

201
123



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**“ESTUDIOS CITOTOXICOS “in vitro” DE ALGUNOS
DERIVADOS DE PLANTAS DE LA FAMILIA DE
LAS COMPUESTAS CON PROBABLE ACTIVIDAD
ANTICANCERIGENA”**

T E S I S

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

Julieta Patricia Tello Alfonso



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

| CAPITULO | PAG. |
|---|------|
| RESUMEN | 1 |
| I. INTRODUCCION | 3 |
| II. GENERALIDADES | 8 |
| 1. Origen y Mecanismos de carcinogénesis | 8 |
| 2. Diferencias celulares | 11 |
| 2.1. Mitochondria | 12 |
| 2.2. Núcleo | 12 |
| 2.3. Retículo endoplásmico | 13 |
| 2.4. Membranas | 13 |
| 2.4.1. Disminución de la cohesión | 14 |
| 2.4.2. Pérdida de inhibición al contacto | 14 |
| 2.4.3. Motilidad "in vitro" | 15 |
| 2.4.4. Guía de contacto | 15 |
| 2.4.5. Elaboración de enzimas y otros productos | 15 |
| 2.4.6. Capacidad de trasplante | 16 |
| 3. Tratamiento del cáncer | 18 |
| 3.1. Cirugía | 19 |
| 3.2. Radioterapia | 20 |
| 3.3. Inmunoterapia | 21 |
| 3.4. Quimioterapia | 22 |

| | |
|--|----|
| 4. Plantas con efectos antitumorales | 24 |
| 4.1. Sesquiterpenlactonas | 25 |
| III. OBJETIVO | 29 |
| IV. MATERIAL Y METODOS | 30 |
| 1. Material biológico | 30 |
| 1.1. Línea HEP 2C | 30 |
| 1.2. Línea L 929 | 31 |
| 2. Sustancias químicas | 31 |
| 2.1. CHE + P | 31 |
| 2.2. CHE - P | 33 |
| 2.3. 17-18 Dihidroviquirepinina | 34 |
| 3. Metodología | 36 |
| 3.1. Preparación de dosis | 37 |
| 3.2. Análisis de exclusión o % de viabilidad | 38 |
| 3.3. Conteo celular | 38 |
| 3.4. Análisis morfológico | 39 |
| 3.5. Análisis estadístico | 39 |
| V. RESULTADOS Y TABLAS | 40 |
| VI. DISCUSION | 53 |
| VII. CONCLUSIONES | 61 |
| IX. APENDICES | 62 |
| I. Medios y reactivos | 62 |
| 1. Medio Basal de Eagle | 62 |
| 2. Propilen glicol | 63 |

| | |
|---|----|
| 3. Azul de tripán | 63 |
| 3.1. Solución amortiguadora de fosfatos 0.2 M | 63 |
| 4. Solución de tripsina 0.25 % | 64 |
| 4.1. Solución P.D. (1X)CONC. | 64 |
| 5. Solución salina 0.9 % | 65 |
| II. Tinción de Jacobson | 66 |
| 1. Preparación de colorantes | 66 |
| 1.1. May Grunwald | 66 |
| 1.2. Giemsa | 66 |
| 1.3. Tincion de Jacobson | 67 |
| III. Formulario estadístico | 68 |
| IV. Tabla de abreviaturas | 71 |
| X. OBRAS CONSULTADAS | 72 |

RESUMEN.

En el presente trabajo se probaron tres lactonas-sesquiterpénicas: la 8 α - hidroxil dehidrocoston (CHE + P) la 8 α - tigloil dehidrocoston (CHE - P) y la 17-18 dihidroviguiepinina. Las cuales fueron extraídas de plantas de la familia de las compuestas, y que por sus características químicas y bioquímicas se les atribuye una probable actividad anticancerígena; para determinarlo se probaron dichos fármacos a diferentes dosis en un sistema "in vitro" y en condiciones previamente establecidas, en dos líneas celulares, una de origen "normal" (L 929) que es una línea de fibroblastos derivados de tejido conectivo murino y otra de origen neoplásico (HEP 2C) proveniente de un carcinoma epidérmico laríngeo humano; todo esto con el fin de determinar sus Dosis Efectivas Medias, que es aquella que inhibe el 50% del crecimiento celular. También se realizaron comparaciones de los efectos en ambas líneas.

Los datos obtenidos experimentalmente se sometieron a pruebas estadísticas para calcular su significancia estadística. De aquí se determinó que la lactona CHE - P afectó de manera significativa a la línea "normal" y requirió de dosis mayores para provocar su efecto sobre la línea neoplásica. La lactona CHE + P causó el efecto de

seado a dosis menores pero afectando más a las células de la línea L 929. Por último el compuesto más efectivo en nuestro sistema "in vitro", fué la 17-18 dihidroviguiépinina, aunque sin una marcada especificidad hacia las células tumorales. Estos estudios iniciales marcan pautas para que en experimentos posteriores en sistemas "in vivo" se corroboren tales hallazgos, así como para que se prueben otros fármacos estructuralmente semejantes.

I. INTRODUCCION.

Las investigaciones relacionadas con el cáncer se remontan hasta 1775, cuando Sir Percival Pott publicó estudios sobre un carcinoma de escroto en los deshollinadores de chimeneas en Londres. La exposición prolongada al hollín y su permanencia en los pliegues del escroto producen una forma particular de enfermedad; este tumor podía ser detectado en semanas, meses o años, lo que demostró que el cáncer podía ser resultado o bien de una serie de factores extrínsecos, contra la idea, que también se manejaba, de que fuera defecto congénito (39).

Durante el siglo XVIII no se avanzó considerablemente en el campo etiológico; predominó durante mucho tiempo la teoría de Conheim, según la cual, el cáncer se debía a la reactivación de grupos celulares de origen embrionario, que habían permanecido estáticos por mucho tiempo (4). En aquél siglo también se iniciaron estudios orientados a la investigación etiológica de los tumores. En París Tanchou y en Viena Rigoni Stern, analizaron los datos estadísticos de sus respectivas ciudades y formularon una serie de teorías etiológicas para explicar las diferencias encontradas. La observación hecha por Stern (46) y que aún es válida, afirma que el cáncer uterino es más frecuente que el de glándula mamaria en mujeres casa-

das que en solteras.

En el año de 1918, los investigadores japoneses - Yamagiwa e Itchikawa lograron demostrar que era posible - producir cáncer experimental en animales, aplicando por - varias semanas en dosis diarias en la oreja de los cone-- jos, extractos de alquitrán de hulla (3). Un poco antes- de la publicación de Yamagiwa, que dió base a la Teoría - química del cáncer, el investigador Peyton Rous de N.Y. - (45) publicaba en 1911 sus observaciones que dieron el a-- poyo a la teoría de que el cáncer era producido por virus filtrables. Rous encontró que en el pollo, un sarcoma -- puede ser transmitido a otros animales de la misma espe-- cie por medio de filtrados libres de células (4).

Actualmente el cáncer es una de las principales - causas de sufrimiento humano, con un elevado índice de -- mortalidad. Esto ha favorecido que innumerables investi- gadores dirijan su atención hacia el conocimiento de los- factores involucrados en el desarrollo del cáncer, enfo-- cando principalmente sus esfuerzos a la cusa prevención y tratamiento del mismo (36).

Las investigaciones en materia de cáncer han sido incrementadas notablemente en las últimas décadas y aun-- que aún quedan muchas incógnitas por despejar los avances han sido relevantes en cuanto a que se han ido definiendo la naturaleza y características particulares de este pade

cimiento. Algunas conclusiones a las que se han llegado indican que el cáncer es una alteración que afecta a todos los organismos pluricelulares, dando como resultado la reproducción celular de un tejido sin control por el individuo, por lo que se le clasifica como enfermedad neoplásica (2).

Como problema biológico la neoplasia es una forma aberrante específica del comportamiento de un tejido vivo y la expresión biológica del proceso, y los factores involucrados, difieren según el tejido afectado. La explicación para esta diversidad, es que la neoplasia no es una enfermedad, sino que representa un amplio rango de enfermedades independientes.

Clínicamente, un tumor o neoplasia está caracterizado por la presencia de un "crecimiento masivo progresivo de un tejido normal", y que en su forma maligna (cáncer), es acompañado de un amplio rango de signos y síntomas de acuerdo con el sitio afectado (3).

Por lo tanto, la neoplasia, es un grupo heterogéneo de enfermedades y las diferencias entre ellas se basan en el tipo de células de origen del tumor en particular, el órgano afectado, la determinación de que sea maligno o benigno, de acuerdo a los criterios ya establecidos, y en caso de malignidad, el grado de la misma y la presencia o no de metástasis (3).

Esta alteración en el hombre se puede dividir básicamente en dos clases:

a) Formación de tumores sólidos, cuya nomenclatura no sigue un sistema constante y único. La mayor parte de los tumores benignos se designan histológicamente agregando el sufijo- oma al tipo celular que forma la neoplasia; -- así por ejemplo los tumores que consisten en fibroblastos se llaman fibromas y se les llama lipomas a los tumores de tejido adiposo. La nomenclatura para tumores malignos sigue, en esencia, el sistema de las benignas, con algunas añadiduras. Los cánceres que nacen en tejido mesenquimatoso se llaman sarcomas (sarco=carnoso)- las neoplasias malignas originadas en células epiteliales se llaman carcinomas. Existen algunos casos en los que los tumores se denominan en forma inadecuada, como son los casos de los hepatomas y melanomas, que deberían llamarse hepatocarcinomas y melanocarcinomas por ser tumores malignos de células hepáticas y melanocitos respectivamente (44).

b) Leucemias, enfermedades de los órganos hematopoyéticos caracterizados principalmente por la aparición de leucocitos anormales o inmaduros, conocidos como formas juveniles, en sangre periférica. Por otro lado un aumento exagerado en el número de glóbulos blancos, que normalmente se presentan en cifras de 5 a 8000 por mm^3 , y que en estos padecimientos superan los 100 000 por mm^3 de sangre - (44). La enfermedad de Hodgkin o linfogranulomatosis se-

representa como un agrandamiento de los ganglios linfáticos de cuello, axila, ingle y bazo (42).

A través de la historia de la medicina, el empleo de productos naturales ha sido un común denominador en todos los tiempos, es por eso que en materia de tratamiento del cáncer se le dé tanta importancia. Actualmente en --- nuestro país, impulsados por esta ola de investigaciones que ha arrojado resultados muy valiosos, se han incrementado los estudios a este respecto especialmente para encontrar principios activos en plantas, minerales, etc., - nacionales, con una probable actividad anticancerígena.

El laboratorio de Biología Celular de la Unidad - de Investigación Biomédica del Centro Médico Nacional, se ha abocado al estudio de una acción específica de productos naturales, que el Instituto de Química de la UNAM ha extraído y purificado hasta presentarlos en forma de cristales, para los estudios "in vitro", mismos que se consideran pruebas iniciales de citotoxicidad y con esto marcar pautas para estudios subsecuentes "in vivo".

II. GENERALIDADES.

1. ORIGEN Y MECANISMOS DE CARCINOGENESIS.

Uno de los aspectos que más ha ocupado la atención de los investigadores va encaminado a descubrir los orígenes y mecanismos de esta enfermedad para que, basados en esto, se le pueda atacar en forma específica y eficiente (3). Así la carcinogénesis se refiere a los factores involucrados en la inducción de tumores y sus modos de acción (etiología y patogénesis). De esta serie de estudios se desprende la idea de que la carcinogénesis es un proceso de naturaleza multifásica en el que generalmente se presentan dos estadios básicos:

1er. Estadio o de iniciación cuyo producto es lo que se ha denominado "célula iniciadora" que no parece ser una célula tumoral y no puede ser reconocida directamente sino con alteraciones moleculares permanentes en ella.

2o. Estadio o de promoción, que es en realidad una secuencia de estadios que causan el desarrollo de células tumorales que se replican y se convierten en tumores sólidos.

El apoyo a la teoría del sistema clásico de iniciación y promoción se encuentra en los experimentos -- de inducción de tumores en la piel de ratón efectuados -- por Rous y Kidd, Mottram y Beremblum (36). Otras investigaciones importantes demuestran que los tumores no se desarrollan sólo con el iniciador o el promotor, tampoco si se aplica primero el promotor. La naturaleza irreversible del proceso se comprueba si añadimos el promotor después de mucho tiempo de haber administrado el iniciador y aún así hay desarrollo de tumores.

La iniciación de los tumores, según investigaciones en el campo de la genética ocurre primero a través de eventos de ésta índole; esto es sugerido por la naturaleza irreversible y por los estudios que se han realizado en algunos cancerígenos químicos electrofílicos con ADN, donde provocan mutaciones que se continúan con transformaciones por traslocaciones de ADN normal y maligno -- para producir células malignas. Por lo tanto muchos tumores son iniciados por uno o más cambios de la información del ADN (19). En este sentido, existe la hipótesis de -- que las células normales contienen genes que son capaces de inducir transformación de células normales a malignas, si se expresan a niveles anormalmente elevados.

Reforzando estos conceptos con los de transformación y traslocación del ADN se dá origen a lo que se -- ha denominado como la Teoría del Oncogene(8), misma que -

presupone factores de herencia en la propensión al cáncer y de la única intervención del promotor para el desarrollo de la enfermedad. Así pues, supone la presencia del iniciador dentro del mismo organismo y es el promotor el que provoca que el gene que se encontraba "dormido" ahora genere una respuesta que se traduce en la aparición del padecimiento.

Otro aspecto es la carcinogénesis hormonal y esto se refiere a hormonas carcinogénicas activas constituyentes normales del cuerpo y que son relacionadas con un desequilibrio hormonal intrínseco o bien con algunos tumores que son hormona-dependientes, como es el caso de los estrógenos en tumores mamarios. Existen ciertos tumores de ovario que producen cantidades anormales de estrógenos y éstos a su vez pueden producir carcinomas del endometrio como resultado de la prolongada estimulación de sus células epiteliales (9).

Cuando se trata un animal por periodos prolongados con tiouracilo, se produce como resultado una hipersecreción de hormonas tiroestimulantes de la hipófisis; ésta a su vez estimula la reproducción de las células del epitelio folicular de la tiroides y puede conducir a la producción de tumores de esta glándula (9).

2. DIFERENCIAS CELULARES.

Al hablar de un proceso neoplásico y de los cambios que éste implica a nivel celular se derivan una serie de estudios en lo que a las células como entidades se refiere.

La célula aislada lleva a cabo numerosas funciones englobadas bajo términos generales de respiración y metabolismo, mismos que se realizan gracias a una serie de complicados mecanismos enzimáticos; sin embargo, además de mantenerse en ese complejo mecanismo dinámico, para sobrevivir como especie, la célula debe reproducirse a sí misma. Así, cuando la capacidad de reproducción de una célula o de un grupo de células viola en exceso e irreversiblemente las leyes generales de organización del individuo, se produce la neoplasia (42).

Por todo lo anteriormente mencionado, resulta de gran importancia establecer las diferencias a nivel celular, así como de fracciones subcelulares, que se encuentran entre una célula considerada como normal y una del tipo neoplásico (38). Por esto, se han recurrido a estudios en el microscopio electrónico que han revelado que existen diferencias cuantitativas con respecto a la proporción de varios organelos en los tumores y estos organelos a su vez pueden mostrar características anormales, aunque las células neoplásicas contengan los mismos componentes subcelulares que están presentes en un tejido normal. Todas estas diferencias han sido base para estable-

cer características generales presentes en las células -- neoplásicas y con las que se han formulado algunas teo--- rías de los transtornos producidos por estos padecimien-- tos. A continuación presentamos algunos ejemplos de las-- diferencias más claramente establecidas.

2.1. MITOCONDRIA.

La mitocondria juega un papel central en la --- Hipótesis de Warburg, en la que un desarreglo respirato-- rio es característica fundamental de las neoplasias. Tam-- bién se ha detectado que a este nivel existe una lesión - primaria que afecta específicamente a enzimas de la cade-- na respiratoria en lo que se ha denominado como "efecto - DPN", caracterizado por un descenso en la capacidad respi-- ratoria. Por otro lado, se encuentra elevada la activi-- dad ATPasa de la mitocondria (38).

2.2. NUCLEO.

El núcleo asume mayor importancia si se involu-- cra un evento genético primario en la iniciación de la - neoplasia, ya que en este organelo es donde se encuentra-- depositada en su mayor parte la información genética de - las células. Además, se ve alterado en su tamaño pues és-- te se incrementa y la proporción con respecto al resto de la célula disminuye al aumentar el radio del núcleo (38).

2.3. RETICULO ENDOPLASMICO

Numerosos trabajos han demostrado que los cambios estructurales tempranos, seguidos de la administración de varios cancerígenos, ocurren en el retículo endoplásmico. Las alteraciones estructurales de estos organelos pueden jugar un papel importante en los disturbios de la regulación enzimática provocados por muchos tumores. - A este nivel se han realizado estudios de aislamiento y de observación en microscopio electrónico, encontrándose diferencias en la composición enzimática. Las alteraciones microsomales examinadas en hepatomas han revelado un descenso en los fosfolípidos, descenso en el contenido enzimático relacionado con reacciones de óxido-reducción, un incremento en la actividad ribonucleasa, así como en la ATPasa y por último pérdida en la inhibición en la retroalimentación de la síntesis del colesterol (38).

2.4. MEMBRANAS.

De todos los estudios realizados a niveles subcelulares, los que han aportado más información se han enfocado a las alteraciones en las membranas celulares. -- Las características de crecimiento de las células tumorales se pueden atribuir a las anormalidades encontradas en la membrana plasmática de estas células, que en comparación con las células normales, presenta las siguientes ca

racterísticas (22):

2.4.1. DISMINUCION DE LA COHESION.

Esta característica ayuda a explicar la formación tumoral, la siembra a cavidades corporales naturales y la tendencia de los tumores a propagarse y a introducirse en tejidos normales adyacentes al foco primario. La menor cohesión también explica la descamación de células cancerosas por vías naturales como son: las secreciones vaginales, bronquiales, por orina, etc. dependiendo del sitio donde se encuentre localizado el tumor. Participan en la disminución de la cohesión varios factores -- (7) uno de los cuales es que el tejido canceroso posee menos calcio que el tejido normal. Los iones calcio brindan un enlace iónico entre las cargas negativas descubiertas de membranas celulares adyacentes. Se han advertido un aumento de las cargas de repulsión entre las células que no permite que se conserve la integridad de las superficies epiteliales y la adherencia de las células(38)

2.4.2. PERDIDA DE INHIBICION AL CONTACTO.

En cultivos celulares cuando las células crecen a partir de una pequeña siembra, las células entran en contacto con sus vecinas y dejan de proliferar. Las células cancerosas no presentan inhibición al contacto "in-vitro", fenómeno que aunque difícil de observar se extra-

pola a la situación "in vivo". Con esto, las células cancerosas seguirán proliferando sin restricciones de presión invadiendo progresivamente y en consecuencia destruyendo tejidos normales vecinos (1).

2.4.3. MOVILIDAD "IN VITRO".

La movilidad de las células cancerosas es mayor que la de la mayoría de las células normales. Se desplazan alejándose del centro de un explante más rápidamente que sus predecesoras normales. Aunque tal movilización podría explicar la extensión de los tumores por tejidos vecinos y su capacidad de invasión, las células tumorales no son tan móviles como los macrófagos y neutrófilos(38).

2.4.4. GUIA DE CONTACTO.

Esto se refiere a la propiedad del crecimiento de las células siguiendo una red estructural o arquitectónica, lo cual explica la capacidad invasora de los tumores entre las células a lo largo de redes de sostén de tejidos normales (22).

2.4.5. ELABORACION DE ENZIMAS Y OTROS PRODUCTOS.

Tratando de explicar la índole destructora e invasora del cáncer, pero aún con pocos datos firmes, se ha

encontrado una hialuronidasa en algunos tipos de cáncer.- Las enzimas elaboradas por células cancerosas por lo general son paralelas a las producidas por sus predecesoras normales. Aunque las células cancerosas invaden a las normales no las destruyen por contacto; esto más bien se explica por la competencia por los elementos nutritivos y la elaboración de productos de desecho resultantes de su actividad metabólica aumentada, y que pudiera explicar la acción citotóxica que poseen. Sin embargo a veces el cáncer no destruye, sino que estimula el crecimiento de células normales vecinas como sucede en los casos de hiperactividad osteoblástica y angioblástica (38). En los que el angioblasto es el tejido embrionario del que derivan los vasos y el osteoblasto es la célula productora del tejido óseo; en consecuencia la actividad normal de éstas se ve incrementada por influencia de un proceso maligno provocando la proliferación de vasos y de tejido óseo por arriba de sus niveles normales.

2.4.6. CAPACIDAD DE TRANSPLANTE.

Casi todos los cánceres son fáciles de explantar. En general, las suspensiones obtenidas de tumores de seres humanos pueden inocularse a los animales donde crecerán produciendo tumores que pueden a veces ser rechazados a consecuencia de respuestas inmunes del mismo organismo. Aún así, las células tumorales tienen una mejor capacidad

de supervivencia que las células normales.

Finalmente, de todos estos estudios también se ha concluido que la alteración aislada de un solo organelo - no es el factor desencadenante, sino más bien la conjunción de alteraciones bioquímicas y morfológicas que son - las que provocan que las células se desarroollen anormalmente y produzcan las neoplasias (38).

3. TRATAMIENTO DEL CANCER.

Abarcada en forma global la problemática del origen y algunas de las alteraciones que el cáncer provoca, el paso obligado es la búsqueda de diferentes vías de solución a éste; por lo que paralelamente a las investigaciones antes mencionadas, se han realizado otras igualmente exhaustivas para el tratamiento de estos padecimientos.

En general, la terapia del cáncer está orientada hacia la inhibición de la nueva formación anormal, tratando de que el resto del organismo no se dañe. En la actualidad se recurre a varias formas de tratamiento que pueden ser utilizadas solas o combinadas (52).

La elección del método ideal de tratamiento, -- tanto en forma como en intensidad, depende de una serie de factores como son: la situación del tumor o del órgano dañado, el tiempo de evolución, la determinación de la malignidad del mismo y en consecuencia los posibles focos de metástasis, el tipo de tumor de que se trate si éste es sólido, o bien es un cáncer de órganos hematopoyéticos. Por parte del paciente influyen aspectos de raza, sexo, de herencia, así como su estado de salud general. Cada una de las técnicas terapéuticas presenta sus ventajas y desventajas, y analizando esto, en la actualidad se tra--

baja con cuatro tipos de tratamiento. A saber:

3.1. CIRUGIA.

Es considerado como el tratamiento primario para muchos cánceres tempranos. Como sea, en muchos pacientes esta enfermedad no responde a una cirugía curativa -- (13). Muchos tumores son operables si la cantidad de tejido que es necesario remover no afecta de manera significativa al resto del organismo, si se encuentra en un sitio accesible para el cirujano y si no se dañan nervios ni órganos vitales (37). En 1894. Halsted practicó la -- mastectomía radical, pero lo hizo sin conocer la posible aparición de focos de metástasis; sin embargo en la actualidad se sigue empleando como una de las técnicas quirúrgicas (13). La curación, después de remover el foco primario únicamente, no siempre es completa y puede volver a aparecer el tumor. Esto se explica por experimentos que han demostrado que solo una fracción de células, en la masa tumoral, retienen su capacidad de producir metástasis (células clonogénicas); de otra manera no continúa el crecimiento, y por otro lado, el huésped tiene la capacidad de destruir un pequeño número de células propagadoras aunque el tumor tiene por sí mismo tendencia a la metástasis. La cirugía radical no siempre es el tratamiento empleado, aún cuando en la actualidad exista la cirugía reconstruc-

tiva como apoyo.

3.2. RADIOTERAPIA.

Se le considera como terapia de forma regional, principalmente para el control de un cáncer localizado. - El ideal de ésta es lograr la erradicación completa del tumor, de tal manera que el tejido adyacente muestre una pequeña o ninguna alteración estructural ni funcional (13) Con este objeto, debe encontrarse previamente la magnitud de la respuesta de los tejidos a la radiación, para elaborar todo el programa de tratamiento y favorecer la posibilidad de control del tumor y disminuir la probabilidad de necrosis de un tejido normal (49).

El factor más importante en este tipo de tratamiento es la diferencia de radiosensibilidad entre células normales y neoplásicas, misma que depende de la capacidad para reparación intracelular de ambas células y la habilidad de órganos normales para continuar funcionando a pesar de tener un segmento dañado o extirpado. Así, como los tejidos normales, diferentes tumores tienen un alto rango de sensibilidad que va desde unos cientos de rads hasta tumores que son incurables a dosis mayores de ---- 10,000 rads. Las radiaciones utilizadas son del tipo electromagnético no particuladas e ionizantes, donde las partículas gamma pueden ser emitidas en forma natural como sucede en los rayos X o bien en forma artificial como

los elementos radiactivos (Ra y Co 60). Las radiaciones de muy corta longitud de onda tienen un alto poder de penetración en el tejido (34). Según algunos estudios, los efectos de esta terapia recaen directamente sobre moléculas de ADN provocando alteraciones en la secuencia de los nucleótidos, cambios en la transcripción y defectos en la reparación, produciendo en consecuencia la muerte celular (13, 34). Cuando los efectos sobre la célula no son inmediatos, se atribuye a la formación de lo que se ha llamado "daño potencialmente letal", el cual incluso sin la necesidad de una segunda radiación, puede convertirse en letal, o bien, por otro lado, puede ser reparado y no causar ningún efecto. Esto explica un poco las diferencias en las respuestas del organismo al tratamiento (41).

3.3. INMUNOTERAPIA.

Desde el advenimiento de la idea de que el sistema inmunológico del huésped puede estar involucrado en el control de un proceso maligno, la inmunología se enfocó al tratamiento del cáncer. Así, tumores provenientes de animales han sido tratados con inmunoterapia activa y pasiva, y es probable que puedan ser aplicadas a humanos. Para lograr una máxima reducción del tumor, éste debe ser tratado con cirugía, radioterapia o quimioterapia y después con inmunoterapia; para esto el huésped debe ser inmunocompetente y dejar pasar un tiempo óptimo entre los -

tratamientos anteriores y la aplicación de la inmunoterapia. La mayoría de los agentes antitumorales son inmunosupresores, pero tan pronto se recobra el paciente de estos efectos, viene un incremento en la reactividad inmunológica y este puede ser el tiempo ideal para la inmunoterapia. La aplicación de ésta al control de los tumores malignos en humanos es prometedora. Como sea, los resultados no han producido respuestas comparables con otros tratamientos; por lo que es probable que se use como complemento (19).

3.4.. QUIMIOTERAPIA.

La búsqueda de sustancias con actividad antitumoral se inicia con la identificación accidental del efecto de las mostazas nitrogenadas, un derivado de los gases de mostaza, empleados en la 1a. y 2a. Guerra Mundial. -- Los primeros intentos se hicieron al tratar la enfermedad de Hodgkin y en linfomas, pero sin éxito, pues hubo muchas recaídas. No fué sino hasta que Gilman y Philips -- utilizaron el antimetabolito Metrotexate contra la leucemia aguda en niños (31), y en el tratamiento de coriocarcinoma de mujeres, cuando en 1950 se estandarizó el estudio organizado de drogas con actividad antitumoral. Desde entonces, muchos productos de origen animal, vegetal, sintético, de fragmentación o minerales, han sido identificados como anticancerígenos, de los cuales se han elegido a aquellos con un efecto inhibidor del crecimiento -

aunque la mayoría de estas sustancias no discriminan entre células sanas y neoplásicas causando daño a los tejidos sanos, principalmente a aquellos de renovación continua como son médula ósea y epitelios de recubrimiento. Sin embargo, actualmente se calculan de estos agentes, -- más de 40 no hormonales con efectos en pacientes con metástasis y que permiten una sobrevida de una a tres veces más, e incluso la recuperación total, si después de cinco años de efectuado el tratamiento, no hay recaídas ni nuevos focos tumorales (25). Se han encontrado seis clases principales de agentes antitumorales y algunas drogas sueltas (12): a) agentes alquilantes, b) antimetabolitos, c) alcaloides de plantas, d) antibióticos antitumorales, e) agentes endócrinos y f) estimulantes inmunológicos. La acción citotóxica de los agentes es definida por una cinética de primer orden; éstos matan a una fracción constante de células en vez de un número constante (13). La mayoría de las drogas simples o combinadas, usadas para tumores sólidos, tienen un potencial limitado y pueden no esperarse efectos curativos totales cuando el tumor es -- grande, tanto en su tamaño como en su cinética.

Antes se reservaba la quimioterapia para después de las cirugías o radioterapias, obteniéndose muy -- buenos resultados.

Para explicar la acción específica de los anticancerígenos se puede dividir a un tumor en tres distin--

tos compartimentos, cada uno con su importancia particular en relación con la efectividad del agente:

- 1o. La fracción en crecimiento del tumor, que es la más vulnerable.
- 2o. Es una fracción de células que temporalmente no están en división, pero que tienen la capacidad de regresar al estado replicativo y son considerablemente menos sensibles.
- 3o. El grupo de las que permanentemente han perdido su capacidad de proliferación y hasta que mueren y son absorbidas, siguen contribuyendo a la masa tumoral.

Con el incremento del tamaño de un tumor, el porcentaje de células en la fracción de crecimiento sensible a la droga, decrece por el aumento del porcentaje de las células en el tercer estado, que son las menos sensibles (44).

4. PLANTAS CON EFECTOS ANTITUMORALES.

En la actualidad se está tratando de recurrir principalmente al empleo de productos de extracción natural, procurando que el efecto mortal de los agentes quimioterapéuticos tenga selectividad por las células cancerosas sobre las normales, por lo que recientemente se --

han hecho estudios sobre muchas sustancias de origen vegetal encontrándose que varias de ellas son prometedoras en el tratamiento del cáncer (20).

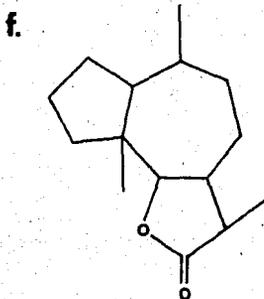
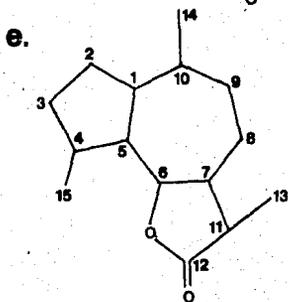
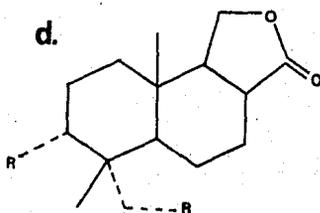
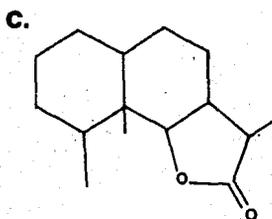
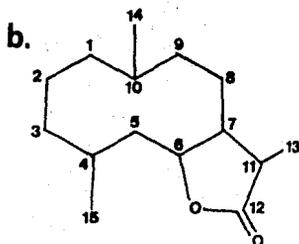
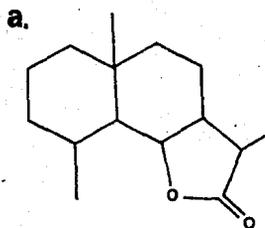
El empleo de extractos de plantas como medicamentos se remonta al principio de la historia del hombre que se basó en experimentos empíricos con grandes errores, pero también con grandes aciertos, para ir abriendo la investigación en este campo científico. Al organizarse el estudio de estos recursos naturales en México, en el tiempo de la Colonia, fué que se publicó la "Historia de las Plantas de la Nueva España", escrita por Francisco Hernández, como un testimonio de los recursos empleados por los indígenas, mismos que más tarde fueron adoptados por los españoles y que aún son utilizados.

Las sustancias que ocupan al presente trabajo son principios activos del tipo de las lactonas sesquiterpénicas, aisladas principalmente de plantas de la familia de las compuestas (32), que por sus características químicas y bioquímicas se han identificado como probables agentes antitumorales. Este concepto lo trataremos adelante.

4.1. SESQUITERPENLACTONAS.

Las sesquiterpenlactonas poseen un esqueleto fundamental de quince átomos de carbono, que teóricamente deriva de la unión de tres fragmentos de isopreno (2-metilbutadieno-1,3), cabeza, cola y algunos productos de trans

posición (v.gr. pseudoguaianólidos); parte del esqueleto es un anillo metilbutenólido. Por deshidrogenación pueden formar derivados del naftaleno, como ocurre con los del tipo eudesmanólido o selenólido (a), germacrólido (b) erenofilanólido (c) y drimanólido (d) y los del tipo guaianólido (e) y pseudoguaianólido (f), que forman derivados del azuleno.



Las sesquiterpenlactonas se han encontrado principalmente en extractos de flores o partes aéreas de las compuestas, siendo lo suficientemente típicos para tener cierto valor quimiotaxonómico. En algunas de ellas el oxígeno de la lactona se halla en el carbono 8, con grupos epóxido, acetoxi o carbonilo, como parte de la molécula, contribuyendo a incrementar los miembros de este grupo, conociéndose actualmente más de doscientos. Algunas poseen acción citotóxica, otras analgésica, amebicidas, etc. (14). Las lactonas sesquiterpénicas son sustancias amargas de farmacología poco estudiada, pero provenientes de plantas usualmente reportadas como medicinales por lo que es probable que sean agentes con algún valor terapéutico. Se ha sugerido que la actividad citotóxica está relacionada con el grupo exometilbutenólido y también que este grupo modifica el crecimiento de vegetales.

Por lo general, las sesquiterpenlactonas son lo suficientemente polares para ser insolubles en éter de petróleo, aunque también son insolubles en agua; el etanol o metanol caliente las disuelven, pero son aún más solubles en cloroformo o éter etílico; estas propiedades son utilizadas para extraerlas y separarlas de otros compuestos.

Para la identificación específica de una lactona determinada se usan pruebas de colorimetría, cromatografía en capa delgada o espectros de absorción, etc.

Los espectros de masas han sido poco utilizados para aclarar estructuras; por otro lado analizando la forma en que reaccionan los diferentes grupos, se han esclarecido sus correspondientes reacciones de acetilación, hidrogenación, epoxidación, oxidación, etc. (6)

Bioquímicamente a las lactonas sesquiterpénicas se les considera como metabolitos secundarios. Los estudios de Kupchan, Lee y otros investigadores, demostraron que las lactonas biológicamente activas, eran las alfa-metilen-gamma-lactonas, las cuales tenían otros grupos funcionales como epóxidos, clorhidrinas, ésteres insaturados, lactonas insaturadas y cetonas insaturadas (47). Experimentos realizados "in vitro" con cisteína, demostraron -- que la estructura básica requerida para la actividad citotóxica de una lactona sesquiterpénica, era el grupo alfa-metilen-gamma-lactona (33).

III. OBJETIVO.

En el presente trabajo se probaron tres diferentes compuestos pertenecientes al grupo de las lactonas -- sesquiterpénicas: la 8 α - hidroxidehidrocostus (CHE + P) la 8 α -tigloildehidrocostus (CHE - P) y la 17-18 dihidro viguiepinina, que por sus características moleculares pudieran presentar una probable actividad anticancerígena. Para esto se analizó su efecto citotóxico "in vitro" sobre dos líneas celulares: una de origen neoplásico (HEP -- 2C) y otra proveniente de células de origen normal (L 929) Todo esto con el fin de localizar sus correspondientes Dosis Efectivas Medias (DE 50), o sea aquella dosis que inhibe el 50% del crecimiento celular y valorar su efecto en los cultivos celulares para su posible estudio "in vivo" en animales experimentales de laboratorio, con el propósito de explorar su posible uso terapéutico en el tratamiento de cáncer en humanos.

IV. MATERIAL Y METODOS.

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Para los estudios "in vitro" realizados en el presente trabajo se seleccionaron dos diferentes líneas celulares, cuyas características cumplen con los requerimientos para experimentos de citotoxicidad.

1.1. LINEA HEP 2C.

La línea HEP 2C (Carcinoma epidérmico laríngeo-humano), fué establecida en 1952. Proviene de tumores -- que fueron producidos en ratas destetadas, radiadas y tratadas con cortisona, después de una inoculación con un -- carcinoma epidérmico proveniente de la laringe de un hombre de 56 años. Esta línea celular ha sido empleada en -- estudios experimentales de producción de tumores en ratas, hamsters, huevos embrionarios de aves de 8 a 10 días y pacientes voluntarios con cáncer terminal. Se cultiva en -- siempre en Medio Basal de Eagle (APENDICE 1.) y su morfología es del tipo epitelial; su cariotipo presenta un -- número modal de 76 cromosomas con un rango entre 73 y 79; presenta poliploidías ocasionales. Al inicio del experimento se encontraba en el subcultivo número 184 del laboratorio (43).

1.2. LINEA L 929.

Es una línea de fibroblastos derivados de tejido conectivo murino LM, proveniente de una clona NCTC 929 L de ratón. La cepa L original fué derivada de tejido -- areolar subcutáneo y adiposo normal de un ratón macho --- C3H/An de 100 días.

La clona L 929 de la cepa original ha sido utilizada en estudios nutricionales, metabólicos, enzimáticos, virales, inmunológicos, toxicológicos, etc. Se cultivan en Medio Basal de Eagle; su morfología es del tipo de los fibroblastos; su cariotipo presenta un número modal de 66 cromosomas con un rango entre 56 y 241. Se encontraba en el paso número 85, del laboratorio, al iniciar el trabajo (43).

2. SUSTANCIAS QUIMICAS.

Las sustancias a probar como posibles agentes anticancerígenos, fueron proporcionadas por el Instituto de Química de la UNAM, ya purificadas en forma de cristales e identificados con espectros de absorción, espectro de infrarojo, etc.

2.1. 8 α -HIDROXIDEHIDROCOSTUS (CHE + P)

Aislada del género de las Göchnatia, sólo han sido analizadas químicamente cinco especies, aunque todas ellas contienen triterpenos, se han encontrado solamente-

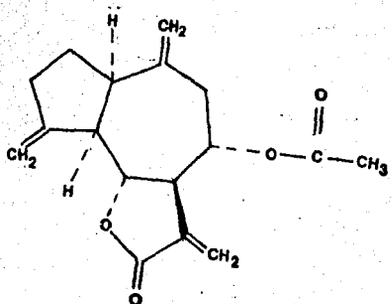
lactonas sesquiterpénicas en G. discoidea, G. rusbyana y G. paniculata.

Se ha reportado el aislamiento de dos guaianólidos provenientes de Gochnatia smithii, ambos compuestos - cercamente relacionados con los derivados dehidrocostus - de la lactona de la tribu Vernoniae.

El mayor componente, denominado Compuesto A cuya fórmula es: $C_{17}H_{20}O_4$ presenta un punto de fusión de -- 120-121°C. Es una lactona sesquiterpénica del tipo de -- los guaianólidos.

Este compuesto por bandas de absorción de masas, Ultravioleta, etc. muestra una gamma-lactona, alfa-beta, - no saturada, un éster saturado y dobles enlaces. El espectro revela la presencia de tres metilenos terminales, - uno de los cuales corresponde al conjugado con la gamma-lactona. La molécula de diacetilo fué eliminada por saponificación de este compuesto, para producir otro en pequeña proporción. En el espectro de Infrarojo la banda carbonil de la función éster no apareció, y en su lugar se observó la absorción de un hidroxilo. Las constantes físicas de este compuesto son idénticas a las que muestra - la lactona 8 α -hidroxi dehidrocostus. Los hechos mencionados permitieron establecer la estructura del Compuesto A como una lactona 8 α -acetoxi dehidrocostus.

La fórmula estructural de este compuesto es la siguiente (41):

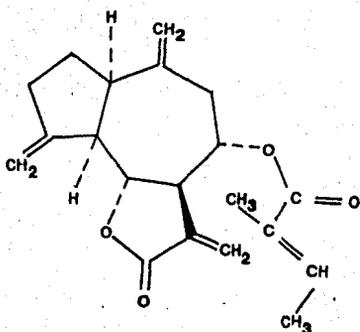


2.2. 8 α -TIGLOILOXI DEHIDROCOSTUS (CHE - P)

El segundo guaianólido aislado de la Gochnatia-smithii, considerado como el menor componente, ha sido de nominado Compuesto B y su fórmula es $C_{20}H_{24}O_4$ (EM), con un punto de fusión de 96-98°C. Este es obtenido de la fracción menos polar de la cromatografía; también es una alfa,beta- no saturada- gamma lactona. El espectro de absorción de masas indica una gran similitud con A.

El Compuesto B es esterificado con un residuo de tigloil en lugar del acetyl del Compuesto A, de aquí que se le asigne la estructura de una 8 alfa-tigloiloxi dehidrocostus, que es idéntica a la lactona ferreyanthus.

Los experimentos mencionados han permitido establecer la estructura química de este compuesto de la siguiente manera:



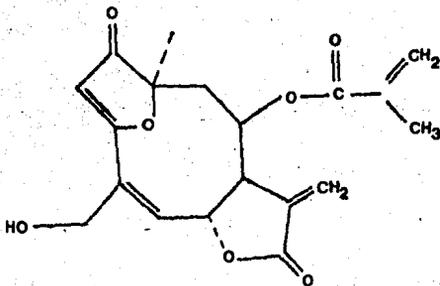
2.3. 17-18 DIHIDROVIGUIEPININA.

El genero Viguiera es rico en lactonas sesquiterpénicas (heliangólidos y germacrólidos). La Viguiepinina se encuentra en la especie V. pinnatilobata.

De la extracción con cloroformo de V. eriophora se obtuvieron tres lactonas, la tercera de éstas y la más polar fué la 17-18 dihidroviguiepinina, cuya fórmula es: $C_{19}H_{20}O_7$, con un punto de fusión de 163-164°C, con características típicas de heliangólidos aislados de Viguiera.

En particular se determinó la presencia de un alcohol alílico primario del metileno, al cual, el hidroxilo es agregado después de la formación de un éster. La estructura de la 17-18 Dihidroviguiepinina se asigna a -- una de las dos lactonas de Calea zacatechichi, que no puede ser inducida a cristalización, por lo que son idénticas en estructura, más no es propiedades físicas.

Su estructura se propone así: (11)



3. METODOLOGIA.

Para la elaboración del esquema del proyecto se tomaron en cuenta, tanto el número de compuestos a probar, el CHE + P, el CHE - P y la 17-18 Dihidroviguiépinina, que como ya se ha mencionado fueron extraídas por el Instituto de Química de la UNAM; también se consideró a las líneas celulares, L 929 y HEP 2C escogidas para este estudio.

Se sembraron series de 11 tubos Leyighton, con aproximadamente 60,000 células/ml en cada tubo, en Medio Basal de Eagle, suplementado con suero fetal de bovino (10%), 100 UI de Penicilina/ml y - 100 ug de Estreptomicina/ml, como antibióticos. Las series se prepararon para cada una de las dosis y para los controles en cada línea. De estos tubos tre contenían laminilla y ocho no contenían laminilla, estos últimos fueron empleados para conteo celular y determinación del porcentaje de inhibición del crecimiento celular que cada dosis provocó. Con respecto a los tre tubos restantes, se utilizaron para las pruebas de viabilidad celular, usando el Azul de Tripán (APENDICE 1.) y análisis morfológico, previa fijación con alcohol metílico y teñidas con el método de la Tinción de Jacobson (APENDICE 2.); las pruebas se llevaron a cabo al finalizar cada experimento.

El número de tubos usados para conteo celular fue escogido con base en experimentos previos que mostraron validez estadística - (50).

Todos los tubos de la serie se incubaron en forma horizon-

tal y estáticos en una estufa con una atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂ durante un período de 24 hrs.; en este tiempo las células se adhieren a la superficie del tubo y empiezan a confluir. Después de cumplido este primer paso se prepararon las dosis de los compuestos a probar de la siguiente manera:

3.1. PREPARACION DE DOSIS.

- Se pesó 1 miligramo del compuesto cristalizado y se colocó en un tubo de centrifuga.
- Se añadieron 50 Lamdas de Propilen Glicol.
- Se calentó ligeramente hasta la disolución del compuesto.
- Se agregaron 10 ml. de Medio Basal de Eagle.
- Se filtró con sistema Millipore en membrana de 0.22 u.
- Se realizaron las diluciones correspondientes a cada sustancia.

Se cambió el medio de cultivo original por el medio conteniendo los fármacos en estudio a las dosis de 0.1 a 50 ug/ml, dependiendo de la lactona estudiada, con un grupo control para cada sustancia y cada línea en estudio. Todos los tubos, tanto los experimentales, como los controles se volvieron a incubar durante 72 hrs. en las mismas condiciones, permitiendo que los compuestos actuaran en la línea celular durante su fase de crecimiento. Al finalizar la incubación se realizaron las siguientes pruebas:

3.2. ANALISIS DE EXCLUSION O % DE VIABILIDAD.

- Se desechó el medio de cultivo de un tubo con laminilla por dosis.
- Se añadió 1 ml. de colorante Azul de Tripán y se dejó actuar durante 5 min. aproximadamente.
- Se sacó la laminilla del tubo Leyighton y se colocó en un portaobjetos de manera que las células quedaron en contacto con el cristal.
- Se realizaron tres lecturas contando 100 células en cada una, en diferentes zonas de la laminilla con el microscopio de luz.
- Se determinó el porcentaje de células vivas y muertas presentes, promediando las tres lecturas de la laminilla.

3.3. CONIBO CELULAR.

- Se vació el medio de cultivo de los ocho tubos sin laminilla en viales de 20 ml. (uno para cada tubo), previamente etiquetados con la dosis, el fármaco y la línea celular correspondientes.
- Se enjuagaron las células por decantación con 2 ml. de solución salina al 0.9% y se pasó al vial.
- Se agregó 1 ml. de Tripsina al 0.25% (APENDICE 1.) y se dejó actuar aproximadamente durante 10 min., tiempo en el que las células se desprenden.
- Se vació la Tripsina conteniendo a las células en el vial.
- Se lavaron los tubos dos veces con 8 ml. de solución salina, para arrastrar las células que se hubieran podido quedar en el tubo, e incorporamos ambos lavados al vial, de manera que se obtuvo un vo-

lumen final de 20 ml.

- Se contaron las células en un contador de partículas*, realizando cuatro cuantas por vial.

3.4. ANALISIS MORFOLOGICO.

- Se eliminó el medio de cultivo de dos tubos con laminilla por dosis.
- Se lavaron las células con 3 ml. de solución salina al 0.9% para eliminar el medio de cultivo y se desechó la solución.
- Se agregaron 5 ml. de metanol y se taparon los tubos. El metanol se dejó actuar un mínimo de 20 min. y un máximo de 15 días para la fijación adecuada de las células.
- Se tiñeron las laminillas con la Técnica de Jacobson (APENDICE 2.)
- Se cuantificó en porcentajes contando 1 000 células en cada lectura y realizando un mínimo de tres conteos por laminilla.

3.5. ANALISIS ESTADISTICO.

El análisis de los resultados se llevó a cabo utilizando una de las variantes de correlación lineal denominado PROBITS (PROBITAS), con los datos encontrados de los experimentos, para localizar la DE 50 (Dosis Efectiva Media) y las diferencias entre éstas para cada fármaco, por lo que fueron analizadas por medio de la prueba de t de Student para muestras independientes usando un nivel de significancia de 0.05 (APENDICE 3.)

* Contador Coulter. Modelo B Hialeah, Fla. USA.

V. RESULTADOS.

Los experimentos realizados para el estudio citotóxico de cualquier droga, requieren un análisis preliminar, en este proyecto se realizaron pruebas con cada una de las lactonas a dosis de 1, 10 y 100 ug/ml, con el fin de localizar la dosis que incluyera o inhibiera el 50% del crecimiento celular en relación al control.

Los presentes resultados muestran el estudio con dosis más cercanas al valor obtenido en el estudio preliminar, con el propósito de precisar la Dosis Efectiva Media (DE 50). Esta es aquella que al calcularse inhibe el crecimiento al 50% en comparación con el control (6).

Después de que se realizaron las series de experimentos con cada uno de los compuestos en ambas líneas celulares, se calculó el promedio de los porcentajes de inhibición y sus respectivas desviaciones estándar, así como los porcentajes de crecimientos (TABLA 1 y 2).

Con el compuesto CHE * P en la línea HEP 2C, la dosis mínima no parece tener ningún efecto sobre el crecimiento; sin embargo cuando se aumenta la dosis se aprecia mayor inhibición como se puede observar en la TABLA 2. -- Así la dosis de 1 ug/ml produjo una inhibición del 44% -- mientras que la de 50 ug/ml lo produjo del 98% y además -

se observó que no existe una relación directa entre la dosis y la respuesta, con un coeficiente de correlación $r = 0.70$. Esta misma lactona no ejerció una acción similar en presencia de células fibroblásticas L 929, donde el efecto observado fué del tipo dosis--respuesta, provocando una inhibición del 11% a dosis de 1. ug/ml, -- mientras que con la dosis de 10 ug/ml la inhibición fué del 99% (TABLA 2), con un coeficiente de correlación $r = 0.94$.

Las DE 50 encontradas para esta lactona en HEP 2C y L 929 fueron de 2.40 y 1.86 respectivamente (TABLA 3), sin que se apreciaran diferencias estadísticamente significativas al hacer la comparación de promedios por medio de la prueba t de Student para muestras independientes ($t = 0.28$ para una $p < 0.05$).

En cuanto al análisis a nivel celular, en el estudio morfológico, la lactona CHE + P en la línea epitelial HEP 2C, la elevada inhibición no permitió realizar cuentas que fueran estadísticamente significativas a dosis de 10 y 50 ug/ml (TABLA 4). A partir de 5 ug/ml se encontró una inhibición en el número de mitosis que fué desde 64% hasta 43% en relación a las encontradas en las laminillas control. Las células multinucleadas tampoco se pudieron localizar en las dosis elevadas; sin embargo en las dosis de 0.1, 1 y 5 ug/ml aumentó el número en relación directa a la dosis, siendo de un 82, 98 y 163% respectivamente.

En la línea fibroblástica se encontró en términos generales un aumento en las mitosis, que fué decreciendo junto con la do--

sis, los datos encontrados fueron de 96, 125 y 150% para las dosis de 1, 3 y 5 ug/ml respectivamente. En las células multinucleadas se observó algo similar con valores de 142, 342 y 535% en las dosis mencionadas respectivamente.

La 17-18 Dihidroviguiépinina se estudió a dosis de 0.5, 1, 2, 4 y 6 ug/ml en la línea epitelial HEP 2C, encontrándose una correlación entre la inhibición del crecimiento y las dosis con un coeficiente $r=0.96$. La DE 50 se localizó entre 1 y 2 ug/ml, mientras que en la línea fibroblástica las dosis que se probaron fueron de 0.1, 0.5, 1 y 2 ug/ml y la DE 50 se encontró entre 1 y 2 ug/ml (TABLA 1 y 2), con un coeficiente de correlación $r=0.98$, implicando un comportamiento dosis-respuesta.

El análisis estadístico de los datos que se obtuvieron de la exposición a esta lactona, que también tiene un comportamiento del tipo dosis-respuesta, resultó en la localización de la DE 50 para la línea HEP 2C de 0.88 ug/ml y para la línea L 929 de 0.79 ug/ml, sin que se apreciarán diferencias estadísticamente significativas al compararlas por medio de la prueba t de Student para muestras independientes ($t=3.32 \times 10^{-3}$ para $p=0.05$).

El análisis morfológico con la 17-18 Dihidroviguiépinina en la línea HEP 2C (TABLA 5) no se pudo realizar a dosis altas por la elevada inhibición. En dosis de 0.5 ug/ml se observó un valor de 158% en relación al control para las mitosis, mientras que en las células multinucleadas el aumento fue de 200% para la dosis de 0.5 ug/ml y de 230 para 1 ug/ml con respecto al control. En la línea fibro

blástica el número de mitosis fué igual o menor al control con valores de 6, 6, 13 y 20% para las dosis de 0.1, 0.5, 1 y 2 $\mu\text{g/ml}$ respectivamente. Las células multinucleadas se encontraron con valores de 106 y 93% en relación al control para las dosis de 0.1 y 0.5 $\mu\text{g/ml}$ y se elevaron junto con la dosis llegando hasta un 366% en relación al control a dosis de 2 $\mu\text{g/ml}$.

La última de las lactonas a probar fué la CHE - P, la cual en la línea HEP 2C se probó con dosis de 1, 3 y 5 $\mu\text{g/ml}$. El crecimiento con estas tres dosis siempre se encontró por arriba del 70% en relación al control, aumentando en proporción inversa a la dosis, por lo que la DE 50 fué una dosis extrapolada de los datos anteriores. Sin embargo, en la línea L 929 se probaron dosis desde 1 hasta 10 $\mu\text{g/ml}$ y la DE 50 se localizó entre 1 y 5 $\mu\text{g/ml}$. Con dosis de 1 $\mu\text{g/ml}$ hubo un crecimiento celular similar o ligeramente por arriba del control, en cambio a dosis de 10 $\mu\text{g/ml}$ hubo 100% de muerte celular (TABLA 1 y 2).

De la tabulación de los datos se observó un comportamiento del tipo dosis-respuesta, similar a las otras lactonas en la línea L 929 con un coeficiente $r=0.88$, mientras que en la línea HEP 2C no hubo esta relación al encontrarse una $r=0.60$. Del análisis con la prueba t de Student para muestras independientes se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las DE 50 calculadas que correspondieron a 6.70 para HEP 2C y a 2.56 $\mu\text{g/ml}$ para L 929 --- ($t=2.26$ para 0 0.05) (TABLA 3).

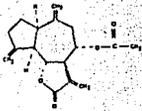
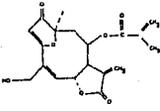
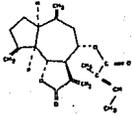
Con la lactona CHE - P en la línea epitelial se encontró -
disminución en el porcentaje de mitosis con respecto al control en -
todas las dosis y cuyos valores van de 23 a 20% para las dosis de 1-
y 5 ug/ml respectivamente. En las células multinucleadas se observó
un ligero aumento sobre el control en todas las dosis, que fluctúa -
entre 115 y 119%. En la línea L 929 se observó un aumento en las mi-
tosis que fué de 119% para la dosis de 1 ug/ml y de 142% para la de-
5 ug/ml; en cuanto a las células multinucleadas el aumento fué de --
152% para la dosis de 1 ug/ml y de 552% para la de 5 ug/ml (TABLA 6).

TABLA 1. EFECTO DE CHE + P, CHE - P Y 17-18 DIHIDROVI-
PININA SOBRE EL CRECIMIENTO CELULAR DE LAS LINEAS
HEP 2C Y L 929.*

| COMPUESTO | LINEA CELULAR | DOSIS ug/ml | PROMEDIO DE PORCENTAJE DE CRECIMIENTO. |
|-----------------------------------|------------------|----------------|---|
| CHE + P | HEP 2C | 0.1 | 100.00 +14.51 |
| | | 1.0 | 56.24 ± 9.75 |
| | | 5.0 | 36.94 ± 5.65 |
| | | 10.0 | 26.18 ± 1.57 |
| | | 50.0 | 1.25 ± 0.24 |
| CHE + P | L 929 | 1.0 | 88.92 ± 0.80 |
| | | 3.0 | 42.13 ± 1.74 |
| | | 5.0 | 29.03 ± 5.18 |
| | | 10.0 | 0.49 ± 0.12 |
| 17-18 DIHIDROVI- GUIEPININA | HEP 2C | 0.5 | 61.16 + 4.57 |
| | | 1.0 | 53.74 ± 6.33 |
| | | 2.0 | 31.34 ± 5.35 |
| | | 4.0 | 9.33 ± 12.52 |
| | | 6.0 | 0.00 ± 0.00 |
| 17-18 DIHIDROVI- GUIEPININA | L 929 | 0.1 | 100.00 +20.31 |
| | | 0.5 | 75.39 ± 16.25 |
| | | 1.0 | 58.02 ± 6.83 |
| | | 2.0 | 13.47 ± 2.17 |
| CHE - P | HEP 2C | 1.0 | 97.67 +12.16 |
| | | 3.0 | 73.47 ± 12.89 |
| | | 5.0 | 71.02 ± 6.73 |
| CHE - P | L 929 | 1.0 | 100.00 ± 1.15 |
| | | 3.0 | 44.75 ± 7.45 |
| | | 5.0 | 20.97 ± 0.45 |
| | | 10.0 | 0.00 ± 0.00 |

* El crecimiento celular se juzgo por conteo celular y porcentaje de viabilidad, como se indica en el texto. Las cifras expresan promedios de porcentajes con respecto al control + desviación estándar de 3 a 4 experimentos efectuados por octuplicado.

TABLA 2. EFECTO DE LAS LACTONAS CHE + P, CHE - P Y 17-18 DIHIDROVIGUIEPININA, SOBRE LA INHIBICION DEL -- CRECIMIENTO CELULAR. *

| COMPUESTO | LINEA CELULAR | DOSIS ug/ml | PROMEDIO DE PORCIENTO DE INHIBICION. |
|--|---------------|-------------|--------------------------------------|
| CHE + P  | HEP 2C | 0.1 | 0.00 |
| | | 1.0 | 43.76 |
| | | 5.0 | 63.06 |
| | | 10.0 | 73.82 |
| | | 50.0 | 98.75 |
| | L 929 | 1.0 | 11.02 |
| | | 3.0 | 57.77 |
| | | 5.0 | 70.97 |
| | | 10.0 | 99.51 |
| | | 10.0 | 99.51 |
| 17-18 DIHIDROVI- GUIEPININA  | HEP 2C | 0.5 | 38.84 |
| | | 1.0 | 46.26 |
| | | 2.0 | 68.66 |
| | | 4.0 | 90.67 |
| | | 6.0 | 100.00 |
| | L 929 | 0.1 | 0.00 |
| | | 0.5 | 24.61 |
| | | 1.0 | 41.98 |
| | | 2.0 | 86.53 |
| | | 2.0 | 86.53 |
| CHE - P  | HEP 2C | 1.0 | 2.33 |
| | | 3.0 | 26.53 |
| | | 5.0 | 28.98 |
| | L 929 | 1.0 | 0.00 |
| | | 3.0 | 55.25 |
| | | 5.0 | 79.03 |
| | | 10.0 | 100.00 |
| | | 10.0 | 100.00 |

* Las cifras expresan promedios de porcentajes con respecto al control de 3 a 4 experimentos efectuados por octuplicado. Las desviaciones estándar son las mismas que en la Tabla 1.

TABLA 3. DOSIS EFECTIVA MEDIA Y LIMITES DE CONFIANZA CALCULADOS POR -- PROBITS.

| COMPUESTO | LINEA CELULAR | DE 50 ug/ml | LIMITES DE CONFIANZA | |
|----------------------------|---------------|-------------|----------------------|----------|
| | | | Inferior | Superior |
| CHE + P | HEP 2C | 2.40 | 0.933 | 6.025 |
| | L 929 | 1.86 | 1.16 | 2.6 |
| 17-18 DIHIDROVIGUIE-PININA | HEP 2C | 0.88 | 0.014 | 1.89 |
| | L 929 | 0.79 | 0.277 | 62.36 |
| CHE - P | HEP 2C | 6.70 | ----* | ----* |
| | L929 | 2.56 | 0.64 | 7.11 |

* Cuando la relación entre la pendiente y el error estándar es muy grande los valores para los límites de confianza no son significativos.

TABLA 4. EFECTO DE LA LACTONA CHE + P SOBRE EL NUMERO DE CELULAS MULTINUCLEADAS Y MITOSIS ENCONTRADAS EN HEP 2C Y L 929.

| DOSIS ug/ml | CELULAS MONONUCLEADAS | | MITOSIS | | CELULAS MULTINUCLEADAS | | TEST DE EXCLUSION |
|----------------|--------------------------|-----|---------|-----|---------------------------|-----|----------------------|
| | Número | %* | Número | %* | Número | %* | Por ciento |
| HEP 2C CONTROL | 931 | 100 | 28 | 100 | 41 | 100 | 95 |
| 0.1 | 954 | 102 | 12 | 64 | 34 | 82 | 97 |
| 1 | 941 | 101 | 18 | 43 | 40 | 98 | 85 |
| 5 | 915 | 98 | 18 | 43 | 67 | 163 | 58 |
| 10 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | 80 |
| 50 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | 6 |
| L 929 CONTROL | 958 | 100 | 28 | 100 | 14 | 100 | 95 |
| 1 | 953 | 99 | 27 | 96 | 20 | 142 | 89 |
| 3 | 917 | 96 | 35 | 125 | 48 | 342 | 84 |
| 5 | 883 | 92 | 42 | 150 | 75 | 535 | 76 |
| 10 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | 5 |

* Los porcentajes son considerados en relación al control

** Dosis a las que no se pudo efectuar el análisis por la elevada inhibición.

TABLA 5. EFECTO DE LA LACTONA 17-18 DIHIDROVIGUIEPININA SOBRE EL NUMERO DE CELULAS MULTINUCLEADAS Y MITOSIS ENCONTRADAS EN HEP 2C Y L 929

| DOSIS ug/ml | CELULAS MONONUCLEADAS | | MITOSIS | | CELULAS MULTINUCLEADAS | | TEST DE EXCLUSION |
|----------------|--------------------------|-----|---------|-----|---------------------------|-----|----------------------|
| | Número | %* | Número | %* | Número | %* | Porcentaje |
| HEP 2C CONTROL | 960 | 100 | 17 | 100 | 26 | 100 | 95 |
| 0.5 | 932 | 97 | 27 | 158 | 46 | 200 | 76 |
| 1 | 929 | 98 | 18 | 105 | 53 | 230 | 79 |
| 2 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | 46 |
| 4 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | 15 |
| 6 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | 0 |
| L 929 CONTROL | 985 | 100 | 20 | 100 | 15 | 100 | 95 |
| 0.1 | 978 | 99 | 6 | 30 | 16 | 106 | 72 |
| 0.5 | 979 | 99 | 6 | 30 | 14 | 93 | 94 |
| 1 | 940 | 95 | 13 | 65 | 47 | 313 | 88 |
| 2 | 925 | 94 | 20 | 100 | 55 | 366 | 92 |

* Los porcentajes son considerados en relación al control.

** Dosis a las que no se pudo realizar el análisis por la elevada inhibición.

TABLA 6. EFECTO DE LA LACTONA CHE - P SOBRE EL NUMERO DE CELULAS MULTINUCLEADAS Y MITOSIS ENCONTRADAS EN HEP 2C Y L 929.

| DOSIS ug/ml | CELULAS MONONUCLEADAS | | MITOSIS | | CELULAS MULTINUCLEADAS | | TEST DE EXCLUSION |
|----------------|--------------------------|-----|---------|-----|---------------------------|-----|----------------------|
| | Número | %* | Número | %* | Número | %* | Por ciento |
| HEP 2C CONTROL | 943 | 100 | 31 | 100 | 14 | 100 | 85 |
| 1 | 947 | 100 | 23 | 74 | 30 | 115 | 80 |
| 3 | 945 | 100 | 25 | 81 | 30 | 115 | 80 |
| 5 | 949 | 101 | 20 | 65 | 31 | 119 | 93 |
| L 929 CONTROL | 962 | 100 | 21 | 100 | 17 | 100 | 86 |
| 1 | 949 | 99 | 25 | 119 | 26 | 152 | 89 |
| 3 | 942 | 98 | 22 | 104 | 36 | 211 | 81 |
| 5 | 875 | 91 | 30 | 142 | 94 | 552 | 74 |
| 10 | ** | ** | ** | ** | ** | ** | 0 |

* Los porcentajes son considerados en relación al control

** Dosis a las que no se pudo realizar el análisis por la elevada inhibición.

LINEA L 929

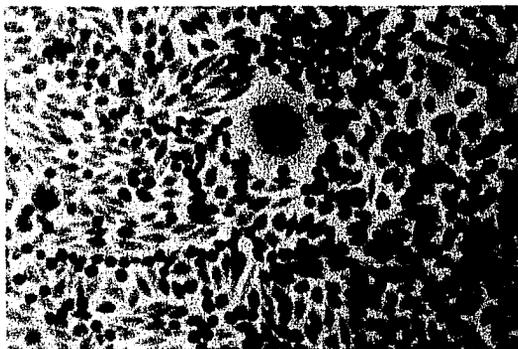


FOTO 1. VISTA MICROSCOPICA
DE CRECIMIENTO NORMAL EN -
MONOCAPA.

FOTO 2.

- a) CELULA MULTINUCLEADA
- b) CELULA EN MITOSIS

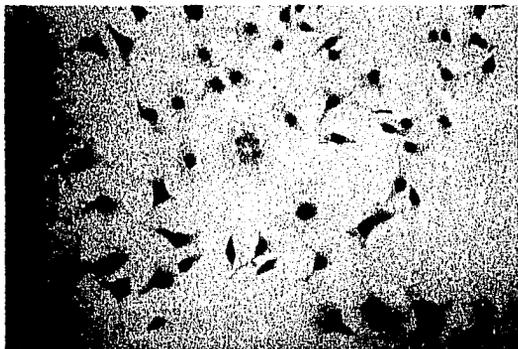
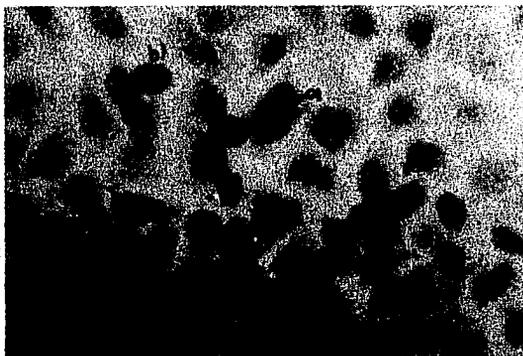


FOTO 3. EFECTO INHIBITORIO DE
LA LACTONA 17-18 DIHIDROVIGUIE
PININA A DOSIS DE 2 ug/ml.
a) CELULA MULTINUCLEADA
b) CELULA EN MITOSIS

LINEA HEP 2C

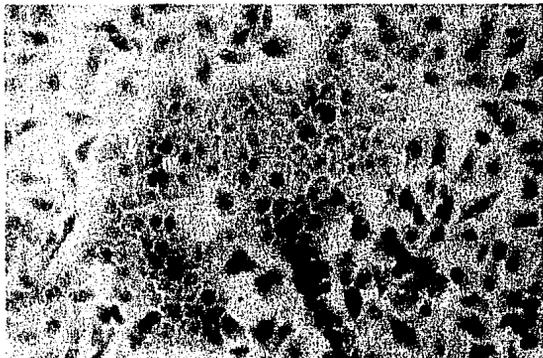


FOTO 4. VISTA MICROSCOPICA DE
CRECIMIENTO NORMAL EN PLACAS.

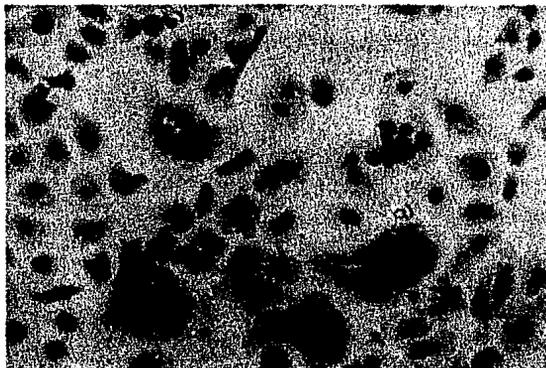


FOTO 5.

- a) CELULA MULTINUCLEADA
- b) CELULA EN MITOSIS



FOTO 6. EFECTO INHIBITORIO DE
LA LACTONA 17-18 DIHIDROVIRGIE
PININA A DOSIS DE 2 ug/ml.

VI. DISCUSION.

El compuesto CHE + P, en la línea HEP 2C a dosis muy elevadas de 50 ug/ml tuvo un fuerte efecto citotóxico, que provocó la muerte celular; al disminuir las dosis el efecto se volvió citostático, lo que indica que el efecto fué probablemente sobre el crecimiento celular, sin afectar en forma considerable la viabilidad. La acción de esta lactona también se observó sobre el número de células multinucleadas, que aumentaron a dosis altas en relación al control, no observándose dicho efecto a dosis bajas del fármaco (47).

En la línea fibroblástica el efecto fué similar al observado en la línea de origen neoplásico en cuanto a viabilidad se refiere, pues se observó una acción citostática apareciendo asimismo las células multinucleadas aumentadas en relación al control. Sin embargo no se observó variación en las mitosis, lo que indicó que las células se siguieron reproduciendo en forma activa a dosis altas y en forma similar al control a dosis menores. Así mismo el compuesto ejerció una acción directa sobre las células, pues el porcentaje de crecimiento en relación al control fué bajo. Esto sugiere que la línea epitelial pudiera ser menos sensible que la fibroblástica a la lactona, como se puede apreciar en el promedio de los porcentajes de crecimiento celular en la TABLA 1.

El análisis de CHE -P indicó un efecto citotóxico sobre el crecimiento celular, como se ve al comparar las columnas de crecimiento y por ciento de viabilidad. La diferencia entre ambas líneas-

celulares se encontró en las células multinucleadas, que fueron considerablemente en mayor cantidad en la línea L 929 que en al HEP 2C; por otro lado, hubo una mínima variación en lo que a las mitosis se refiere, lo que podía deberse a un ciclo de reproducción celular alterado (47). En este caso resultó también más sensible la línea L 929, lo que se confirmó con la diferencia en las DE 50 de ambas, - pues mientras que para la línea epitelial se necesitó de una dosis - aproximada de 6.7 ug/ml para producir el efecto deseado, para la línea fibroblástica se requirió tan solo de 2 ug/ml.

De las tres lactonas estudiadas, la 17-18 Dihidroviguiepi-
nina resultó ser la más efectiva, pues utilizó dosis menores de 1 ug/
ml para alcanzar la DE 50. Por otro lado el estudio morfológico in-
dicó que la línea HEP 2C resultó más afectada, encontrándose un au-
mento en las células multinucleadas al mismo tiempo que aumentaron -
las mitosis. Esto sugiere que el ciclo celular está fuertemente a--
fectado (47). Así mismo la viabilidad celular es baja, probablen-
te como consecuencia de un efecto citotóxico elevado. La línea L 929
también fué afectada, en cuanto a que produjo a dosis altas del com-
puesto una elevación en el número de células multinucleadas, pero --
conforme la dosis disminuyó, éstas se normalizaron en relación al --
control; por lo que a las mitosis se refiere éstas decrecieron al --
disminuir la dosis, lo que supone un efecto del compuesto sobre la -
línea considerada "neoplásica". De todo esto se dedujo que con esta
lactona pudieran efectuarse experimentos posteriores " in vivo ".

Basados en los reportes de Siskin (47), se puede decir que el efecto ejercido por las lactonas estudiadas en nuestro trabajo, - sobre las células, fué en general a nivel de división celular, por - lo que es conveniente hacer notar que con los tres fármacos en la lí - nea L 929 el número de células multinucleadas aumentó de 3 a 5 veces en comparación con el control, mientras que no ocurrió lo mismo con la línea HEP 2C. Analizando las variaciones en el número de células multinucleadas, podemos observar que ambas líneas celulares, tanto - la considerada como "normal", como la "neoplásica", presentan un de - terminado número de este tipo de células en el control, aún sin la - acción de un fármaco. Esto se explica porque las células en cultivo, incluso las de origen normal, presentan de hecho esta característica, misma que se puede ir incrementando con el número de subcultivos que de ella se relícen. Experimentos realizados en pollos y ratones al - ser inoculados con células de este tipo no han producido tumores e - incluso al dividirse una célula multinucleada dá origen a células no - nucleadas (47). Esto podría significar que el aumento de estas cé - lulas por acción del fármaco no significa necesariamente una trans - formación neoplásica. Es un hecho que las células en cultivo presen - tan algunas transformaciones, son células que se vuelven aneplóides - (que presentan un número variable de cromosomas). La acción del fár - maco podría en un momento dado producir alguna alteración a nivel de la citocinesis o de la formación del surco de división celular, pues - to que este fenómeno se ha observado con sustancias que actualmente - se emplean en la quimioterapia (Vincristina, Vinplastina, etc.). En el caso de las lactonas que se estudiaron en este trabajo, para po -

der determinar las causas específicas del aumento de las células multinucleadas y los efectos a nivel de organelos y de ciclo celular, tendríamos que realizar pruebas específicas a nivel de membranas, de cuantificación de proteínas estructurales e incluso de ADN, para poder establecer si existen o no algunas transformaciones neoplásicas por efecto de los fármacos.

Como se ve en la TABLA 1. el promedio de crecimiento celular en presencia de las lactonas mostró variaciones en los valores de las Dosis Efectivas Medias de cada una. Al comparárlas, se observó que las obtenidas con la 17-18 Dihidroviguiepinina son menores a 1 ug/ml, mientras que en el otro extremo se ubicó la CHE - P con una DE 50 de 6.7 ug/ml; de acuerdo con los estudios de Kupchan (30), aquellos compuestos que presenten una dosis menor o igual a 4 ug/ml se pueden considerar con una citotoxicidad significativa. Por otro lado todas ellas se encuentran dentro de los requerimientos indicados para este tipo de estudios en los Protocolos de Análisis de Agentes Químicos y Productos Naturales en Contra de Tumores y Otros Sistemas Biológicos, elaborados por el Cancer Chemotherapy National Service Center (CCNSC). Este dato se localiza en el protocolo para sistemas específicos No. 1-1.901 Cell Culture (Drug evaluation branch National Cancer Institute, National Institutes of Health, Maryland) (6); en donde menciona que los compuestos extraídos de plantas en la fase 1. de estudios deben cumplir con una DE 50 menor o igual a 30 ug/ml y en la fase 2. la DE 50 debe ser menor o igual a 20 ug/ml. Estos datos se obtuvieron con las dosis experimentales y vinieron a-

ser confirmados por el análisis estadístico, donde se observó que — las DE 50 obtenidas al realizar corrección de rectas después de una regresión lineal también se encontraron dentro de estos límites y — muy cercanas a las dosis experimentales. Las diferencias entre ambas se explicó por las desviaciones estándar en los porcentajes de crecimiento (TABLA 1,)

La lactona CHE + P fué ligeramente más tóxica sobre la línea L 929 y completando con el análisis morfológico (TABLA 4), se podría considerar con probabilidades de continuar también sus estudios "in vivo", par analizar si esta sensibilidad se exacerba o se mantiene similar.

La lactona CHE - P afectó a la línea L 929 en forma notable, tanto por las dosis requeridas para la DE 50, que son muy distantes a las necesarias para HEP 2C, así como a nivel celular, de lo que podemos suponer que el fármaco resultó muy tóxico para la línea considerada como "normal" en nuestro sistema.

Se puede atribuir parte de la sensibilidad de la línea fibroblástica L 929 en comparación con la epitelial HEP 2C, al hecho de que los fibroblastos tienen un ciclo celular más corto, es decir que se reproducen más rápidamente; esto sumado a la circunstancia de que la células en reproducción son más sensibles al efecto de un compuesto antitumoral (44), nos explica que en un momento determinado — un mayor número de células se están reproduciendo y resultan más sensibles, aunque se necesitan más experimentos para poder probar las aseveraciones anteriores.

Con respecto a la estructura química de las lactonas estudiadas, misma que fué proporcionada por estudios realizados en el Instituto de Química de la UNAM, la CHE + P es una lactona sesquiterpénica que presenta un grupo δ -lactona- α,β -insaturado y α -metilen- γ -lactona; la diferencia con el compuesto CHE - P, que también posee estos grupos está en el grupo tigloil presente en éste y que vino a sustituir al acetato lateral de la CHE + P. La 17-18 Dihidroviguiepinina presenta un α -metilen- γ -lactona, un grupo cetona- α,β -insaturado y un éster insaturado lateral.

S. Morris Kupchan y otros investigadores (30), en una serie de experimentos con éste tipo de compuestos buscaron la relación entre los grupos funcionales presentes en la estructura y la citotoxicidad. De sus estudios preliminares dedujeron que muchas de las lactonas biológicamente activas, eran α -metilen- γ -lactonas, las cuales tenían otros grupos funcionales como : epóxidos, clorhidridinas, ésteres insaturados, lactonas insaturadas y cetonas insaturadas. La demostrada actividad de estos grupos funcionales con tioles (SH), hizo suponer una alquilación de centros nucleofílicos de un sistema biológico, misma que fué probada y comprobada al hacer reaccionar estos compuestos con cisteína, donde dedujeron que el enlace se efectúa entre el grupo sulfhídrido de la cisteína y el ---

α -metileno exocíclico de la γ -lactona priorotariamente --
(26).

Estudios posteriores de Kupchan y colaboradores demostraron que la estructura básica requerida para la actividad citotóxica de una lactona sesquiterpénica, era el grupo α -metileno- γ -lactona, ya que la hidrogenación del --conjugado redundaba en la inactividad del compuesto (33,-27). Similar a esto la presencia de una cetona α,β -insaturada, en la que el grupo metileno era exocíclico, podría actuar de la misma manera que un α -metileno- γ -lactona (33).

En los compuestos que competen a nuestro trabajo, las tres lactonas presentan un grupo α -metileno- γ -lactona, que les confirió actividad citotóxica. Las diferencias entre las lactonas CHE + P y CHE - P, en cuanto a su efectividad se pueden atribuir a un impedimento estérico provocado por la molécula de tigloil presente en el CHE - P muy cercana al grupo α -metileno de la γ -lactona.

En el caso de la 17-18 Dihidroviguiepinina, además del enlace con el α -metileno de la γ -lactona, podría existir otro más con el metileno del éster lateral, ya -- que Lee y colaboradores demostraron que la presencia del-conjugado $O=C-C=CH_2$, sin necesidad de que provenga de una lactona resulta también activo (33), aunque el producto -

de este enlace se ha obtenido en forma experimental con un exceso de grupos tioles (26), reaccionando, además la presencia de la cetona α,β -insaturada también le confieren mayor actividad citotóxica al compuesto de acuerdo con los reportes de Kupchan (30).

VII. CONCLUSIONES.

El objetivo del proyecto se cumplió, pues se localizaron las Dosis Efectivas Medias de las tres lactonas. Según lo establecido para este tipo de estudios en los protocolos de Cancer Chemotherapy National Service Center, donde se indica que las dosis efectivas-50 deben ser menores o iguales a 20 ug/ml en la fase 2. de estudios, en cultivos celulares; las lactonas analizadas cumplieron lo establecido.

En términos generales la línea L 929, considerada de origen "normal", resultó ser más sensible a la acción de los fármacos en nuestro sistema "in vitro", lo que nos habla de una probable falta de especificidad de los compuestos por las células neoplásicas.

De los compuestos probados se encontró que solo la 17-18--Dihidroviguiépinina tenía una probable acción específica, dado que, aunque las DE 50 fueron muy parecidas, los límites de confianza se encontraron de 20 a 30 veces menos en la línea considerada como neoplásica en relación a la "normal".

De acuerdo con los estudios de Kupchan, Lee y otros investigadores, la estructura química de las lactonas es determinante en la citotoxicidad de las mismas, por la presencia del grupo α -metileno gamma lactona. Para comprobar este hecho y especificar la acción de los compuestos es necesario realizar más pruebas, aunque éstos nos dan parámetros para estudios posteriores en sistemas "in vivo".

APENDICE I

MEDIOS Y REACTIVOS

1. MEDIO BASAL DE EAGLE.

Powdered media of: Grand Island Biological Co. 3175 ---
 Stanley road P.O. Box 68.
 Grand Island, New York 14072
 Cal. # F-15 MEA! with Earles calts, ---
 with L-Glutamine, with 11 on essential-
 amino acids with out Na HCO_3 .

Para 5 litros:

| | |
|-----------|--|
| 49.0 gr. | Medio de Eagle en polvo |
| 11.0 gr. | Bicarbonato de Sodio (Na HCO_3) |
| 50.0 ml. | Piruvato de Sodio 0.01 M |
| 500 ml. | Suero fetal de bovino |
| 100 ug/ml | Estreptomocina |
| 100 UI | Penicilina/ml. |

Manera de hacerse:

Mezclar el medio en polvo en un litro de agua destilada y el bicarbonato en otro litro, mezclarlos; agregar el piruvato de sodio y aforar a 5 litros. No mezclar el bicarbonato de sodio y el -

medio en polvo juntos, porque de lo contrario no quedan disueltos.

Después de que se tiene el medio en polvo, el bicarbonato de sodio y el piruvato en un volumen total de 5 litros, agitar bien y quitar 500 ml. de la solución, entonces agregar 500 ml. de suero fetal y al final los antibióticos. Filtrar el medio lo antes posible para esterilizarlo.

2. PROPILLEN GLICOL : $\text{CH}_3 \text{CHOH CH}_2 \text{OH}$

T. ebullición : 87.4°C

Densidad : 0.038

HARLECO

3. AZUL DE TRIPAN (0.1 %)

Trypanblau. Distributed by: Roboz Surgical Instrument Co.,
Inc. 810. 18th street, N.Y. Washington D.C.
20006.

Pesar 0.1 gr. de Azul de Tripán en polvo y disolver en --
100 ml. de la solución amortiguadora. Conservar en refrigeración.

3.1. SOLUCION AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.2 M a pH 7.2.

SOLUCION A : Fosfato de sodio monobásico 0.2 M

$\text{Na H}_2\text{PO}_4$ 27.58 gr.

H_2O 1000 ml.

SOLUCION B : Fosfato de sodio dibásico 0.2 M

| | |
|---------------------|-----------|
| Na HPO ₄ | 28.38 gr. |
| H ₂ O | 1000 ml. |

Para el pH de 7.2 tomar 28 ml. de la Solución A y 72 ml. de la Solución B, diluir en 200 ml. de agua.

4. SOLUCION DE TRIPSINA 0.25 %.

Agregar 2.5 gr. de tripsina en polvo a un litro de solución P.D. (1X) conc. en un recipiente grande, colocarlo sobre la plancha magnética durante una hora. Dejar reposar la solución 30 minutos o una hora a 4°C. Esterilizar por filtración.

4.1. SOLUCION P.D. (1X) CONC.

| | |
|----------------------------------|----------|
| Na Cl | 8.0 gr. |
| K Cl | 0.2 gr. |
| Na HPO ₄ | 1.15 gr. |
| K H ₂ PO ₄ | 0.2 gr. |
| H ₂ O | 1000 ml. |
| Rojo de fenol | 10.0 mg. |

Colocar las sales en un recipiente de un litro de capacidad y llenar con agua destilada o demineralizada. Conservar a 4°C.

Antes de usarla, calentarla a temperatura ambiente, hasta

que todas las sales estén en solución.

5. SOLUCION SALINA 0.9%.

Na Cl 0.9 gr.

Agua destilada 100 ml.

Pesar 0.9 gr. de cloruro de sodio y disolverlos en 100 --
ml. de agua destilada. Esterilizar por filtración.

APENDICE II

TINCION DE JACOBSON

1. PREPARACION DE COLORANTES.

1.1. MAY GRUNWALD.

| | |
|-----------------------|---------|
| May Grunwald en polvo | 0.3 gr. |
| Alcohol metílico | 100 ml. |

Disolver el colorante en polvo en el alcohol metílico agitando hasta que se disuelva y conservarlo en un frasco ambar.

1.2. GIEMSA.

| | |
|------------------|---------|
| Giemsa en polvo | 0.8 gr. |
| Glicerina | 50 ml. |
| Alcohol metílico | 50 ml. |

Moler la glicerina y el Giemsa en un mortero, mezclar y pasar a un envase. Calentar a baño María a 55°C y 60°C hasta que todo el colorante se disuelva. Enfriar y agregar el alcohol. Guardar 2 o 3 semanas, filtrar y conservarlo en una botella ambar. Se diluye con la solución que se prepara de la siguiente manera:

SOLUCION A :

| | |
|-----------------------------------|----------|
| Fosfato dibásico de sodio anhidro | 9.5 gr. |
| Agua destilada | 1000 ml. |

SOLUCION B :

| | |
|-------------------------------|----------|
| Fosfato de potasio monobásico | 9.7 gr. |
| Agua destilada | 1000 ml. |

SOLUCION DE TRABAJO :

| | |
|----------------|----------|
| Solución A | 61.1 ml. |
| Solución B | 38.9 ml. |
| Agua destilada | 900 ml. |

Se toma una parte de Giemsa por tres partes de la solución amortiguadora

1.3. TINCION DE JACOBSON.

- Lavar los cultivos en solución salina durante 3 minutos
- Fijar las células con alcohol metílico.
- Teñir con May Grünwald filtrado durante 20 minutos.
- Teñir con Giemsa diluido 1:10 durante 15 minutos.
- Deshidratar en dos cambios de acetona y dos cambios de acetona-xilol a partes iguales 5 minutos cada uno.
- Hacer un paso en Xilol un mínimo de 20 minutos.
- Montar en Bálsamo de Canadá.

APENDICE III

FORMULARIO ESTADISTICO.

1. PROMEDIO

$$\bar{X} = \frac{X_1 + X_2 + X_3 + \dots + X_N}{N}$$

Donde N = Número de datos.

2. DESVIACION ESTANDAR.

$$S = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2}{N - 1}}$$

3. COEFICIENTE DE CORRELACION.

$$r = \frac{(SP_{xy})^2}{(SS_x)(SS_y)}$$

Donde:

$$SP_{xy} = \sum XY - \frac{(\sum X)(\sum Y)}{N}$$

$$SS_x = \sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}$$

$$SS_y = \sum Y^2 - \frac{(\sum Y)^2}{N}$$

La significancia de r se estimó por la expresión:

$$t = \sqrt{\frac{r^2 (N - 2)}{1 - r^2}}$$

tomando como nivel de significancia un valor de $p = 0.05$

4. PROBITS.

Este método trabaja con una escala arbitraria de logaritmos base 10 para las dosis y una tabla de valores constantes, ya calculados, que corresponden a los porcentajes de crecimiento con respecto al control.

$$b = \frac{SP_{xy}}{SS_x}$$

$$S_{y.x}^2 = \frac{1}{N - 2} (SS_y - b^2 (SP_{xy}))$$

$$S_{yx} = \sqrt{S_{y.x}^2}$$

$$m = \frac{\bar{Y} - \bar{Y} - (b \bar{X})}{b}$$

Donde:

$$\bar{Y} = \text{PROBIT } 5$$

m = Valor medio correspondiente a la DE 50 en la escala logarítmica arbitraria.

5. LÍMITES DE CONFIANZA.

$$G = \frac{t^2 (S_{yx}^2)}{b^2 (SS_x)}$$

Donde t corresponde a un valor de p 0.05

LÍMITES DE CONFIANZA =

$$\frac{1}{1-g} \left[(m - \bar{X}) \pm \frac{t (S_{yx})}{b} \frac{1-g}{N} + \sqrt{\frac{(m - \bar{X})^2}{SS_x}} \right]$$

6. t DE STUDENT PARA MUESTRAS INDEPENDIENTES.

$$t = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{(N_1 - 1) S_1^2 + (N_2 - 1) S_2^2}{N_1 + N_2 - 2} \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}}$$

Donde:

S^2 = Varianza

para una t con un valor de p 0.05

APENDICE IV

TABLA DE ABREVIATURAS

| | |
|--------|----------------------------------|
| ug | microgramos |
| ml | mililitros |
| gr | gramos |
| mg | miligramos |
| lt | litro |
| hrs | horas |
| ADN | acido desoxiribonucleico |
| DE 50 | Dosis Efectiva Media |
| min | minutos |
| ATPasa | adenosintrifosfatasa |
| TCP | Posibilidad de control del tumor |
| NP | Posibilidad de necrosis |
| Ra | Radio |
| Co | Cobalto |

X. OBRAS CONSULTADAS

1. ALBERCROMBIE, M. " Social behavior of cells in tissue culture --
III. "Mutual influence of sarcoma cells and fibroblasts."
Exp. Cell Research. 13, 1957 : 276-281.
2. BEREMBILM, I. El hombre contra el cáncer. -- Buenos Aires : Ed.-
Candelabro, 1953.-- 129 p.
3. ----- Carcinogenesis as a biological problem. -- Holland : ----
North-Holland Pubs., 1974. -- 324 p.
4. BOUTWELL, R.K. " Some biological aspects of skin carcinogenesis"
-- Prog. Exp. T. Res. 4, 1964 : 207-250.
5. CAMPBELL, T.C. " Chemical carcinogenesis on human risk assesment"
-- Fed.Proc. v.8, n.39, 1980 : 2467-2470.
6. CANCER CHEMOTHERAPY NATIONAL SERVICE CENTER. Protocols for ----
screening chemical agents and natural products against ani-
mal tumors and other biological systems. -- Cancer Chemothe-
rapy Reports. 25, 1962 : p. 22.
7. COMAN, D.R. "Decreased mutual adhesiveness. A property of cells -
from squamous cell carcinomas." -- Cancer Research. 4, ----
1974 : 625-630.
8. COOPER, G.M., S. Okenquist and L. Silverman. "Transforming acti-
vity of DNA of chemically transformed and normal cells." --
Nature. 284, 1980 : 418-421.

9. CORREA, P., J. Arias, R. Pérez Tamayo y L. Carbonell. Texto de - Patología. -- México : La Prensa Médica Mexicana, 1970. -- 489-525.
10. DANIEL, W.W. Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. -- México : Ed. Limusa, 1979. -- 243-268.
11. DELGADO, G., A. Romo de Vivar and. W. Herz. "Sesquiterpene lactones from Viguiera species." -- Phytochemistry. v.8, n.6, -- 1982 : 1305-1308.
12. DE VITA, V. and H.S. Busch. Cancer drug development. Part A. -- U.S.A. : Academic Press, 1979. -- 100-159.
13. ----- "Principles of cancer therapy" en Harrison's principles of internal medicine. -- 9th ed., -- U.S.A. : Mc Graw-Hill-Book Company, 1980. --
14. DOMINGUEZ, X.A. Métodos de investigación fitoquímica. -- México : Ed. Limusa, 1971. -- 53-65.
15. FELIX, J.S. and J.W. Littlefield. "Urinary tract epithelial cell-culture from human urine." -- International Review of Cytology. 10, 1979 : 11-23.
16. GOLDTEIN, A. Biostatistics. An Introductory Text. -- New York : Mac Millan Company, 1964. 360 p.
17. GON, K.Q., A. Baumen, A. Bakameiner, H. Lee and I.E. Wall. "Leukemia in radiations trated patients : Citogenetic studies in 8 cases." -- American Journal Medicine Science. 276, 1978 : 189-195.

18. GONZALEZ, Diddi M., J.M. Trujillo y B. Jrewinko. "Viabilidad de células inmunocompetentes en cultivo de tejidos después de tripsinización." -- Asociación Mexicana de Patología. 7, -- 1969 : 113-118.
19. GROSS, Z. Oncogenic viruses. -- U.S.A. : Pergamon Press, 2nd. -- ed., 1970. -- 7-15.
20. HARIWELL, J.L. and B.T. Abbott. "Antineoplastic principles in -- plants: Recent developments in the field." en Advances in Pharmacology and Chemotherapy. -- U.S.A. : Academic -- Press, 1969. -- 1117-1130.
21. HEROUF, V. "Biochemistry of sesquiterpenoids." en Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry. -- England : Academic -- Press, 1971. -- 53-60.
22. HOELZE, D.F. and M.D. Wallach. "Generalized membrane defects in cancer." -- Medical progress. v. 14, n. 284, 1974 : 761-767.
23. HOPPS, H.C. Patología. -- México : Ed. Interamericana, 1960. -- 226-240.
24. KOLLMAN, R.F. "Methods for study of radiation effects on cancer-cells." en Methods in Cancer Research. -- U.S.A. : Academic Press, v. 4, 1968 : 309-322.
25. KREIG, B.M. Medicina Verde. -- México : CECSA. Editores, 1970.- : 297-310.
26. KUPCHAN, S.M., D.C. Fessler, M.A. Eakin and T.J. Gracabbe. "Reactions of Alpha Methylene Lactone. Tumor Inhibitors with Mo-

- del Biological Nucleophile." -- Science. 168, 1970 : 376-377.
27. ----- "Recent advances in the chemistry of tumor inhibitors of plant origin." -- Trans. N.Y. Acad. Sci. 32, 1970 : 85-106.
28. ----- R.L. Hanson and A. Iardu. "Inhibition of phosphofructokinase by Quinone methide and Aloha-,etilene lactone tumor inhibitors." -- Science. 168, 1970 : 168-171.
29. ----- V.H. Davies, T. Fujita, M.R. Cox and R. Bryan. "A novel antileukemic sesquiterpene lactones from Liatris chapmanii" -- Journal of American Chemistry Society. 93, 1971 : 4916--4918.
30. ----- "Tumor inhibitors 69. Structure-citotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones." -- J. Med. Chem. 14, -- 1971 : 1147-1152.
31. ----- "Novel products with antitumor activity." -- Fed. Proc. - v. 11, n. 33, 1974 : 2288-2295.
32. LEE, K.H., I.H. Hall, S. Mar, C.O. Starnes, S.A. Elgebaldy and T. G. Waddell. "Sesquiterpene antitumor agents : Inhibitors - of cellular metabolism." -- Science. 196, 1977 : 533-537.
33. -----E.S. Huang, C. Piantadosi, J.S. Pagano and T.A. Geissmann.- "Citotoxicity of sesquiterpene lactones." -- Cancer Research 31, 1971 : 1649-1654.
34. MARK, P. and H.E. Johns. "Ultraviolet effects on polinucleotides" en Canadian Cancer Conference. -- U.S.A. : Academic Press, 1967. -- 353-369.

35. MARTINEZ, P.R. Determinación en vegetales de la actividad biológica de lagunas lactonas sesquiterpénicas. -- Tesis (Licenciatura, Facultad de Ciencias, UNAM). -- México D.F.
36. MILLER, E.C. and J.A. Miller. "Mechanism of chemical carcinogenesis." -- Cancer. 47, 1981 : 1055-1064.
37. MULLIGAN, R.M. Syllabus of human neoplasms. -- U.S.A. : Lea and Febiger, 1951. -- 17-25.
38. MURRAY, R.K., R. Suss and H.C. Pitot. "Isolation and characterization of cytoplasmic components of cancer cells." en --- Methods in Cancer Research. -- U.S.A. : Academic Press, v.2 1966 : 239-251.
39. NELSON, N. "Cancer prevention environmental industrial and occupational factors." -- Cancer. 47, 1981 : 1065-1070.
40. NEUSS, N., M. Gorman and J.S. Johnson. "Natural products in cancer chemotherapy." en Methods in Cancer Research. -- U.S.A. : Academic Press, v.3, 1967 : 633-640.
41. ORTEGA, A. and E. Maldonado. "Guaianolides from Gochmatia smithii." -- Phytochemistry. v.21, n.6, 1984 : 1507-1509.
42. PEREZ TAMAYO ,R. Principios de Patología. -- México : Ed. Interamericana, 1960. -- 226-254.
43. REGISTRY OF ANIMAL CELL LINES. Cell Culture Collection Committee -- U.S.A. : U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1964. -- 30P.
44. ROBBINS, S.L. Patología estructural y funcional. -- México : Ed.

Interamericana, 1965. -- 105-125.

45. ROUS, P. and J.G. Kidd. "Conditional neoplasm and subthrestiol - neoplastics states. A study of tar tumors in rabbits." --- Exp. Med. 73, 1941 : 365-389.
46. SETALA, k. "Progress in carcinogenesis. A bio-assay of skin tumor formation." -- Prog. Exp. T. Res. 1, 1960 : 225-278.
47. SISKEN, J.E. "Inhibitors and stimulators in the study of cytokinesis." en Mitosis/Cytokinesis. -- U.S.A. : Academic Press, 1981. -- 437-450.
48. STAEHELIN, L.A. and E.B. Hall. "Junstion between living cells." -- Sci. Amer. 238, 1978 : 140-152.
49. SUIT, H.D. "Effects of radiation on tumor in animals." en Canadian Cancer Conference. -- U.S.A. : Academic Press, 1967. -- 389-395.
50. TELLEZ, M.J., J. Taboada y M. González Diddi. "Citotoxicidad de algunas lactonas sesquiterpénicas "in vitro". -- Archivo de Investigación Médica. 11, 1980 : 435-443.
51. VAN LANCKER, J.L. Molecules, Cells and Disease. -- New York : -- Springen_Verag Inc., 1977. -- 273-290.
52. WAIZEL, B.J. Cultivo, aislamiento y variación de principios activos de tres especies de plantas con propiedades anticancerígenas. -- Tesis (Doctorado, Colegio de Ciencias y Humanidades, UNAM) México, D.F. 1979.

53. WEINHOUSE, S. "Oxidative metabolism of neoplastic tissues." en -
Advances in Cancer Research. -- U.S.A. : Academic Press, --
v.3, 1955 : 270-177.
54. WEISS, P. "Cell interactions." en Canadian Cancer Conference. --
U.S.A. : Academic Press, v.5, 1963 : 241-259.
55. WITHMORE, G.F. and S. Gellyas. "Recovery processes in X-irradiated mammalian cells." en Canadian Cancer Conference. -- U.S. A. : Academic Press. v.7, 1967 : 370-387.