en los diferentes tratamientos con CAPE.**

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control positivo, ANOVA, Tukey's $\alpha = 0.05$

XI.3.1.2 Índice Mitótico

La determinación del índice mitótico señala la capacidad de división celular, en la cual una célula madre origina a dos células hijas. Como se muestra en la Tabla 13 el índice mitótico \pm desviación estándar y en su respectivo gráfico (Figura 22) hay diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo para las concentraciones de 7.5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ de CAPE determinado por un análisis de varianza (ANOVA) en donde se obtuvo una F de 23.742 y una prueba de Toker - Kramer de comparación múltiple con una $P < 0.0001$

Tabla 13. **Índice Mitótico observado en cultivos de linfocitos humanos.** Sometidos a diferentes concentraciones de CAPE.

Tratamiento	I.M. \pm Desviación estándar
Control positivo	*16 \pm 1.414
Control negativo	30.5 \pm 0.7071
Control del vehículo	31.5 \pm 2.121
2.5 $\mu\text{g/ml}$ de CAPE	28 \pm 1.414
5 $\mu\text{g/ml}$ de CAPE	26.5 \pm 2.121
7.5 $\mu\text{g/ml}$ de CAPE	*25 \pm 0.0
10 $\mu\text{g/ml}$ de CAPE	*22.5 \pm 0.7071

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo, ANOVA, Toker-Kramer $P < 0.0001$.

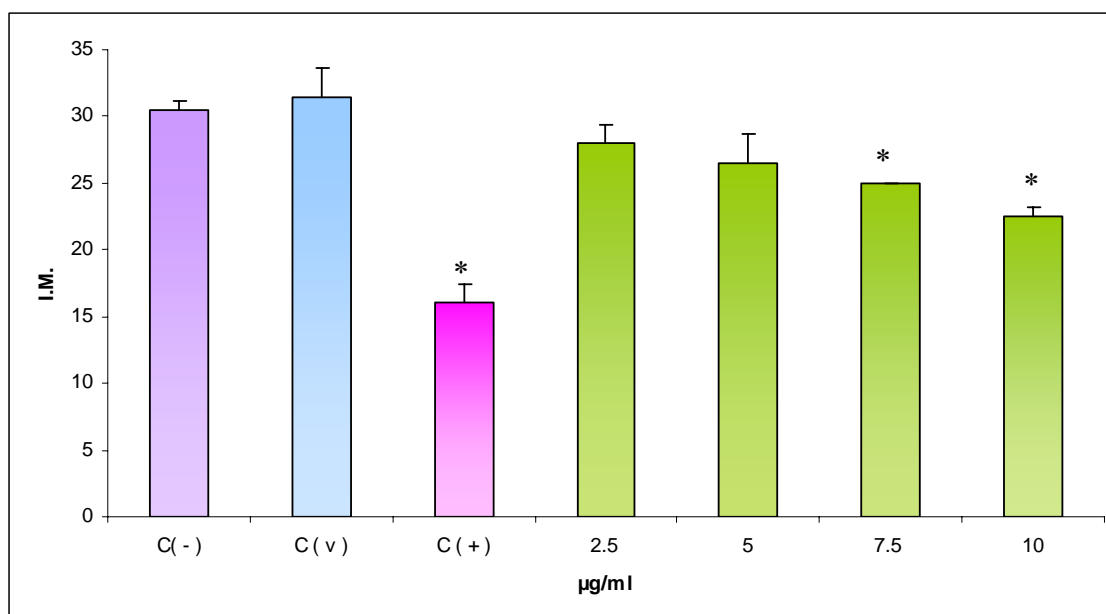


Figura 22. **Índice Mitótico de los diferentes tratamientos con CAPE.**

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo, ANOVA, Toker-Kramer $P < 0.0001$.

XI.3.1.3 Cinética de proliferación celular: índice de replicación

La cinética de proliferación celular se refiere al comportamiento de las poblaciones celulares que están en división y de esta forma nos permitió evaluar el impacto del CAPE sobre el ciclo celular. Los resultados se muestran en la Tabla 14, el análisis estadístico que se realizó a este parámetro fue un análisis de varianza en donde se obtuvo una F de 73.009 y una prueba de Toker - Kramer de comparación múltiple con una $P < 0.0001$.

Tabla 14. **Índice Replicación observado en cultivos de linfocitos humanos.** Sometidos a diferentes concentraciones de CAPE.

Tratamiento	I.R. ± Desviación estándar
Control positivo	*1.465 ± 0.049
Control negativo	1.745 ± 0.0
Control del vehículo	1.680 ± 0.007
2.5 µg/ml de CAPE	*1.640 ± 0.028
5 µg/ml de CAPE	*1.5 ± 0.0
7.5 µg/ml de CAPE	*1.465 ± 0.007
10 µg/ml de CAPE	*1.420 ± 0.028

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo, ANOVA, Toker-Kramer $P < 0.0001$.

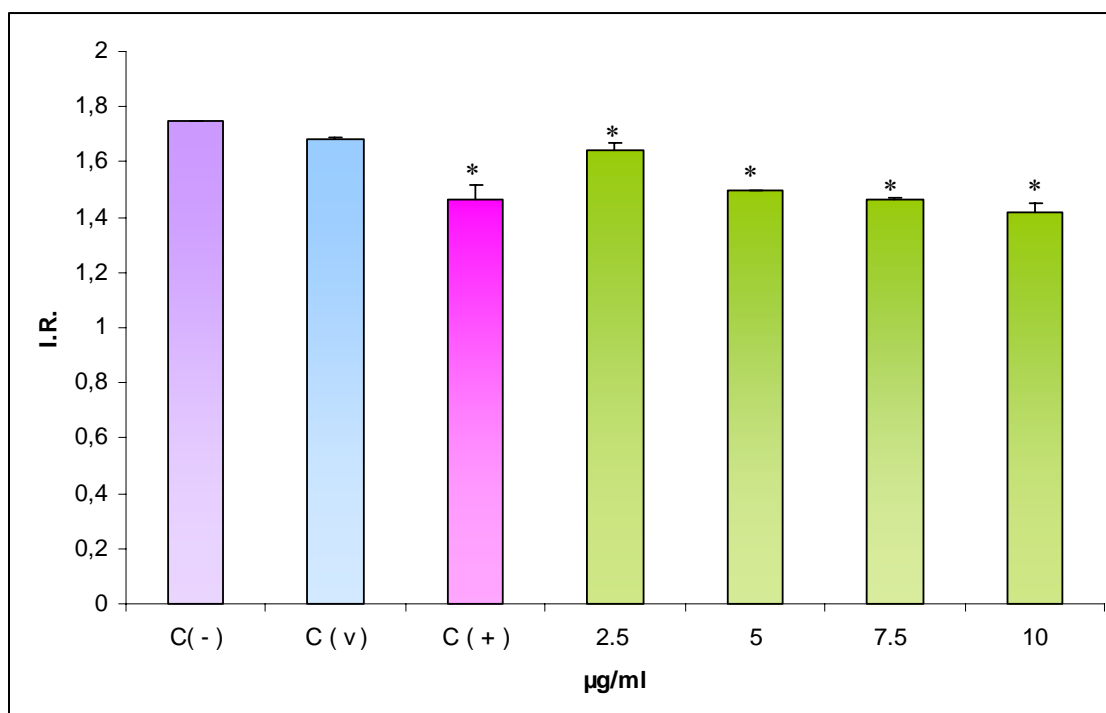


Figura 23. **Índice de Replicación de los diferentes tratamientos con CAPE.**

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo, ANOVA, Tuke-Kramer $P < 0.0001$.

XI.3.2 Ensayo Antigenotóxico

XI.3.2.1 Frecuencia de ICH

Se realizó un ensayo de antigenotoxicidad retando las diferentes concentraciones de CAPE con un mutágeno conocido que fue la ifosfamida a una concentración de 40 µg/ml de cultivo celular. Con este ensayo se determinaron los siguientes parámetros: porcentaje de inhibición de ICH, índice mitótico y la cinética de proliferación determinando el índice de replicación, estos parámetros nos permitieron determinar la actividad antigenotóxica del CAPE.

Para determinar el índice de inhibición que ejerció el CAPE ante el mutágeno ifosfamida se realizó el siguiente cálculo:

$$\text{Índice de inhibición} = 1 - \frac{ICH(\text{tratamiento}) - ICH(\text{control} \cdot \text{negativo})}{ICH(\text{control} \cdot \text{positivo}) - ICH(\text{control} \cdot \text{negativo})} \times 100$$

Los resultados que se obtuvieron para el ensayo de antigenotoxicidad con respecto al número de ICH se muestran en la Tabla 15.

Tabla 15. Frecuencia de ICHs e Índice de inhibición del CAPE retado con ifosfamida

Tratamiento	ICH \pm Desviación estándar	% de Inhibición
Control positivo ifosfamida (40 μ g/ml)	12.3 \pm 0.11	
Control negativo	*2.6 \pm 0.11	
2.5 μ g/ml de CAPE + ifosfamida (40 μ g/ml)	*7,56 \pm 0.17	49
5 μ g/ml de CAPE + ifosfamida (40 μ g/ml)	*6,66 \pm 0.141	58
7.5 μ g/ml de CAPE + ifosfamida (40 μ g/ml)	*5,58 \pm 0.085	69
10 μ g/ml de CAPE + ifosfamida (40 μ g/ml)	*4,4 \pm 0.113	81

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control positivo, ANOVA, Tukey's $\alpha = 0.05$

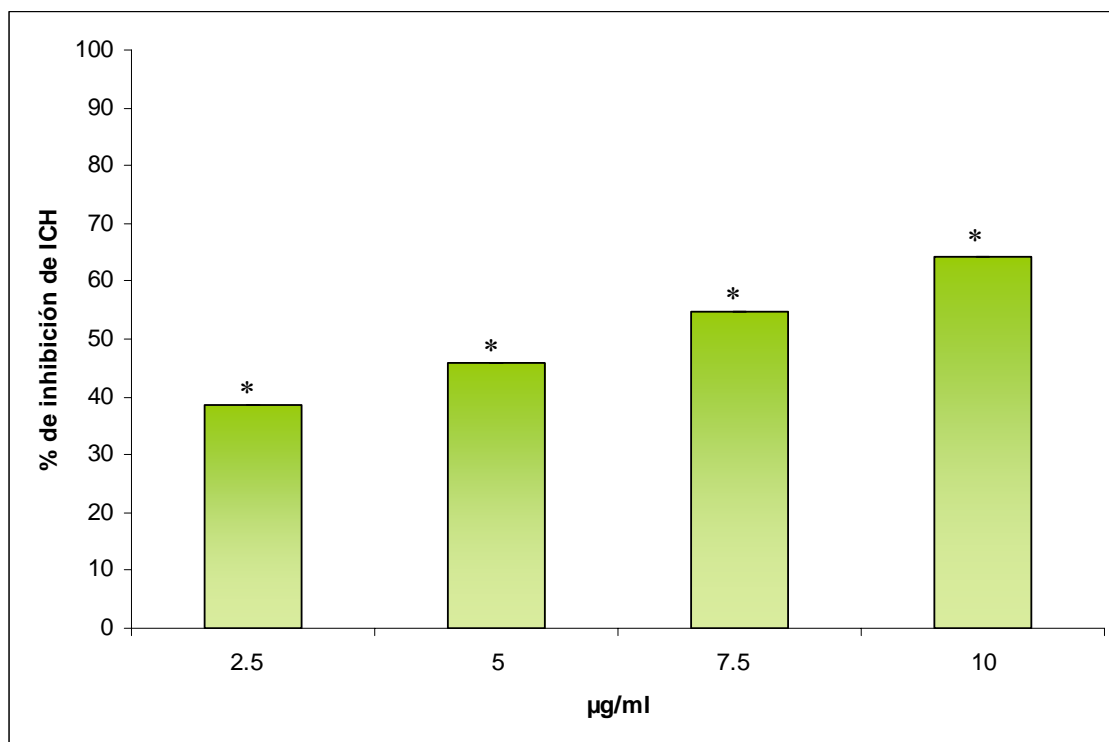


Figura 24. Porcentaje de inhibición de ICH del CAPE retado con ifosfamida

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control positivo, ANOVA, Tukey's $\alpha = 0.05$

XI.3.2.2 Índice Mitótico

Los resultados del índice mitótico del ensayo de antigenotoxicidad del CAPE se muestran en la Tabla 16 y su grafico respectivo (Figura 25). A este parámetro se le realizo un análisis estadístico donde se determino la varianza (ANOVA) en donde se obtuvo una F de 23.742 y una prueba de Toker - Kramer de comparación múltiple con una $P < 0.0001$.

Tabla 16. **Índice Mitótico observado en cultivos de linfocitos humanos sometidos a diferentes concentraciones de CAPE y retados con ifosfamida.**

Tratamiento	I.M. ± Desviación estándar
Control positivo ifosfamida (40µg/ml)	*16 ± 1.414
Control negativo	30.5 ± .07071
2.5 µg/ml de CAPE + ifosfamida (40µg/ml)	*20.5 ± 0.7071
5 µg/ml de CAPE + ifosfamida (40µg/ml)	*23.5 ± 0.7071
7.5 µg/ml de CAPE + ifosfamida (40µg/ml)	27 ± 1.414
10 µg/ml de CAPE + ifosfamida (40µg/ml)	28 ± 1.414

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo, ANOVA, Toker-Kramer $P < 0.0001$.

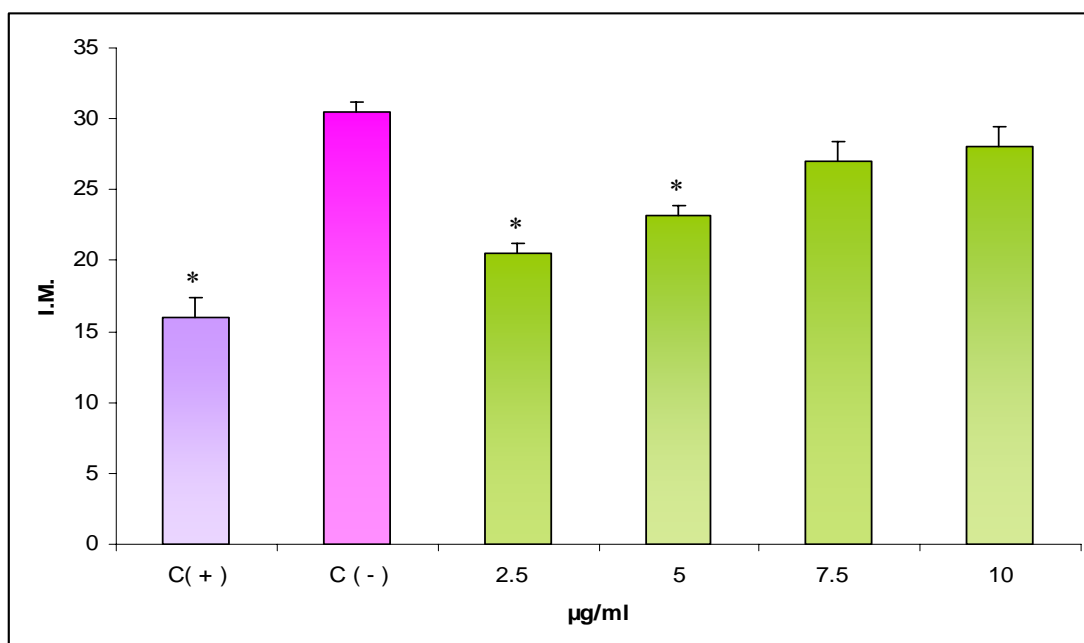


Figura 25. **Índice Mitótico del ensayo de antigenotoxicidad**

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo, ANOVA, Toker-Kramer $P < 0.0001$.

XI.3.2.3 Cinética de proliferación celular: índice de replicación

Los resultados se muestran en la Tabla 17, el análisis estadístico que se realizó a este parámetro fue un análisis de varianza en donde se obtuvo una F de 73.009 y una prueba de Toker - Kramer de comparación múltiple con una $P < 0.0001$.

Tabla 17. Índice Replicación observado en cultivos de linfocitos humanos sometidos a diferentes concentraciones de CAPE y retos con ifosfamida.

Tratamiento	I.R. \pm Desviación estándar
Control positivo	*1.465 \pm 0.049
Control negativo	1.745 \pm 0.0
2.5 $\mu\text{g/ml}$ de CAPE + ifosfamida (40 $\mu\text{g/ml}$)	*1.580 \pm 0.0
5 $\mu\text{g/ml}$ de CAPE + ifosfamida (40 $\mu\text{g/ml}$)	*1.605 \pm 0.007
7.5 $\mu\text{g/ml}$ de CAPE + ifosfamida (40 $\mu\text{g/ml}$)	*1.665 \pm 0.007
10 $\mu\text{g/ml}$ de CAPE + ifosfamida (40 $\mu\text{g/ml}$)	1.770 \pm 0.0

* Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo, ANOVA, Toker-Kramer $P < 0.0001$.

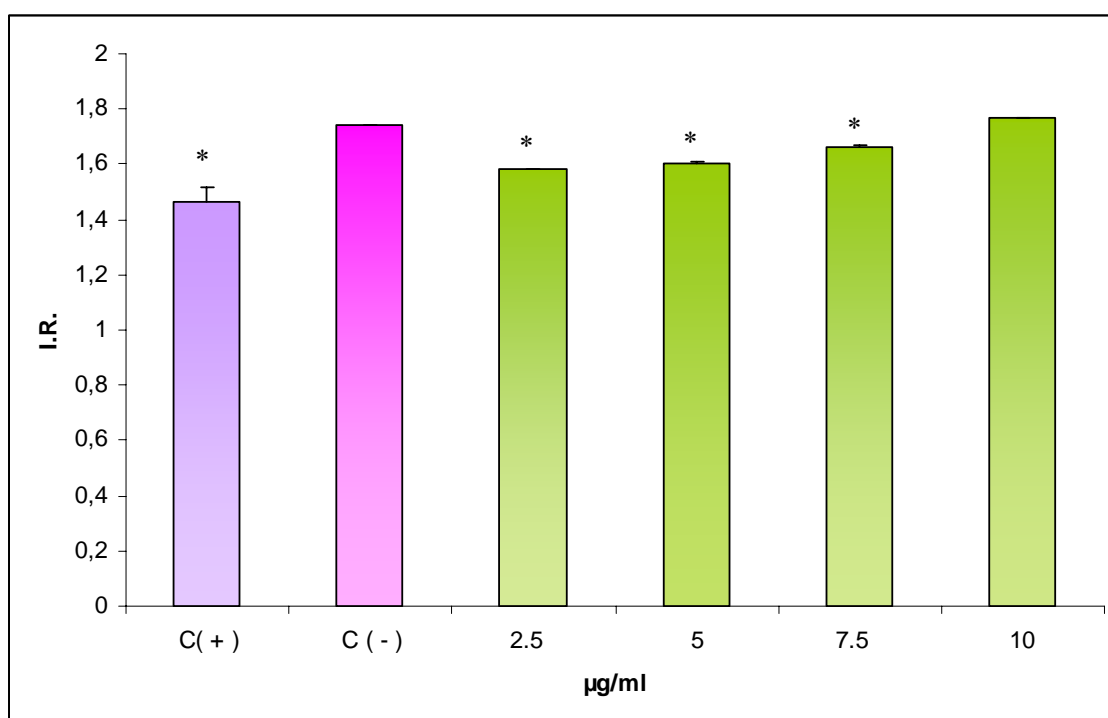


Figura 26. Índice de Replicación del ensayo de antigenotoxicidad
Diferencia estadísticamente significativa con respecto al control negativo, ANOVA, Toker-Kramer $P < 0.0001$.

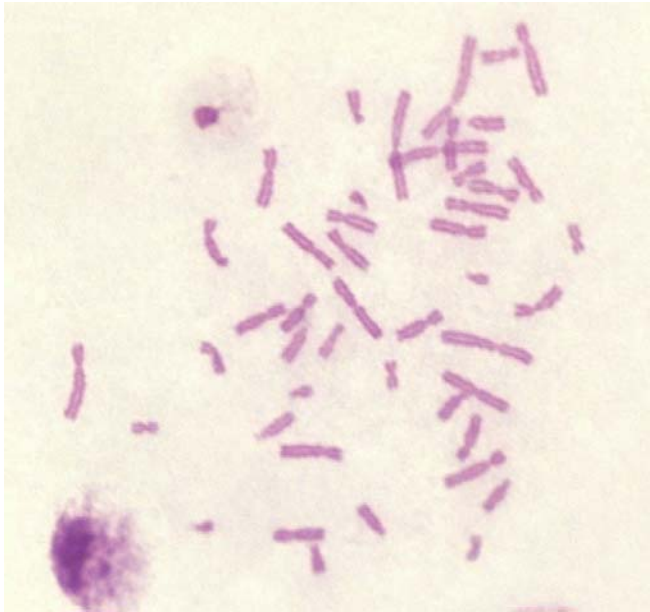


Figura 27. Metafase en primera división
 La tinción diferencial utilizada en la técnica de ICH permite distinguir la metafase en primera división debido a que los cromosomas se encuentran teñidos uniformemente.

Figura 28. Metafase en segunda división
 La tinción diferencial permite distinguir una cromátida teñida y otra no lo que facilita el conteo de ICH. Las flechas indica ICH

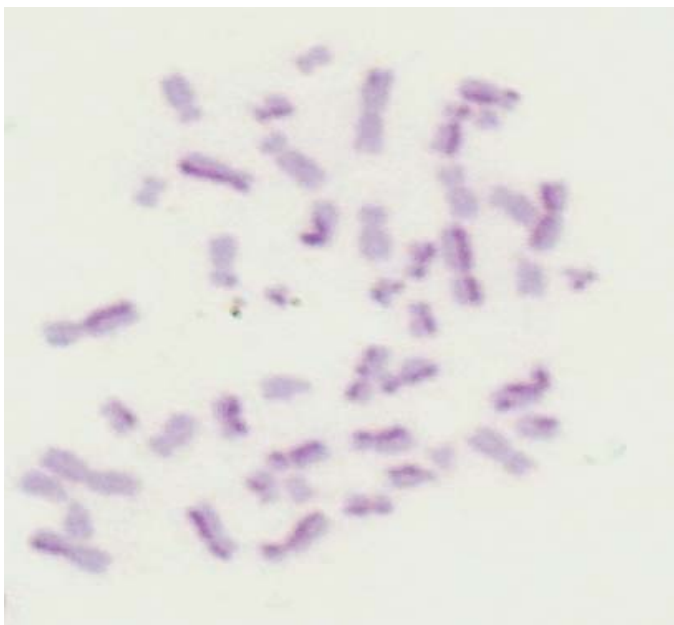
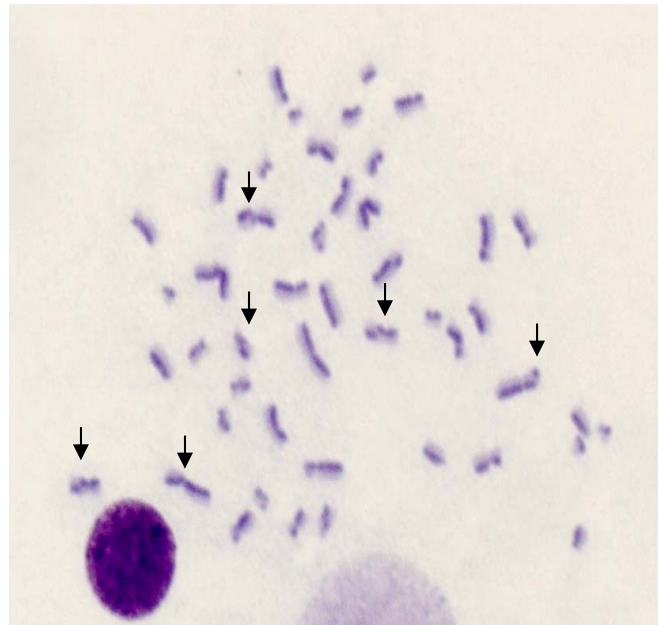


Figura 29. Metafase en tercera división
 En esta metafase se pueden distinguir dos tipos de cromosomas unos totalmente claros y unos con una cromátida clara y otra oscura.

XII. DISCUSIÓN

La naturaleza esencial del cáncer en seres humanos o en animales continúa siendo un reto para los científicos interesados en la biología, prevención y terapia de la enfermedad. Sin embargo, uno de los principales impedimentos del análisis científico de las neoplasias malignas es la escasez de modelos en los cuales las diferentes señales fenotípicas del cáncer pueden ser variables independientemente, debido a la diversidad fenotípica y heterogeneidad de las poblaciones celulares que aparecen en la mayoría de los cánceres (Carrasco-Leglue, 2003). Por esta razón es importante el estudio en diversos modelos tanto *in vivo* como *in vitro* de nuevos antitumorales de origen natural para evidenciar sus propiedades, comprender su mecanismo de acción molecular y así proponer nuevas alternativas para el tratamiento del cáncer.

Nuestro grupo de investigación se ha interesado en la actividad antitumoral que se ha observado del CAPE en estudios *in vivo* que emplean el modelo de hepatocarcinogénesis inducida en rata, suponemos que los efectos que el CAPE es capaz de inducir *in vitro*, podrían ayudar a explicar el mecanismo por el cual este compuesto presenta dicha actividad contra neoplasias. Por esta razón en este trabajo investigamos la posible acción del CAPE en líneas celulares de origen tumoral.

Para elucidar el mecanismo antitumoral del CAPE determinamos el comportamiento de la proliferación celular en las líneas HeLa, VERO, JURKAT y K562 pre-tratadas con CAPE a concentraciones de 2.5, 5, 7.5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ mediante el ensayo de MTT y a continuación se realizaron ensayos de anexina para conocer si esta inhibición de la proliferación tan solo incluía el cese del crecimiento del cultivo o bien al mismo tiempo se encontraba involucrado un mecanismo de muerte celular programada, la apoptosis.

En este primer ensayo, el de MTT, en las cuatro líneas incluídas se observa una inhibición de la proliferación celular, con un efecto dosis dependiente que varía según la línea celular, la concentración y el tiempo de incubación, siendo las células VERO las que presentan un mayor porcentaje de inhibición de la proliferación a las 48 hrs. a la concentración de un 10 $\mu\text{g/ml}$, siendo de un 67% (Figura 14).

Las células VERO son células de riñón de mono verde africano que han sido inmortalizadas lo que significa que aunque no provienen de cáncer, no son células normales sino que su maquinaria celular ha sido alterada, por esta razón se podría explicar el hecho de que el CAPE inhibiera su proliferación celular.

Este trabajo seleccionó el uso de la línea celular VERO, debido a que es una línea se utiliza frecuentemente en estudios de toxicidad y por lo tanto su uso aporta datos acerca de sustancias que pudieran producir efectos citotóxicos o proliferativos observables *in vitro*.

Por otro lado en el laboratorio de micro del PIBIOM-ENMH las células VERO se utilizan de rutina para observar cambios microscópicos a nivel de su citoplasma, inducidos por toxinas, ya que a una confluencia del 70-80% las VERO son células extendidas que permiten la observación de cambios celulares tales como picnosis de los núcleos, retraimiento del citoplasma, vacuolización, etc.

En el caso del presente estudio las VERO permiten obtener resultados a partir de células que no son de origen tumoral, pero que por así decirlo, están en una posición limítrofe entre las células normales y las tumorales y se encontró que su proliferación se ve inhibida por tratamientos con CAPE.

Por otro lado las células HeLa que sí provienen de carcinoma cervical mostraron una inhibición de la proliferación celular de 48% a la concentración de un 10 µg/ml incubando 48 h (Figura 13). La línea celular HeLa es una representante clásica derivada de CACU y por tanto, se incluyó en este estudio para valorar si el CAPE es capaz de ejercer sus efectos antitumorales sobre este tipo de carcinoma. Los resultados sugieren que a concentraciones relativamente altas el CAPE inhibe la proliferación de células tumorales de Cáncer Cervico-Uterino, aunque es necesario incluir en éste tipo de estudio a otras líneas celulares con el mismo origen, para contribuir con mas elementos que apoyen esta tesis.

Por otra parte los resultados de este trabajo, relativos a las células HeLa, correlacionan con los publicados por Orsolich y colaboradores en el 2005, que muestran una inhibición de la proliferación celular en el ensayo de proliferacion con timidina tritiada sobre células HeLa tratadas con CAPE a concentraciones de 6.25, 12.5, y 25 µg/ml. Aunque estos autores midieron el comportamiento de la proliferación, no estudiaron la inducción de muerte celular programada y por tanto no satisficieron la necesidad de conocer si tan solo se inhibe la proliferación celular, o bien intervienen mecanismos de muerte en dicho proceso.

Con lo que respecta al uso de las células JURKAT, éstas provienen de una leucemia aguda de células T y junto con ellas se estudiaron las K562 que provienen de leucemia mieloide crónica. Se incluyeron estas líneas a fin de representar a las células tumorales de origen linfoide, es decir, representan a las células derivadas de leucemia y

sus resultados permitirían proponer la utilidad del CAPE en su tratamiento. Por otra parte las JURKAT son ampliamente usadas en modelos que describen muerte celular, por lo que en las perspectivas de este estudio se podría incluir la exploración del mecanismo de apoptosis inducida por los tratamientos con CAPE.

Estas dos líneas celulares, JURKAT Y K562, mostraron un porcentaje de inhibición de la proliferación celular a una concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ del 43 y 44% respectivamente (Figuras 15 y 16). Un efecto muy similar es el reportado por Chen y colaboradores en 1996 en una línea celular de leucemia aguda (HL-60) se observó que el CAPE a concentraciones de 0.71, 2.8 y 5.6 $\mu\text{g/ml}$ inhibe el crecimiento celular interfiriendo tanto con la síntesis de proteínas como con la síntesis de DNA y RNA, lo que confirma el efecto del CAPE en nuestros estudios sobre líneas celulares de leucemia tratadas. Con base en sus resultados Chen y colaboradores sugieren que el CAPE es capaz de alguna manera de "reconocer" a las células en proliferación, esto podría deberse a la respuesta de sus receptores, por lo tanto estos autores proponen realizar un estudio más a fondo de cómo el CAPE afecta la respuesta ante factores de crecimiento y diversas actividades enzimáticas en células normales y de origen tumoral.

Una vez observada su actividad de inhibición de la proliferación en el ensayo de MTT, la siguiente pregunta fué si esta inhibición se debía a muerte de las células inducida por lisis o necrosis, o bien en otro caso que ocurriera una activación de algún mecanismo de muerte celular programada. Por tanto otro de los objetivos planteados para elucidar el mecanismo de carcinogénesis del CAPE, fue determinar su probable actividad apoptótica, lo cual se realizó mediante ensayos de anexina. En el ensayo de anexina con las células JURKAT se observó inducción de apoptosis hasta del 55% a la concentración mas alta de CAPE empleada (10 $\mu\text{g/ml}$). Otra células empleadas son las células mononucleares de sangre periféricas obtuvo un porcentaje de apoptosis del 65 % a la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$.

Márquez y colaboradores en el 2004 reportan el efecto del CAPE sobre la proliferación y la progresión del ciclo celular en células JURKAT y células mononucleares de sangre periférica, en donde usando el ensayo de timidina tritiada observaron que al tratar a las células con distintas concentraciones de CAPE se aprecia una inhibición de la proliferación, aun en presencia de estimulantes de la proliferación de células T, como la fitohemaglutinina, mientras que la progresión del ciclo celular parece responder a tratamientos con CAPE, impidiendo que la célula pase a la fase de síntesis del ciclo celular.

Las otras líneas tratadas con CAPE y a las que se les evaluó su actividad apoptótica mediante la prueba de anexina, fueron las células HeLa y VERO las cuales presentaron un porcentaje de apoptosis a la concentración de 10 µg/ml de 17 y 21% respectivamente, este efecto es menor al presentado por las células JURKAT y células mononucleares de sangre periférica, lo que posiblemente indica que el efecto de la inhibición de la proliferación celular observado en el ensayo de MTT no se debe directamente a una activación de la apoptosis de la célula sino a otro evento celular que posiblemente tenga que ver con los receptores de la proliferación como lo había sugerido en trabajo antes mencionado de Chen y colaboradores.

Zhao y colaboradores en el 2003 evalúan el efecto *in vitro* del CAPE sobre la proliferación mediante la incorporación de timidina y prolina tritadas y apoptosis en líneas de células hepáticas. Estos autores evaluaron la proliferación a concentraciones de 0.71, 2.8, 5.6 y 11.37 µg/ml en este ensayo reportan un efecto de inhibición de la proliferación que ocurre en forma dosis dependiente y que para la máxima concentración encontraron una inhibición de la proliferación del 38.46%, con esto concluyen que el CAPE es un inhibidor de la proliferación, por esta razón deciden evaluar la apoptosis por medio del ensayo de TUNEL en donde observan que solo a las concentraciones de 5.6 y 11.37 µg/ml se observa apoptosis que va del 5 y 11% respectivamente, estos resultados se asemejan a los porcentajes obtenidos en nuestros ensayos para el control negativo lo que explicaría que la apoptosis depende principalmente de la línea celular ya que Zhao y colaboradores. presentaron su control negativo con apoptosis del 3%.

En el 2005 Wang y colaboradores, en el 2005 evaluaron el efecto del CAPE sobre proliferación y apoptosis *in vitro* en células de cáncer colorectal (HCT116). En esta investigación evalúan la proliferación celular por medio del ensayo de MTT a diferentes tiempos de incubación y a concentraciones de CAPE de 5.36, 6.47, 12.07 y 22.45 µg/ml obteniendo como resultado una inhibición del crecimiento celular de la línea HCT116 dosis y exposición dependiente. A las 48 hrs observaron un porcentaje de inhibición de 48% a la concentración de 12.07 y a las 24 h en esta misma concentración de un 21% aproximadamente.

Para evaluar la apoptosis se utilizó la tinción doble de anexina V y yoduro de propidio en este ensayo los resultados que se obtuvieron fueron de un porcentaje de apoptosis de un 21, 15 y 10 % para las concentraciones de 10, 5 y 2.5 mg/L respectivamente. Wang y colaboradores, también evalúan el efecto del CAPE en el ciclo

celular y encuentra que hay un incremento de células en fase G_0/G_1 y un decremento en la células que se encuentran en fase S de del ciclo celular este efecto es concentración dependiente, con todos estos resultados Wang y colaboradores, concluyen que el CAPE inhibe la proliferación de la células HCT116 así como induce un arresto en el ciclo celular y apoptosis y que estos hallazgos pueden ayudar a explicar algunas de las características del efecto antitumoral del CAPE.

Los resultados que este trabajo proporciona acerca del efecto del CAPE en la inducción de apoptosis son congruentes con los trabajos publicados antes mencionados, ya que en nuestro caso la inducción de apoptosis varió dependiendo la línea celular y la concentración de CAPE empleada. En las células HeLa el porcentaje de apoptosis total que se presenta a la dosis máxima empleada fue del 17%, mientras que para las células VERO fue de 21% a la misma concentración. Por otro lado las células de origen linfocitoide muestran un efecto mayor de apoptosis en esta concentración que fue del 55 y 65% para las células JURKAT y las células mononucleares de sangre periférica respectivamente. Estos resultados sugieren que el CAPE induce muerte celular del tipo de apoptosis en las células que ignoran las señales de crecimiento normal, inclusive de células blancas de sangre periférica, esto indica que al inducirles apoptosis, se previene una excesiva liberación del contenido citoplásmico que ocurriría en el caso de presentarse lisis o necrosis del tumor y que las células de la inflamación se presenten a combatirla, por lo tanto no causaría un shock en el paciente al que se le administre directamente sobre la masa tumoral, como en el modelo de tumor inducido en rata del Dr. Villa-Treviño.

La administración en humanos de toda sustancia, para uso terapéutico involucra un riesgo, mismo que se minimiza al estudiar sus propiedades genotóxicas.

Por lo anterior, otro de los objetivos planteados fue la determinación de la probable actividad genotóxica del CAPE usando la técnica de intercambio de cromátidas hermanas en células nucleadas de individuos sanos, es decir células normales de sangre periférica, este objetivo nos permitió determinar si el CAPE *per se* induce un daño genotóxico a las células. Por otro lado al retar el efecto del CAPE con un mutágeno como la ifosfamida, permitió determinar su acción como antígenotóxico. Para ambos ensayos se determinaron tres parámetros que fueron: el número de ICH, el índice mitótico y el índice de replicación.

Para el ensayo de genotoxicidad se utilizó como control positivo la ifosfamida a una concentración de 40 $\mu\text{g/ml}$, como control negativo se tuvo el cultivo sin

tratamiento. La ifosfamida dio como resultado una frecuencia de ICH de 12.3 por metafase, lo que comprueba lo reportado por Natarajan (Benedict, *et. al.*, 1978, Krishna, *et. al.*, 1986) de que la ifosfamida es un buen inductor de ICH. Para el análisis estadístico de la frecuencia de ICH se realizó un análisis de varianza que dio como resultado un coeficiente de variación de 2.34 y una F de 1270, posteriormente se realizó una prueba de Tukey's usando como variable el número de ICH. Este análisis estadístico mostró que tanto el control negativo como los distintos tratamientos con CAPE presentaron diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control positivo, sin embargo solo la concentración de 2.5 µg/ml de CAPE no mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo, mientras que las tres concentraciones restantes si lo presentaron. De este resultado se podría interpretar que el CAPE no induce un número de ICH tan alto como el control positivo, pero si es suficiente para inducir diferencias estadísticamente significativas en comparación con el control negativo. Para el análisis del índice mitótico se realizó un análisis de varianza (ANOVA) obteniendo una F de 23.742 una $P < 0.0001$, también se realizó una prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, encontrando que existen diferencias estadísticamente significativas contra el control positivo a las concentraciones de 7.5 y 10 µg/ml de CAPE con respecto al control negativo mientras que hay una diferencia estadísticamente significativa de las cuatro concentraciones de CAPE empleadas, con respecto al control positivo. Este resultado nuevamente, sugiere fuertemente que el CAPE *per se* muestra un efecto en el ciclo celular a las concentraciones de 7.5 y 10 µg/ml sin llegar a comportarse como el mutágeno utilizado como control positivo.

Para el último parámetro evaluado en este ensayo, el índice de replicación, se realizó el mismo análisis que con el índice mitótico y los resultados que se obtuvieron fueron los siguientes: primero, en cuanto a los controles, que se observa una diferencia estadísticamente significativa del control positivo con respecto al control negativo y segundo que las cuatro concentraciones de CAPE estudiadas también mostraron diferencias al compararse con el control negativo. Al mismo tiempo, solo la concentración de 2.5 µg/ml de CAPE mostró diferencias estadísticamente significativas con respecto al control positivo.

El índice de replicación nos permitió evaluar el impacto del CAPE sobre el ciclo celular. Los resultados muestran que aparentemente el CAPE no permite que las células transiten de la fase G_0/G_1 a la fase de síntesis, esto se ve reflejado en la disminución de

los índices tanto de replicación como el mitótico. Los resultados de este estudio son consistentes con los antes mencionados de Wang y colaboradores en el 2005.

La importancia del aumento de ICH inducido por el CAPE, se puede explicar mencionando los fundamentos de la prueba de ICH, ya que los ICH se llevan a cabo en la fase G₁ y por lo tanto si el CAPE es capaz de arrestar a las células en esta fase es más probable que se lleven a cabo los mecanismos por los que se producen los ICH. Estos mecanismos no se conocen con precisión, pero se han postulado varias teorías como la que propone que estos se originan en los puntos de replicación que contienen involucradas secuencias genómicas conteniendo altas cantidades de guanina, otros autores proponen que son causados por lesiones discretas al DNA (Latt, 1974; Kato, 1977)

El ensayo de genotoxicidad sugiere que el CAPE *per se* muestra un efecto sobre el cultivo células blancas de sangre periférica aumentando el número de ICH y disminuyendo tanto el índice de replicación como el mitótico, lo que habla de un cierto efecto genotóxico del CAPE. Por esta razón se decidió realizar un ensayo de antigenotoxicidad.

En los ensayos de genotoxicidad, se retó al CAPE con un mutágeno como la ifosfamida, conocido por inducir altas tasas de daño genotóxico, esto es con el fin de determinar si el CAPE presentaría un efecto sinérgico con la ifosfamida aumentando el daño genotóxico producido por esta o por el contrario, sería capaz de disminuir o amortiguar el daño inducido por la ifosfamida.

Para analizar los resultados de esta prueba, se evaluó el índice de inhibición del número de ICH, nuevamente se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación múltiple de Tukey-Kramer, obteniendo como resultados que los tratamientos de CAPE que se retaron con el mutágeno mostraron diferencias estadísticamente significativas con ambos controles tanto positivo como negativo y al hacer el porcentaje de inhibición de ICH se encontró que las cuatro concentraciones de CAPE mostraron un porcentaje de inhibición que fue dosis dependiente partiendo de 39% para la concentración de 2.5 µg/ml y 46, 55 y 64% para las concentraciones de 5, 7.5 y 10 µg/ml respectivamente. Estos resultados fuertemente sugieren que el CAPE no mostró un efecto aditivo o sinérgico con la ifosfamida sino que por el contrario, al parecer revirtió su efecto. El hecho de que a pesar de la disminución en el número de ICH se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control

negativo esto se deben al efecto *per se* del CAPE, sin embargo el número de ICH no es lo suficientemente alto para considerarlo deletéreo.

En cuanto al índice mitótico evaluado en el ensayo de antigenotoxicidad se encontró que el control positivo y las concentraciones de CAPE de 2.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ mostraron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control negativo. Esto indica que el CAPE a las concentraciones de 7.5 y 10 $\mu\text{g/ml}$ aparentemente consigue contrarrestar el efecto de la ifosfamida, manteniendo sus valores de índice mitótico, sin diferencias significativas del índice mitótico con el control negativo, mientras que las concentraciones de 2.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$ no fueron suficientes para abatir el efecto citotóxico de la ifosfamida, siendo la concentración de 2.5 $\mu\text{g/ml}$ la única que no mostró diferencias con el control positivo.

Finalmente en el ensayo para determinar el índice de replicación, se obtuvo como resultado diferencias significativas con respecto al control negativo al tratar las células con concentraciones de CAPE de 2.5, 5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$, siendo la concentración de 10 $\mu\text{g/ml}$ la única que aparentemente logró abatir el efecto del mutágeno, sin embargo el índice de replicación no disminuyó ni en las concentraciones de 2.5, 5 y 7.5 $\mu\text{g/ml}$ ni tampoco en el control positivo lo que apoya fuertemente que el CAPE presenta un efecto protector contra el mutágeno.

Los resultados anteriores confirman lo publicado por el Dr. Villa-Treviño en donde al usar un mutágeno que induce tumores en el modelo *in vivo* y realizar tratamientos con este muestra un efecto antigenotóxico, por lo tanto el resultado obtenido en este trabajo es consistente con los resultados obtenidos en el modelo *in vivo* de hepatocarcinogénesis.

Con los datos obtenidos de los ensayos de genotoxicidad y antigenotoxicidad podemos sugerir que a concentraciones tan pequeñas como 2.5 y 5 $\mu\text{g/ml}$, el CAPE se comporta como un agente quimioprotector, cuyo uso terapéutico podría sugerirse tanto al inicio como durante el proceso carcinogénico.

A concentraciones mayores como las empleadas aquí, el CAPE se podría utilizar a otros niveles del proceso de carcinogénesis. Debido a que mostró no ser un agente genotóxico con efectos aditivos potencialmente deletéreos, probablemente sería útil como profiláctico para intentar reducir el riesgo de recurrencia de cáncer, administrándose como tratamiento subsecuente a la extirpación quirúrgica de tumores sólidos o bien luego de un trasplante de médula ósea en el caso de las leucemias.

Los resultados de esta investigación apoyan fuertemente que el CAPE posee características que permiten sugerir su uso terapéutico como antitumoral, ya que mostró inhibir la proliferación celular de las líneas inmortalizadas y las transformadas de origen tumoral, así también mostró inducción de apoptosis de estas mismas.

En los ensayos de este trabajo el CAPE presentó actividad anti-genotóxica al retarlo con un mutágeno y evidenció que no posee un efecto genotóxico suficiente como para considerarse deletéreo, lo que sugiere que es posible usarse como un quimioprotector. Por otra parte este trabajo presenta algunos resultados alentadores que permiten suponer que es necesario continuar con esta línea de investigación para contribuir en la elucidación del mecanismo molecular por el cual el CAPE ejerce su actividad.

Obviamente es necesario continuar estudiando la correlación de los resultados de los modelos tanto *in vitro* como *in vivo* para determinar el mecanismo molecular por el cual el CAPE es capaz de inducir protección antitumoral y de esta forma poder implementar su uso de una forma segura en el tratamiento contra varios tipos de cáncer.

XIII. CONCLUSIONES

El CAPE inhibió la proliferación celular en las líneas transformadas (HeLa, JURKAT y K562) e inmortalizada (VERO) de forma dosis dependiente, lo que sugiere que podría estar actuando sobre aquellas células que presentan proliferación descontrolada.

En las líneas celulares (HeLa, JURKAT y células mononucleares de sangre periférica) tratadas con CAPE se indujo apoptosis de manera dosis dependiente, lo que permite sugerir que su uso, aplicándolo directamente sobre tumor en modelos *in vivo* previene la necrosis de las células, evitando desencadenar un proceso inflamatorio indeseable.

Las actividades pro-apoptótica e inhibidora de la proliferación que en los experimentos de este trabajo muestra el CAPE, podrían interpretarse como cualidades especialmente útiles para aquellas células tumorales que aún presentan intactas las vías normales de apoptosis, ya que no solo inducen la muerte celular programada, sino que también desaceleran su proliferación.

Se sugiere que el efecto genotóxico presentado por el CAPE al ser evaluado a través de la técnica de Intercambio de Cromátidas Hermanas, puede ser considerado no deletéreo, porque en su magnitud no es comparable con el control positivo (ifosfamida); por el contrario, permite proponer que esta sustancia interviene probablemente a nivel de los mecanismos que dan lugar a la ocurrencia de dichos intercambios en el material cromosomal.

Se observó que el CAPE posee un efecto inhibitorio en los índices de replicación y mitótico evaluados a través de la técnica de Intercambio de Cromátidas Hermanas.

El CAPE mostró un efecto antígenotóxico al retar su actividad contra un mutágeno (ifosfamida) disminuyendo el número de ICH y aumentando los índices de replicación y mitótico evaluados a través de la técnica de Intercambio de Cromátidas Hermanas.

XIV. PERSPECTIVAS

Los resultados de este estudio apoyan otros trabajos *in vivo* afirmando que el CAPE podría ser un buen agente antitumoral, debido a que presentó varios efectos que indican a qué nivel podría estar actuando. Presentó efecto de inhibición de la proliferación celular e inducción de apoptosis en las líneas celulares sometidas a tratamiento. Sin embargo es necesario seguir investigando el efecto del CAPE en modelos *in vitro* para de esta manera contribuir a explicar mejor su mecanismo de acción.

Para continuar con esta línea de investigación es necesario considerar una serie de experimentos en donde se evalúe la proliferación celular empleando un rango más alto de concentraciones, así como diferentes tiempos de exposición. Sería apropiado sugerir el uso de otras líneas celulares de cáncer cervical con características complementarias, a fin de apoyar con mayor fuerza las conclusiones de este trabajo. El empleo de métodos con mayor sensibilidad para estudiar los mismos fenómenos, (ensayo de carboxifluoresceína, incorporación de timidina tritiada en el caso de inhibición de la proliferación) permitiría mejorar la calidad de los reportes para publicación.

En cuanto a los resultados del proceso de apoptosis, del cual el CAPE mostró ser inductor, sería útil corroborarlo con una técnica como la de TUNEL, que evidencia eventos finales de este fenómeno.

Una vez que se obtengan estos resultados un siguiente paso sería determinar la vía por la cual se induce la apoptosis, si es por medio de la vía extrínseca o intrínseca, esto se podría evaluar mediante el uso de inhibidores de caspasas.

Empleando líneas celulares resistentes a apoptosis sería posible evaluar la capacidad del CAPE de inhibir la proliferación celular.

Todos estos experimentos permitirían realizar una mejor descripción del mecanismo que da lugar a la actividad antitumoral del CAPE, para de esta manera apoyar su posible uso como sustancia de origen natural, segura, con utilidad en el tratamiento y en la prevención de los cánceres de los cuales se originan los modelos celulares estudiados aquí.

XV. BIBLIOGRAFIA

- Adams Jerry M. 2003. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes & Development*. **17**:2481–2495
- Beltrán Ramírez Olga. 2005. Mecanismo de quimiprevención del CAPE: alteración de los CYP450. Tesis de maestría. Biología celular. CINVESTAV
- Benedict William F., 1978. Ashutosh Banerjee, and Natarajan Venkatesan. Cyclophosphamide-induced Oncogenic Transformation, Chromosomal Breakage, and Sister Chromatid Exchange following Microsomal Activation. *Cancer Research*. **38**, 2922-2924
- Bielas J.H., Loeb K.L., Rubin B. P., True L., and Loeb L. 2006. Human cancers express a mutator phenotype. *PNAS*. **103**: 18238–18242
- Budd Ralph C. 1992. Death receptors couple to both cell proliferation and apoptosis. *The Journal of Clinical Investigation*. **109**:437-441
- Carew J.S. and Huang P. 2002. Mitochondrial defects in cancer. *Molecular Cancer*. **1**:9
- Carrasco-Legleu C E, Martínez-Rosado L, Fattel-Fazeda S, Arce-Popoca E, Pérez-Carrón JI. 2004. Chemoprotective effect of caffeic acid phenethyl ester on promotion in a médium-term rat hepatocarcinogenesis assay. *Int. J. Cancer*. **108**:488-492
- Carrasco-Legleu CE. 2003. Efecto protector del éster fenetílico del ácido caféico *in vivo* e *in vitro* en hepatocitos de rata Wistar tratados con carcinógenos. Tesis de maestría. Biología celular. CINVESTAV
- Chen Jian-Hong , Yu Shaoa,b, MowTuan Huang, Chee-Kok Chinb, Chi-Tang Hoa. 1996. Inhibitory effect of caffeic acid phenethyl ester on human leukemia HL-60 cells. *Cancer Letters*. **108** (1996) 211-214
- Cohen Gerald M. 1997. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J*. **326**: 1-16
- Cooper G. Oncogenes. *Jones and Bartlett Publishers*, 1995.
- Durk E. 1997. The Ability of bee products to modulate human immune system. Eight International *Symposium on trends in Biomedicine in Finland: allergy, oxidants and antioxidants, and human health*
- Elmore Susan. 2007. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol*. **35**(4): 495–516

- Farré R, Frassetto I, Sánchez A. 2004. Propolis and human health. *Ars Pharmaceutica*, **45**: 21-43
- Fukuda S. and Pelus L. M. 2006. Survivin, a cancer target with an emerging role in normal adult tissues. *Mol Cancer Ther.* **5**:1087-1098
- Garrett Michelle D.2001. Cell cycle control and cancer. *Current Science.* **81**:515-522
- Gibbs Jackson B. 2000. Mechanism-Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research. *Science.* **287**(5460):1969 – 1973
- Gottlieb Roberta A.2000. Mitochondria: execution central. *FEBS Letters.* **482**:6-12
- Gray C., Ward R., Karran E., Turconi S., Rowles A., Viglienghi D., Southan C., Barton A., Fantom H., West A., Savopoulos J., Hassan N.,Clinkenbeard H.,Hanning C., Amegadzie B., Davis J., Dingwall C., Liv G. and Creasy C. 2000. Characterization of human HtrA2, a novel serine protease involved in the mammalian cellular stress response. *Eur. J. Biochem.* **267**, 5699-5710
- Green Douglas R.1998. Apoptotic Pathways: Ten Minutes to Dead. *Cell*, 121: 671–674
- Green Douglas R.1998. Apoptotic Pathways: The Roads to Ruin. *Cell*, **94**:695–698
- Hanahan D. and Weinberg R.A. 2000. The Hallmarks of Cancer. *Cell.* **100**:57–70.
- Hsing-Chun K., Wu-Hsien K., Yean-Jang L. , Chau-Jong W, Tsui-Hwa T. 2006. Enhancement of caffeic acid phenethyl ester on all-trans retinoic acid-induced differentiation in human leukemia HL-60 cells. *Toxicology and Applied Pharmacology.***216** :80–88
- Ishihara Y. and Shimamoto N. 2006. Involvement of Endonuclease G in Nucleosomal DNA Fragmentation under Sustained Endogenous Oxidative Stress. *The Journal Of Biological Chemistry.* **281**: 6726–6733
- Jordán Joaquín. 2003. Apoptosis: muerte celular programada. *OFFARM.* **22**:100-106
- Kanduc D.,Mittelman A., Serpico R., Sinigaglia E., Sinha A., Natale C., Santacroce R., Di Corcia M., Lucchese A., Dini L., Pani P., Santacroce S., Simone S., Bucci R., and Farber E. 2002. Cell death: Apoptosis versus necrosis (Review). *International Journal Of Oncology.* **21**: 165-170

- Kato H. 1977. Mechanisms for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. *Chromosoma*. **59**: 179-191
- Knudson Alfred G.1993. Antioncogenes and human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**: 10914-10921
- Krell R.1996. Value-added products from beekeeping. FAO Agricultural Services Bulletin N°. 124. Rome.
- Krishna, J. Nath, and T. Ong. 1986. Inhibition of Cyclophosphamide and Mitomycin C-induced Sister Chromatid Exchanges in Mice by Vitamin C. *Cancer Research* **46**, 2670-2674
- Kuklinsk, C. 2000. Farmacognosia. Ed. Omega, Barcelona, España. 371-379
- Latt Samuel A. 1974. Sister Chromatid Exchanges, Indices of Human Chromosome Damage and Repair: Detection by Fluorescence and Induction by Mitomycin C. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. **71**(8): 3162-3166
- Lengauer C., Kinzler KW. Vogelstein B.1998. Genetic instabilities in human cancers. *Nature*.**17**; 396(6712):643-9.
- Li H., Bergeron L., Cryns V., Pasternack M., Zhu H., Shi L., Greenberg A., and Yuan J. 1997. Activation of Caspase-2 in Apoptosis. *The Journal Of Biological Chemistry*. **272**: 21010–21017
- Mannick J., Schonhoff C., Papeta N., Ghafourifar P., Szibor M., Fang K. and Gaston B. 2001. S-Nitrosylation of mitochondrial caspases. *The Journal of Cell Biology*. **154**:1111-1116
- Marshall W.A., Reynolds S., You M. and Maronpot R. 2002 Role of Protooncogene Activation in Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*. **98**:13-24
- Martínez MT, García F, Hernández MJ, Manzanera Saura JT, Garrigós JA. Los citostáticos. *Enfermería Global* n.º 1; 2002
- McMahon Gerald. 1994. The Genetics of Human Cancer: Implications for Ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*. **102**:75-80
- Morales-Ramírez, P. 1988. El daño a la información genética y los intercambios entre cromátides hermanas. *Ciencia y desarrollo*.**81**: 65-72.
- Munnes M., Patrone G., Schmitz B., Romeo G. and Doer W. 1998. A 5'-CG 3'-rich region in the promoter of the transcriptionally frequently silenced RET protooncogene lacks methylated cytidine residues. *Oncogene*. **17**: 2573 – 2583
- Nagata Shigekazu. 1997. Apoptosis by Death Factor. *Cell*, **88**:355–365

- Natarajan K., Singh S., Burke T., Grunbergert D., And Aggarwal B. 1996. Caffeic acid phenethyl ester is a potent and specific inhibitor of activation of nuclear transcription factor NF- κ B. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**: 9090-9095
- Nguyen N., Millar D., Yong V.W., Korsmeyer S.J. and Shores G.C. 1993. Targeting of Bcl-2 to the Mitochondrial Outer Membrane by a COOH-terminal Signal Anchor Sequence. *The Journal Of Biological Chemistry.* **268**: 25265-25268
- Nieves Márquez, Rocío Sancho, Antonio Macho, Marco A. Calzado, Bernd L. Fiebich, and Eduardo Muñoz. 2004. Caffeic Acid Phenethyl Ester Inhibits T-Cell Activation by Targeting Both Nuclear Factor of Activated T-Cells and NF- κ B Transcription Factors. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics.* **308**(3):993-1001
- Orsolich N., Terzic S., Mihaljevic Z., Sver L., And Basic I.. 2005. Effects of Local Administration of Propolis and Its Polyphenolic Compounds on Tumor Formation and Growth. *Biol. Pharm. Bull.* **28**(10) :1928—1933
- Roberts D., Merrison W., MacFarlane M, and Cohen G. 2001. The Inhibitor of Apoptosis Protein-binding Domain of Smac Is Not Essential for its Proapoptotic Activity. *The Journal of Cell Biology.* **153**: 221–227
- Royds J., and Lacopetta B. 2006. p53 and disease: when the guardian angel fails. *Cell Death and Differentiation.* **13**: 1017–1026
- Salvesen Guy S. 2002. Caspases: opening the boxes and interpreting the arrows. *Cell Death and Differentiation.* **9**: 3- 5
- Sandal T. 2007. Molecular Aspects of the Mammalian Cell Cycle and Cancer. *The Oncologist.* **7**:73-81
- Schulze-Osthoff K., Ferrari D., Los M., Wesselborg S. and Peter M. 1998. Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* **254**: 4392459
- Sherr Charles J. 2000. The Pezcoller Lecture: Cancer Cell Cycles Revisited. *Cancer Research.* **60**:3689–3695.
- Sherr Charles J. 2004. Principles of Tumor Suppression. *Cell*, **116**: 235–246
- Shi Yigong. 2004. Caspase activation, inhibition, and reactivation: A mechanistic view. *Protein Science.* **13**:1979–1987.
- Srinivasula S., Ahmad M., MacFarlane M., Luo Z., Huang Z., Fernandes-Alnemri T., and Alnemri E. 1998. Generation of Constitutively Active

- Recombinant Caspases-3 and -6 by Rearrangement of Their Subunits. *The Journal Of Biological Chemistry*. **273**: 10107–10111
- Sugimura T., Terada M., Yolota J., Hirohashi S. and Wakabayashi K. 1992. Multiple Genetic Alterations in Human Carcinogenesis. *Environmental Health Perspectives*. **98**: 5-12.
 - Susin S., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Costantini P., Ferri K., Irinopoulou T., Prévost M-C., Brothers G., Mak T., Penninger J., Earnshaw W. and Kroemer G. 2002. Two Distinct Pathways Leading to Nuclear Apoptosis. *J. Exp. Med.* **192**: 571–579
 - Vogelstein B, Kinzler KW. The Genetic Basis of Human Cancer. McGraw-Hill: 1998.
 - Wang D., Xiang D-B., He Y-J., Li Z-P., Wu X-H., Mou J-H, Xiao H-L., Zhang Q-J. 2005. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of colorectal cancer cells in vitro. *World J Gastroenterol* . **11**(26):4008-4012
 - Weinberg Robert A. 1996. How Cancer Arises. *Scientific American*. 62-67
 - Wen-Xing Zhao, Jing Zhao, Chong-Li Liang, Bing Zhao, Rong-Qing Pang, Xing-Hua Pan. 2003. Effect of caffeic acid phenethyl ester on proliferation and apoptosis of hepatic stellate cells in vitro. *World J Gastroenterol*. **9**(6):1278-1281
 - Wickremasinghe Gitendra and Hoffbrand A. Victor. 1999. Biochemical and Genetic Control of Apoptosis: Relevance to Normal Hematopoiesis and Hematological Malignancies. *Blood*. **93**(11): 3587-3600
 - Wolf B. And Green D.R. 1999. Suicidal Tendencies: Apoptotic Cell Death by Caspase Family Proteinases. *The Journal Of Biological Chemistry*. **274**: 20049 – 20052
 - Yokota J. and Sugimura T. 1993. Multiple steps in carcinogenesis involving alterations of multiple tumor suppressor genes. *The FASEB Journal*. **7**: 920-925
 - Zhang A., Helen Y., David L. Yew T. 2004. Apoptosis – A Brief Review. *Neuroembryology*. **3**:47–59.