



300627  
33  
24

**UNIVERSIDAD LA SALLE**

**ESCUELA DE QUIMICA**  
**INCORPORADA A LA U.N.A.M.**

**ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD IN VITRO DE 2  
DILACTONAS SESQUITERPENICAS CON POSIBLE  
ACTIVIDAD ANTICANCEROSA**

**T E S I S**

Que para obtener el título de  
**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

**P r e s e n t a**

*Guadalupe Teresita Vidales Ibarra*

México, D. F.

1987



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **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.

## INDICE

	CAPITULO	PAGINA
I.-	RESUMEN	2
II.-	INTRODUCCION	4
III.-	GENERALIDADES	14
IV.-	OBJETIVO	16
V.-	MATERIAL Y METODO	17
VI.-	RESULTADOS	25
VII.-	TABLAS	30
VIII.-	DISCUSION	35
IX.-	CONCLUSIONES	39
X.-	APENDICE	40
XI.-	TABLA DE ABREVIATURAS	51
XII.-	BIBLIOGRAFIA	52

## RESUMEN

EL CÁNCER ES UNA ENFERMEDAD QUE ESTÁ CLASIFICADA COMO NEOPLASIA MALIGNA YA QUE CONSISTE EN UN CRECIMIENTO ANORMAL DE LAS CÉLULAS, CUYA REPRODUCCIÓN NO VA DE ACUERDO CON LA HOMEOSTASIS DEL ORGANISMO.

EN LA ACTUALIDAD SE UTILIZAN VARIOS TRATAMIENTOS TERAPÉUTICOS CON EL FÍN DE INHIBIR O MATAR SELECTIVAMENTE LAS CÉLULAS DAÑADAS, DENTRO DE ESTOS TRATAMIENTOS SE INCLUYE LA QUIMIOTERAPIA QUE TIENE EL OBJETIVO DE EMPLEAR FÁRMACOS CAPACES DE DESTRUIR LAS CÉLULAS CANCEROSAS SIN DAÑAR A LAS CÉLULAS NORMALES, DESGRACIADAMENTE AÚN NO SE HAN ENCONTRADO SUSTANCIAS QUE ACTUEN DE ESTA MANERA, SIN EMBARGO EXISTE UN GRUPO NUMEROSO DE INVESTIGADORES QUE TRABAJAN PARA ESTE FÍN,

DENTRO DE ESTOS TRABAJOS SE ENCUENTRAN EL ESTUDIO DE EXTRACTOS DE PLANTAS, YA QUE ALGUNAS DE ESTAS SUSTANCIAS HAN EVIDENCIADO ACTIVIDAD ANTITUMORAL.

EN PARTICULAR LA CITOTOXICIDAD QUE MUESTRAN ALGUNAS LACTONAS SESQUITERPÉNICAS AISLADAS Y PURIFICADAS DE PLANTAS DE LA FAMILIA DE LAS COMPUESTAS HAN CREADO INTERÉS EN ESTE CAMPO.

EN EL PRESENTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO UNA INVESTIGACIÓN CON RESPECTO A CITOTOXICIDAD Y POSIBLE EFECTO ANTITUMORAL DE DOS DILACTONAS SESQUITERPÉNICAS EXTRAÍDAS DE UNA PLANTA DEL GÉNERO ZINNIA DE LA FAMILIA DE LAS COMPUESTAS, LAS CUALES FUERON PROPORCIONADAS POR EL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNAM UTILIZÁNDOSE DOS LÍNEAS CELULARES, UNA DE ORÍGEN NORMAL, LÍNEA L929 QUE SON CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS DERIVADAS DE TEJIDO CONECTIVO MURINO LM Y OTRA DE ORÍGEN NEOPLÁSICO, LÍNEA HEP 2C, QUE SON CÉLULAS EPITELIALES DERIVADAS DE UN CARCINOMA LARÍNGEO HUMANO.

LOS FÁRMACOS SE PROBARON A DIFERENTES DOSIS "IN VITRO" EN DICHAS LÍ-

NEAS CELULARES Y EN CONDICIONES PREESTABLECIDAS.

SE OTUVIERON LAS DOSIS EFECTIVAS MEDIAS ( $DE_{50}$ ) PARA CADA UNO DE LOS COMPUESTOS, REALIZÁNDOSE ANÁLISIS MORFOLÓGICOS Y SOMETIENDO LOS RESULTADOS A ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

DE LOS RESULTADOS OBTENIDOS SE CONCLUYÓ QUE AMBAS SUSTANCIAS PRESENTARON UN EFECTO CITOTÓXICO TANTO EN CÉLULAS DE ORÍGEN NORMAL COMO EN CÉLULAS DE ORÍGEN NEOPLÁSICO.

AMBAS DILACTONAS CUMPLEN CON LOS REQUERIMIENTOS DE LA CÁNCER CHEMOTHERAPY NATIONAL SERVICE CENTER, AL TENER UNA DOSIS EFECTIVA MEDIA, QUE ES ADMITIDA POR ESTOS PROTOCOLOS, PESE A ELLO, DEBIDO A SU ALTA CITOTOXICIDAD, EN EL CASO DE CONTINUAR CON ESTA INVESTIGACIÓN ES NECESARIO QUE SE LLEVEN A CABO CIERTAS MODIFICACIONES EN LA ESTRUCTURA MOLECULAR DE CADA UNA DE LAS SUSTANCIAS.

## INTRODUCCION.

EN 1775 EN LONDRES, EL CIENTÍFICO SIR PERCIVAL POTT REALIZÓ LOS PRIMEROS ESTUDIOS SOBRE CÁNCER, AL OBSERVAR UNA FRECUENCIA ELEVADA DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE ESCROTO EN LOS MINEROS EXPUESTOS AL CONTACTO COTIDIANO CON EL HOLLÍN (20 (21))

UN SIGLO MÁS TARDE FUÉ CUANDO SE SUGIRIÓ UNA RELACIÓN CAUSAL ENTRE LA APARICIÓN DE CÁNCERES DE PIEL EN LOS OBREROS Y LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS CONTENIDAS EN EL ALQUITRÁN. DESPUÉS DE HABER INDUCIDO CÁNCER DÉRMICO EN ANIMALES EXPUESTOS A EXTRACTOS DEL ALQUITRÁN, KOOK DEMOSTRÓ EN 1933 QUE LA SUSTANCIA RESPONSABLE DE TALES CÁNCERES ERA 3-4 BENZOPIRENO, SIENDO ÉSTA LA PRIMERA CONSTATAción DEL PAPEL CANCERÍGENO DE UNA SUSTANCIA QUÍMICA (22)

DESDE ENTONCES SE HAN REALIZADO NUMEROSOS EXPERIMENTOS IN VIVO E IN VITRO, ASÍ COMO ESTUDIOS ESTADÍSTICOS ORIENTADOS A LA INVESTIGACIÓN DE LA ETIOLOGÍA DE LOS TUMORES (23) (24)

LA ETIOLOGÍA DE UNA ENFERMEDAD ES LA CAUSA PRODUCTORA DE ELLA Y LA PATOGENIA SON LOS MECANISMOS POR LOS CUALES SE PRODUCE Y MANIFIESTA. EL ORGANISMO SÓLO TIENE UN NÚMERO LIMITADO DE FORMAS DE REACCIONAR ANTE LOS CASI INNUMERABLES ESTÍMULOS QUE LO ACOSAN, LO QUE DETERMINA QUE EN MUCHAS OCASIONES LA PATOGENIA DE UN GRUPO DE ENFERMEDADES SEA SEMEJANTE AUNQUE SU ETIOLOGÍA SEA DISTINTA. (25). EN EL CASO DE LAS NEOPLASIAS EL NÚMERO DE AGENTES ETIOLÓGICOS ES ENORME POR LO QUE SE PUEDE CLASIFICAR EN TRES GRUPOS PRINCIPALES:

### 1.- AGENTES QUÍMICOS.

A ESTE GRUPO PERTENECEN LOS CARCINÓGENOS, QUE SON SUSTANCIAS QUÍMICAS CAPACES DE AUMENTAR DE MODO ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICA-

TIVO LA PROPORCIÓN DE CÁNCER EN UNA POBLACIÓN DADA DE SERES VIVOS (26). ESTAS SUSTANCIAS SE PUEDEN ENCONTRAR EN LOS ALIMENTOS COMO COMPUESTOS ACTIVOS QUE FORMAN PARTE DE ELLOS, COMO EN EL CASO DE DETERMINADAS FRUTAS, HORTALIZAS Y HONGOS COMESTIBLES. - COMO ADITIVOS TALES COMO: EDULCORANTES, COLORANTES Y CONSERVADORES O COMO CONTAMINANTES, INSECTICIDAS, FUNGICIDAS Y HERBICIDAS. TAMBIÉN PUEDEN PRESENTARSE COMO RESULTADO DEL PROCESO DE CONSERVACIÓN DE UN ALIMENTO, POR EJEMPLO EL AHUMADO, ASADO, CURADO -- ETC. (27) (28) (29) (30)

## II.- AGENTES FÍSICOS.-

COMPRENDE LAS RADIACIONES; ENTRE ELLAS LOS RAYOS X, RAYOS SOLARES, RAYOS U.V. Y RAYOS GAMMA.

LA HISTORIA DE LOS CÁNCERES PROVOCADOS POR RADIACIÓN EN EL SER HUMANO DATA DESDE LOS PRIMEROS RADIÓLOGOS, QUIENES A VECES COLOCABAN LAS MANOS EN EL HAZ DE RAYOS X PARA COMPROBAR LA FUNCIÓN DE LOS INSTRUMENTOS; MUCHOS PRESENTARON CÁNCERES DE LA PIEL.

LA ENERGÍA RADIANTE EN FORMA DE LUZ U.V. ES CAUSA IMPORTANTE DE CARCINOMA EN LAS ZONAS EXPUESTAS DE LA PIEL. A ELLO SE DEBE LA FRECUENCIA DE 6 A 7 VECES MAYOR DE LOS CÁNCERES CUTÁNEOS EN LAS POBLACIONES DE CIUDADES ASOLEADAS COMO DALLAS EN COMPARACIÓN CON LOS QUE VIVEN EN DETROIT (31) (32)

## III.- AGENTES BIOLÓGICOS.-

### A) PREDISPOSICIÓN GENÉTICA.

LA HERENCIA DESEMPEÑA UN PAPEL IMPORTANTE EN LA EVOLUCIÓN DEL CÁNCER. POR EJEMPLO: LA FRECUENCIA DE CÁNCER EN LOS DESCENDIENTES DE PADRES QUE TIENEN O QUE ADQUIEREN DESPUÉS CÁNCER, ES APROXIMADAMENTE CUATRO VECES MAYOR QUE EN LOS DESCENDIENTES DE PADRES SIN ESTA ENFERMEDAD. ESTE HECHO ES DEMOSTRADO

MUCHO MÁS FÁCILMENTE EN CEPAS PURAS DE ANIMALES DE LABORATO--  
RIO QUE EN LOS SERES HUMANOS. (33) (34) (35)

B) VIRUS.

DEBIDO A QUE LOS VIRUS EN FORMA NATURAL PRODUCEN NEOPLASIAS --  
EN VARIAS ESPECIES ANIMALES, SE PENSÓ EN LA POSIBILIDAD DE QUE  
ELLOS MISMOS FUESEN AGENTES ETIOLÓGICOS EN ALGUNOS TIPOS DE --  
CÁNCER HUMANO. HACE 70 AÑOS SE PENSÓ QUE LOS VIRUS PODRÍAN DAR  
ORÍGEN A TUMORES AL DEMOSTRAR CIUFFO, EN 1907, QUE EL EXTRACTO  
DE VERRUGAS LIBRES DE CÉLULAS ES CAPAZ DE PRODUCIR PAPILOMAS -  
CUANDO SE INOCULABA A HUMANOS. AÑOS MÁS TARDE, SHOPE Y COL. --  
AISLARON UN VIRUS, QUE PRODUCÍA PAPILOMAS EN LOS CONEJOS DOMÉS  
TICOS. ÉSTE VIRUS SE PUDO AISLAR FÁCILMENTE DE LOS PAPILOMAS -  
INDUCIDOS EN FORMA EXPERIMENTAL Y ADEMÁS, SE TRANSMITIÓ A NUE-  
VOS ANIMALES, REPRODUCIÉNDOSE LA ENFERMEDAD. PERO CUANDO ESTE  
VIRUS ERA INOCULADO A CONEJOS SALVAJES, LO QUE SE OBTENÍA NO -  
ERAN PAPILOMAS SINO CARCINOMAS MALIGNOS, DE LOS CUALES NO ERA  
POSIBLE AISLAR EL AGENTE VIRAL INFECCIOSO.

ÉSTA FUÉ LA PRIMERA EVIDENCIA EN QUE UN VIRUS ERA CAPAZ DE -  
CAUSAR UNA TRANSFORMACIÓN NEOPLÁSICA EN AUSENCIA DE PRODUCCIÓN  
DE MATERIAL INFECCIOSO. (36) (37)

LA NEOPLASIA ES UNA NEOFORMACIÓN CONSTITUÍDA POR ACUMULACIÓN ANOR-  
MAL DE CÉLULAS, CUYO CRECIMIENTO EXCEDE DE LOS TEJIDOS NORMALES Y ES -  
INCOORDINADO CON EL DE LOS MISMOS. SE CLASIFICA EN DOS GRANDES GRUPOS:  
NEOPLASIAS BENIGNAS Y NEOPLASIAS MALIGNAS.

NOMENCLATURA:- LA MAYOR PARTE DE LOS TUMORES BENIGNOS SE DESIGNAN  
HISTOLOGICAMENTE AL AGREGAR EL SUFIJO-OMA AL NOMBRE DE LA CÉLULA DE LA  
CUAL PROVIENE EL TUMOR. POR EJEMPLO: CÉLULAS DEL TEJIDO FIBROSO SE LLA  
MAN FIBROMAS.



LOS TUMORES MALIGNOS SE CLASIFICAN POR EL ÓRGANO EN EL CUAL SE --  
PRODUCEN Y POR EL TIPO DE TEJIDO O CÉLULA QUE LES DA ORÍGEN, Y SE SUBDI  
VIDEN EN 4 GRUPOS:

- 1.- LAS NEOPLASIAS MALIGNAS ORIGINADAS EN LAS CÉLULAS EPITELIALES  
QUE PROVIENEN DE CUALQUIERA DE LAS TRES CAPAS GERMINATIVAS Y -  
SE LES LLAMA CARCINOMAS, POR EJEMPLO ADENOCARCINOMAS,
- 2.- LAS NEOPLASIAS MALIGNAS QUE SE ORIGINAN EN EL TEJIDO MESENQUI  
MATOSO SE DENOMINAN SARCOMAS; ESTÁN COMPUESTAS DE NUMEROSAS -  
CÉLULAS, GENERALMENTE ALARGADAS QUE FORMAN MASAS COMPACTAS IN  
FILTRANTES, ASÍ EL TUMOR MALIGNO DE TEJIDO FIBROSO SE DENOMI  
NA FIBROSARCOMA,
- 3.- TUMORES MALIGNOS DE TEJIDOS Y ÓRGANOS ESPECIALES COMO LOS GLIO  
MAS DEL CEREBRO,
- 4.- LEUCEMIAS Y LINFOMAS (25) (38) (39)

#### CARACTERÍSTICAS DE LAS NEOPLASIAS.

##### A) NEOPLASIA BENIGNA.

LOS TUMORES BENIGNOS SUELEN ESTAR FORMADOS POR CÉLULAS SEMEJAN  
TES A LAS DE ORÍGEN; SON BIEN DIFERENCIADAS AUNQUE SUFRIERON -  
ALTERACIONES SUBMICROSCÓPICAS CELULARES PARA QUE SE PRODUJERA  
LA MASA TUMORAL.

##### B) NEOPLASIA MALIGNA.

LAS CÉLULAS DE TUMORES MALIGNOS EN GENERAL HAN PERDIDO TODA -  
SEMEJANZA CON LAS CÉLULAS NORMALES. LAS CÉLULAS Y SUS NÚCLEOS  
SON PLEOMÓRFICOS, A MENUDO EL NÚCLEO OCUPA LA MAYOR PARTE DE -  
LA CÉLULA, HAY MAYOR ACUMULACIÓN DE CROMATINA, EN MULTIPLES -  
OCASIONES LOS NUCLEÓLOS SON MUY GRANDES Y A VECES SE RODEAN -  
DE UN HALO, A NIVEL DE MEMBRANA CELULAR SE PIERDEN ANTÍGENOS  
Y SE ALTERA EL FENÓMENO DE LA "INHIBICIÓN POR CONTACTO", SE GA

NAN NUEVAS MOLÉCULAS QUE ANTES NO SE SINTETIZABAN EN EL TEJIDO NORMAL DEL CUAL DERIVÓ LA CÉLULA NEOPLÁSICA, SE DETECTA DISMINUCIÓN DE LA ADHESIVIDAD ENTRE UNA CÉLULA Y OTRA, - DISMINUCIÓN DE UNIONES HERMÉTICAS Y DESAPARICIÓN DE ANTÍGENOS ORGANOESPECÍFICOS (25) (40)

ÉSTAS ALTERACIONES MORFOLÓGICAS A MENUDO GUARDAN RELACIÓN, - AUNQUE NO INVARIABLEMENTE, CON ABUNDANTES MITOSIS E ÍNDICE DE ACTIVIDAD RÁPIDA DE CRECIMIENTO; MUCHAS DE ESTAS MITOSIS SON ANORMALES, BIPOLARES, TRIPOLARES Y MULTIPOLARES.

LOS TUMORES MALIGNOS CONTRASTAN CON LOS EQUIVALENTES BENIGNOS YA QUE SE CARACTERIZAN POR CRECIMIENTO INFILTRATIVO Y - EROSIVO. ÉL TUMOR SE EXTIENDE POR LOS PLANOS DE MENOR RESISTENCIA CAUSANDO EROSIÓN Y DESTRUYENDO TEJIDOS NORMALES.

LA FACULTAD DE DAR METÁSTASIS ES CARÁCTER QUE DISTINGUE A - LOS TUMORES MALIGNOS DE LOS BENIGNOS, LOS TUMORES BENIGNOS NO LA PRESENTAN.

LA EVOLUCIÓN DE UNA METÁSTASIS COMPRENDE VARIOS FENÓMENOS:

- 1.- DEBEN LIBRARSE CÉLULAS O FRAGMENTOS TUMORALES QUE TENGAN LA FACULTAD DE SUPERVIVENCIA AUTÓNOMA.
- 2.- DEBEN EXISTIR VÍA DE DISEMINACIÓN.
- 3.- ES OBLIGADO QUE EN EL SITIO DE IMPLANTACIÓN HAYA UN MEDIO - ADECUADO PARA QUE SE ESTABLEZCA Y CREZCA LA SIEMBRA (25) - (39) (41)

EXISTE UN MODELO HIPOTÉTICO DEL PROCESO DE LA CARCINOGENESIS EL - CUAL SE PUEDE DIVIDIR EN DOS ETAPAS PRINCIPALMENTE.

1.- INICIACIÓN Y

2.- PROMOCIÓN

EN LA INICIACIÓN UN AGENTE QUÍMICO, CARCINÓGENO O SUS PRODUCTOS DE BIOTRANSFORMACIÓN INTERACCIONAN CON EL ÁCIDO DESOXIRIBONUCLEICO (ADN) DE UNA CÉLULA SOMÁTICA NORMAL, EXISTIENDO UNA ALTERACIÓN MOLECULAR DE LA CÉLULA LLEGANDO A SER UNA CÉLULA TRANSFORMADA. LA LESIÓN EN EL ADN PUEDE SER REPARADA POR LA CÉLULA PARA RESTITUIR LA NORMALIDAD. SI ELLO NO OCURRE ANTES QUE LA CÉLULA SE DIVIDA, ENTONCES, EN LAS CÉLULAS HIJAS, SE HABRÁ PERPETUADO LA TRANSFORMACIÓN. LA CÉLULA TRANSFORMADA ES UNA ENTIDAD QUE POTENCIALMENTE PUEDE LLEGAR A EVIDENCIAR QUE POCHEE ALTERACIONES IRREVERSIBLES EN PARTES DEL MATERIAL GENÉTICO QUE CONTROLAN LOS PROCESOS DE CRECIMIENTO Y DUPLICACIÓN CELULAR Y DAR LUGAR A UN CÁNCER, PARA QUE ESA POTENCIALIDAD SE MANIFIESTE LA CÉLULA TRANSFORMADA DEBE SER OBJETO DE UNA PROMOCIÓN. ESA PROMOCIÓN PUEDE HACER QUE SE FORME UNA CLONA DE CÉLULAS ALTERADAS SUFICIENTES PARA CONSTITUIR UN TUMOR Y OBTENER UN CÁNCER (26)

TRATAMIENTOS TERAPEUTICOS CONTRA EL CANCER.

LOS TRATAMIENTOS TERAPÉUTICOS ESTÁN DIRIGIDOS HACIA LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL, PERMITIENDO QUE EL RESTO DEL ORGANISMO QUEDE SIN DAÑO. ÉSTOS TRATAMIENTOS PUEDEN DIVIDIRSE EN 4 TIPOS:

- A) QUIRÚRGICOS.
- B) RADIOLÓGICOS.
- C) QUIMIOTERÁPICOS.
- D) INMUNOLÓGICOS.

A) QUIRÚRGICOS.- LA CIRUGÍA DEL CÁNCER SIGUE SIENDO HASTA AHORA EL TRATAMIENTO DE ELECCIÓN DE ESTE TIPO DE NEOPLASIAS.- EL OBJETIVO DE ESTE PROCEDIMIENTO ES EL DE CONSEGUIR UNA CU

RA TOTAL O PARCIAL DEL CÁNCER, ESTO ES DEPENDIENDO DEL ESTADÍO EN QUE SE ENCUENTRA LA TUMORACIÓN; ESTO SE CONSIGUE CONTANDO CON EL APOYO DEL ESTUDIO HISTOPATOLÓGICO, PARA DE TERMINAR LA EXTENSIÓN DEL PROCESO TUMORAL, POR EJEMPLO; SI EL TUMOR ES PRIMARIO, LOCALIZADO Y NO HAY METÁSTASIS, CAE EN LA POSIBILIDAD DE SER UNA CURA TOTAL, PORQUE SE EVITA LA DISEMINACIÓN DE LAS CÉLULAS CANCEROSAS; PERO SI HAY METÁSTA SIS, ENTONCES SERÁ UNA CURA PARCIAL O PALIATIVA CON EL FÍN DE DISMINUIR LA SINTOMATOLOGÍA Y PROLONGAR LA ESPERANZA DE VIDA.

- B) RADIOLÓGICOS.- LA RADIOTERAPIA ES OTRO TIPO DE TRATAMIENTO QUE SE LLEVA A CABO EN PACIENTES CON CÁNCER. SE UTILIZA FRE CUENTEMENTE DESPUÉS DE LA CIRUGÍA EN UNOS CASOS PARA PODER REMITIR TOTALMENTE EL PADECIMIENTO Y EN OTROS COMO TRATA--- MIENTO PALIATIVO. DEBEMOS TOMAR EN CUENTA QUE LA TUMORACIÓN SEA RADIOSENSIBLE Y DEPENDIENDO DE ESTO SE OBTENDRÁ UN MÁXI MO EFECTO TERAPÉUTICO.
- C) QUIMIOTERAPIA.- ES OTRA ALTERNATIVA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER E IMPLICA EL EMPLEO DE PRODUCTOS CAPACES DE LOCALIZAR, IDENTIFICAR Y DESTRUÍR CÉLULAS Y TEJIDOS MALIGNOS SIN DAÑAR A LOS NORMALES. NORMALMENTE SE APLICA ESTE TRATAMIENTO A PA CIENTES QUE POR ALGÚN MOTIVO NO SE PUEDEN INTERVENIR QUIRÚR GICAMENTE, PERO TAMBIÉN SE APLICA ANTES Y DESPUÉS DE LA CIRU GÍA PARA EVITAR METÁSTASIS, ASÍ COMO LA DESTRUCCIÓN DE RESÍ- DUOS QUE HAYAN QUEDADO. (25) (42)
- D) INMUNOTERAPIA.- LA INMUNOTERAPIA EN EL CÁNCER, ESTÁ SIENDO OTRA DE LAS POSIBLES ALTERNATIVAS PARA EL TRATAMIENTO DE ES TA ENFERMEDAD MALIGNA EN EL HUMANO, ESTO ES EN BASE A ESTU-

DIOS LLEVADOS A CABO EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN, YA QUE EN EL HUMANO ES TODAVÍA UN ASPECTO CIRCUNSTANCIAL, TENEMOS QUE ALGUNOS ESTUDIOS HAN DEMOSTRADO Poca O NULA CORRELACIÓN DE LA INMUNOTERAPIA EN LA EVOLUCIÓN DEL TUMOR; DEBIDO A ESTO LA MAYOR PARTE DE LOS ENSAYOS DE INMUNOTERAPIA HAN ADOPTADO UN MEDIO EMPÍRICO; ES DECIR INTENTANDO EL USO DE COADYUVANTES INMUNOLÓGICOS. (43)

### BUSQUEDA DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD ANTITUMORAL

EL PRINCIPIO DE LA QUIMIOTERAPIA MODERNA DEL CÁNCER SE INICIA CON EL DESCUBRIMIENTO DE FARBER Y GILMAN EN LA DÉCADA DE LOS 40's, AL DEMOSTRAR QUE CON MEDICAMENTOS DERIVADOS DE LA MOSTAZA NITROGENADA SE PODÍAN CURAR NIÑOS LEUCÉMICOS (44)

DESDE ENTONCES A EXISTIDO UNA BÚSQUEDA INTENSA DE FÁRMACOS CAPACES DE INHIBIR SELECTIVAMENTE EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS TUMORALES SIN HACER DAÑO EXCESIVO A LAS CÉLULAS NORMALES.

EXISTE EN LA ACTUALIDAD UNA SERIE DE AGENTES ANTINEOPLÁSICOS DE DIFERENTES ORÍGENES ENTRE LOS QUE SE INCLUYEN, EXTRACTOS DE PLANTAS, AGENTES QUÍMICOS SINTÉTICOS Y DE ORIGEN ANIMAL.

ESTOS AGENTES DE ACUERDO A RONALD O KUN Y COLABORADORES (1) SE PUEDEN CLASIFICAR EN:

- A) AGENTES ALQUILANTES.
- B) ANTIMETABOLITOS.
- C) HORMONAS.
- D) EXTRACTOS DE PLANTAS.
- E) OTROS AGENTES

ES MUY IMPORTANTE Y ÚTIL EL USO DE LAS SUSTANCIAS QUÍMICAS BIOLÓGICA

MENTE ACTIVAS QUE TIENEN SU ORIGEN EN EL REINO VEGETAL.

EXISTE UN GRUPO NUMEROSO DE INVESTIGADORES, DISTRIBUIDO POR TODO EL MUNDO QUE TRABAJAN CON DERIVADOS DE VEGETALES.

EL PAPIRO MÁS ANTIGUO CONOCIDO SOBRE PLANTAS, ORIGINARIO DE EGIPTO ES EL PAPIRO DE EBERS, DONDE SE HACE MENCIÓN DE PLANTAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER. EL ESFUERZO DESDE ESE ENTONCES Y LA PERSISTENCIA DE CURANDEROS POPULARES Y MÁS RECIENTEMENTE DE MÉDICOS E INVESTIGADORES DE LAS DIFERENTES DISCIPLINAS DE LA CIENCIA HA SIDO FINALMENTE RECOMPENSADO POR EL DESCUBRIMIENTO DEL PRIMER FÁRMACO ÚTIL CLINICAMENTE DE ORIGEN VEGETAL DESCUBIERTO EN 1958 Y LLAMADO VINCALEUKO - BLASTINE. (45)

EN UN ESTUDIO EFECTUADO EN 1967 SE INFORMÓ LA EXISTENCIA APROXIMADA DE 3,000 ESPECIES DE PLANTAS USADAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER (2) (45)

EN PARTICULAR EL ESTUDIO DE LA CITOTOXICIDAD QUE MUESTRAN VARIAS DE LAS LACTONAS SESQUITERPÉNICAS AISLADAS DE MIEMBROS DE LA FAMILIA - COMPOSITAE TRATADA POR KUPCHAN Y POR HERZ SEGUIDA MÁS TARDE POR LA DEMOSTRACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL IN VIVO, CREARON INTERÉS - EN TODO ESTE TIPO DE SUSTANCIAS.

LAS SESQUITERPENLACTONAS SE ENCUENTRAN PRINCIPALMENTE EN EXTRACTO DE FLORES O PARTES AÉREAS DE LAS COMPUESTAS, TAMBIÉN SE HAN ENCONTRADO EN ALGUNAS UMBELÍFERAS. ESTAS SUSTANCIAS SON DE SABOR AMARGO, DE FARMACOLOGÍA POCO ESTUDIADA, CATALOGADAS COMO METABOLITOS SECUNDARIOS, POSEEN OLOR LEVE DEBIDO A SU BAJA VOLATILIDAD, INSOLUBLES EN ÉTER DE PETRÓLEO, INSOLUBLES EN AGUA, SOLUBLES EN ETANOL Y METANOL CALIENTE, SOLUBLES EN CLOROFORMO Y ÉTER ETÍLICO, UTILIZÁNDOSE ESTAS PROPIEDADES PARA SU EXTRACCIÓN Y SEPARACIÓN. (46)

EL AMPLIO RANGO DE ACTIVIDAD BIOLÓGICA EXHIBIDA POR LAS LACTONAS SE HA ESTUDIADO DURANTE VARIOS AÑOS; ALGUNAS SE HAN UTILIZADO COMO AMEBICIDAS, ANTIHELMÍNTICAS, ANALGÉSICAS Y OTRAS DE ELLAS COMO LA ALANTOLACTONA SON FITOTÓXICAS, OTRAS COMO LA ELEFANTINA, ELEFANTOPINA Y HELENALINA TIENEN ACTIVIDAD ANTITUMORAL Y/O ANTILEUCÉMICA. (44) (47) (48)

EL ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE ESTRUCTURA Y ACTIVIDAD REVELAN INTERACCIONES GENERALES MUY VALIOSAS EN ESTAS LACTONAS SESQUITERPÉNICAS. LA ESTRUCTURA QUÍMICA DE LAS LACTONAS SESQUITERPÉNICAS MUESTRAN UNA VARIACIÓN CONSIDERABLE EN SU ESQUELETO DE CARBONO Y CONTIENE UNA VARIEDAD DE COMBINACIONES DE GRUPOS FUNCIONALES; COMO EPÓXIDOS, ÉSTERES NO SATURADOS Y LACTONAS NO SATURADAS.

KUPCHAN Y COLABORADORES ENCONTRARON QUE LA PRESENCIA DE UNA  $\alpha$  METILEN  $\gamma$  LACTONA ES ESENCIAL PARA SU ACTIVIDAD CITOTÓXICA Y QUE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA ES INCREMENTADA POR LA PRESENCIA DE CIERTOS GRUPOS FUNCIONALES CARBONILO  $\alpha, \beta$  INSATURADOS ADICIONALES. (11)

KUPCHAN Y COLABORADORES DEMOSTRARON QUE EL GRUPO METILEN CONFIERE UNA ACCIÓN ALQUILANTE Y QUE SU ACTIVIDAD BIOLÓGICA PUEDE ENCONTRARSE EN SU CAPACIDAD DE ALQUILACIÓN DEL CENTRO NUCLEOFÍLICO DEL SISTEMA BIOLÓGICO ESTUDIADO (15) (17) (18)

## GENERALIDADES:

LA ALTA INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD NEOPLÁSICA, LAS LIMITACIONES - OBIAS DE LOS MÉTODOS QUIRÚRGICOS Y RADIOLÓGICOS Y LOS RESULTADOS NO SATISFATORIOS DE LA QUIMIOTERAPIA, HAN IMPULSADO A UNA BÚSQUEDA INTENSA DE AGENTES CAPACES DE SUPRIMIR SELECTIVAMENTE EL CRECIMIENTO DE CÉLULAS NEOPLÁSICAS QUE DEBEN SER LETALES O INCAPACITAR A LAS CÉLULAS TUMORALES SIN HACER DAÑO EXCESIVO A LAS CÉLULAS NORMALES (1) (2).

AUNQUE SE HAN EFECTUADO GRANDES PROGRESOS EN BIOLOGÍA DEL CÁNCER, FARMACOLOGÍA MOLECULAR, FARMACOCINÉTICA Y OTROS CAMPOS RELACIONADOS, EL OBJETIVO DE ENCONTRAR NUEVOS FÁRMACOS EFECTIVOS ESTÁ AÚN LEJOS DE ALCANZAR (3) (4) (5).

LAS PLANTAS HAN SIDO ESTUDIADAS PARTICULARMENTE EN BUSCA DE NUEVOS FÁRMACOS, DESDE LOS PRIMEROS INTENTOS PRIMITIVOS EN MEDICINA, BASADOS EN LA ESPECULACIÓN Y SUPERSTICIÓN, HASTA LA UTILIDAD DE SUSTANCIAS QUÍMICAS DERIVADAS DE PLANTAS QUE SEAN BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS Y ÚTILES COMO MEDICAMENTOS (6) (7) (8).

A FINALES DE LA DÉCADA DE LOS 60'S SE INFORMÓ LA EXISTENCIA APROXIMADA DE 3000 ESPECIES DE PLANTAS USADAS EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER, LO CUAL MOTIVÓ A FORMAR GRUPOS DE INVESTIGADORES EN DIVERSOS PAÍSES QUIENES HAN ESTABLECIDO VARIOS OBJETIVOS ENTRE LOS QUE SE INCLUYEN:

- 1.- EL DESCUBRIMIENTO DE AGENTES ACTIVOS QUE PUEDAN UTILIZARSE -- COMO FÁRMACOS ANTICÁNCEROSOS.
- 2.- EL DESCUBRIMIENTO DE AGENTES QUE AL MODIFICARSE QUÍMICAMENTE TENGAN ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA.
- 3.- EL DESCUBRIMIENTO DE AGENTES CON ESTRUCTURA NUEVA Y MECANISMOS DE ACCIÓN QUE PUEDAN USARSE EN EL ESTUDIO DE LA CÉLULA TUMORAL (9) (10) (11) (12).

SE HAN AISLADO PRINCIPIOS ACTIVOS DEL TIPO LACTONAS SESQUITERPÉNICAS, SUSTANCIAS PROCEDENTES DE PLANTAS DE LA FAMILIA DE LAS COMPUESTAS (13) (14). DE LAS CUALES SE CONOCE SU AMPLIA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DESTACANDO SU PROPIEDAD CITOTÓXICA QUE --



PUEDE SER APROVECHADA PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER (15) - (16) (17) (18).

EN EL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, SE AISLARON 8 NUEVOS PRINCIPIOS ACTIVOS DE UNA PLANTA DEL GÉNERO ZINNIA DE LA FAMILIA DE LAS COMPUESTAS Y - EN ESTE TRABAJO SE ESTUDIÓ EL EFECTO DE 2 DE ESTOS COMPUESTOS QUE SON DILACTONAS SESQUITERPÉNICAS, PARA COMPROBAR SU -- CITOTÓXICIDAD IN VITRO Y DETERMINAR SU POSIBLE ACTIVIDAD ANTI CANCERÍGENA (19).

OBJETIVO:

ANALIZAR LA CITOTOXICIDAD DE 2 DILACTONAS SESQUITERPÉNICAS EN 2 LÍNEAS CELULARES, UNA DE ORIGEN NORMAL Y OTRA DE ORIGEN -- NEOPLÁSICO.

DETERMINAR SU DOSIS EFECTIVA MEDIA IN VITRO Y DEMOSTRAR SI -- PUEDEN SER ACEPTADAS COMO POSIBLES AGENTES ANTITUMORALES.

## MATERIAL Y METODO

### 1.- MATERIAL

#### A) MATERIAL-BIOLÓGICO.

SE UTILIZARON 2 LÍNEAS CELULARES, CUYAS CARACTERÍSTICAS CUMPLEN CON LOS REQUERIMIENTOS PARA EXPERIMENTOS DE CITOTOXICIDAD.

##### 1.- LÍNEA-L-929.-

CÉLULAS FIBROBLÁSTICAS L 929 DERIVADAS DE TEJIDO CONECTIVO MURINO LM, PROVENIENTE DE UNA CLONA NCTC 929 DE RATÓN.

LA CEPA L ORIGINAL FUÉ DERIVADA DE TEJIDO AREOLAR SUBCUTÁNEO Y ADIPOSEO 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, ETC. LA LÍNEA L 929 SE CULTIVA EN MEDIO BASSAL EAGLE. (APENDICE 1)

SU MORFOLOGÍA ES DEL TIPO DE LOS FIBROBLASTOS.

LA LÍNEA L 929 SE ENCONTRABA EN EL SUBCULTIVO # 85 DEL LABORATORIO AL INICIO DEL EXPERIMENTO. (49)

##### 2.- LÍNEA-HEP-2-C

CÉLULAS EPITELIALES HEP 2C DERIVADAS DE UN CARCINOMA LARÍNGEO HUMANO. LÍNEA ESTABLECIDA POR A.E. MOORE, L. SABACHWSKY Y H. W. TOOLAN EN 1952. PROVENIENTES 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.

LÍNEA QUE HA SIDO UTILIZADA 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 MEDIO BASAL EAGLE, SU MORFOLOGÍA ES DE TIPO EPITELIAL.

LA LÍNEA HEP 2C SE ENCONTRABA EN EL SUBCULTIVO # 184 DEL LABORATORIO AL INICIO DEL EXPERIMENTO (49)

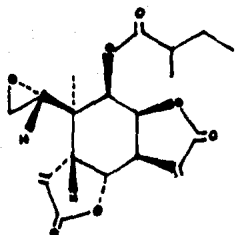
#### B) MATERIAL QUIMICO.

LAS SUSTANCIAS QUE SE UTILIZARON EN EL PRESENTE TRABAJO SON DOS DILACTONAS SESQUITERPÉNICAS QUE FUERON PROPORCIONADAS POR EL INSTITUTO DE QUÍMICA DE LA UNAM, EXTRAÍDAS DE UNA PLANTA DEL GÉNERO ZINNIA DE LA FAMILIA DE LAS COMPUESTAS, LA CUAL FUE RECOLECTADA EN SALINA CRUZ OAXACA Y DEPOSITADA EN EL HERBARIO DEL INSTITUTO DE BIOLOGÍA DE LA UNAM (MEXV-359508)

3.5 KG DE DICHA PLANTA FUERON SOMETIDOS A UNA EXTRACCIÓN EN DICLOROMETANO, OBTENIENDO 157 GRS DE EXTRACTO SECO, EL CUAL FUE PERCOLADO EN UNA COLUMNA DE TONSIL, Y ELUIDA CON HEXANO, DICLOROMETANO Y ACETONA OBTENIENDO 44.5, 78.7 Y 21.6 GRS DE RESIDUO RESPECTIVAMENTE. LA FRACCIÓN DE DICLOROMETANO (78.7 GRS) FUE PERCOLADA EN SÍLICA GEL (MERCK 6) CON HEXANO Y ACETATO DE ETILO, CON LA FRACCIÓN DE ACETATO DE ETILO (50 GRS) SE LLEVÓ A CABO UNA CROMATOGRFIA EN COLUMNA SOBRE 1000 GRS DE SÍLICA GEL (70 - 230 MALLAS) USANDO COMO ELUYENTE HEXANO-ACETATO DE ETILO. DE LA FRACCIÓN ELUIDA HEXANO-ACETATO DE ETILO (7:3) SE OBTUVO UNA MEZCLA DE ZINNIA FLAVICOMA A-F LA CUAL FUE SEPARADA POR CROMATOGRFIA EN COLUMNA DE SÍLICA GEL, OBTENIENDO 3.47 GRS DE LA ZINAFLAVIN B O DILACTONA II Y 5.03 GRS DE LA ZINAFLAVIN D O DILACTONA

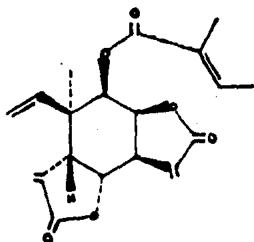
III.

ESTRUCTURA QUÍMICA DE LOS FÁRMACOS



DILACTONA III

(ZINAFLAVIN D)



DILACTONA II

(ZINAFLAVIN B)

DILACTONA III (ZINAFLAVIN D)

PRESENTA UN PUNTO DE FUSIÓN.- 180-183°C (ACETATO DE ETILO-HEXANO)

PRESENTA UN MÁXIMO DE ABSORCIÓN DE ULTRAVIOLETA  $\lambda_{\text{MAX}}^{\text{EtOH}}$  DE 214 --

NM, CON UN COEFICIENTE DE ABSORTIVIDAD DE 10983, PRESENTA EN EL PO

LARÍMETRO UN  $[\alpha]_D^{25} + 1.77$  (c 0.226; CHCl<sub>3</sub>) EN EL I.R V  $\text{CHCl}_3$  EN -

CM<sup>-1</sup> PRESENTANDO UN NÚMERO DE ONDA MÁXIMO, CON LÓS SIGUIENTES ---

PICOS: 1774, 1752, 1665.

EN EL ESPECTRO DE MASA (EIMS) 70 EV PRESENTA EN FRAGMENTO M/E: 376  
 $[M]^+$  + IÓN MOLECULAR  $C_{20}H_{24}O_9$ , M/E 348 POR PÉRDIDA DE CO DEL IÓN  
 MOLECULAR  $[M-CO]^+$  ; M/E 332 POR PÉRDIDA DE  $CO_2$  DEL IÓN MOLECULAR  
 $[M-CO_2]^+$  , M/E 292 POR PÉRDIDA DE  $C_5H_8O$  DEL IÓN MOLECULAR ----  
 $[M-C_5H_8O]^+$  , M/E 275 POR PÉRDIDA DE  $C_5H_9O_2$  DEL IÓN MOLECULAR ---  
 $[M-C_5H_9O_2]^+$  , M/E 261, POR PÉRDIDA DEL IÓN MOLECULAR DE  $C_5H_9O_2$   
 $[M-C_5H_9O_2]^+$  + M/E 85 POR PÉRDIDA DE  $[C_5H_9O]$  M/E 57 POR PÉRDI-  
 DA DE  $[C_4H_9]^+$  .

LA DILACTONA III POSEE UN GRUPO 2 METILBUTIRATO EN EL CARBONO 9 LO  
 CUAL ES EVIDENTE EN EL ESPECTRO DE RMN Y ESPECTRO DE MASAS.

DILACTONA II (ZINAFLAVIN B)

PRESENTA UN PUNTO DE FUSIÓN: 196 - 198°C (ACETATO DE ETILO-HEXANO),  
 PRESENTA UN MÁXIMO DE ABSORCIÓN AL ULTRAVIOLETA EN ETANOL  $\lambda$  <sup>ETOH</sup><sub>MAX</sub>

SE 213 NM CON UN COEFICIENTE DE ABSORTIVIDAD DE 29 248, EN EL POLA-  
 RÍMETRO PRESENTA UN  $[\alpha]_D = +29.569$  (C0.183;CHCl<sub>3</sub>), EN EL I.R.  
 SE OBSERVAN LOS SIGUIENTES PICOS: 1778, 1772, 1726, 1665,1651.

EN EL ESPECTRO DE MASAS (EIMS) 70 EV PRESENTA UN FRAGMENTO M/E 358

$[M]^+$  + IÓN MOLECULAR  $C_{20}H_{22}O_6$ , M/E 314 POR PÉRDIDA DE  $CO_2$  DEL -  
 IÓN MOLECULAR  $M-CO_2^+$  , EL FRAGMENTO M/E 258 POR PÉRDIDA DE --  
 $C_5H_8O_2$  DEL IÓN MOLECULAR  $[M-C_5H_8O_2]^+$  , M/E 214 POR PÉRDIDA DE  
 $C_5H_8O_2$  DE 314  $[314-C_5H_8O_2]^+$  + M/E 83 POR PÉRDIDA DE  $C_5H_7O$  M/E -  
 55 POR PÉRDIDA DE  $[C_4H_7]^+$  . (49) (50) (57)

LA DILACTONA II POSEE UN GRUPO TIGLATO (2 METIL.2 BUTENOICO) QUE -  
 SE PUEDE EVIDENCIAR EN EL ESPECTRO RMN Y DE MASAS.

ESTAS DOS SUSTANCIAS, YA PURIFICADAS EN FORMA DE CRISTALES Y ---  
PREVIAMENTE IDENTIFICADAS FUERON DISUELTAS EN 50  $\mu$ l DE PROPILEN-  
GLICOL Y 10 ML DE MEDIO BASAL EAGLE, CON UNA MÁXIMA CONCENTRA---  
CIÓN DE 100  $\mu$ g/ml.

## II.- METODO

SE REALIZARON DILUCIONES DE CADA UNA DE LAS LÍNEAS CELULARES EN EL MEDIO BASAL EAGLE SUPLEMENTADO CON SUERO FETAL DE BOVINO AL 10%, - 100 U.I. DE PENICILINA POR ml Y 100 ug DE ESTREPTOMICINA POR ml -- (APENDICE 1) Y SE CULTIVARON EN TUBOS LEIGHTON CONTENIENDO APROXIMADAMENTE 60.000 CÉLULAS POR ml.

POR CADA UNA DE LAS DOSIS DE 0.1, 1, 5, 10 Y 50 ug/ml Y EL CONTROL SE SEMBRARON UNA SERIE DE 11 TUBOS LEIGHTON, 3 DE ELLOS CON LAMINILLA PARA LLEVAR A CABO LA PRUEBA DE VIABILIDAD CELULAR Y ANÁLISIS MORFOLÓGICO Y LOS 8 RESTANTES SIN LAMINILLA EMPLEADOS PARA EL CONTEO CELULAR Y DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR.

LOS TUBOS LEIGHTON SE INCUBARON A 37°C EN FORMA HORIZONTAL Y ESTÁTICOS, EN UNA ATMÓSFERA DE 5% DE CO<sub>2</sub> Y 95% DE AIRE DURANTE UN PERÍODO DE 24 HORAS, LAPSO EN EL CUAL LAS CÉLULAS CRECEN ADHERIÉNDOSE A LA SUPERFICIE DEL TUBO.

EL NÚMERO DE TUBOS SEMBRADOS FUÉ ESCOGIDO EN BASE AL RESULTADO DE ESTUDIOS EFECTUADOS EN EL LABORATORIO DE BIOLOGÍA CELULAR DEL -- IMSS LOS CUALES MOSTRARON VALIDEZ ESTADÍSTICA.

AL TRANSCURRIR LAS 24 HORAS, SE CAMBIO EL MEDIO DEL CULTIVO ORIGINAL POR EL MEDIO CONTENIENDO LOS FÁRMACOS EN ESTUDIO A LAS DOSIS - DE 0.1 A 50 ug/ml DEPENDIENDO DE LA LACTONA A ESTUDIAR, CON UN GRUPO CONTROL PARA CADA SUSTANCIA Y PARA CADA LÍNEA, LOS TUBOS SE INCUBARON 72 HORAS BAJO LAS MISMAS CONDICIONES.

LA FORMA DE PREPARACIÓN DE LAS DIFERENTES DOSIS SE EFECTUÓ DE LA SIGUIENTE MANERA:

SE PESO 1 MILIGRAMO DEL FÁRMACO CRISTALIZADO COLOCÁNDOSE EN UN TUBO CENTRÍFUGA, SE AGREGARON 50 LAMNDAS DE PROPILENGLICOL Y SE CALEN



TÓ SUAVEMENTE HASTA DISOLUCIÓN COMPLETA POSTERIORMENTE SE AGREGA--  
RON 10 ml DEL MEDIO BASAL EAGLE, SE FILTRÓ CON UN SISTEMA MILLIPO--  
RE EN MEMBRANA DE 0.22 U Y SE REALIZARON LAS DIFERENTES DILUCIONES.  
UNA VEZ FINALIZADA LA INCUBACIÓN SE REALIZARON LAS SIGUIENTES DE--  
TERMINACIONES:

1) CONTEO-CELULAR,

SE VACIÓ EL MEDIO DE CULTIVO DE LOS OCHO TUBOS LEIGHTON SIN LAMINI  
LLA EN VIALES DE 20 ml DE CAPACIDAD, IDENTIFICÁNDOSE CADA TUBO CON  
LA DOSIS, FÁRMACO Y LÍNEA CELULAR CORRESPONDIENTE.

LAS CÉLULAS SE LAVARON POR DECANTACIÓN CON 2 ml DE SOLUCIÓN SALINA  
AL 0.9% (APENDICE 2) PASÁNDOSE POSTERIORMENTE AL VIAL.

LAS CÉLULAS FUERON DESPRENDIDAS, AGREGANDO 1 ml DE TRIPSINA AL -  
0.25% (APENDICE 3) DEJANDO ACTUAR POR UN LAPSO DE 10 MINUTOS.

SE VACIÓ LA TRIPSINA CONTENIENDO A LAS CÉLULAS EN EL VIAL, SE LAVA  
RON LOS TUBOS LEIGHTON DOS VECES CON 8 ml DE SOLUCIÓN SALINA, PARA  
PODER ARRASTRAR TODAS LAS CÉLULAS, INCORPORANDO AMBOS LAVADOS AL -  
VIAL, DE MANERA QUE EL VIAL SE LLEVÓ A UN VOLÚMEN FINAL DE 20 ml Y  
SE LLEVÓ A CABO EL CONTEO CELULAR, REALIZÁNDOSE CUATRO LECTURAS --  
POR VIAL EN UN CONTADOR ELECTRÓNICO DE PARTÍCULAS\*.

LOS DATOS OBTENIDOS FUERON ANALIZADOS POR MEDIO DE PROBITS QUE ES  
UNA VARIANTE DE CORRELACIÓN LINEAL (APENDICE 4) OBTENIENDO DE ESTA  
MANERA LA DOSIS EFECTIVA MEDIA ( $DE_{50}$ ) DE CADA UNO DE LOS FÁRMACOS  
EN LAS DOS LÍNEAS CELULARES.

II.- PORCENTAJE DE VIABILIDAD (ANÁLISIS DE EXCLUSIÓN)

SE DECANTO EL MEDIO DE CULTIVO DE UN TUBO CON LAMINILLA POR DOSIS

\* CONTADOR COULTER, MODELO B HIALEAH FLORIDE USA.

Y SE AÑADIÓ 1 ml DE AZUL DE TRIPAN, DEJANDO ACTUAR EN EL LAPSO DE 5 MINUTOS (APENDICE 5)

POSTERIORMENTE SE SACÓ LA LAMINILLA DEL TUBO LEIGHTON Y SE COLOCÓ EN UN PORTA-OBJETOS DE MANERA QUE ESTÉN EN CONTACTO LAS CÉLULAS - CON EL CRISTAL.

SE LEYERON 3 SERIES DE 100 CÉLULAS EN ZONAS DIFERENTES DE LA LAMINILLA EN EL MICROSCÓPIO DE LUZ Y SE DETERMINÓ EL PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR.

### III) ANALISIS MORFOLOGICO

SE DECANTO EL MEDIO DE CULTIVO DE DOS TUBOS LEIGHTON CON LAMINILLA POR DOSIS Y SE LAVARON LAS CÉLULAS 3 VECES CON 3 ml DE SOLUCIÓN SALINA AL 0.9% DESECHÁNDOLA, PARA QUITAR LAS PROTEÍNAS DEL MEDIO DE CULTIVO.

SE AÑADIÓ 5 ml DE METANOL A CADA TUBO, SE TAPARON Y SE DEJÓ UN MÍNIMO DE 20 MINUTOS Y UN MÁXIMO DE 15 DÍAS CON EL OBJETO DE FIJAR - LAS CÉLULAS.

PARA TEÑIR LAS CÉLULAS SE LLEVÓ A CABO EL MÉTODO DE TINCIÓN DE -- JACOBSON (APENDICE 6)

UNA VEZ TEÑIDAS LAS CÉLULAS SE REALIZARON LECTURAS DE 1000 CÉLULAS PARA OBTENER EL PORCENTAJE DE CÉLULAS MONONUCLEADAS, MULTINUCLEADAS Y QUE PRESENTEN MITOSIS. (51) (52)

## RESULTADOS

DE ACUERDO A LOS PROTOCOLOS PARA EL ANÁLISIS DE AGENTES QUÍMICOS Y PRODUCTOS NATURALES EN CONTRA DE TUMORES ANIMALES Y OTROS SISTEMAS BIOLÓGICOS ESTABLECIDOS POR LA CÁNCER CHEMOTHERAPY NATIONAL SERVICE CENTER DEL NATIONAL CENTER INSTITUTE SE LLEVARON A CABO PRUEBAS PRELIMINARES DE ACUERDO AL PROTOCOLO 1,901 DEL MISMO INSTITUTO EN LAS QUE SE PROBARON DOSIS DE 0.1, 1.5, 10, 50 Y 100  $\mu\text{g/ml}$  DE LAS LACTONAS A ESTUDIAR, CON EL FIN DE LOCALIZAR LA DOSIS QUE SE ACERCARA A LA DOSIS EFECTIVA MEDIA ( $DE_{50}$ ) QUE ES LA DOSIS EFECTIVA QUE INHIBE EL CRECIMIENTO AL 50% EN COMPARACIÓN AL CONTROL (53).

LOS RESULTADOS DE LAS DOS DILACTONAS FUERON ANALIZADOS POR SEPARADO ENCONTRANDO LO SIGUIENTE:

EN LAS TABLAS 1 Y 2 SE MUESTRAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LA SEGUNDA FASE DE ESTUDIO DE LA DILACTONA III CON DOSIS MÁS CERCANAS A LA DOSIS EFECTIVA 50 COMPRENDIDAS ENTRE 0.1, 1 Y 5  $\mu\text{g/ml}$

DESPUÉS DE LLEVAR A CABO LA SERIE DE EXPERIMENTOS DE LA DILACTONA III EN LA LÍNEA L 929, SE CALCULÓ EL PROMEDIO DE PORCIENTO DE INHIBICIÓN Y SUS RESPECTIVAS DESVIACIONES ESTANDAR, COMO SE PUEDE OBSERVAR EN LA TABLA I, DONDE SE MUESTRA QUE A DOSIS MÍNIMA EL PROMEDIO DE PORCIENTO DE INHIBICIÓN FUÉ DEL 11% MIENTRAS QUE A DOSIS DE 1  $\mu\text{g/ml}$  Y 5  $\mu\text{g/ml}$  FUÉ DE 54% Y 88%, RESPECTIVAMENTE.

A LA MAYOR DOSIS EL PORCIENTO DE INHIBICIÓN FUÉ DE 100%, OBSERVÁNDOSE UN COMPORTAMIENTO DOSIS-RESPUESTA, A MAYOR DOSIS MAYOR PORCENTAJE DE INHIBICIÓN.

LOS ANÁLISIS ESTADÍSTICOS A QUE FUERON SOMETIDOS ESTOS DATOS MUESTRAN UN COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE  $R = 0.914$

EN LA TABLA 2, SE OBSERVA QUE EL PORCIENTO DE VIABILIDAD CELULAR O TEST DE EXCLUSIÓN DECRECE EN FORMA INVERSA A LA DOSIS.

LA DILACTONA III EJERCIO UNA ACCIÓN SIMILAR EN PRESENCIA DE LA LÍNEA -- EPITELIAL HEP 2 C MOSTRANDO EN LA TABLA 1 QUE A DOSIS MÍNIMA EL PROMEDIO DE PORCIENTO DE INHIBICIÓN FUÉ DE SOLO EL 18% SIENDO QUE A DOSIS DE 1 -  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FUÉ DE 54% Y 94% RESPECTIVAMENTE, LLEGANDO A SER DE UN 100% A LA DOSIS DE 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$

EL COEFICIENTE DE CORRELACIÓN FUÉ DE  $R = 0.949$  MOSTRANDO UN COMPORTAMIENTO DOSIS RESPUESTA.

EN LO QUE CONCIERNE AL PORCIENTO DE VIABILIDAD EN LA TABLA 2, SE OBSERVA QUE TAMBIÉN DISMINUYE EN RELACIÓN INVERSA A LA DOSIS.

EN CUANTO AL ANÁLISIS A NIVEL CELULAR EN EL ESTUDIO MORFOLÓGICO SE PUEDE OBSERVAR QUE EN LA TABLA 2 LA DILACTONA III EN LA LÍNEA FIBROBLÁSTICA - L 929 A DOSIS DE 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EL NÚMERO DE MITOSIS DISMINUYÓ DRÁSTICAMENTE EN RELACIÓN AL CONTROL SIENDO ÚNICAMENTE DEL 15% Y A DOSIS DE 1 Y 5 --  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EL PORCENTAJE FUÉ DEL 15 Y 10% RESPECTIVAMENTE EXISTIENDO TAMBIÉN UNA GRAN DISMINUCIÓN DE PORCIENTO DE CÉLULAS EN MITOSIS EN RELACIÓN AL - CONTROL.

EN RELACIÓN A CÉLULAS MULTINUCLEADAS SE OBSERVÓ UN PEQUEÑO AUMENTO CON-- FORME LA DOSIS SIENDO DE 104%, 113% Y 133% A DOSIS DE 0.1, 1 Y 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  - RESPECTIVAMENTE CON RESPECTO AL CONTROL.

A LA DOSIS DE 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$  AL EXISTIR UN NÚMERO INSUFICIENTE DE CÉLULAS PARA REALIZAR CONTEO QUE FUERA ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVO, A CAUSA DE LA ELEVADA INHIBICIÓN CELULAR, NO SE PUDO EFECTUAR EL ANÁLISIS MORFOLÓGICO.

LA DILACTONA III EN LA LÍNEA EPITELIAL HEP 2C NO EJERCIÓ UNA DISMINUCIÓN MUY ELEVADA EN EL NÚMERO DE CÉLULAS EN MITOSIS SIENDO EN TODAS LAS DOSIS MUY SIMILAR OBTENIÉNDOSE EN LA DOSIS DE 0.1, 1.0 Y 5.0  $\mu\text{g/ml}$  UN PORCENTAJE DE 89, 81 Y 89 RESPECTIVAMENTE EN RELACIÓN AL CONTROL.

EL NÚMERO DE CÉLULAS MULTINUCLEADAS PRESENTES A DOSIS DE 0.1  $\mu\text{g/ml}$  FUÉ DE 117% Y A DOSIS DE 1.0  $\mu\text{g/ml}$  FUÉ DE 155% SIENDO MAYOR A AMBAS DOSIS QUE EL NÚMERO DE CÉLULAS MULTINUCLEADAS DEL GRUPO CONTROL, EN CAMBIO A DOSIS DE 5.0  $\mu\text{g/ml}$  PRESENTÓ UN 96%, ES DECIR HUBO UN LIGERO DECREMENTO.

A DOSIS DE 10.0  $\mu\text{g/ml}$  LA ELEVADA INHIBICIÓN CELULAR NO PERMITIÓ REALIZAR CUENTAS QUE FUERAN ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS.

EN LA TABLA 5 SE MUESTRAN LA DOSIS EFECTIA MEDIA Y LOS LÍMITES DE CONFIANZA DE LA DILACTONA III EN AMBAS LÍNEAS CELULARES,

SIENDO LA  $DE_{(50)}$  DE 0.55  $\mu\text{g/ml}$  EN LA LÍNEA FIBROBLÁSTICA L 929 Y LA  $DE_{(50)}$  EN LA LÍNEA EPITELIAL HEP 2C DE 0.473  $\mu\text{g/ml}$

EN LA TABLA 3 Y 4 SE MUESTRAN LOS RESULTADOS OBTENIDOS DE LA SEGUNDA FASE DE ESTUDIO DE LA DILACTONA 2 A DOSIS DE 0.1, 1, 10 Y 50  $\mu\text{g/ml}$ . OBSERVÁNDOSE EN LA TABLA 3 QUE EN LA LÍNEA L 929 EXISTIÓ UNA CORRELACIÓN ENTRE LA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO Y LAS DOSIS CON UN COEFICIENTE DE  $R = 0.918$

MOSTRANDO EN LA DOSIS DE 0.1  $\mu\text{g/ml}$  EL 6% DE INHIBICIÓN Y A DOSIS DE 1 Y 10  $\mu\text{g/ml}$  UN 46 Y 91% DE INHIBICIÓN RESPECTIVAMENTE.

EN LA TABLA 4 SE OBSERVA QUE EN LA TEST DE EXCLUSIÓN, EL PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR VA DECRECIENDO CON RELACIÓN AL AUMENTO DE DOSIS SIENDO DE 91% A 0.1  $\mu\text{g/ml}$  DE 74% A 1.0  $\mu\text{g/ml}$  DE 50% A 10  $\mu\text{g/ml}$  HASTA UN CERO

PORCIENTO A DOSIS DE 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

CON REFERENCIA A LA LÍNEA HEP 2C LAS DOSIS TRABAJADAS DE LA DILACTONA II FUERON DE 0,1, 1, 10 Y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , OBSERVÁNDOSE EN LA TABLA 3 QUE EL PROMEDIO DE PORCIENTO DE INHIBICIÓN AUMENTÓ AL AUMENTAR LA DOSIS EXISTIENDO A DOSIS DE 0,1, 1, 10 Y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  UN PORCIENTO DE INHIBICIÓN DE 8, 43, 89 Y 97% RESPECTIVAMENTE EN RELACIÓN AL CONTROL EXISTIENDO UNA RELACIÓN DOSIS-RESPUESTA CON UN COEFICIENTE DE CORRELACIÓN DE  $R = 0,774$ .

EN LA PRUEBA DE PORCIENTO DE VIABILIDAD O TEST DE EXCLUSIÓN MOSTRADA EN LA TABLA 4 SE ENCUENTRA UN 74% A DOSIS DE 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , UN 84% A DOSIS DE 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Y TAN SOLO UN 16 Y 5% A LAS DOSIS DE 10 Y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DANDO COMO RESULTADO TAMBIÉN QUE A MAYOR DOSIS MENOR PORCENTAJE DE VIABILIDAD. EL ANÁLISIS MORFOLÓGICO CON LA DILACTONA II EN LA LÍNEA CELULAR L 929 NO SE PUDO REALIZAR A DOSIS DE 10 Y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  POR LA ELEVADA INHIBICIÓN CELULAR.

CON REFERENCIA AL NÚMERO DE CÉLULAS EN MITOSIS A DOSIS DE 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SE OBSERVÓ UN VALOR DEL 20% Y A DOSIS DE 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  DE 25%, EN AMBAS EXISTIÓ GRAN DISMINUCIÓN DE ESTAS CÉLULAS CON RESPECTO AL GRUPO CONTROL, EN CAMBIO EXISTIÓ UN AUMENTO DE CÉLULAS MULTINUCLEADAS SIENDO DE 114% A DOSIS DE 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Y DE 231% A DOSIS DE 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ .

EN LA LÍNEA EPITELIAL HEP 2C NO SE PUDO LLEVAR A CABO ANÁLISIS A LAS DOSIS DE 10 Y 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  POR EL NÚMERO INSUFICIENTE DE CÉLULAS PARA LLEVAR A CABO EL ANÁLISIS.

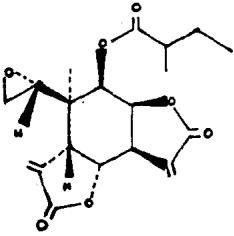
EL NÚMERO DE CÉLULAS ENCONTRADAS EN MITOSIS DISMINUYÓ A DOSIS DE 0,1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Y 1,0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EN RELACIÓN AL GRUPO CONTROL OBTENIÉNDOSE EL 78 Y EL 67% RESPECTIVAMENTE.

EL NÚMERO DE CÉLULAS MULTINUCLEADAS A DOSIS DE 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  FUÉ MUY SIMILAR AL GRUPO CONTROL, PUESTO QUE SE ENCONTRÓ EL 99% EN CAMBIO A DOSIS DE -- 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  SE ENCONTRÓ EL 137% EN COMPARACIÓN AL GRUPO CONTROL.

LA DOSIS EFECTIVA MEDIA DE LA DILACTONA II EN AMBAS LÍNEAS CELULARES Y LOS RESPECTIVOS LÍMITES DE CONFIANZA SE MUESTRAN EN LA TABLA 5 DONDE LA  $DE_{(50)}$  EN LA LÍNEA L 929 FUÉ DE 1.17  $\mu\text{g}/\text{ml}$  Y LA  $DE_{(50)}$  EN LA LÍNEA --- HEP 2C FUÉ DE 0.20  $\mu\text{g}/\text{ml}$

TABLA I

EFFECTO DE LA DILACTONA III SOBRE LA  
INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO CELULAR\*  
DE LAS LINEAS HEP 2 C Y L 929

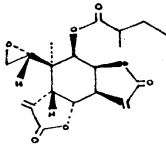
FARMACO DILACTONA III	LINEA CELULAR	DOSIS ug/ml	PROMEDIO DE PORCIENTO DE INHIBICION
 DILACTONA III	L 929	0.1	11 ± 1.90
		1.0	54 ± 4.42
		5.0	88 ± 1.67
		10.0	100 ± 0.00
	HEP 2 C	0.1	18 ± 3.21
		1.0	54 ± 4.18
		5.0	94 ± 0.63
		10.0	100 ± 0.00

\*LAS CIFRAS EXPRESAN PROMEDIOS DE PORCENTAJE CON RESPECTO AL CONTROL ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE 3 A 4 EXPERIMENTOS EFECTUADOS POR OCTUPPLICADO.



TABLA 2

EFFECTO DE LA DILACTONA III SOBRE EL NUMERO DE CELULAS MULTINUCLEADAS Y MITOSIS ENCON--  
TRADAS EN LAS LINEAS CELULARES L 929 Y HEP 2C

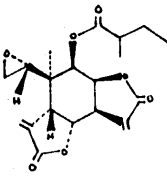
FARMACO	LINEA CELULAR	DOSIS ug./ml	CELULAS MONONUCLEADAS		CELULAS MULTINUCLEADAS		MITOSIS		TEST DE EXCLUSION
			NUMERO	% <sup>x</sup>	NUMERO	% <sup>x</sup>	NUMERO	% <sup>x</sup>	PORCIENTO
 <p>DILACTONA III</p>	L 929	CONTROL	956	100	24	100	20	100	94
		0.1	973	102	25	104	3	15	83
		1.0	971	101	27	113	3	15	74
		5.0	966	101	32	133	2	10	38
		10.0 <sup>xx</sup>	---	---	--	---	--	---	0
	HEP 2C	CONTROL	889	100	83	100	27	100	96
		0.1	879	99	97	117	24	89	96
		1.0	848	95	129	155	22	81	70
		5.0	895	101	80	96	24	89	39
		10.0 <sup>xx</sup>	---	---	---	---	--	---	0

x LOS PORCENTAJES SON CONSIDERADOS EN RELACION AL CONTROL.

xx NÚMERO INSUFICIENTE DE CÉLULAS PARA EFECTUAR EL ANÁLISIS Y HACER UN CONTEO ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVO.

TABLA 2

EFFECTO DE LA DILACTONA III SOBRE EL NUMERO DE CELULAS MULTINUCLEADAS Y MITOSIS ENCON-- TRADAS EN LAS LINEAS CELULARES L 929 y HEP 2C

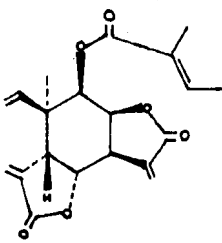
FARMACO	LINEA CELULAR	DOSIS $\mu\text{g}/\text{ml}$	CELULAS MONONUCLEADAS		CELULAS MULTINUCLEADAS		MITOSIS		TEST DE EXCLUSION
			NUMERO	% <sup>x</sup>	NUMERO	% <sup>x</sup>	NUMERO	% <sup>x</sup>	PORCIENTO
 <p>DILACTONA III</p>	L 929	CONTROL	956	100	24	100	20	100	94
		0.1	973	102	25	104	3	15	83
		1.0	971	101	27	113	3	15	74
		5.0	966	101	32	133	2	10	38
		10.0 <sup>xx</sup>	---	---	--	---	--	---	0
		HEP 2C	CONTROL	889	100	83	100	27	100
	0.1	879	99	97	117	24	89	96	
	1.0	848	95	129	155	22	81	70	
	5.0	895	101	80	96	24	89	39	
	10.0 <sup>xx</sup>	---	---	---	---	--	---	0	

x LOS PORCENTAJES SON CONSIDERADOS EN RELACION AL CONTROL.

xx NÚMERO INSUFICIENTE DE CÉLULAS PARA EFECTUAR EL ANÁLISIS Y HACER UN CONTEO ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVO.

TABLA 3

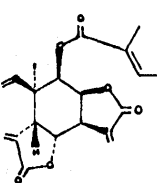
EFFECTO DE LA DILACTONA II SOBRE LA  
INHIBICION DEL CRECIMIENTO CELULAR\*  
DE LAS LINEAS HEP 2C Y L 929

FARMACO DILACTONA II	LINEA CELULAR	DOSES ug/ml	PROMEDIO DE PORCIENTO DE INHIBICION
 <p>DILACTONA II</p>	L 929	0.1	6 ± 2.28
		1.0	46 ± 6.36
		10.0	91 ± 1.04
		50.0	100 ± 0.00
	HEP 2C	0.1	8 ± 3.27
		1.0	43 ± 5.82
		10.0	89 ± 1.93
		50.0	97 ± 0.21

\*LAS CIFRAS EXPRESAN PROMEDIOS DE PORCENTAJE CON RESPECTO AL --  
CONTROL ± DESVIACIÓN ESTÁNDAR DE 3 A 4 EXPERIMENTOS EFECTUADOS  
POR OCTUPPLICADO.

TABLA 4

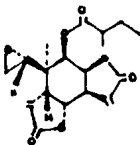
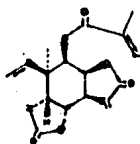
EFFECTO DE LA DILACTONA II SOBRE EL NUMERO DE CELULAS MULTINUCLEADA Y MITOSIS ENCON-  
TRADAS EN LAS LINEAS CELULARES L 929 Y HEP 2C

FARMACO	LINEA CELULAR	DOSIS ug/ml	CELULAS MONONUCLEADAS		CELULAS MULTINUCLEADAS		MITOSIS		TEST DE EXCLUSION
			NUMERO	% <sup>x</sup>	NUMERO	% <sup>x</sup>	NUMERO	% <sup>x</sup>	PORCIENTO
 DILACTONA II	L 929	CONTROL	958	100	22	100	20	100	95
		0,1	966	101	25	114	4	20	91
		1,0	939	98	51	231	5	25	74
		10,0 <sup>xx</sup>	---	---	---	---	---	---	50
		50,0 <sup>xx</sup>	---	---	---	---	---	---	0
	HEP 2C	CONTROL	924	100	71	100	18	100	99
		0,1	912	98	70	99	14	78	74
		1,0	892	97	97	137	12	67	84
		10,0 <sup>xx</sup>	---	---	---	---	---	---	16
		50,0 <sup>xx</sup>	---	---	---	---	---	---	5

x LOS PORCENTAJES SON CONSIDERADOS EN RELACION AL CONTROL.  
xx NUMERO INSUFICIENTE DE CELULAS PARA EFECTUAR EL ANALISIS Y HACER UN CONTEO ESTADISTICAMENTE SIGNIFICATIVO.

TABLA 5

DOSIS EFECTIVA MEDIA Y LÍMITES DE CONFIANZA DE LA DILACTONA III Y LA DILACTONA II EN LAS LÍNEAS L 929 Y HEP 2C CALCULADOS POR PROBITS

FARMACO	LINEA CELULAR	DE <sub>50</sub> ug/ml	LÍMITES DE CONFIANZA	
			INFERIOR	SUPERIOR
 DILACTONA III	L 929	0.55	0.00005	2.13240
	HEP 2C	0.473	* ---	* ---
 DILACTONA II	L 929	1.17	* ---	* ---
	HEP 2C	0.20	0.12390	3.30970

- \* CUANDO LA RELACIÓN ENTRE LA PENDIENTE Y EL ERROR ESTÁNDAR SON MUY GRANDES LOS VALORES QUE SE OBTIENEN PARA LOS LÍMITES DE CONFIANZA NO SON ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVOS.

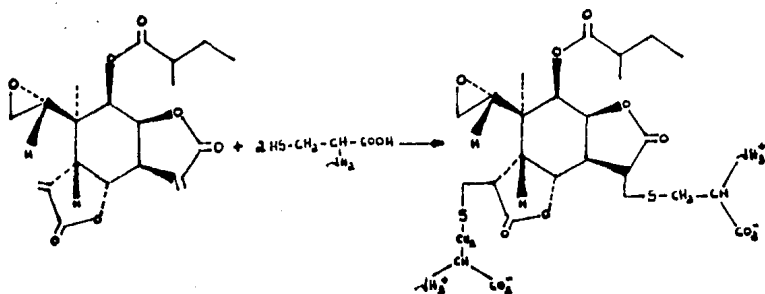
DE ACUERDO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN DE LAS DOS DILACTONAS CON LAS DOS LÍNEAS CELULARES, SE ENCONTRÓ QUE LA DOSIS EFECTIVA MEDIA CALCULADA ESTADÍSTICAMENTE (VER TABLA 5) SE ACERCA - MUCHO A LA DOSIS EFECTIVA MEDIA OBTENIDA EN FORMA EXPERIMENTAL (VER TABLAS 1 Y 3) Y SIN CORRECCIONES Y LAS DIFERENCIAS SE EXPLICAN POR LAS DESVIACIONES ESTANDAR OBTENIDAS A PARTIR DE LOS PORCENTAJES DE CRECIMIENTO CELULAR.

CON RESPECTO A LOS RESULTADOS DESCRITOS EN LAS TABLAS 1, 2, 3 Y 4 SE PUEDE HACER NOTAR QUE LOS PORCENTAJES DE MITOSIS DE LAS CÉLULAS L 929 TRATADAS CON AMBAS DILACTONAS DISMINUYERON EN FORMA DRÁSTICA CON RESPECTO AL CONTROL, DE LA MISMA MANERA EL PORCENTAJE DE VIABILIDAD CELULAR NOS INDICA UN MAYOR NÚMERO DE CÉLULAS MUERTAS EN LAS DOSIS MÁS ALTAS, LO QUE SIGNIFICA QUE AMBAS SUSTANCIAS SON ALTAMENTE CITOTÓXICAS Y ESTO SE REFLEJA EN EL ESCASO CRECIMIENTO CELULAR, MIENTRAS QUE EN LA LÍNEA HEP 2C LOS PORCENTAJES DE MITOSIS MUESTRAN UNA DISMINUCIÓN MENOS DRÁSTICA, ESTO PUEDE INDICAR UNA MEJOR RECUPERACIÓN DE LAS CÉLULAS QUE SOBREVIVEN AL CONTACTO CON LAS DILACTONAS Y QUE PUEDEN LLEGAR A DIVIDIRSE, SIN EMBARGO ESTA RECUPERACIÓN ES ESCASA O MUY LENTA, POSIBLEMENTE SE DEBA A QUE EL CICLO CELULAR EN CÉLULAS NEOPLÁSICAS AÚN EN CRECIMIENTO IN VITRO ES DIFERENTE AL CICLO CELULAR DE LAS CÉLULAS DE ORIGEN NORMAL.

DE ACUERDO CON LOS ESTUDIOS EFECTUADOS POR KUPCHAN Y COLABORADORES (16), CON RESPECTO A LA ESTRUCTURA DE LOS FÁRMACOS, SE PUEDE DECIR QUE EXISTE UNA RELACIÓN ENTRE LA ESTRUCTURA MOLECULAR Y LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ESTOS.

KUPCHAN Y COLABORADORES ESTUDIARON ESTA RELACIÓN EN LAS LACTONAS -

SESQUITERPÉNICAS Y ENCONTRARON QUE LA MAYOR PARTE DE LAS LACTONAS BIOLÓGICAMENTE ACTIVAS ERAN  $\alpha$  METILEN  $\gamma$  LACTONAS Y POSEÍAN GRUPOS FUNCIONALES TALES COMO GRUPOS EPÓXIDO, ÉSTERES INSATURADOS, CETONAS INSATURADAS Y LACTONAS INSATURADAS. POSTERIORMENTE DEMOSTRARON QUE LA PRESENCIA DE UNA  $\alpha$  METILEN  $\gamma$  LACTONA, ES ESENCIAL PARA SU ACTIVIDAD CITO TÓXICA, PUESTO QUE SI SE HIDROGENABA ESTE CONJUGADO, EXISTÍA UNA INACTIVACIÓN DEL COMPUESTO. TAMBIÉN OBSERVARON QUE ESTE GRUPO FUNCIONAL REACCIONA CON LOS GRUPOS SULFIDRILLO DE LA CISTEÍNA (15) Y QUE EXISTE UNA ALQUILACIÓN DE LOS CENTROS NUCLEOFÍLICOS, DICHA ALQUILACIÓN SE LLEVA A CABO MEDIANTE UNA ADICIÓN TIPO MICHAEL COMO SE MUESTRA EN EL SIGUIENTE ESQUEMA:



LAS DOS DILACTONAS ESTUDIADAS, TIENEN EN SU CONFIGURACIÓN MOLECULAR LA PRESENCIA DE GRUPOS REACTIVOS COMO SON EL GRUPO  $\alpha$  METILEN  $\gamma$  LACTONA, EL GRUPO EPÓXIDO (EN EL CASO DE LA DILACTONA III) Y UN ÉSTER NO SATURADO (EN EL CASO DE LA DILACTONA II).

DE ACUERDO A LO DICHO ANTERIORMENTE, SE PUEDE DECIR QUE EL EFECTO CITOTÓXICO DE LOS DOS FÁRMACOS ESTUDIADOS ES DEBIDO PRINCIPALMENTE A LA

PRESENCIA DE LOS DOS GRUPOS  $\alpha$  METILEN  $\gamma$  LACTONA (51), YA QUE PESE A QUE LA DILACTONA II POSEE UN GRUPO EPÓXIDO, ÉSTE SOLO INCREMENTA LIGERAMENTE LA ACTIVIDAD CITOtóXICA COMPARADO CON LA DILACTONA I QUE EN SU LUGAR TIENE UN GRUPO ÉSTER NO SATURADO.

SE HAN REALIZADO ESTUDIOS SOBRE LA ACTIVIDAD FARMACOLóGICA DE LOS GRUPOS EPÓXIDO Y DE ACUERDO A MONTGOMERY (56) HA ENCONTRADO QUE ESTOS GRUPOS ACTÚAN COMO AGENTES MUTAGÉNICOS QUE PUEDEN FORMAR ENLACES CRUZADOS CON CADENAS DE DNA POR MEDIO DE PROCESOS DE ALQUILACIÓN. DE CUALQUIER FORMA ESTE GRUPO CONTRIBUYE EN PARTE PARA CONFERIRLE A LA MOLÉCULA EL ALTO GRADO DE CITOtóXICIDAD QUE PRESENTA.

EN EL PROTOCOLO PARA SISTEMAS ESPECÍFICOS No. 1-1.901 CELL CULTURE (DRUG EVALUATION BRANCH, NATIONAL CÁNCER INSTITUTE, NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH, MARYLAND) (53) SE ESTABLECE QUE PARA QUE LOS EXTRACTOS DE PLANTAS SEAN CONSIDERADOS COMO POSIBLES AGENTES ANTITUMORALES DEBEN CUMPLIR CON UNA DOSIS EFECTIVA MEDIA ( $DE_{50}$ ) MENOR O IGUAL A 30  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EN LA FASE I DE ESTUDIO Y UNA  $DE_{50}$  MENOR O IGUAL A 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  EN LA FASE II DE ESTUDIO AMBAS A NIVEL DE CULTIVO "IN VITRO".

LAS DOS DILACTONAS ANALIZADAS EN ESTE ESTUDIO PRESENTAN LAS  $DE_{50}$  REQUERIDAS POR EL SISTEMA DE PROTOCOLOS ANTES MENCIONADO, SIN EMBARGO ENCONTRAMOS QUE ELLAS NO TIENEN EL EFECTO SELECTIVO QUE SE BUSCABA PARA INHIBIR O MATAR ÚNICAMENTE A LAS CÉLULAS DE ORÍGEN NEOPLÁSICO, YA QUE LA ALTA CITOtóXICIDAD QUE PRESENTAN AFECTA DE MANERA SIMILAR A CÉLULAS DE ORÍGEN NORMAL QUE A CÉLULAS DE ORÍGEN NEOPLÁSICO, SIENDO LO MISMO -- QUE OCURRE CON ALGUNOS AGENTES ANTINEOPLÁSICOS UTILIZADOS EN LA CLÍNICA EN EL TRATAMIENTO DE CÁNCER COMO LO SON LA VINCRISTINA Y LA VINBLASTINA.

SIENDO ENTONCES RECOMENDABLE DE QUE DE CONTINUAR CON LOS ESTUDIOS



SE HICIERA CON DOSIS MUY PEQUEÑAS UNIENDO LA MOLÉCULA A ACARREADORES --  
ESPECÍFICOS; PARA APROVECHAR LA CITOTOXICIDAD DE LA MOLÉCULA Y LA ESPE-  
CIFICIDAD DEL ACARREADOR, POR EJEMPLO UNIRLA A UNA HORMONA ESTEROIDE Y  
TRATAR CÉLULAS NEOPLÁSICAS QUE TENGAN RECEPTORES PARA ESTE TIPO DE MOLÉ-  
CULAS, COMO LO SON LAS CÉLULAS DERIVADAS DE CÁNCER DE MAMA.

## CONCLUSIONES

LAS LACTONAS SESQUITERPÉNICAS ESTUDIADAS PRESENTAN UN EFECTO CITOTÓXICO TANTO EN CÉLULAS DE ORIGEN NORMAL COMO EN CÉLULAS DE ORIGEN TUMORAL.

DE ACUERDO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS SE CONCLUYE QUE EL ESTUDIO EN AMBAS DILACTONAS SESQUITERPÉNICAS PESE A QUE CUMPLEN CON LOS REQUERIMIENTOS DE LA CÁNCER CHEMOTERAPY NATIONAL, SERVICE CENTER, NO DEBEN CONTINUARSE HASTA NO MODIFICAR LA ESTRUCTURA MOLECULAR Y ÉSTA -- TENGA MAYOR SELECTIVIDAD A CÉLULAS NEOPLÁSICAS, QUE ES EL OBJETIVO - PRINCIPAL DE ESTA LÍNEA DE TRABAJO.

APENDICE

- 1) MEDIO BASAL EAGLE SUPLEMENTADO
- 2) SOLUCION SALINA AL 0.9%
- 3) SOLUCION DE TRIPSINA AL 0.25%
- 4) FORMULAS QUE SE UTILIZARON -  
PARA EFECTUAR EL ANALISIS --  
ESTADISTICO
- 5) SOLUCION DE AZUL DE TRIPAN
- 6) TINCION DE JACOBSON

### MEDIO BASAL EAGLE SUPLEMENTADO

PARA 5 LITROS:

MEDIO DE EAGLE EN POLVO	49.0	gr
BICARBONATO DE SODIO ( $\text{NaHCO}_3$ )	11.0	gr
PIRUVATO DE SODIO 0.01 M	50.0	ml
SUERO FETAL DE BOVINO	500.0	ml
ESTREPTOMICINA	100	ug/ml
PENICILINA/ml	100	U.I.

MEZCLAR EL MEDIO EAGLE EN POLVO EN UN LITRO DE AGUA DESTILADA.

MEZCLAR EL BICARBONATO DE SODIO EN OTRO LITRO DE AGUA DESTILADA.

(NO MEZCLAR EL MEDIO EN POLVO Y EL BICARBONATO JUNTOS PUESTO QUE NO SE DISUELVEN)

MEZCLAR AMBAS SOLUCIONES Y AGREGAR EL PIRUVATO DE SODIO AFORANDO A 5 - LITROS, AGITAR HASTA DISOLUCIÓN COMPLETA.

QUITAR 500 ml DE LA SOLUCIÓN Y AGREGAR 500 ml DE SUERO FETAL DE BOVINO Y POSTERIORMENTE LOS ANTIBIÓTICOS.

FILTRAR Y ESTERILIZAR EL MEDIO.

SOLUCION SALINA 0.9%

NaCl                    0.9        gr

AGUA DESTILADA        100        ml

PESAR 0.9 gr DE CLORURO DE SODIO Y DISOLVERLOS EN 100 ml DE

AGUA DESTILADA.

ESTERILIZAR LA SOLUCIÓN POR FILTRACIÓN.

### SOLUCION DE TRIPSINA 0.25 %

AGREGAR 2.5 g DE TRIPSINA EN POLVO A UN LITRO DE SOLUCIÓN P.D. (IX) CONCENTRADA.

EN UN MATRAZ DE 1000 ml, COLOCARLO SOBRE PLACA MAGNÉTICA DURANTE 1 HORA A 40°C, ESTERILIZAR POR FILTRACIÓN (FILTRO # 7 MILLIPORE) Y DEJARLA EN TUBOS ESPECIALES PARA TRIPSINA.

#### SOLUCIÓN P.D. ( IX ) CONCENTRADA

NaCl	8.0	g
KCl	0.2	g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.15	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.2	g
H <sub>2</sub> O	1000	ml
ROJO FENOL	10.0	mg

COLOCAR LAS SALES EN UN MATRAZ AFORADO DE 1 LITRO Y AFORAR CON AGUA DESTILADA O DESMINERALIZADA.

CONSERVAR A 4°C. ANTES DE USARLA, CALENTAR LA SOLUCIÓN A TEMPERATURA AMBIENTE HASTA QUE TODAS LAS SALES ESTÉN EN SOLUCIÓN.

FORMULAS QUE SE UTILIZARON PARA  
EFECTUAR EL ANALISIS ESTADISTICO

PROMEDIO

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

N = NÚMERO DE DATOS

DESVIACION ESTANDAR

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

S = DESVIACIÓN ESTANDAR

COEFICIENTE DE CORRELACION

$$R = \frac{(SP_{XY})^2}{(SS_X)(SS_Y)}$$

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

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

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

## PROBITS

ESTE MÉTODO ES UNA VARIANTE DE CORRELACIÓN LINEAL QUE SE UTILIZA PARA OBTENER LA DOSIS EFECTIVA MEDIA (DE<sub>50</sub>)

EN ESTE MÉTODO SE TRABAJA CON UNA TABLA DE VALORES CONSTANTES, YA CALCULADOS, QUE CORRESPONDEN A LOS PORCENTAJES DE CRECIMIENTO CON RESPECTO AL CONTROL Y UNA ESCALA ARBITRARIA DE LOGARITMOS BASE 10 PARA CADA DOSIS.

PENDIENTE.-

$$B = \frac{\frac{\sum XY - \frac{\sum X \sum Y}{N}}{\sum X^2 - \frac{(\sum X)^2}{N}}}{N}$$

MEDIA.-

$$M = \frac{\tilde{Y} - Y}{B} + \bar{X}$$

$\tilde{Y}$  = PROBIT 5

M = VALOR MEDIO CORRESPONDIENTE A LA DE50 EN LA ESCALA LOGARÍTMICA - ARBITRARIA.

ECUACIONES PARA EFECTUAR LOS LÍMITES DE CONFIANZA.-

$$G = \frac{T^2 (SYX^2)}{B^2 (SSX)}$$

DONDE T CORRESPONDE A UN VALOR DE P 0.05



## LIMITES DE CONFIANZA INFERIOR Y SUPERIOR

$$(M-X)_L = \frac{1}{1-\bar{G}} \left[ (M-\bar{X}) - \frac{T(S_{YX})}{B} \frac{1-G}{N} + \frac{(M-\bar{X})^2}{SSX} \right]$$

$$(M-X)_U = \frac{1}{1-G} \left[ (M-\bar{X}) + \frac{T(S_{YX})}{B} \frac{1-G}{N} + \frac{(M-\bar{X})^2}{SSX} \right]$$

EJEMPLO:

LINEA CELULAR.- L 929

FÁRMACO.- DILACTONA III

DOSIS TRABAJADAS.- 0.1, 1, 5 y 10  $\mu\text{g/ml}$ 

PORCENTAJE DE CRECIMIENTO CELULAR EN CADA UNA DE LAS DOSIS RESPECTIVAMENTE.- 89, 46, 12 y 0%

CALCULOS.-

<u>X</u>	<u>y (PROBITS)</u>	<u>xy</u>
0.1	6.23	4.87
1	4.87	5.73
5	3.82	4
<u>10</u>	<u>2</u>	<u>0</u>
$\Sigma x = 4.5$	$\Sigma y = 16.92$	$\Sigma xy = 14.6$
$\bar{x} = 1.125$	$\bar{y} = 4.23$	
$\Sigma x^2 = 7.25$		

N= NÚMERO DE DATOS = 4

$$\frac{\Sigma x \Sigma y}{N} = \frac{19.03}{4} = 4.7575 \quad \frac{(\Sigma x)^2}{N} = \frac{20.25}{4} = 5.0625$$

$$\text{PENDIENTE.- } B = \frac{14.6 - 19.03}{7.25 - 5.06} = \frac{-4.43}{2.19} = -2.02$$

$$\text{MEDIA.} - M = \frac{5 - 4.23}{- 2.02} + 1.125 =$$

$$0.7438 - 1 = 0.256$$

$$\text{ANTILOG} - 0.256 = 0.55$$

DOSIS EFECTIVA MEDIA = 0.55 ug/ml

$$g = \frac{T^2 (S_{Y.X^2})}{B^2 (SSX)}$$

$$SSX = \text{DENOMINADOR DE } B = 2.19$$

$$T^2 = 19.18$$

$$S_{Y.X^2} = 0.2875$$

$$B^2 = 4.080$$

$$g = 0.61$$

$$S_{YX} = 0.536$$

DETERMINACIÓN DE LÍMITES DE CONFIANZA

$(M-\bar{x})_L = \text{LÍMITE INFERIOR}$

$$(M-\bar{x})_L = \frac{1}{1-0.61} \left[ (0.7438-1.125) - 4.38 (0.536) \frac{\sqrt{(1-0.61) + \frac{(0.7438-1.125)^2}{2.19}}}{-2.02} \right]$$

$$(M-\bar{x})_L = 0.00052$$

$(M-\bar{x})_U = \text{LÍMITE SUPERIOR}$

$$(M-\bar{x})_U = \frac{1}{1-0.61} \left[ (0.7438-1.125) + 4.38 (0.536) \frac{\sqrt{(1-0.61) + \frac{(0.7438-1.125)^2}{2.19}}}{-2.02} \right]$$

$$(M-\bar{x})_U = 2.1320$$

SOLUCION DE AZUL DE TRIPAN ( 0.1 % )

SOLUCION DE AZUL DE TRIPAN

AZUL DE TRIPAN 0.1%

PESAR 0.1 gr DE AZUL DE TRIPAN EN POLVO Y DISOLVERLOS EN 100 ml DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS.

CONSERVAR EN REFRIGERACIÓN.

SOLUCION AMORTIGUADORA DE

BUFFER DE FOSFATOS 0.2M A PH 7.2

SOLUCION A:

FOSFATO DE SODIO MONOBÁSICO 0.2 M

$\text{NaH}_2\text{PO}_4$  27.58 gr

$\text{H}_2\text{O}$  1000 ml

SOLUCION B:

FOSFATO DE SODIO DIBÁSICO 0.2 M

$\text{NaHPO}_4$  28.38 gr

$\text{H}_2\text{O}$  1000 ml

PARA OBTENER UN PH DE 7.2 SE DEBEN TOMAR 28 ml DE LA SOLUCIÓN A Y 72 ml DE LA SOLUCIÓN B Y DILUIR EN 200 ml DE AGUA DESTILADA.

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

## TINCION DE JACOBSON

### PREPARACION DE LOS COLORANTES

#### A) MAY GRUNWALD

MAY GRUNWALD EN POLVO	0.3	gr.
ALCOHOL METÍLICO	100	ml

DISOLVER EL COLORANTE EN POLVO EN ALCOHOL METÍLICO HASTA DISOLUCIÓN, Y CONSERVAR LA SOLUCIÓN EN UN RECIPIENTE ÁMBAR.

#### B) GIENSA

GIENSA EN POLVO	0.8	gr.
GLIERINA	50	ml
ALCOHOL METÍLICO	50	ml

MEZCLAR EL COLORANTE EN POLVO CON LA GLICERINA, Y CALENTAR EN BAÑO - MARÍA A 55°C. HASTA COMPLETA DISOLUCIÓN.

ENFRIAR Y AGREGAR EL ALCOHOL METÍLICO, GUARDAR LA SOLUCIÓN 2 O 3 SEMANAS, FILTRAR Y CONSERVARLA EN FRASCO ÁMBAR.

DILUIR UNA PARTE DE ESTA SOLUCIÓN POR TRES PARTES DE LA SOLUCIÓN -- AMORTIGUADORA QUE SE PREPARA DE LA SIGUIENTE FORMA:

#### SOLUCIÓN 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

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA

SOLUCIÓN A	61.1	ml.
SOLUCIÓN B	38.9	ml.
AGUA DESTILADA	900	ml.

TINCIÓN DE JACOBSON

- 1) LAVAR LOS CULTIVOS EN SOLUCIÓN SALINA DURANTE 3 MINUTOS.
- 2) FIJAR LAS CÉLULAS CON ALCOHOL METÍLICO.
- 3) TEÑIR CON MAY GRUNWALD FILTRADO DURANTE 20 MINUTOS.
- 4) TEÑIR CON GIEMSA DILUÍDO 1:10 DURANTE 15 MINUTOS.
- 5) DESHIDRATAR EN DOS CAMBIOS DE DE ACETONA Y DOS CAMBIOS DE ACETONA-XILOL A PARTES IGUALES 5 MINUTOS CADA UNO.
- 6) HACER UN PASO CON XILOL UN MÍNIMO DE 20 MINUTOS.
- 7) MONTAR EN BÁLSAMO DE CANADÁ

TABLA DE ABREVIATURAS

ADN	ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO
°C	GRADOS CENTÍGRADOS
(DE <sub>50</sub> )	DOSIS EFECTIVA MEDIA
g	GRAMOS
HR.	HORA
N	MOLAR
mg	MILIGRAMOS
ug	MICROGRAMOS
ml.	MILILITROS
U.V.	ULTRAVIOLETA

BIBLIOGRAFIA

- 1.- RONALD, OKUN.: DRUGS USED IN THE TREATMENT OF NEOPLASTIC DISEASE, GENERAL PHARMACOLOGY, 55; 587-592 (1963)
- 2.- DE VITA, V. AND BUSCH, N. S., CANCER DRUG DEVELOPMENT PART A 1ST. ED. A. PRESS USA; P. 100 (1979)
- 3.- GARCÍA, G.: BIOLOGÍA DEL CÁNCER, GACETA MÉDICA DE MÉXICO. 114; 15-28 (1978)
- 4.- GARCÍA, G.: BIOLOGÍA DEL CÁNCER, SEMANARIO DEL HOSPITAL ESPAÑOL 6: 94-118 (1978)
- 5.- KNUDSON, A.; GENETICS AND THE ETIOLOGY OF CHILDHOOD CÁNCER, PEDIATR. RES. 10:513-518 (1976)
- 6.- MARTWELL, J. L., ABBOTT, B. T., ANTINEOPLASTICS PRINCIPLES IN PLANTS: RECENT DEVELOPMENTS IN THE FIELD IN ADVANCES IN PHARMACOLOGY AND CHEMOTHERAPY 1s. ED. USA: A. PRESS. 1117 (1969)
- 7.- NEUSS, N., GORMAN, M. AND JOHNSON, J. S. NATURAL PRODUCTS IN CANCER CHEMOTHERAPY IN METHODS IN CANCER RESEARCH, VOL. 3 ED. U.S.A.: A. PRESS. 633 (1967)
- 8.- MARTÍNEZ, P. R. DETERMINACIÓN EN VEGETALES DE LA ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE ALGUNAS LACTONAS SESQUITERPÉNICAS. TESIS PROFESIONAL. FACULTAD DE CIENCIAS UNAM MÉXICO. D.F.
- 9.- DELGADO, G. A. SESQUITERPENE LACTONES FROM VIGUIERA SPECIES. PHYTOCHEMISTRY VOL. 21, 6: 1305-1308 (1982)
- 10.- NEUSS, N. GORMAN, M. AND JOHNSON, J. S. NATURAL PRODUCTS IN CANCER CHEMOTHERAPY IN METHODS IN CANCER RESEARCH. VOL. 3 1ST. ED. USA: A. PRESS. 633 (1967)
- 11.- KUPCHAN, S. M. RECENT ADVANCES IN THE CHEMISTRY OF TUMOR INHIBITORS OF PLANT ORIGIN TRANS. N.Y. ACAD. OF SCIENCES. 32: 85-106 (1970)
- 12.- LEE, K. H., HALL, I. H., MAR, S., STARNES, C. O., ELGBOLES, S. A., WADDELL, T. G. SESQUITERPENE ANTITUMORS AGENTES: INHIBITORS OF CELULAR METABOLISM. SCIENCE 196: 533 (1977)

- 13.- ROMO DE VIVAR, A.: NEW PSEUDOGUAIANOLIDES FROM PARTHENIUM --- CONFERTUM GRAY (COMPOSITAE) TETRAHEDRON 26: 2775-2780: (1970)
- 14.- WAIZEL, B.J. CULTIVO, AISLAMIENTO Y VARIACIÓN DE PRINCIPIOS - ACTIVOS DE TRES ESPECIES DE PLANTAS, CON PROPIEDADES ANTICANCERÍGENAS. TESIS DE DOCTORADO. COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES UNAM, MÉXICO, D.F. (1979)
- 15.- JONES, J.B., YOUNG, J.M.: CARCINOGENECITY OF LACTONES III. THE REACTIONS OF UNSATURATED GAMMALACTONES WITH L-CYSTEINE. CAN. J. CHEM. 11: 1176 (1968)
- 16.- KUPCHAN, S.M., EAKIN, M.A. AND THOMAS, A.M.: TUMOR INHIBITORS 60. STRUCTURE CYTOTOXICITY RELATIONSHIPS AMONG THE SESQUITERPENE LACTONES, J. MED. CHEM. 14: 1147-1152 (1971)
- 17.- FESSLER, D.C., EAKIN, M.A., GRACOBBE, T.J., KUPCHAN, S.M. REACTIONS OF ENDOCYCLIC ALPHA-BETA, UNSATURATED GAMMALACTONES WITH THIOLS, J. ORG. CHEM. 35: 3539 (1970)
- 18.- KUPCHAN, S.M.; GIACOBBA, T.J.; KNELL, I.S.; THOMAS, A.M.; FESSLER, D.C.; REACTIONS OF ALPHA METHYLENE LACTONE TUMOR INHIBITORS WITH MODEL BIOLOGICAL NUCLEOPHILES. SCIENCE 168: 376 (1970)
- 19.- ORTEGA, A. AND MALDONADO, E. GUAIANOLIDES FROM COCHNATIA -- SMITHII. PHYTOCHEMISTRY VOL. 23 7: 1597-1509 (1984)
- 20.- CORREA, P., ARIAS, J.E., PÉREZ TAMAYO, R. Y CARBONELL, L.M.: -- TEXTO DE PATOLOGÍA. 3A. EDICIÓN. LA PRENSA MÉDICA MEXICANA - (1975)
- 21.- SETALA, K.: PROGRESS IN CARCINOGENESIS. ABIO-ASSAY OF SKIN TUMOR FORMATION. PROG. EXP. TUMOR. RES. 1: 115-178 (1960)
- 22.- BERENBLUM, I.: CARCINOGENESIS AS BIOLOGICAL PROBLEM. RES. - FRONT, BIOL. 34: 1-168 (1979)
- 23.- BERWAD, Y.: IN VITRO CELLS TRANSFORMATION WITH CHEMICAL -- CARCINOGENS NATURE. 200: 1182-1184 (1983)
- 24.- BOLTWELL, R.K.: SOME BIOLOGICAL ASPECTS OF SKIN CARCINOGENESIS PROG. EXP. T. RES. 4: 207-250 (1964)
- 25.- PEREZ TAMAYO, R.: PRINCIPIOS DE PATOLOGÍA. 2A. ED. MÉXICO: - LA PRENSA MÉDICA MEXICANA, MÉXICO, D.F. SEGUNDA EDICIÓN. 485 (1965)
- 26.- MELLER, E.R. AND HILLER, J.A. MECHANISM OF CHEMICAL CARCINOGENS. CANCER 47: 1050-1064 (1981)



- 27.- RHIN, J.S.: TRANSFORMATION OF HUMAN OSTEOSARCOMA CELL BY --  
CHEMICAL CARCINOGENS. J.NAT. CANCER INST. 24: 336-340 (1979)
- 28.- CASTRE, J.A.: EL CÁNCER, EL ALIMENTO Y LA ALIMENTACIÓN. ACTA  
BIOQUIM. CLIN. LATINOAMER. 16: 243-264 (1982)
- 29.- ITSIEH, D.P., WONG, J.J., MICHAS Y B.H.: MYCOTOXINS IN HUMAN  
AND ANIMAL. HEALTH. PARK FOREST SOUTH. PATHOTOX PUBLISHER.  
U.S.A. (1977)
- 30.- O.P.S.: CRITERIOS DE SALUD AMBIENTAL II: MICOTOXINAS --  
PUBLICACIÓN CIENTÍFICA No. 453, ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE  
LA SALUD. MÉXICO (1983)
- 31.- GON, K.O., BOUMEN, A., BAKANEINER, A., LEE, H. AND WALL, J.E.: -  
LEUKEMIA IN RADIATIONS TREATED PATIENTS: CYTOGENETIC STUDIES  
IN EIGHT CASES. AMER. J. MED. SCI. 276: 189-195 (1978)
- 32.- KOLLMAN, R.F. METHODS FOR STUDY OF RADIATION EFFECTS ON CANCER  
CELLS IN METHODS IN CANCER RESEARCH VOL 4 1ST. ED. USA: A.  
PRESS. 309 (1968)
- 33.- CARLO, M.C., HILARY, K. GENETIC OF CANCER HUMAN: SCIENTIFIC ---  
AMERICAN 19: 68-77 (1978)
- 34.- LINCH, H.T. KRUSH, A. CANCER GENETICS, SOth MED. J. 64: 26 -  
(1971)
- 35.- KNUDSON, A., STRONG, L., ANDERSON, D.: HEREDITY AND CANCER IN -  
MAN. IN PROGRESS IN MEDICAL GENETICS. VOL. IX, 113 (1973)
- 36.- DULBECCO, R.: THE INDUCTION OF CANCER BY VIRUSES SCI, AMER. -  
216: 28-37 (1967)
- 37.- GROSS, Z ONCOGENIC VIRUSES. 2ND. ED. USA: PERGAMON PRESS. 7  
(1970)
- 38.- GARCÍA, G.: BIOLOGÍA DEL CÁNCER. GACETA MÉDICA DE MÉXICO. -  
114. 15-28 (1978)
- 39.- HOPPS, HOWARD, C. PATOLOGÍA. 1A. ED. MÉXICO: ED. INTERAMERI-  
CANA. 226 (1960)
- 40.- DONALD, P., HOELZE, D.F., WALLACH, M.D.: GENERALIZED MEMBRANE -  
DEFECTS IN CANCER. MEDICAL PROGRESS. 284: 761-767 (1979)

- 41.- BEREMBLUM, I. EL HOMBRE CONTRA EL CÁNCER, ED. CANDELABRO, -- BUENOS AIRES, ARGENTINA, 43, (1953)
- 42.- STOCK, A.J.: CHEMOTHERAPY OF CANCER, CHEM. BRITAIN, 6: 11-16 (1970)
- 43.- FUDENBERG, H.H., STILES, D.P., COLDVELL, J.V., WELLES, J.V.: - MANUAL DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA, 2A. ED. ED. MANUAL MODERNO, S. A. MÉXICO, 316-346 (1980)
- 44.- KUPCHAN, S.M.: NOVEL NATURAL PRODUCTS WITH ANTITUMOR - ACTIVITY, FED. PROC. 11: 2288-2295 (1974)
- 45.- JONATHAN, L.: ANTINEOPLASTIC PRINCIPLES IN PLANTS: RECENT - DEVELOPMENTS IN THE FIELD, CANCER CHEMOTHERAPY NATIONAL - SERVICE CENTER, 117-125 (1973)
- 46.- DOMÍNGUEZ, V.A. MÉTODOS DE INVESTIGACIÓN FITOQUÍMICA IA, ED. MÉXICO: ED. LIMUSA, 93-108 (1973)
- 47.- KRECHMAL, A.C.: AGUIDE TO THE MEDICINAL PLANTS OF THE U.S.A. QUADRANGLE, THE NEW YORK TIMES BOOK CO. 116-117 (1973)
- 48.- ALINE, S.M. y L. PAASH. INTOXICACIÓN DE BORREGOS CON HELENUM INTEGRITOLIUM, VETERINARIA MÉXICO, 4: 214-222 (1973)
- 49.- REGISTRY OF ANIMAL CELL LINES, CERTIFIED BY THE CELL CULTURE COLLECTION CONMETTEL, 1st. ED, U.S. DEPARTAMENT OF HEALTH - EDUCATION AND WELFARE (1964)
- 50.- ORTEGA, A., MALDONADO, E. NUEVAS DILACTONAS DE ZINNIA FLAVICO • NIA XI SIMPOSIUM INTERNACIONAL, QUÍMICA DE PRODUCTOS NATURALES, MONTERREY, MÉXICO. (1983)
- 51.- TELLEZ, J., TABOADA, J. y GONZÁLEZ-DIDDI, M. CITOTOXICIDAD - DE ALGUNAS LACTONAS SESQUITERPÉNICAS "IN VITRO". ARCH. INVEST. MÉD. MÉXICO. 11: 435-443 (1980)
- 52.- GONZÁLEZ-DIDDI, M., TRUJILLO, J.M. VIABILIDAD DE CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES EN CULTIVO DE TEJIDOS DESPUÉS DE TRIPNIZACIÓN, BOL. ASOC. MÉX. PAT. 7: 113 (1969)
- 53.- CANCER CHEMOTHERAPY NATIONAL SERVICE CENTER, PROTOCOLS FOR - SCREENING CHEMICAL AGENTS AND NATURAL PRODUCTS AGAINST ANIMAL TUMORS AN OTHER BIOLOGICAL SISTEMS IN CANCER CHEMOTHERAPY - REPORTS No. 25. P 22 (1962)

- 54.- DANIEL, W.W. BIOESTADÍSTICA BASE PARA EL ANÁLISIS DE LAS CIENCIAS DE LA SALUD. MÉXICO: ED. LIMUSA P. 243 (1979)
- 55.- GOLSTEINS A. BIOSTADISTICS AN INTRODUCTORY TEST. MACMILLAN COMPANY, N.Y, USA: P. 129 (1964)
- 56.- HADDOW, A. HOMBURGER F. FISHMAN W. MECHANISMS OF CARCINOGENESIS. II BIOLOGIC ALKYLATING AGENTS. IN THE PHYSIOPATHOLOGY OF CANCER. EDS. HOEBER, N.Y. II: 478 (1953)
- 57.- ORTEGA, A., MALDONADO, E. ELEMENOLIDES FROM ZINNIA FLAVICOMA. PHYTOCHEMISTRY, 24: 2635-2639 (1985)