



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

EVALUACION DE SUSTANCIAS ANTINEOPLASICAS.
EL CULTIVO DE LINFOCITOS COMO SISTEMA DE PRUEBA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

T E S I S
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)
P R E S E N T A

M.EN C. EMILIO ROJAS DEL CASTILLO

DIRECTORA DE TESIS: DRA.PATRICIA OSTROSKY WEGMAN

MEXICO, D.F.

1992

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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 esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

INDICE

	HOJA
RESUMEN	1
PLANTEAMIENTO	3
INTRODUCCION	6
OBJETIVOS	35
DISEÑO EXPERIMENTAL	36
MATERIAL Y METODOS	38
RESULTADOS	45
DISCUSION	53
CONCLUSIONES	65
BIBLIOGRAFIA	67
FIGURAS	90
TABLAS	92
GRAFICAS	110

RESUMEN

La búsqueda de sistemas capaces de detectar sustancias con acción anticancerígena adquiere alta prioridad en nuestro tiempo, por esta razón se decidió validar el cultivo de linfocitos como un sistema para la detección de sustancias con potencial antineoplásico, usando como parámetros al índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular (CPC). Asimismo se evaluó el efecto de sustancias de síntesis nueva en este sistema.

Se estudiaron los efectos de: mitomicina-C, cisplatino, bleomicina, melfalan, 6-mercaptopurina, 5- fluorouracilo, metotrexate y colcemida (fármacos utilizados como antineoplásicos en la clínica).

Se compararon los resultados con los obtenidos para la incorporación de timidina trititada (método tradicionalmente utilizado para la evaluación citotóxica), tanto para el cultivo de linfocitos como para dos líneas celulares (X63 y L5178) ampliamente usadas en el cernimiento de sustancias antineoplásicas.

Todos los antineoplásicos utilizados provocaron una disminución del IM mitótico comparable a su efecto sobre la incorporación de timidina trititada, y solo aquellas sustancias que son capaces de interaccionar directamente con el DNA, (cisplatino, mitomicina-c, bleomicina y melfalan) retrasan la CPC de los linfocitos.

Los resultados apoyan el uso del IM y la CPC en el cultivo de linfocitos para la detección de sustancias con posible actividad citostática.

Por lo que respecta a las moléculas de nueva síntesis se probaron tres sustancias pertenecientes a la familia de las casiopeinas, compuestos de coordinación con centro metálico (cobre), observándose que la casiopeina 1 y la casiopeina 2 provocaban una disminución del IM y un retraso en la CPC de los linfocitos, mientras que otra la IGM1 no presenta actividad biológica en nuestro sistema.

PLANTEAMIENTO DE LA INVESTIGACION

El cáncer a nivel mundial, está reconocido como un problema importante de salud pública, debido a las frecuencias tan elevadas que ha alcanzado, a su impacto económico y trascendencia social (Registro Nacional del Cáncer; R.N.C. 1987). Por ello se ha dado especial atención al problema en los programas de atención médica, de investigación, prevención y epidemiológicos.

En muchos países, la mortalidad debida al cáncer oscila entre los 5 primeras causas de muerte. Así, por ejemplo, en Estados Unidos y Francia para el año 1985 el 22% de las muertes se debieron a esta enfermedad, y se calcula que la incidencia de cáncer anual es de aproximadamente un millón de nuevos casos.

Frente a esto, la ciencia dispone clásicamente de tres armas, la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, cabe mencionar que en las últimas décadas se ha desarrollado fuertemente el área de los moduladores biológicos. Sin embargo, con frecuencia se trata de un "combate ciego" donde las armas utilizadas "hieren" indistintamente a las células normales y a las células malignas.

Desde principios de este siglo los investigadores han tratado de encontrar sustancias químicas que puedan detener o matar a las células tumorales, así ya en los años 20s Coley mezcló toxinas, compuestos arsenicales, colchicina y otros venenos mitóticos, para ver su efecto sobre la dinámica tumoral (Zubrod et al, 1977).

Por una investigación sistemática y organizada o por serendipia, se han ido encontrando o desarrollando agentes químicos (tanto naturales o sintéticos) que se utilizan en el tratamiento de ciertos cánceres.

Cada año la industria farmacéutica produce más y más sustancias, a pesar de esto, son muy pocas las que tienen utilidad en el tratamiento del cáncer (aproximadamente unas 30 sustancias), por lo cual subsiste la necesidad de encontrar agentes con un amplio espectro de actividad antitumoral y con menor toxicidad que los agentes usados actualmente.

En México, la necesidad de importación de estos productos, y su costo muy elevado hace que el desarrollo de productos antineoplásicos adquiera alta prioridad. Consciente de esta situación en la Universidad Nacional Autónoma de México se planteó un proyecto para el desarrollo de sustancias antineoplásicas participando en él investigadores de la Facultad de Química, Facultad de Medicina y del Instituto de Investigaciones Biomédicas, los cuales desarrollan y evalúan drogas sintéticas con potencial antineoplásico.

En general la búsqueda sistemática de nuevos antineoplásicos consiste en realizar un cernimiento en el cual de un grupo de sustancias se escogen aquellas que puedan tener el mayor potencial como agentes anticancerígenos al ser aplicados en la clínica. Este cernimiento se lleva a cabo tanto para moléculas naturales como para sintéticas, cuando en estos estudios no hay actividad entonces la investigación de la sustancia se suspende, y sirve de retroalimentación para modificar la estructura. Si hay confirmación de la actividad, entonces se puede continuar con pruebas más específicas.

En el Instituto de Investigaciones Biomédicas, se ha utilizado el cultivo de linfocitos de sangre periférica de humanos como un método para la evaluación de los efectos genotóxicos, encontrándose que diversas sustancias son capaces de alterar la proliferación de estas células, por lo que surgió la idea de usar este sistema para detectar sustancias capaces de alterar la proliferación y su uso como un sistema de cernimiento de actividad citostática.

El objetivo de este trabajo fue validar al cultivo de linfocitos de sangre periférica humana *In Vitro* como un sistema para la detección de sustancias con capacidad antineoplásica, usando como parámetros al índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular (CPC), y evaluar sustancias de nueva síntesis con posible actividad antineoplásica.

INTRODUCCION

CANCER Y QUIMIOTERAPIA

a) ASPECTOS HISTORICOS

Aunque el concepto de tratamiento del cáncer con drogas se remonta al menos a 500 años, donde preparaciones de plata, zinc y mercurio eran usadas, la utilidad de los medicamentos en el tratamiento sistémico del cáncer está bien documentada, hasta 1865 cuando Lissauer usó arsenito potásico (solución de Fowler) en un paciente con leucemia y notó un efecto positivo (Lissauer, 1865). Sin embargo la quimioterapia del cáncer no se desarrolló hasta por lo menos 80 años después.

Resulta irónico que la primera droga anticancerígena efectiva aparece en el contexto de la guerra y no proviene de la medicina. Esta droga fue la mostaza del nitrógeno, cuyo precursor, la mostaza del azufre (o gas H), fue usado en el campo de batalla en 1917.

Se sabía que el gas H era extremadamente irritante y que podía quemar la piel, el tracto digestivo y hasta los ojos. Fue hasta después de la guerra que se conoció que esta mostaza presentaba otros efectos tóxicos, como son; leucopenia, aplasia de la médula ósea y ulceraciones del tracto intestinal (Krumbhaar y Krumbhaar, 1919). En 1931 Adair y Bagg aplicaron gas H a un paciente con cáncer escamoso, pero fue considerado demasiado tóxico para el uso sistémico.

En los años treinta otra mostaza fue desarrollada para su posible uso en la guerra, la mostaza del nitrógeno. Aunque nunca fue usada en combate durante la Segunda Guerra Mundial. Un desafortunado accidente durante ella, hizo que personal de la Marina de Estados Unidos y varias personas más que habitaban el puerto de Bari, se expusieran a esta mostaza (Ingfield,G,1971).

Pocos años después Gilman examinó su efecto antitumoral experimentalmente en ratones con linfosarcoma, encontrando un efecto positivo (Gilman,1963).

En Noviembre de 1942, Gilman, Goodman, Lindskog y Dougherty empezaron el primer tratamiento clínico utilizando la mostaza del nitrógeno, en pacientes con linfosarcoma, sin embargo su utilidad en el tratamiento del cáncer no fue conocida hasta el año de 1946, cuando aparece una revisión de Gilman y Philips. Esa revisión marca el inicio de la quimioterapia moderna del cáncer.

Diversas sustancias fueron evaluadas. La aminopterina fue la segunda droga que tuvo éxito en la quimioterapia y pertenece a la clase de los llamados antimetabolitos.

Farber y colaboradores decidieron probar los conjugados y antagonistas del ácido fólico en niños con leucemia, encontrando que los conjugados aceleran el proceso leucémico en médula ósea, mientras que ciertos antagonistas eran citotóxicos. En 1947 cuando se pudieron obtener grandes cantidades de esta sustancia, fue introducida a la clínica.

En otro estudio Farber trató con aminopterina a 16 niños con leucemia aguda (Farber *et al*, 1948) logrando 10 remisiones. Estos resultados motivaron la búsqueda de nuevos antagonistas del ácido fólico menos tóxicos.

De esta manera Seeger y colaboradores en 1949 sintetizaron la droga amenopterina o mejor conocida como metotrexate y en muy poco tiempo fue usada clínicamente. Sin embargo la búsqueda de un medicamento más poderoso y menos tóxico (sueño de Farber) continúa.

Hasta la fecha no se ha encontrado un antifolato significativamente mejor que el metotrexate y este medicamento continúa siendo el miembro de esa clase que es usado en la clínica. Es importante resaltar que el uso del metotrexate en el tratamiento de un coriocarcinoma gestacional, dió el primer ejemplo de cura del cáncer inducida por fármacos (Hertz *et al*, 1961).

El desarrollo del grupo de las antipurinas como sustancias contra el cáncer, empezó con el trabajo de Hitchings y colaboradores a principios de los años 40's (Elion *et al*, 1952). Entre las primeras antipurinas que presentaban efectos sobre tumores experimentales, se encontraban la 8-azoguanina y la 2-6-diaminopurina, sin embargo estos fármacos no fueron usados clínicamente, debido a su alta toxicidad.

La primera antipurina clínicamente efectiva fue la 6-mercaptipurina descrita por Elion y cols en 1952. Cuando se estudió el efecto de este medicamento en contra de leucemias humanas se encontró que tenía una gran actividad (Burchenal *et al*, 1953).

Este medicamento es utilizado hoy día en el tratamiento de leucemias agudas en niños. Recientemente se han desarrollado varios fármacos de este grupo, como la 6-Tioguanina.

Heidelberger y colaboradores en 1965, después de revisar los reportes experimentales existentes acerca de que las células tumorales utilizaron más el uracilo que el ácido orótico para sintetizar los ácidos nucleicos y desarrollaron las antipirimidinas con las que pretendían inhibir la utilización del uracilo por los tumores.

Este grupo pensó que un antimetabolito parecido al uracilo, podría ser incorporado preferentemente por las células tumorales. De esta manera se desarrolló el 5-fluorouracilo, fármaco anticancerígeno utilizado hasta la fecha.

El desarrollo del 5-fluorouracilo es un ejemplo importante ya que fue el primer medicamento diseñado y sintetizado por un grupo interdisciplinario con el único propósito de obtener una sustancia anticancerígena.

El Dr. Farber introdujo otra clase de medicamentos a la clínica, en 1954 usó en niños que presentaban tumores de Wilms, Actinomicina-D, uno de los antibióticos citotóxicos aislados de las especies de Streptomyces (Waksman y Woodruff, 1940),

Los antibióticos antitumorales difieren de los antibióticos antibacterianos, en que los primeros son muy citotóxicos para las células de mamífero. Dentro de este grupo hay una gran cantidad de sustancias, entre las que podemos resaltar, la familia de las mitomicinas, de las bleomicinas y otros..

El azar también juega un papel importante en el descubrimientos de fármacos con capacidad anticancerígena. Uno de estos casos es la introducción a los esquemas de quimioterapia de los alcaloides de la planta Vinca.

Se decía que estos alcaloides producían hipoglucemia, sin embargo cuando Noble y colaboradores en 1958, estudiaron estos alcaloides no encontraron los efectos hipoglucémicos que se les atribuían, pero sí que causaban granulocitopenia y una inhibición de las células de la médula. Posteriormente Johnson y colaboradores (1963) demostraron que algunas fracciones alcaloides de esta planta presentaban actividad antileucémica en ratones.

Nuevos medicamentos han estado apareciendo, pero la mayoría de ellos son sintetizados a partir de compuestos desarrollados hace varios años. En los últimos años la única aparición relevante ha sido el hallazgo del cis-platino . El Cis-diamino-dicloroplatino es un fármaco descubierto por Rosenberg, Van Camp y Krigas en 1965, que cuando trataban un cultivo de Escherichia coli con un campo magnético producido con unos electrodos de platino, notaron que la replicación de las bacterias se detenía. La utilización de este medicamento abrió un amplio campo de investigación.

En relativamente pocos años (aproximadamente 40) se han desarrollado y utilizado diferentes tipos de sustancias para el tratamiento de los diferentes cánceres (Tabla 1). Estos medicamentos se clasifican de acuerdo a sus mecanismos de acción (Tabla 2).

TIPOS DE MEDICAMENTOS ANTINEOPLASICOS DE ACUERDO A SU MECANISMO DE ACCION:

AGENTES ALQUILANTES.

Estos agentes forman iones, altamente reactivos, los cuales reaccionan con componentes celulares esenciales alterando su función biológica normal. Además pueden remplazar los átomos de hidrógeno por radicales alquilo que causan principalmente ligamientos cruzados, "cross linking", y un apareamiento anormal de las bases en la molécula de DNA. También pueden interaccionar con los grupos sulfidrilo, fosfato y amino dando como resultado múltiples lesiones, tanto en células en división como en reposo.

El cisplatino es un complejo metálico de coordinación que entra a la célula por difusión. Los iones de cloro se pierden por hidrólisis dando como resultado la formación de dos sitios de unión o ligandos activos, por lo que ha sido reportado como un agente alquilante bifuncional (Roberts y Pascoe, 1972; Mansy *et al.* 1973; Munchausen y Rahn, 1975).

El sitio preferencial de unión es la guanina, y ha sido reportado como agente mutagénico, teratogénico y clastogénico (Adler y ElTarras, 1990, Fram *et al.* 1986, Turnbull *et al.* 1979).

El cis-platino ha sido de gran utilidad en el tratamiento de diferentes cánceres como: testículo (Williams y Einhorn, 1980), vejiga (Yagoda, 1980), y otros. Este medicamento ha tenido buenos resultados en contra de tumores sólidos (tumores muy difíciles de tratar y con poca respuesta a los tratamientos ya que más del 50 % de las personas que lo presentan mueren) (Stockdale, 1987).

A este mismo grupo pertenece el melfalan el cual es una mostaza nitrogenada derivada de la fenilalanina, es también conocida como l-sarcolisina. Es un agente alquilante bifuncional que transforma células de mamífero en cultivo (Marquardt y Marquardt, 1977), produce mutaciones génicas (Benedict *et al.* 1977) y ha sido reportado como agente genotóxico (Ringborg *et al.* 1981) y produce aberraciones cromosómicas específicas, involucrando principalmente los cromosomas 5, 7, 9, 11 y 17 (Mamuris *et al.* 1989; Parsons y Morrison, 1978).

El melfalan presenta su máximo efecto sobre células en fase G1 y puede alquilar tanto al DNA como a las proteínas de la cromatina (Davydova, 1960; Novikova, 1960, Kurlov *et al.* 1968, 1973).

Ha sido utilizado con éxito contra el mieloma múltiple (Bergsagel, 1972), melanoma maligno, carcinoma de pecho y ovario (Calabresi y Parks, 1980)

ANTIMETABOLITOS.

Incluyen a un variado grupo de compuestos los cuales interfieren con diversos procesos del "metabolismo" del DNA y de ese modo alteran las funciones celulares normales.

Este tipo de medicamentos pueden actuar principalmente por dos mecanismos generales : a) Por la incorporación de la sustancia, más como un compuesto químico esencial que como un constituyente celular normal, o bien b) por la inhibición de una enzima clave (como la dihidrofolato reductasa) para el funcionamiento celular normal (Pratt y Ruddon, 1979).

El metotrexate es un buen inhibidor de la dihidrofolato reductasa, la unión entre ambas es muy fuerte, ya que es resistente a la acción de las proteasas (Hakala y Soulinna, 1966). La inhibición de esta enzima es claramente el mecanismo más importante de acción de este medicamento, aunque es muy posible que a grandes concentraciones, esta sustancia pueda inhibir a la enzima timidilato sintetasa directamente, lo que contribuiría a su efecto citotóxico (Rueckert y Mueller, 1960).

El metotrexate presenta una gran citotoxicidad al parecer debida al efecto "muerte sin timina", agotando las purinas de la célula. Se ha visto que este efecto puede ser reversible si se añade a la célula timina o desoxiadenina, por lo cual ha sido utilizado para sincronizar cultivos (Borsa y Whitmore, 1969).

En pacientes tratados con este medicamento se han observado efectos genotóxicos como aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas, y no existen reportes que sea mutagénico en bacterias (IARC, 1987), pero sí es un reconocido teratógeno (Calabresi y Parks, 1980).

El metotrexate es un buen medicamento para el manejo de la psoriasis, artritis reumatoide y en el campo oncológico para las leucemias linfoblásticas agudas en niños, sin embargo tiene un valor muy limitado en el tratamiento de leucemias en adultos (Kastrup *et al.* 1985).

Otra de los fármacos usados dentro de este grupo es la 6-mercaptopurina que es un análogo natural de la base hipoxantina, que posee un grupo sulfhidrilo en la posición 6 de la base. Este medicamento es el sustrato para la enzima HGPRT (hipoxantina-guanina-fosforibosil-transferasa), y es convertido directamente en nucleótido por vía del ahorro de las purinas, dando como resultado el nucleótido 6-mercaptopurina-ribosa-fosfato, que es la forma más abundante de esta sustancia a nivel celular, y de esta manera inhibe la síntesis de las purinas.

La citotoxicidad de la 6-mercaptopurina no depende de un solo mecanismo de acción ya que este fármaco inhibe muchas funciones celulares (Patterson y Tidd, 1975; Elion y Hitchings, 1965). La inhibición de la síntesis de las purinas es el principal efecto. Produce aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas en linfocitos de pacientes tratados, mutaciones y daño al DNA en bacterias (IARC, 1987).

Esta sustancia ha sido utilizada principalmente para el tratamiento de leucemias agudas (leucemia linfoblástica, leucemia granulocítica crónica), generalmente responden mejor los niños que los adultos que presentan esta enfermedad.

Dentro del grupo de los análogos de pirimidina se encuentra el 5-fluorouracilo (5FU), el cual debe ser convertido a su nucleótido el 5-fluoro-2-deoxiuridina-5- monofosfato (FdUMP), para presentar su efecto citotóxico. Esta conversión del 5FU puede llevarse a cabo por tres diferentes mecanismos; 1.- por medio de la pirimidina fosforibosil-transferasa acoplada a la ribonucleótido reductasa, 2.- por la uridina quinasa y 3- la uridina fosforilasa. La acción de todas ellas da como resultado la formación del nucleótido FdUMP (Lagenbach *et al.* 1972).

El 5FU inhibe la síntesis de DNA por medio de la inhibición de la enzima timidilato sintetasa. Esta enzima dirige la transferencia y reducción de un grupo metileno del ácido fólico al ácido desoxiuridílico para dar el ácido timidílico (Lagenbach *et al.* 1972; Santi *et al.* 1974). Es más tóxica en células en proliferación que en las que no lo están, y se ha sugerido que podría actuar preferentemente sobre células en fase G1 o S (Lozzio, 1969; Kovacks *et al.* 1975).

En pacientes tratados con este medicamento no se observaron efectos genotóxicos (Musilova *et al.* 1979; Clare *et al.* 1982), sin embargo en células de criceto chino induce aneuploidías, aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas (Maier y Schmid, 1976; Yajima *et al.* 1981).

El 5FU es efectivo en contra de varios tumores sólidos. Frecuentemente se usa junto con la ciclofosfamida y el metotrexate en el tratamiento del cáncer de mama (Pratt y Ruddon, 1979).

ANTIBIOTICOS.

Es un grupo de compuestos que son capaces de alterar las funciones celulares normales de los tejidos de mamíferos. Su principal mecanismo de acción es el de inhibir la síntesis de DNA, de RNA y de retrasar o inhibir la mitosis. Dentro de este grupo tenemos dos familias de compuestos muy importantes para el tratamiento del cáncer, las mitomicinas y las bleomicinas.

Las mitomicinas fueron descubiertas por Hata en 1956, y su estructura química fue dilucidada hasta el año de 1962 por Webb. Estas sustancias presentan un grupo uretano, una quinona, así como un anillo de aziridina, el cual es esencial para que presente la actividad antineoplásica (Kersten, 1975).

Después de una reducción enzimática de la quinona y la pérdida del grupo metóxido, la mitomicina se convierte en un agente alquilante bifuncional. De todas las mitomicinas, la mitomicina-C aislada de Streptomyces caespitosus por Wakaki en 1958 es la más activa de todas.

La mitomicina produce entrecruzamientos uniéndose covalentemente con el DNA (Arora, 1979; Szybalsky *et al.* 1967), al parecer la capacidad que presenta para llevar a cabo los entrecruzamientos es proporcional a la cantidad de guaninas y citosinas que estén presentes en el DNA (Tomasz *et al.* 1987). Ha sido reportada como mutagénica para bacterias (Szybalsky, 1964), como agente clastogénico, teratogénico y carcinogénico en células de mamífero (Cohen y Shaw, 1964; Nowell, 1964 y Crooke y Bradner, 1976).

La mitomicina ha sido usada con resultados positivos en el adenocarcinoma gástrico y ha producido beneficios temporales en carcinomas de colon, cervix, recto, páncreas y mama (Crooke y Bradner, 1976, Orwool *et al.* 1978).

La otra familia importante dentro de este grupo de antibióticos antitumorales son las llamadas bleomicinas, que fueron descubiertos por Umezawa *et al.* (1962) como resultado de los productos de fermentación de Streptomyces verticillus. Las evidencias indican que tanto sus efectos tóxicos como su espectro antitumoral pueden verse modificados dependiendo de sus grupos terminales (Umezawa, 1973, Chabner *et al.* 1975).

Se reconocen dos tipos principales de bleomicinas, la A y la B ambas utilizadas en la clínica (el producto comercial es una mezcla de estos dos tipos de bleomicinas), aunque hoy día ya se tiene un derivado que es más activo llamado peplomicina.

Las bleomicinas presentan interesantes propiedades bioquímicas, Al parecer su actividad citotóxica está relacionada con su capacidad de cortar la molécula de DNA (por esta razón se les consideran como agentes radiomiméticos).

Estos cortes se pueden deber a la interacción de la bleomicina con los iones de hierro y oxígeno (Povirk, 1979). Se ha postulado que los grupos bitiozoles de la bleomicina se intercalan en el DNA acercando el grupo Fe al azúcar. La reacción crucial parece ser la oxidación del complejo bleomicina+Fe²⁺+DNA.

El complejo oxidado Fe³⁺ + bleomicina se puede disociar del DNA y ser reducido otra vez a Fe²⁺ + bleomicina, para así poder unirse otra vez al DNA. Cada ciclo de oxidación reducción puede causar la liberación de una base (Sausville *et al.* 1978; Povirk, 1979).

Existen informes de que la bleomicina es genotóxica (Bornstein *et al.* 1971; Hittelman y Rao, 1974; Promchainant, 1975), y produce que se sintetice gran cantidad de la enzima superóxido dismutasa, la cual está involucrada en la eliminación de los efectos producidos por los radicales libres en la célula (Bianchi y Lopez-Lazarra, 1991).

Se considera que a temperaturas fisiológicas el daño al DNA debido a la bleomicina es el resultado de tres diferentes eventos: 1.- degradación del DNA por medio de radicales libres, 2.- inactivación de los radicales libres por medio de enzimas antioxidantes y 3.- la reparación enzimática del daño. A bajas temperaturas no se evita la degradación del DNA por medio de los radicales libres, pero si se inhiben todos los demás eventos (Lopez-Larraza, 1990).

AGENTES INHIBIDORES DE LAS MITOSIS.

Son venenos del huso mitótico, dentro de los que tenemos a los ya comentados alcaloides de la planta Vinca y a la colchicina y sus derivados. Todas estas drogas comparten su capacidad de unirse a la tubulina de los microtúbulos causando una despolimerización de la misma, lo cual lleva a que la célula presente una mala separación de los cromosomas.

Existe información de que el sitio de unión de la colchicina es diferente al de los alcaloides de Vinca, sin embargo cuando una célula es tratada con vinblastina y colcemida, esta última se une a la tubulina más fuertemente (Wilson, 1970). La exposición de las células mitóticas a colcemida (derivado de la colchicina) da como resultado la rápida desaparición del huso y el mantenimiento de los cromosomas en un estado condensado (Borisy *et al.* 1974).

La colcemida al igual que la vinblastina no actúan promoviendo la disociación de los microtúbulos, sino que actúa bloqueando el proceso de polimerización, rompiendo así el estado de equilibrio que presentan los microtúbulos (Margulis y Wilson, 1977).

Se ha informado que estas sustancias se utilizan para sincronizar cultivos ya que al ser lavados de los medios, las células pueden salir de mitosis y entrar en interfase (Pratt y Ruddon, 1979). La colcemida es poco usada hoy día en la clínica, pero se le utilizó para el tratamiento de la leucemia mielóide crónica junto con busulfan y la radioterapia.

Cabe mencionar que todas las drogas utilizadas clínicamente presentan rangos de citotoxicidad que pueden ir desde un leve mareo o náuseas o ser altamente tóxicos para el riñon o el oído, etc.

Como se puede apreciar tenemos un variado campo de mecanismos de acción dentro de las drogas utilizadas para la quimioterapia, hay que mencionar que algunos cánceres son tratados con hormonas, o bien con algunos medicamentos novedosos como es la hidroxiurea. Si bien es cierto que estos medicamentos en algunos casos han tenido éxito para erradicar algunos tipos de cáncer, en la mayoría este tipo de terapia es paliativa.

DESCUBRIMIENTO Y DETECCION DE MEDICAMENTOS ANTINEOPLASICOS

a) ASPECTOS HISTORICOS

En los años 20s ya se conocían los tumores transplantables en ratones, para la búsqueda de sustancias que fueran capaces de detener el crecimiento tumoral. Entre éstos tenemos, los tumores ascíticos de Ehrlich, sarcoma 180, Walker 256, y otros. En el año de 1937 se forma en Estados Unidos lo que hoy se conoce como el Instituto Nacional del Cáncer (Shear *et al.* 1947), rápidamente este Instituto empezó a probar muchas sustancias y a finales de los años 50 se tenían probados más de 3,000 compuestos químicos (Zubrod *et al.* 1977).

Sin embargo durante más de dos décadas los programas de este Instituto tuvieron que ser cortados muchas veces por falta de fondos, fue hasta el año 1955 que se estableció el primer programa con apoyo del gobierno (Staquet *et al.* 1983) y a partir de esa fecha se han llevado a cabo diferentes estudios para lograr establecer estrategias que permitieran detectar agentes que puedan ser aplicados en la clínica para el tratamiento de los diferentes tipos de cáncer.

En general la búsqueda sistematizada de nuevos agentes antineoplásicos consiste en realizar un cernimiento en el cual, de un grupo de sustancias se escogen a aquellas con mayor potencial terapéutico. Para esto se han utilizado diferentes modelos tumorales transplantados en animales de experimentación, principalmente en ratones.

Se asume que existe una correlación entre la actividad contra los tumores transplantados en ratones y la efectividad terapéutica en el humano. Si esta correlación existe, entonces el uso de sistemas experimentales para la selección de las drogas que serán evaluadas en la clínica, es mejor que una selección al azar.

En 1975 se introdujo en el Instituto Nacional del Cáncer un sistema de cernimiento de sustancias anticancerígenas que implicaba la utilización de un sistema de precernimiento en el cual se utilizaba un modelo leucémico llamado P-388, aislado por Potter y Briggs en 1962 de ratones DBA/2 que fueron expuestos a metilcolantreno (Lowe y Davis, 1989).

El ensayo consistía en implantar células P-388 intraperitonealmente en ratones de la cepa CDF1 o BDF1, utilizando un solo sexo en cada ensayo, los cuales después de un día eran tratados con los esquemas seleccionados, que podían consistir en dosis únicas o bien en dosis repetidas del compuesto de elección.

El parámetro evaluado al término de la prueba era el tiempo de supervivencia. Una sustancia era considerada como positiva si los ratones tratados sobrevivían al menos un 25% de tiempo más que los ratones no tratados.

El parámetro de tiempo de supervivencia se eligió en base a estudios en los que se encontró que a medida que disminuía el número de células leucémicas por el tratamiento, el tiempo de supervivencia aumentaba (Shabel *et al.* 1977).

La finalidad de un sistema de cribado inicial es seleccionar aquellas sustancias con posible acción anticancerígena, para así continuar con el cribado secundario y culminar con las pruebas a nivel clínico.

En la etapa primaria del cribado, se requiere que los modelos utilizados tengan una gran sensibilidad, es decir, que detecten un número grande de drogas que tengan el potencialmente activas (Venditti, 1981).

En la etapa secundaria del cribado se requiere que los modelos usados sean capaces de detectar el mayor número de sustancias con actividad específica, es decir deben descartar al mayor número de falsos positivos.

Cabe mencionar que existen casos en los cuales, si las sustancias presentan estructuras químicas relevantes, se puede llegar a hacer a un lado el cernimiento y pasar directamente a las pruebas farmacológicas y clínicas.

La búsqueda de agentes curativos para tumores sólidos a través del cernimiento en tumores transplantados ha tenido un éxito limitado, ya que en la mayoría de los casos el tratamiento principal es paliativo, de ahí la preocupación por la búsqueda de sistemas de cernimiento más sensibles.

METODOS DE DETECCION DE ANTINEOPLASICOS

Los sistemas que han sido utilizados para el cernimiento específico de actividad son principalmente 1.- microorganismos donde el efecto que se mide es si la sustancia interactúa con el DNA; 2.- el cultivo de líneas celulares en donde el efecto es medido por la cantidad de colorantes vitales, o por la incorporación de timidina tritiada, (que es el método clásicamente usado), el parámetro utilizado para el cernimiento es la medición de la citotoxicidad de la sustancia probada.

Hoy día el Instituto Nacional del cáncer de los Estados Unidos, estableció el uso de un panel de alrededor de 60 a 100 líneas tumorales de humano en las cuales se probarían *in vitro* las sustancias. Una de las ventajas que este esquema o estrategia puede tener sobre las anteriores es la posibilidad de descubrir agentes que sean relativamente específicos para un cierto tipo de tumor (Johnson, 1990).

En esta nueva estrategia se pretende que el cernimiento inicial de las fármacos con mayor potencial para ser usadas en la clínica, sea llevado a cabo en el panel de las líneas tumorales que están agrupadas en los siete tipos más frecuentes de tumores detectados en humanos, como cáncer de pulmón, de riñón, de colon, de ovario, del sistema nervioso, melanoma y leucemias (Skehan *et al.* 1990).

El parámetro observado es la inhibición del crecimiento celular *in vitro* a través de la medición de la incorporación de un colorante que determina el total de la síntesis proteica.

Con un estudio inicial se determina que drogas son capaces de detener la proliferación celular y en que tipos de células lo hacen, para así pasar al cernimiento secundario el cual consiste en implantar en ratones desnudos el tipo tumoral sobre el cual actuó la droga en particular y así evaluar si esta actividad se mantiene ahora en un modelo *in vivo*. De ser así se pasa a las pruebas a nivel clínico (Chabner, 1990).

Si bien la nueva propuesta hecha por el Instituto Nacional del Cáncer puede presentar ventajas de selección de agentes con actividad antineoplásica, el manejo de tantas líneas puede llegar a ser complicado y su costo elevado, razones que pueden ser un obstáculo para implementar esta estrategia en muchos laboratorios, es por esto la relevancia de proponer sistemas alternativos de cernimiento de fármacos, como sería el cultivo de linfocitos.

METODOS PARA EL ESTUDIO DE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR

-INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA

La utilización de precursores marcados radioactivamente para la evaluación de la cinética celular ha sido un parámetro ampliamente estudiado para cuantificar los efectos de diversos agentes químicos.

Los primeros estudios de Howard y Pelc (1951), usando fósforo 32 y los de Taylor (1957) con timidina tritiada mostraron que era posible reconocer el punto en el cual se encontraba una célula dentro del ciclo celular, con estas técnicas Quastler y Sherman (1959) realizaron el primer análisis *in vivo* del ciclo celular.

Rapidamente se utilizaron estas técnicas para evaluar la cinética celular de células neoplásicas (Pilgrim *et al.* 1963), así como, de los cambios de la cinética durante la carcinogénesis (Iversen y Bjerknes, 1963; Bresciani, 1965 y Marques-Periera y Leblond 1965).

El uso de la timidina tritiada es considerado hoy día como la técnica clásica para los estudios de cinética de poblaciones celulares sintetizando DNA (Simpson-Herren, 1987) así como para estudiar los efectos citotóxicos de algunas sustancias, ya que cualquier célula que pase por la fase de síntesis en presencia de la timidina radioactiva, dará una señal cuando sea evaluada (Freshney, 1987).

-INCORPORACION DE BROMODESOXIURIDINA

El desarrollo de la técnica de la tinción diferencial (Perry y Wolff, 1974), basada en la incorporación de la bromodesoxiuridina (BrdU) en el DNA, utilizando un fluorocromo como es el Hoescht y seguida de una tinción con Giemsa, ha permitido la identificación de células en metafase, que se han duplicado una, dos o más veces, haciendo posible el examen de la cinética de poblaciones celulares en división. Además este método presenta la ventaja de no trabajar con radioactividad.

EL LINFOCITO COMO SISTEMA DE CERNIMIENTO INICIAL PARA LA DETECCION DE SUSTANCIAS CON CAPACIDAD ANTINEOPLASICA.

El cultivo de linfocitos humanos ha sido ampliamente utilizado como sistema de prueba para evaluar la actividad genotóxica de sustancias químicas y radiaciones (Obe *et al.* 1975; Albertini *et al.* 1980; Ostrosky *et al.* 1987). Además se puede evaluar los efectos de las sustancias sobre la proliferación celular (Gebhart *et al.* 1981; Gebhart, 1982 y Ostrosky *et al.* 1991). Por lo que consideramos que puede utilizarse como un método alternativo para el cernimiento primario de sustancias con actividad antineoplásica.

En el cultivo de linfocitos ha podido demostrarse la presencia de subpoblaciones y determinarse el tiempo del ciclo celular (Craig-Holmes y Shaw, 1977), el cual puede variar en función de: las condiciones del cultivo, (Mutchinick *et al.* 1980; Gonsebatt *et al.* 1990), la edad de los donadores (Schneider *et al.* 1982), su estado de salud (Nazarenko y Burmakina, 1984; Dutrillaux y Fose, 1976; Mutchinick *et al.* 1979; Ortiz y Betancourt, 1990) y la adición de ciertos agentes químicos (Craig-Holmes y Shaw, 1977; Crossen y Morgan, 1977; Snope y Rary, 1979 y Morimoto y Wolff, 1980).

Hay informes de algunos investigadores que mencionan que algunos antiamibianos, antihelmínticos y antimicóticos retardan la cinética de proliferación celular *in vitro* (Ostrosky *et al.* 1984; Jaju *et al.* 1983; Kierszenbaum *et al.* 1990; Szein *et al.* 1990).

Algunos investigadores han estudiado la posible influencia de un proceso maligno (cáncer), sobre la cinética de proliferación de linfocitos de personas que no han recibido ningún tipo de terapia. No se encontró ningún cambio en la cinética de proliferación de linfocitos, en pacientes con con cáncer esofágico (Adhvaryu *et al.* 1988a), cáncer de mama (Adhvaryu *et al.* 1988b) y en neoplasias múltiples endócrinas tipo II (Butler *et al.* 1987). Sin embargo Adhvaryu *et al.* (1988c) y Slavutsky *et al.* (1988) encontraron diferencias con respecto a los controles en pacientes con cáncer ovárico y cáncer de colon.

Hay algunos estudios que indican que la cinética de proliferación celular, puede también ser alterada por la exposición de los linfocitos *in vivo* o *in vitro* a fármacos administrados experimental o terapéuticamente.

Du frain *et al.* (1979) comunican un ligero alargamiento del ciclo celular en linfocitos de conejos tratados con ciclofosfamida y Madle (1981) mostró un retardo en la cinética de proliferación de linfocitos humanos cuando son tratados con ciclofosfamida en presencia de la fracción metabólica S9. Singh y D'Ambrosio (1984) reportan un retraso en la proliferación de los linfocitos de pacientes con cáncer después de tratamientos con ciclofosfamida, cisplatino y mitomicina-C.

Gebhart *et al.* (1980), encuentran que en cultivos de linfocitos de pacientes antes de que reciban terapia con agentes citostáticos, hay un 25% de metafases en primera división y el 75 % restante, corresponde a segundas o subsecuentes generaciones, mientras que después de la terapia, se encontró un 60 % de metafases en primera división.

Recientemente, se ha observado un retraso en la proliferación de linfocitos humanos, tratados con diferentes complejos de platino, encontrando que el complejo Squerodicisplatino I era más activo que el cis-diaminodícloroplatino (Cisplatino).

También hay estudios con agentes esteroideos que muestran un retraso en la cinética de proliferación de linfocitos, observando un mayor número de linfocitos que solo se dividieron en el cultivo una sola vez (Mourelatos *et al.*, 1987; Tselepi *et al.* 1989).

COMPUESTOS DE NUEVA SINTESIS

En México la necesidad de importación de medicamentos antineoplásicos y su costo muy elevado, hace que el desarrollo de estos productos adquiera alta prioridad. Consciente de esta situación la Universidad Nacional Autónoma de México creó en 1988 el proyecto de DESARROLLO DE SUSTANCIAS ANTINEOPLASICAS con grupos de investigación de la Facultad de Química, Facultad de Medicina y del Instituto de Investigaciones Biomédicas, los cuales en coordinación se propusieron desarrollar y evaluar sustancias sintéticas con potencial antineoplásico.

El grupo de investigadores de la Facultad de Química encabezado por la Doctora Lena Ruiz ha sintetizado y caracterizado alrededor de 100 compuestos de coordinación con metales de la primera serie de transición: Mn,Co,Ni y Cu, cuyo diseño se inició en 1975 (Ruiz-Ramírez *et al.* 1980; Ruiz-Ramírez y Moran, 1981).

Desde el desarrollo de técnicas analíticas capaces de detectar cantidades por abajo de μg de metales, principalmente de transición, los investigadores han puesto mucho énfasis en la importancia de los metales en sistemas vivos en general y el organismo humano, tal es así que se ha desarrollado la llamada bioinorgánica. Así en los últimos años se ha informado de compuestos de coordinación con efectos biológicos específicos.

El hecho de disponer de fármacos a base de compuestos de coordinación presenta algunas ventajas: las dosis que producen efectos biológicos son menores, la molécula orgánica sufre menor grado de biotransformación después de ser suministrada y la presencia del metal ofrece mayor especificidad.

De los compuestos de coordinación con cobre emerge toda una familia, entre las que tenemos la droga llamada casiopeina 1, la casiopeina 2, y la denominada IGM1 (Ruiz-Ramírez *et al.* 1987; Ruiz-Ramírez, 1992a; Ruiz-Ramírez *et al.* 1992b; Gasque *et al.* 1992)

EL COBRE Y SU INTERACCION CON EL ORGANISMO

El cobre es un elemento esencial para el organismo humano, posee funciones bioquímicas indispensables en los mamíferos. Este elemento junto con el hierro son necesarios para el desarrollo de la eritropoyesis. Así mismo el cobre es un componente de varias enzimas de importancia clave en el metabolismo celular como son la ceruloplasmina, la oxidasa del citocromo-c , la superóxido dismutasa, y otras.

La deficiencia de cobre es un trastorno clínico raro en el hombre, ya que en la dieta diaria hay suficiente cantidad de dicho elemento para suplir las necesidades del organismo. Sin embargo existen algunas enfermedades atribuidas directamente a este metal como son la enfermedad de Wilson y el síndrome de Menkes, enfermedades en las que se acumula el cobre en tejidos como hígado, cerebro, riñón y córnea.

La toxicidad inducida por este metal es rara y sobreviene con dosis superiores a los 10 mg produciendo náuseas, vómito, diarrea y dolores abdominales principalmente.

La actividad anticarcinogénica del cobre se encontró por primera vez en los años 60s cuando se realizaron estudios con sales de este elemento empleadas como complemento diario en la dieta o el agua administrada a ratas o ratones sujetos a un tratamiento con carcinógenos químicos. Los resultados observados sugieren que el cobre es capaz de inhibir la acción carcinogénica de una amplia variedad de compuestos (Jacobs y Griffin, 1981).

También se ha intentado establecer una relación entre el complejo enzimático de superóxido dismutasa constituido por varias enzimas (una de ellas dependiente de cobre) y el proceso carcinogénico (Westman y Marklund, 1981; Parsons y Morrison, 1982, Lin *et al.* 1983). Debido a que este complejo enzimático es el encargado de eliminar los radicales libres de la célula, un comportamiento anormal de este complejo traería como consecuencia una acumulación de radicales libres que pueden alterar al DNA (Bianchi y Lopez-Lazarra, 1991).

Se ha reportado que los metales de transición entre ellos el cobre tienen la capacidad de intercalarse en el DNA con una gran afinidad (Jacobs y Griffin, 1981; Sherman y Lippard, 1987) y que la unión del cobre es selectiva sobre las células tumorales (Apelgot *et al.* 1981; Parsons y Morrison, 1982; Snyder *et al.* 1986). A este metal se le atribuye actividad de inmunomodulador tanto en sistemas *In Vitro* como *in vivo* (Carpentieri *et al.* 1986; Martell *et al.* 1981).

Se sabe que las concentraciones séricas de los metales de transición son susceptibles de ser modificadas en algunos tipos de cáncer, por ejemplo, las concentraciones séricas de cobre pueden verse incrementadas notablemente en algunas leucemias y linfomas; aunada a estos cambios de concentración de dichos metales se asocia una respuesta inmune anormal (Carpentieri *et al.* 1986).

Toda esta información resalta la importancia de determinar la actividad citotóxica de los compuestos sintetizados con centro metálico. De acuerdo a la bibliografía antes citada se espera que tales moléculas induzcan una acción preferencialmente citotóxica y mayor eficiencia que los medicamentos de empleo actual contra el proceso neoplásico maligno.

Las tres sustancias que se estudiaron (Casiopaina 1, casiopaina 2 e IGM1) son compuestos de coordinación del cobre estabilizados con el anión NO_3^- y un grupo batofenantrolina. La diferencia entre la casiopaina 1 y la casiopaina 2 es la presencia de dos fenilos en la casiopaina 1 que están sustituidos por dos metilos en la casiopaina 2, lo que hace que ésta última sea mucho más soluble en agua. (Uno de los principales problemas de la casiopaina es su poca solubilidad). La IGM1 presenta el centro de cobre y una bipyridina en vez de la batofenantrolina.

OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo fueron: 1.- el de validar el cultivo de linfocitos humanos *in vitro* como un sistema útil en el cernimiento de actividad antineoplásica, usando como parámetros al índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular (CPC), y 2.- el uso de este sistema para evaluar la citotoxicidad y citostaticidad de sustancias de nueva síntesis con núcleo de cobre.

DISEÑO EXPERIMENTAL

Se realizó un experimento para evaluar los diferentes solventes para los fármacos, entre los que se probaron DMSO, metanol, metilcelulosa, NaOH, acetona, al 0.2 y 2%.

Se llevaron a cabo un estudio longitudinal y uno transversal con la mitomicina-C (como control positivo) para determinar si el sistema mostraba reproducibilidad, para lo cual en el estudio longitudinal se evaluó la CPC y el IM de dos donadores a lo largo de un mes (4 veces) y en el transversal se evaluó estos dos parámetros en cinco diferentes donadores al mismo tiempo, en un solo experimento.

Se hicieron experimentos para comparar el efecto del cisplatino y de la mitomicina-C sobre la incorporación de timidina tritiada en las líneas X 63 y L 5178 (utilizadas para el cernimiento primario de sustancias) y su efecto sobre el índice mitótico de linfocitos en los cultivos.

Se realizaron los experimentos evaluando la CPC y el IM en el cultivo de linfocitos para el cisplatino, melfalan, bleomicina, 6-mercaptopurina, 5-fluorouracilo, metotrexate y la colcemida (todos fármacos utilizados clínicamente).

Para evaluar la citotoxicidad en nuestro sistema se compararon las tendencias de los datos de reducción del IM, con la incorporación de timidina tritiada obtenida en linfocitos, por los fármacos antes mencionados,

A partir de estos experimentos se calcularon las concentraciones necesarias para inhibir el 50% de cada parámetro (IM, ITT e IR), con el objeto de poder comparar la potencia de las sustancias.

Se representó gráficamente la relación entre el IR y la inhibición del IM para comparar el comportamiento de las diferentes sustancias en el sistema.

Para evaluar el posible efecto biológico de tres nuevas sustancias sintetizadas en la facultad de Química, se determinaron el IM y la CPC tanto para la casiopeina2 y la IGM1, mientras que para la casiopeina1 (sustancia que no es soluble en agua, se llevaron a cabo varios experimentos con diferentes vehículos (agua acidulada, alcohol benzílico y DMSO).

Se calculó tanto para la casiopeina1 y como para la casiopeina2, las concentraciones necesarias para causar una inhibición del 50 % tanto para el IM, como para el IR, para poder compararlas con los fármacos de referencia, asimismo se realizó el perfil de la relación entre el IR y la Inhibición del IM tanto para la casiopeina1 como para la casiopeina2.

MATERIAL Y METODOS

OBTENCION Y PREPARACION DE MUESTRAS SANGUINEAS PARA LA MEDICION DEL IM Y LA CPC.

Se obtuvo sangre de donadores sanos, con jeringas desechables previamente heparinizadas bajo condiciones de esterilidad, la sangre se cultivó siguiendo la técnica descrita por Moorhead et al (1960) que consiste en lo siguiente:

CULTIVO DE MUESTRAS

Alicuotas de 0.5 ml de sangre se le agregan a 6.5 ml de medio RPMI 1640 modificado y suplementado con 1 ml de aminoácidos no esenciales y 1 ml de glutamina por cada 100 ml de medio; a cada cultivo se agregaron 0.2 ml de fitohemaglutinina y 0.3 ml de bromodesoxiuridina (concentración final 32 uM), los cultivos se mantuvieron en incubación a 37 grados centígrados, por 72 horas.

Los tratamientos fueron aplicados a los cultivos codificados por duplicado, obteniendo así dos réplicas del experimento y la evaluación posteriormente fue a doble ciego.

TRATAMIENTOS

Todas las sustancias fueron añadidas hasta alcanzar un volumen final de 50 uL a las 48 horas del cultivo, continuando 22 horas más a 37 °C, después de las cuales se le agrega colcemida al 0.1% a cada tubo y se cultivan dos horas más antes de cosechar los linfocitos.

Todas las sustancias que no fueron solubles en el medio de cultivo se diluyeron en dimetilsulfóxido, excepto el metotrexate que se diluyó en 500 ul de NaOH, para después ajustar su molaridad con medio de cultivo.

En general cada sustancia se evaluó con sangre de dos donadores y en dos experimentos, excepto para el caso de la mitomicina-C en el que se hizo un estudio longitudinal con dos individuos muestreados en 4 ocasiones y un estudio transversal en el que se evaluó el efecto en 5 donadores.

COSECHA

Este procedimiento se efectuó centrifugando los tubos de cultivo a 1200 rpm durante 10 minutos, retirando la mayor parte del sobrenadante y aplicando un choque hipotónico a las células (resuspendidas previamente) durante 30 minutos con una solución de cloruro de potasio (KCl) 0.075 M a una temperatura de 37°C.

Posteriormente se centrifugaron los tubos nuevamente, retirando el exceso del sobrenadante y se fijaron los núcleos con una solución de metanol- ácido acético 3:1 fría, agregada después de resuspender el botón del tubo, se centrifugó y se lavó varias veces con fijador. Este procedimiento se realizó hasta que el sobrenadante fue transparente. Se guardaron los tubos en refrigeración durante 24 horas con muy poco fijador (aproximadamente 0.5 ml).

PREPARACION DE LAMINILLAS

Después de transcurridas 24 horas de la fijación de los núcleos se hicieron preparaciones de cromosomas sobre laminillas lavadas y enfriadas previamente con alcohol de caña. Se resuspendió el botón de núcleos con una pipeta Pasteur y se tomaron algunas gotas de la solución, éstas se dejaron caer sobre la laminilla desde una altura de aproximadamente 1.50 metros y se secaron a la flama de un mechero.

TINCION

Para teñir las laminillas se siguió la técnica de Perry y Wolff (1974) donde se utilizó una solución de 1.0 ml de Hoechst al 0.01% en 50 ml de buffer de fosfatos con un pH de 6.8 (fosfato de sodio al 0.95% y fosfato de potasio al 0.91% en proporción 1:1) en la que se sumergieron las laminillas durante 30 minutos en completa oscuridad, una vez transcurrido este tiempo se enjuagaron con agua corriente y se secaron al aire para exponerlas a luz negra, cubiertas con buffer de fosfatos y un cubreobjetos para evitar la evaporación, durante aproximadamente dos horas.

Después de este período, las laminillas se enjuagaron con agua corriente y se secaron al aire para inmediatamente ser teñidas con una solución de 1.5 ml de Giemsa en 50 ml de solución de buffer de fosfatos durante aproximadamente 2 a 4 minutos, las laminillas se enjuagaron de nuevo con agua corriente y se secaron para poder ser analizadas al microscopio.

ANALISIS DE LAMINILLAS

INDICE MITOTICO

Las laminillas se leyeron al microscopio fotónico a 20 aumentos recorriéndolas en zig-zag y comenzando de la parte central de la laminilla para contar dos mil núcleos totales y de ellos determinar cuántos estaban en división (metafase). Se registraron como núcleos aquellos que presentaban una forma aproximadamente esférica, de tinción clara y de tamaño relativamente grande, siempre y cuando pudieran identificarse individualmente como un núcleo de linfocito que sobrevivió en el cultivo. Como metafase se cuantificó a las agrupaciones de cromosomas bien definidas con un número de elementos mayor de 30 cromosomas.

El valor del índice mitótico se obtiene con la siguiente fórmula:

$$I.M. = \frac{\text{NUMERO TOTAL DE METAFASES}}{\text{NUMERO TOTAL DE NUCLEOS (2000)}}$$

CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR.

Se leyeron 100 metafases seguidas con el objetivo de 100 aumentos y aceite de inmersión, determinándose cada una, como de primera (M1) segunda (M2), tercera división o subsecuentes (M3), dependiendo de la cantidad de tinción clara y oscura que presentaran los cromosomas.

Si la metafase presentaba un 100 % de tinción oscura se clasificó como M1, si en esta se observaba un 50 % de tinción clara y un 50 % de tinción oscura sobre cada cromosoma se clasificó como M2 y por último, si la metafase presentaba aproximadamente un 25% de tinción oscura y un 75% de tinción clara la metafase se clasificó como M3.

Con esta información se calculó el índice de replicación utilizando la siguiente fórmula:

$$I:R: = \frac{1(\# \cdot M1) + 2(\#M2) + 3(\#M3)}{\text{NUMERO DE METAFASES LEIDAS (100)}}$$

OBTENCION Y PREPARACION DE LINFOCITOS PARA LA MEDICION DE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA

De sangre obtenida por venopunción, se separan los linfocitos por medio de una centrifugación de 30 minutos en un gradiente de Ficoll-Hypaque (Boyum, 1968), se aísla el anillo de células mononucleadas, se lava en medio de cultivo y se vuelve a centrifugar por diez minutos, se tira el sobrenadante y se resuspende en 2 mililitros de medio RPMI 1640, tomando una muestra de 50 uL. Esta se coloca en un mililitro del colorante vital azul de tripano, para poder llevar a cabo la cuantificación de linfocitos así como su viabilidad.

Se les añadió fitohemaglutinina (concentración 32uM) y 20% de suero homólogo, y timidina tritiada (0.2 uCi por pozo, con una actividad de 6.70 Ci/mmol NEN Products), y se dejó a 37°C y 5% de CO₂ durante 48 horas. Después de las cuales se realizó una dilución para que en 250 uL se tuvieran 250 mil linfocitos, los cuales se colocaron en pozos de 300 uL, añadiendoseles la sustancia (tres pozos por cada concentración) a tratar durante 24 horas más, al término, se cosecharon los pozos mediante una cosechadora automática (Cell Harvester MH-12), obteniendose los núcleos en filtros de microfibras de vidrio (Whatman #9434-AH).

Estos filtros son posteriormente llevados a un contador de centelleo (Beckman LS-1801) y se determinó la cantidad de radioactividad.

OBTENCION Y PREPARACION DE LINEAS CELULARES PARA LA MEDICION DE LA INCCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA

Se realizaron cultivos de las líneas en el medio RPMI-1640, colocando un total de 3×10^4 células por pozo y se les adicionó timidina tritiada (.2 uCi por pozo) y el fármaco a las 24 horas del cultivo, a las 72 horas se cosecharon de la misma forma que se realizó para los linfocitos.

Las antineoplásicos que se probaron fueron: Cis-platino (Bristol, México), Mitomicina-C (Sigma,U.S.A.), Metotrexate (Sigma,U.S.A.), Bleomicina (Mack, Germany), 5-fluoruracilo (Sigma U.S.A.), 6- Mercaptopurina (Sigma U.S.A.), Melfalan (Sigma,U.S.A.) y Colcemid (Microlab,México).

Todas estas fármacos fueron escogidas por su conocida acción y su utilización en la clínica (ver Tablas 1 y 2).

ESTADISTICA:

Se realizó una prueba de chi cuadrada modificada por Yates para estudiar las diferencias entre los donadores y una prueba de T de Student para examinar las diferencias entre las concentraciones de las sustancias con respecto al control (Spiegel. 1970)

RESULTADOS

EFFECTO DE DIVERSOS SOLVENTES SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS.

La necesidad de utilizar solventes, pues no todas las sustancias son solubles en agua, llevó a la evaluación de sus efectos en el cultivo de linfocitos. Los datos (Gráficas 6 y 7) muestran que el DMSO, metanol, metilcelulosa, NaOH, el etanol y la acetona al 2%, no alteran en las concentraciones evaluadas la proliferación de los linfocitos. Sin embargo la acetona y el etanol al 0.2 % sí alteran estos dos parámetros ($p < 0.05$).

ESTUDIO LONGITUDINAL Y TRANSVERSAL DE LOS EFECTOS DE LA MITOMICINA-C.

Los datos obtenidos del estudio longitudinal de los efectos *in vitro* de la mitomicina-C en los linfocitos de dos donadoras tratados en cuatro ocasiones diferentes (Tabla 3 y Gráfica 2) y del estudio transversal en los linfocitos de cinco donadores (Tabla 4 y Gráfica 3) muestran una inhibición de la proliferación en función de la concentración, disminuyendo el índice mitótico (IM) y la cinética de proliferación celular (CPC) al aumentar la concentración de mitomicina-C. En el estudio longitudinal se observa variación intraindividual, siendo estadísticamente significativa solo en las primeras divisiones de los cultivos tratados con 0.1 uM. Por lo que respecta a la variación interindividual en el estudio transversal se puede ver que hay diferencias entre los donadores sin embargo estas no son estadísticamente significativas.

COMPARACION DEL EFECTO DE LA MITOMICINA-C Y EL CISPLATINO SOBRE EL INDICE MITOTICO DE LINFOCITOS Y LA PROLIFERACION DE LINEAS CELULARES.

Se comparó el efecto sobre la inhibición del IM y de la proliferación de las líneas X63 y L5178 (ampliamente utilizadas como sistema de cernimiento primario) debidas al tratamiento con MMC y CSPT. Se observa en las gráficas 4 y 5 que la inhibición total de la proliferación en las dos líneas y del IM de los linfocitos están muy cercanas a una concentración de 5 micromolar aproximadamente con la MMC, mientras que para el CSPT la concentración es de casi 400 micromolar. Por lo tanto el comportamiento de la inhibición de la proliferación y del IM es similar.

EFFECTOS DE VARIOS ANTINEOPLASICOS SOBRE LA PROLIFERACION DE LINFOCITOS.

Se evaluaron 8 medicamentos antineoplásicos con diferentes mecanismos de acción encontrándose que el cisplatino, el melfalan, y la bleomicina muestran un comportamiento semejante al de la mitomicina-C, esto es, disminuye el IM (Gráfica 1) y retrasa la CPC en función de la concentración (ver Tablas 5, 6, 7 y Gráficas 8, 9 y 10).

La 6-mercaptopurina al igual que las anteriores reduce el IM (Gráfica 1) conforme aumenta la concentración, sin embargo la CPC no se altera en presencia del medicamento (ver Tabla 8 y Gráfica 11). Por lo que respecta al 5 fluorouracilo se observó que la respuesta entre donadores fue muy diferente (Tabla 9) ($p < 0.05$).

En un donador se observa en forma repetida la inhibición del IM (Gráfica 1) y el retraso de la CPC (Gráfica 12), mientras que en los otros dos donadores con las mismas concentraciones se observa una disminución menos drástica del IM y no hay efecto sobre la CPC (Gráfica 13).

El metotrexate inhibió al IM (Gráfica 1), pero esta inhibición no responde a la concentración ya que a concentraciones bajas se observó una gran inhibición que no varía al aumentar la concentración. Con respecto a la CPC se vió que este medicamento no la altera (Tabla 10 y Gráfica 14).

En la Tabla 11 y Gráfica 15 se muestra el efecto producido por la colcemida, donde se ve un aumento del IM, mientras que la CPC tiende a retrasarse conforme aumenta la concentración del tratamiento.

Para conocer la potencia de los fármacos con respecto al IM se calculó la dosis que inhibe el 50% del mismo, lo cual se obtuvo a partir de regresiones lineales de los datos experimentales, observándose que la sustancia más potente fue la bleomicina, siguiéndole la mitomicina-C, el melfalan, el cisplatino, el 5 fluorouracilo y la 6 mercaptopurina (Gráfica 16) Se calculó la dosis para el metotrexate que fue de 0.9 micromolar, sin embargo la correlación fue muy baja debido al comportamiento, o sea que no responde a una curva concentración- respuesta.

De la misma manera que para el IM50, se obtuvieron las concentraciones capaces de reducir al 50 % el índice de replicación calculadas por medio de una regresión lineal a partir de una transformación de los datos usando el parámetro elR. En la gráfica 17 se observa la citostaticidad presentada por las sustancias que interactúan con el DNA.

INDICE MITOTICO VS. INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA

Para validar el sistema además de evaluar varios antineoplásicos de amplio uso en la clínica, se compararon los resultados sobre el índice mitótico, con el efecto de estos medicamentos sobre la incorporación de timidina tritiada, parámetro ampliamente usado para cuantificar la citotoxicidad de una sustancia.

En las gráficas 18 a 24 se comparan los efectos de los diferentes antineoplásicos utilizados sobre la inhibición del IM y la incorporación de timidina tritiada (ITT). En todas las gráficas se ve que los dos parámetros presentan una dinámica muy parecida, aunque existen ciertas diferencias.

En la gráfica 24 donde se analiza el efecto del metrotexate sobre estos dos parámetros, se observa que la inhibición del IM no es dependiente de la dosis, mientras que el efecto sobre la ITT si depende de ella, sin embargo conforme aumenta la concentración la respuesta de los dos parámetros se hace similar.

Cuando se compara la tendencia de ambos parámetros ajustada por medio de un programa de computación (Gráficas 25 a 31) se aprecia que en las gráficas 25 a 29 la inhibición de la ITT producida por cisplatino, mitomicina-C, bleomicina, 6-mercaptopurina, y 5 fluorouracilo respectivamente, es mayor que para la inhibición del IM, y solo para el mefalan y el metrotexate (Gráfica 30 y 31) se observa que la inhibición del IM es mayor que la inhibición de la ITT.

Para comparar la potencia de las sustancias sobre la inhibición de la ITT y el IM se obtuvieron regresiones lineales de la misma manera que para la inhibición del 50 % del IM y se calculó la dosis necesaria para inhibir el 50% de la ITT, los resultados se muestran en la gráfica 32. Al compararlos con los del IM (Gráfica 33) se ve que (sin contar al metrotexate por su comportamiento antes mencionado) todas los demás medicamentos, presentan el mismo orden.

SUBSTANCIAS DE NUEVA SINTESIS

Se evaluaron 3 compuestos de nueva síntesis con núcleo de cobre; la casiopeína 1, casiopeína 2 y la IGM1. La casiopeína 1 muestra un comportamiento similar a la mitomicina-c (Tabla 12, Gráfica 34). Los primeros experimentos con casiopeína 1 se realizaron diluyéndola en agua acidulada (Tabla 13) mostrando una inhibición del IM y un retraso en la CPC, sin embargo los investigadores de la Facultad de Química encontraron que la solvatación en agua acidulada cambiaba las características químicas de la molécula.

Cuando se diluyó en alcohol benzílico se pudo observar un ligero efecto sobre el IM y ningún cambio en la CPC (Tabla 14), de esta manera se trató de buscar un vehículo adecuado en el cual la casiopeína fuera más soluble; después de utilizar varios solventes, se probó disuelta en DMSO en donde la casiopeína muestra una mayor solubilidad y estabilidad.

Se realizaron algunos experimentos diluyendo en DMSO, observándose que la casiopeína mostraba una gran efecto sobre el IM y la CPC (Tabla 12). Posteriormente se llevaron a cabo varios experimentos probando un lote nuevo de la sustancia, pudiéndose observar que esta nueva partida era mucho más tóxica que la empleada anteriormente (Gráfica 35).

Uno de los principales problemas de esta sustancia es su poca solubilidad, por lo cual se evaluó su análogo que es soluble en agua, la casiopeina 2. En la tabla 15 y gráfica 36 se ve que hay una inhibición del IM conforme aumenta la concentración y tiende a retrasar la CPC, aunque su efecto es menos marcado que el de la casiopeina 1, mientras que en el lote controlado se ve que la sustancia es más potente (Tabla 16 y Gráfica 37).

Por lo que respecta a la potencia de estas dos sustancias (primeros lotes), en cuanto a su capacidad de inhibición del 50 % del IM, se vé en la gráfica 16 que la casiopeina 1 muestra una potencia similar a la mitomicina-C y la casiopeina 2 al cisplatino. En el lote nuevo ambas sustancias presentan la misma potencia , siendo esta mayor al cisplatino. En la gráfica 17 se ve las dosis necesarias para inhibir el 50% del IR de las dos sustancias y de sus dos lotes.

También se probó el efecto de la droga IGM1 la cual no mostró ningún efecto sobre los dos parámetros cuantificados (Tabla 17 y Gráfica 40).

DISCUSION

Uno de los objetivos de este trabajo fue el de validar al cultivo de linfocitos humanos *in vitro* como un sistema útil en la detección de actividad antineoplásica, usando como parametros al IM y la CPC, los resultados muestran: que el índice mitótico y la cinética de proliferación presentan cierta variabilidad basal entre los donadores, dicha variabilidad de los resultados existe en los sistemas biológicos (Brusick, 1987), y en el cultivo de linfocitos ha sido reportada por varios investigadores (Giulotto *et al.* 1980; Auf der Maur y Berlincourt-Böhni, 1979; Obe y Beck, 1984)

Al tratar las células con diferentes agentes como la mitomicina-C (MMC), el cis-platino (CSPT), el melfalan (MELF), la Bleomicina (BLEO), el 5-Fluoruracilo (5FU), la 6-mercaptopurina (6MP) y el metotrexate (METO) se observó que a pesar de existir diferencias basales entre donadores, el comportamiento de los cultivos tratados es muy semejante entre los donadores. Esto se hace más evidente a medida que la concentración de estas sustancias aumenta en el cultivo. Efectos similares han sido reportados para el MELF (Mamuris *et al.* 1988), para el METO (Martenet, 1989), para la MMC y el CS-PT (Singh y D'Ambrosio, 1984) y para la BLEO (De Berry *et al.* 1985).

Como se puede apreciar en las tablas 3 y 4 el IM y la CPC aunque con algunas variaciones interindividuales (a bajas dosis), responden en forma de dosis-respuesta a la MMC y que estos resultados son reproducibles tanto en un solo individuo a través del tiempo, como entre varios donadores en un mismo experimento (ver Gráficas 2 y 3).

Otro punto importante para validar un sistema, es el de comparar la sensibilidad de este con otros métodos utilizados para el cernimiento de sustancias. Uno de los métodos más utilizados para evaluar el efecto de sustancias ha sido la cuantificación del efecto citotóxico .

La citotoxicidad ha sido usada en la evaluación de nuevas sustancias, principalmente aquellas que están involucradas en la producción de las industrias alimentaria y la farmacéutica. Así mismo ha sido utilizada en el cernimiento de sustancias con potencial anticancerígeno, debido al hecho de que el modo de acción de estos fármacos es mediante la detección del crecimiento celular (Shrivastav et al, 1980).

Existen varios métodos para la evaluación de la citotoxicidad, pero el clasicamente usado es el de la incorporación de timidina tritiada.

Otros métodos se han desarrollado para la cuantificación de este parámetro como son incorporación de colorantes vitales, evaluación del índice mitótico, colorantes que se unen a las proteínas, y otros (Babich y Borenfreund, 1987; Johnson, 1990).

El índice mitótico es un parámetro que indica el porcentaje de células que están en mitosis, este índice ha sido ampliamente utilizado como un marcador para evaluar y comparar la tasa de proliferación celular (Pisecioti *et al.* 1967; Scott *et al.* 1991).

Por esta razón se comparó el efecto que tiene la MMC y el CSPT, sobre la incorporación de la timidina tritiada de dos líneas celulares ampliamente usadas en el cernimiento de drogas como son la X-63 y la L-5178 y del índice mitótico de linfocitos estimulados con fitohemaglutinina (PHA). Como se puede apreciar en las gráficas 4 y 5, ambos parámetros, la inhibición de la incorporación de la timidina tritiada (en las dos líneas) y la inhibición del IM, se comportan de una manera similar, siendo la concentración de 5 micromolar la que aproximadamente inhibe en un 100 % de proliferación con MMC y 400 con CSPT, lo que muestra la coincidencia en la evaluación de la potencia de esos dos antineoplásicos. Lo cual indica que el índice mitótico es un buen parámetro para medir citotoxicidad.

Cuando se evaluó el efecto del CSPT (Gráfica 8), se pudo observar que el comportamiento es muy semejante al que presenta la MMC en cuanto a la CPC y al índice de replicación, aunque su toxicidad es menos marcada (Gráfica I).

Cuando se analizan los resultados obtenidos con el MELF (Gráfica 9) se observó que tiende a retrasar la cinética de proliferación y a inhibir el índice de replicación pero de manera menos pronunciada que la MMC, por lo que respecta al índice mitótico se puede observar en la gráfica I que es más tóxico que el CS-PT, pero presenta una toxicidad menor que la MMC.

BLEO se comporta de manera similar a las sustancias descritas anteriormente (Gráfica 10), y en cuanto a su toxicidad, es mayor que la de la MMC.

Mientras que el 5FU, 6MP y el METO producen una inhibición del IM (gráfica 1 y 16), pero no producen efecto alguno sobre la cinética de proliferación (Gráficas 11,13 y 14).

Los primeros fármacos (CSPT, BLEO, MEL Y MMC) comparten la característica de que interactúan directamente con el DNA, aunque sus mecanismos de acción no sean iguales, mientras que el 5FU, el 6MP y el METO actúan de manera indirecta, esto quiere decir que actúan sobre la síntesis de nucleótidos ya que los dos primeros son análogos de base y el metotrexate es un análogo del ácido fólico (Pratt y Ruddon,1979)

Por su forma de actuar y los resultados obtenidos, se podría sugerir que las sustancias que interactúan directamente con el DNA, además de ser agentes citotóxicos, son agentes citostáticos, es decir que además de matar a las células, las que no mueren, detienen su división, mientras que las que actúan indirectamente no producen este efecto.

Cuando se probó el efecto de la colcemida se observó un aumento del IM y un retraso en la CPC (Tabla I1 y Gráfica 15), lo cual está de acuerdo con el mecanismo de acción de este fármaco, al ser un veneno del huso mitótico secuestra en mitosis a las células, por lo tanto el IM aumenta y la CPC tiende a retrasarse (Wilson *et al.*1976) .

Para estudiar la potencia de las drogas para inhibir el IM, se realizó una regresión lineal para ver la potencia de los fármacos, se comparó la concentración necesaria para crear una inhibición del 50%. Como se puede apreciar en la gráfica 16, los agentes que interactúan directamente con el DNA son las más potentes, sin embargo hay que resaltar el caso del metotrexate que no presenta un comportamiento de dosis respuesta como todos los demás fármacos, dando como resultado una correlación de la regresión muy baja. Esto está de acuerdo con reportes previos en donde se menciona que el metotrexate arresta las células en la fase G2, dando como resultado que muy pocas células llegarán a la metafase, dando así una gran inhibición del IM con una dosis muy baja (Prescott, 1976).

Cuando se compararon las concentraciones necesarias para inhibir el IM e IR al 50%, por medio del cociente entre estos dos valores (Gráfica 38), se pudo observar que el índice mitótico, parámetro que cuantifica citotoxicidad, es más sensible que el de citostaticidad (el índice de replicación) ya que el valor del cociente nunca se acerca a 1, valor esperado si los dos parámetros fueran igual de sensibles, o bien esto nos podría indicar que la citostaticidad solo se expresa en aquellas células que pueden soportar el "shock" citotóxico de la sustancia (Sofuni *et al.* 1992).

Otro punto interesante a discutir de estos experimentos, es la diferente respuesta que se observó entre los donadores al 5FU, lo cual sugiere que hay una susceptibilidad individual a este fármaco por uno de los donadores. Un gran número de factores pueden contribuir a la capacidad de una célula o tejido a responder al 5FU: a la capacidad celular de convertir a la sustancia en sus metabolitos, así por ejemplo, los astrocitos son un tejido que no presentan dicha actividad. Esta podría ser una de las razones de la pérdida de respuesta clínica de este tejido a dicho medicamento (Mukherjee *et al.* 1963). Algunos modelos animales presentan muy poca capacidad de catabolizar al 5FU y las diferencias en la inactivación de la droga o de sus nucleótidos (debidas a diferencias en la capacidad de defosforilación de cada tejido) afectan la citotoxicidad de la sustancia (Chaudhuri *et al.* 1958).

En las gráficas 41-47, se puede observar la relación entre la inhibición del índice mitótico y el índice de replicación, donde los fármacos que interaccionan directamente con el DNA presentan una pronunciada pendiente negativa, mientras que los agentes que no interaccionan directamente con el DNA presentan una pendiente que tiende a cero. Para validar el sistema debemos analizar la credibilidad del mismo, para esto tenemos que evaluar tres parámetros reproducibilidad, sensibilidad y especificidad. De los datos obtenidos se puede afirmar que en nuestras manos el sistema es reproducible, sin embargo hay muy pocos datos en la literatura para poder saber si son reproducibles en otros laboratorios.

Como se puede apreciar en las gráficas 18 a 24 , aunque los dos parámetros están cuantificando dos cosas diferentes (uno, las células que entran en fase S y el otro, las células que quedan arrestadas en mitosis), la respuesta conforme aumenta la dosis es similar, lo cual apoyaría la hipótesis de que todas las células que entran en fase S llegan a mitosis.

Ahora bien cuando analizamos la tendencia de estos resultados (ajustada por una computadora, programa Tadpole de Biosoft) podemos observar que en conjunto estos dos parámetros, nos permiten elucidar la fase del ciclo celular a la cual es más sensible la célula, es así como en las gráficas 24-28 se puede observar que el CSPT, MMC, BLEO, 6MP y 5FU actúan principalmente en fase de S dando como resultado una inhibición de la ITT mayor que la del IM, mientras que el MELF y el METO (Gráfica 29 y 30) que principalmente actúan en fase de G₂, presentan una mayor inhibición del IM que de la ITT.

Cuando se comparan las dosis requeridas para causar una inhibición del 50 % en ambos parámetros, se puede apreciar que el IM en general es menos sensible que la ITT aunque están muy cercanas las dosis, la única droga que no presenta esta relación es el METO posiblemente debido al comportamiento antes mencionado (Gráfica 33).

Es importante mencionar que el sistema evalúa principalmente dos parámetros. El componente citotóxico, el cual responde de manera similar al método clásico para evaluar citotoxicidad, y el componente de proliferación celular que nos da información de las sustancias con posible acción citostática.

Se puede decir que nuestro sistema es sensible, ya que da resultados semejantes a los de la incorporación de timidina tritiada.

Por lo que respecta a la especificidad del sistema, con los datos no se puede asegurar que el sistema sea específico ya que deberíamos haber probado también sustancias que no causaran ningún efecto, sin embargo con los reportes en la literatura se puede considerar que el sistema no es específico, ya que hay muchas condiciones que pueden alterar estos dos parámetros (Wen y Liew, 1983; Malaragno y Smith, 1990; Dutrillaux y Fose, 1976; Obe *et al.* 1975; Mutchinick *et al.* 1979; Ostrosky *et al.* 1984). Sin embargo esto también se puede apreciar en otros sistemas que se utilizan para cernimiento inicial de sustancias antineoplásicas por ejemplo las líneas P-388 y L1210 (Staquet *et al.* 1983).

Uno de los puntos importantes en el diseño de las sustancias de nueva síntesis es su centro metálico. Desde el reporte de la actividad del cis-platino se han desarrollado muchos fármacos con los metales de la primera y segunda serie de transición. Por ejemplo se han desarrollado compuestos con cobre, cobalto, níquel, manganeso, plomo, hierro, rutenio, osmio, etc. Una de las ventajas de sintetizar sustancias con centro de cobre es la planaridad del cobre que hace recordar la presentada por el cis-platino.

Hay reportes de fármacos que presentan complejos de coordinación con cobre (tiosemicarbazonas) en donde se plantea que es el mismo cobre, el que actúa directamente sobre el DNA (Sideris *et al.* 1988), sin embargo cabe mencionar que el cobre por sí solo en el cultivo de linfocitos no mostró actividad alguna.

En este trabajo se evaluaron tres sustancias con centro metálico, casiopeina 1, casiopeina 2, y la IGM1 pudiéndose observar que las dos primeras sí presentan actividad, mientras que la tercera, IGM1, no.

Cuando se evaluó el efecto de la casiopeina 1 (no soluble en agua) se observó que dependiendo del vehículo en el que viene disuelta, puede variar su actividad, cabe mencionar que estos vehículos no presentaron efecto alguno *per se*, esto se puede apreciar muy bien en las tablas 13 y 14 y se puede deber a que el complejo de coordinación no sea muy estable, lo que podría hacer que la molécula cambie. Cuando el vehículo utilizado es DMSO el efecto es reproducible (Tabla 12 y Gráfica 35) y la molécula es más soluble, teniendo una estabilidad de varias horas en anaquel.

Es importante mencionar que el sistema fue lo suficientemente sensible, como para poder detectar un comportamiento diferente entre lote y lote de la sustancia. Estas diferencias se pueden deber a cambios estructurales de esta molécula debidos a una síntesis diferente (Gráfica 35), ya que el nuevo lote de casiopeina 1 se comportaba de diferente manera.

Un punto importante que se desprende de la gráfica 38, en donde se compara las concentraciones IM50 y la IR50 de todas las sustancias, es que los tres citostáticos que actúan alquilando al DNA, aunque presentan diferencias en cuanto a potencia, mantienen su relación IM50/IR50 igual; mientras que cuando comparamos los valores obtenidos para las casiopeinas de los diferentes lotes se ve que esta relación no se mantiene, lo cual podría explicarse si estas tuvieran diferencias estructurales.

También otra diferencia que se puede observar entre lote y lote de la casiopeina 1, es que la concentración que inhibe al 100% en el lote controlado está muy cercana a la concentración que no produce ningún efecto, mientras que esta distancia es mayor en la casiopeina del primer lote.

El rango de dosis en el cual la casiopeina 1 (lote controlado) mostró efecto va de 2.12 mg/Kg a 10 mg/kg (dosis a la cual hay citotoxicidad del 100%), mientras que la casiopeina del lote anterior el rango de dosis va de 1.16 mg/Kg a 53 mg/kg (Gráfica 39). La casiopeina 1 (lote anterior) ha sido probada en ratones Taconic siendo su dosis letal media de 9.8 mg/Kg (García *et al.* 1991).

Con respecto a la relación IM/IR, como se puede apreciar en las gráficas 48 y 49, los perfiles para las dos casiopeinas son muy semejantes, y cuando se comparan estos con los perfiles de los fármacos de referencia, se puede observar que su comportamiento es muy similar al de los agentes que interaccionan directamente con el DNA, principalmente con el de la mitomicina-C, esto nos sugiere que estas sustancias podrían tener el mismo mecanismo de acción, o sea causando ligamientos cruzados en las moléculas de DNA.

Cuando comparamos la estructura de las tres drogas (Figura 1) se puede apreciar que entre ellas hay muy pocas diferencias por ejemplo entre la casiopeina 1 y la casiopeina 2, hay un cambio de los radicales fenilo por metilo, lo que nos podría explicar el porque la casiopeina 1 presenta un efecto mayor que la casiopeina 2, al ser menos solubles estos radicales.

La planaridad de las dos moléculas nos sugiere que el mecanismo de acción podría ser el de intercalación en el DNA, sin embargo como se dijo anteriormente la presencia de los radicales fenilo o metilo bien podrían ayudar a un mecanismo de ligamientos cruzados en el DNA, (el perfil IM/IR apoyaría este último mecanismo).

La diferencia entre las casiopeinas y la IGM1 es una sustitución del grupo fenantreno por un grupo de biperidina, lo que hace que esta molécula presente un anillo benzénico menos que los otros dos fármacos, esto podría explicar el porqué esta sustancia no presenta actividad ya que presenta una menor energía de resonancia electrónica lo que produciría que fuera menos estable que las que presentan el grupo fenantreno, o bien que debido a la mayor "flexibilidad" estructural la IGM1 no presente actividad.

CONCLUSIONES

Los resultados apoyan el uso de estos dos parámetros (el IM y la CPC) del cultivo de linfocitos para la detección de sustancias con posible actividad citostática.

El uso de los dos parámetros en conjunto nos permite conocer más acerca del mecanismo de acción de los fármacos a probar y hace al sistema más confiable.

Los fármacos que interaccionan directamente sobre el DNA alteran la cinética de proliferación de los linfocitos, mientras que los que actúan indirectamente sobre el DNA no alteran este parámetro, en los cultivos de linfocitos de 72 horas.

Por los resultados presentados considero que el sistema es reproducible, sensible y poco específico, por lo cual se puede utilizar como un sistema de cernimiento inicial o precernimiento, donde no es muy importante la especificidad, pero sí la reproducibilidad y la sensibilidad.

Tanto la casiopeina 1 como la casiopeina 2 muestran actividad citotóxica y citostática mayores a la del cis-platino en el cultivo de linfocitos, lo cual sugiere que estas moléculas sí presentan actividad biológica y que es importante continuar con su estudio como posibles antineoplásicos en un cernimiento secundario.

Debido a que se desconoce el mecanismo de acción de la familia de las casiopeinas, es importante el seguir evaluando a esta familia, examinando si estas moléculas son capaces de producir daño al DNA (aberraciones cromosómicas e intercambio de cromátidas hermanas) y viendo si el metabolismo tiene algún efecto sobre las mismas. Estos estudios se pueden llevar a cabo *in vitro* en nuestro sistema adicionando al cultivo la fracción microsòmica de hígado de rata llamada S9.

BIBLIOGRAFIA

Adair, F.E. y Bagg, H.J. (1931) Experimental and clinical studies on the treatment of cancer by dichloroethylsulfide (mustard gas) *Ann. Surgery* 93:190.

Adhvaryu, S.G., Rawal, U.M. y Patel, J.V. (1988c) Enhancement of lymphocytic SCE frequencies in patients with ovarian cancer. *Neoplasma* 35: 103-108.

Adhvaryu, S.G., Rawal, U.M., Patel, J.V. y Balar, D.B. (1988a) Elevated sister chromatid exchange frequencies in the lymphocytes of esophageal cancer patients. *Cancer* 61: 1867-1871.

Adhvaryu, S.G., Rawal, U.M., Patel, J.V. y Balar, D.B. (1988b) Increased frequency of sister chromatid exchanges in lymphocytes of breast cancer patients. *Int. J. Cancer* 41:394-398.

Adler, I.D. y ElTarras, A. (1990) Clastogenic effects of cis-diamminedichloroplatinum. II Induction of Chromosomal aberrations in primary spermatocytes and spermatogonial stem cell of mice. *Mutation Res.* 243: 173-178.

Albertini, R.J. (1980) Drug Resistant lymphocytes in man as indicators of somatic cell mutation. *Teratogen. Carcinogen. Mutagen.* 1:25-48.

Apelgot, S., Coppey, S., Grisuard, S., Guillé, E. y Sissoëff, I. (1981) Distribution of copper 64 in control mice and mice bearing ascitic krebs tumor cells. *Cancer Res.* 41:2962-2966.

Arora, S.K. (1979) Structural investigations of mode of action of drugs, I molecular structure of mitomycin- C. Life Sciences, vol 24 pp 1519-1526.

Auf der Maur, P. y Berlincourt-Böhni, K. (1979) Human lymphocyte cell cycle: Studies with the use of BrUdR. Hum. Genet. 49:209-215.

Babich, H. y Borenfreund, E. (1987) Structure-Activity relationship (SAR) models established *in vitro* with the neutral red cytotoxicity assay. Toxicology in vitro 1:3-10.

Benedict, W.F., Baker, M.S., Haroun, L., Choi, E. y Ames B.N, (1977) Mutagenicity of cancer chemotherapeutic agents in the *Salmonella* microsome test. Cancer Res. 37: 2209-2213.

Bergsagel, D.E. (1972) Plasma cell myeloma. An interpretive review. Cancer 30: 1588-1584.

Bianchi, N.O. y Lopez-Lazarra, D.M. (1991) DNA damage and repair induced by bleomycin in mammalian and insect cells. Env. Mol. Mutat. 17:63-68.

Borisy, G.G., Olmsted, J.B., Marcum, J.M. y Allen, C (1974). Microtubule assembly *in vitro* . Fed. Proc 33:167

Bornstein, R.S., Hungerford, D.A., Haller, G., Engstrom, P.F. y Kühn, H. (1971) Cytogenetic effects of bleomycin therapy in man. Cancer Res. 31: 2004-2007.

Borsa, J. y Whitmore, G.F. (1969) Studies relating to the mode of action of methotrexate. III. Inhibition of thymidilate synthetase in tissue culture cells and in cells- free systems. Mol. Pharmacol 5:318.

Boyum, A. (1968) Separation of leukocytes from blood and bone marrow. Scand. J. Clin. Lab. Invest. 21(suppl. 97) 51-76.

Bresciani, F. (1965) Effect of ovarian hormones on duration of DNA synthesis in cells of the C3H mouse mammary gland. Exp. Cell Res. 38:13-32.

Brusick, D. (1987) Principles of Genetic Toxicology. Plenum Press, Nueva York pp 284.

Burchenal, J.H., Murphy, M.L., Ellison, R.R., Karnofsky, D.A., Sykes, M.P., Tan, T.C., Leone, L.A., Craver, L.F., Dargeon, H.W. y Rhoads, C.P. (1953) Clinical evaluation of a new antimetabolite, 6-mercaptopurine. in the treatment of leukemia and allied diseases. Blood 8:965.

Butler, M.G. Rames, L.J. y Joseph, G.M. (1987) Cytogenetic studies of individuals from four kindreds with multiple endocrine neoplasia type II syndrome. Cancer Genet Cytogenet 28: 253-260.

Calabresi, P. y Parks, R.E. (1980) Antiproliferative agents and drugs used for immunosuppression. En : The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ed. Goodman y Gilman. Editorial MacMillan Publishing. Capitulo 55, pp 1256-1313.

Carpentieri, V., Myers, J., Thorpe, L., Daeschner, Ch. W. y Haggard, M.E. (1986) Copper, Zinc and iron in normal and leukemic lymphocytes from children, *Cancer Res* 46: 981-984.

Chabner, B.A. (1990) In defense of cell line screening. *J. Natl. Can. Inst.* 82:1083-1085.

Chabner, B.A., Myers, C.E., Coleman, C.N. y Johns, D.G. (1975) The clinical pharmacology of antineoplastic agents. *N. Eng. J. Med.* 292:1107-1113.

Chadauri, N.K., Mukherjee, K.L. y Heidelberger, C. (1958) Studies on fluorinated pyrimidines. VII The degradative pathway. *Biochem Pharmacol.* 1:328.

Clare, M.G., Jone, W.G. y Taylor, J.H. (1982) Sister Chromatid Exchanges in human lymphocytes to single cytotoxic drugs *in vivo* or *in vitro*. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 18(10) pp 979-989.

Cohen, M.M. y Shaw, M.W. (1964) Effects of mitomycin C on human Chromosomes. *J. Cell Biol.* 23: 386-395.

Craig-Holmes, A.P. y Shaw, M.W. (1977) Effect of six carcinogens on SCE frequency and cell kinetics in cultured human lymphocytes. *Mutation Res.* 23:375-384.

Crooke, S.T. y Bradner, W. (1976) Mitomycin C: a review. *Cancer treatment Reviews* 3:121-139.

Crooke, S.T. y Bradner, W. (1976) Bleomycin a review. *J. Med* 7:333.

Crossen, P.E. y Morgan, W.F. (1977) Analysis of human lymphocyte cell cycle time in cultured measured by sister chromatid differential staining. *Exp. Cell Res.* 104:453-457.

Davidova, S. (1960) Problems in Chemotherapy of malignant tumors. Moscow pp 326.

De Berry, D.E., Chang, L.H. y Hecht, S.M. (1985) DNA damage and growth inhibition in cultured human cells by bleomycin congeners. *Biochemistry* 24(13) 3207-3214.

DuFrain, R.J. Littlefield, L.G. y Wilmer, J.L. (1979) Cyclophosphamide induced SCE's in rabbit lymphocytes. *Environ. Mutagenesis* 1(3) 283-286.

Dutrillaux, B. y Fose, A.M. (1976) Utilization de BrdU dans l'etude du cycle cellulaire de sujets normaux et anormaux. *Ann Genet.* 19:95-102.

Farber, S., Diamond, L.K., Mercer, R.D., Sylvester, R.f. y Wolff, J.A. (1948) Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-amino-pteroyl-glutamic acid (aminopterin) *New Eng. J. Med* 238: 787.

Fram, R.J., Cusick, P.S. y Marinus, M.G. (1986) Studies on mutagenesis and repair induced by platinum analogs. *Mutation Res.* 173: 13-18.

Freshney,R.J.(1987) Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Techniques. Ed. R.Liss, Neeva York, p 385.

Garcia,E., Medina,M., Rojas,Y.,Ruiz,L.,Ostrosky,P. y Rodriguez,R. (1991) Acute toxicity of casiopeine, a new type of cytotoxic agent. Proc. West. Soc. 34:65-67.

Gasque,L., Moreno,R. y Ruiz-Ramirez,L. (1992) Stabilities of ternary copper and nickel complexes with 1, 10-phenantroline. Journal of Inorganic Biochemistry 47.

Gebhart,E.(1982)The epidemiological approach: chromosome aberrations in person exposed to chemical mutagens. En: Cytogenetic Assays of environmental mutagenes. T.C.Hsu ED. Allanheld Osmun, Totowa Nueva York, pp 385-408.

Gebhart,E., Windolph,B. y Wopfner,F.(1980) Chromosomes studies on lymphocytes of patients under cytostatic therapy.II Studies using the BUDR-labelling technique in cytostatic therapy. Human Genet. 56:157-167.

Gilman,A. y Philips, F.S. (1946) The biological actions and therapeutic applications of beta-chloroethyl amines and sulfides. Science 103: 409.

Gilman,A.(1963) The initial clinical trial of nitrogen mustard. Am.J. Surgery 105:574.

Giulotto,E.,Mottura,A., Giorgi,R. De Carli,L.y Nuzzo,F (1980) Frequencies of sister-chromatid exchanges in relation to cell kinetics in lymphocyte cultures. Mutat. Res. 70: 343-350.

Gonsebatt, M.E., y Mutchinick, O. (1990) Human Lymphocyte proliferation kinetics in hank's BSS supplemented with autologous plasma and in synthetic medium. *Mutation Res.* 243:255-258.

Hakala, M.T. y Soulinna, E.M. (1966) Specific protection of folate reductase against chemical and proteolytic inactivation. *Mol. Pharmacol.* 2:465.

Hata, T., Sano, Y., Sugarawa, R., Matsumae, A., Kanamori, K., Shima, T. y Hoshi, T. (1956) Mitomycin, a new antibiotic from Streptomyces. *J. Antibiot (Tokyo) Ser. A-9.* 141-146.
Heidelberger, C. (1965) Fluorinated pyrimidines. in: *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology.* Ed. por J.N. Davidson y W.E. Cohn. New York: Academic Press pp 1-50.

Hertz, R., Lewis, J. y Lippsett, M.B. (1961) Five years experience with the chemotherapy of metastatic choriocarcinoma and related trophoblastic tumors in women. *Am. J. Obstet. Gynec.* 82:631.

Hittelman, W.N. y Rao, P.N. (1974) Bleomycin induced damage in prematurely condensed chromosomes and its relationships to cell cycle progression in CHO cells. *Cancer Res.* 34: 3433-3439.

Howard, A. y Pelc, S.R. (1951) Nuclear incorporation of P³² as demonstrates by autoradiographs. *Exp. Cell. Res.* 2:178-187.

I.A.R.C. (1987) Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. World Health Organization, Supplement # 6. Lyon ,Francia.

Ingfield,G.B.(1971) Disaster in Bari. New York MacMillan Co.

Iversen,O.H. y Bjerknes,R.(1963) Kinetics of epidermal reaction to carcinogens. Oslo. Universitetsforlaget.

Jacobs,M.M. y Griffin,C.A.(1981) trace elements and metals as anticancerogens. En: Inhibition of tumor induction and development, Ed.M.S. Zedeck y M.Lipkin Plenum Press pp 161-188.

Jaju,M., Jaju,M. y Ahuja,Y.R. (1983) Cytogenetic effect of colistin on human lymphocytes *in vitro*: Chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, mitotic index, cell cycle kinetics and acrocentric associations. Teratogen, Carcinogen Mutagen 3: 515-526.

Johnson,I.S.,Armstrong,J.G.,Gorman,M y Burnett,J.P. (1963) The *Vinca* alkaloids: a new class of oncolytic agents. Cancer Res. 23:1390.

Johnson,R.K.(1990) Screening Methods in Antineoplastic drug discovery. J.Natl.Can.Inst. 82:1082-1083.

Kastrup, E.(1985) Antineoplastic Drugs. En : Drug facts and comparisons. Facts and Comparisons St. Louis. pp 1835-1902.

Kersten,H.(1975) Antineoplastic and immunosuppressive Agents. Part II. A.C. Sartorelli y D.G. Johns Eds. Springer-Verlag. pp 47-64.

Kierszenbaum,F., Cuna,W.R., Beltz,L.A. y Szein,M.B. (1990) Trypanosomal immunosuppressive factor: a secretion product(s) of *Trypanosoma cruzi* that inhibits proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. Immunol 144: 4000-4004.

Kovačs,C.J.,Hopkins,H.A.,Simon,R.M. y Looney,W.B.(1975) Effects of 5-fluorouracil on the cell kinetic and growth parameters of hepatoma 3924A. Br.J.Cancer 32:42.

Krumbhaar,E.B. y Krumbhaar, H.D.(1919) The blood and bone marrow in yellow croos gas (mustard gas) poisoning: Changes produced in the bone marrow of fatal cases. J. Med. Res. 40:497.

Kurlov,O.V. y Koifman,E.K.(1973) Problems of radiobiology and biological effect of cytostatic compounds. Vol 5. Tomsk pp 98.

Kurlov,O.V.,Golosov,O.S. y Koifman,E.K.(1968) Biological effect of cytostatic compounds. Tomsk pp 118.

Lagenbach,R.J.,Danenber,P.V. y Heidelberger,C.(1972) Thymidilate synthetase: Mechanism of inhibition by 5-fluoro-2'-deoxyuridylate. Biochem.Biophys Res. Commun. 48:1565.

Lin,P.S.,Kwock,L. Hefter,K y Missibeck,G.(1983) Effects of iron, copper, cobalt and their chelators on the cytotoxicity of bleomycin. *Cancer Res.* 43:1049-1053.

Lissauer (1865) II Zwei Fälle von Leucaemie. *Berl. Klin. Wochenschr.* 40:403.

López-Lazzarra,D.M., De luca,J.C. y Bianchi,N.O. (1990) The kinetics of DNA damage by bleomycin in mammalian cells. *Mutat.Res.* 232:57-61.

Lowe,M.C. y Davis R.D. (1987) The current Toxicology Protocol of the National Cancer Institute. En: *Fundamentals of Cancer Chemotherapy* .Ed.S.K. Carter y K. Hellmann.. Capitulo 24 pp 228-235.

Lozzio,C.B.(1969) Lethal effects of fluorodeoxyuridine on culture mammalian cells at various stages on the cell cycle. *J. Cell. Physiol.* 74:57.

Madle,S.(1981) Evaluation of experimental parameters in an S9/human leukocyte SCE test with cyclophosphamide. *Mutat. Res.* 85: 347-356.

Maier,P. y Schmid,W.(1976) Ten models mutagens evaluated by the micronucleus test. *Mutation Res.* 40(4):325-337.

Malaragno,M.I.y Smith,M de A.(1990) Sister Chromatid Exchange and proliferation pattern in lymphocyte from newborns, elderly subjects and in premature aging syndromes. *Mech. Aging Dev.* 15: 43-53.

Mamuris,Z., Prieur,M.,Dutrillaux,B y Aurias,A. (1988)
Chromosomal aberrations in lymphocytes of patients treated
with melphalan.Int. J. Cancer 42:133-139.

Mamuris,Z.,Prieur,M.,Dutrillaux,B. y Aurias,A.(1989)
Specificity of melphalan and their transmission through cell
divisions. Mutagenesis 4: 133-139.

Mansy,S. Rosenber,B. y Thomson,A.J.(1973) binding of cis-
and trans-dichlorodiammineplatinum (II) to nucleosides. I.
Location of the binding sites. J.Am.Chem.Soc.95:1663.

Margulis,R.L.y Wilson,L.(1977) Addition of colchicine-
tubulin complex to microtubule ends: Mechanism of
substoichiometric colchicine poisoning. Proc Natl,Acad.
Sci.U.S. 74:3466.

Marquardt,H. y Marquardt,H.(1977) Induction of malignant
trasformation and mutagenesis in cell cultures by cancer
chemotherapeutic agents. Cancer 40: 1930-1934.

Marques-Pereira,J.P. y Leblond,C.P.(1965) Mitosis and
differentiation in the stratified epithelium of the rat
oesophagus. Am.J.Anat.117:73-89.

Martell,S.E., Berlin,M., Brubaker,G., Eichorn,G.C.,
Gruth,D., Jennette,K., Petering,H, Piscator,M., Schubert,J y
Seven, I. (1981) Chemistry and metabolism of metals
relevant to their carcinogenecity. Environ. Health
Perspectives 40: 27-34.

Martenet, A.C. (1989) Classical immunosuppressive agents. Bull.Soc.Belge.Ophthalmol: 230:135-141.

Moorhead, P.S., Howell, P.D. Mellman, W.J. Battips, D.M y Hungerford D.A. (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp. Cell.Res 20:613.

Morimoto, K y Wolff, S. (1980) Increase of sister chromatid exchanges and perturbations of cell division kinetics in human lymphocytes by benzene metabolites. Cancer Res. 40:1189-1193.

Mourelatos, D., Petrou, C., Boutis, L., Papageorgiou, A., Catsoulacos, P y Dozi-Vassiliades, J. (1987). Induction of cytogenetic damage by modified steroidal derivatives of p-bis(2-chloroethyl)aminophenylacetic acid in human lymphocytes. Mutat.Res. 190:205-210.

Mukherjee, K.L., Boohar, J., Wentland, D., Javid, M. y Heildelberger, C. (1963) Studies on fluorinated pyrimidines. XVII tissue distribution of 5-Fluorouracil-2- C^{14} and 5-flouro-2- deoxyuridine in cancer patients. Cancer Res. 23:67.

Munchausen, L.L. y Rahn, R.O. (1975) Physical studies on the binding of cis-dichlorodiammine platinum(II) to DNA and homopolynucleotides. Biochim Biophys Acta 414:242.

Musilova, J., Michalova, K., Folberova, L y Pacovsky, V. (1989) Chromosome aberrations induced by bleomycin in the lymphocytes of young and old persons. Cas-Lek-Cesk; 128(37) pp 1166-1169.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Mutchinick,O., Lisker,R., Ruz,L., Salamañca,F. y Armendares,S. (1979) Frequency of sister chromatid exchanges in severe protein calorie malnutrition. *Ann Génét* 22:129-132.

Mutchinick,O.,Ruz,L. y Casas,L.(1980) Time of first-generation metaphases.I. The effect of various culture media and of fetal calf serum in human lymphocyte cultures. *Mutation Res.* 72:127-134.

Nazarenko,S.A. y Bumarkina,IuE.(1984) Relationship of spontaneous chromosome instability and sister chromatid exchanges in fanconi's anaemia. *Biull. Eksp.Biol.Med.* 98:334-336.

Noble,R.L.,Beer,C.T. y Cutts J.H.(1958) Further biological activities of vincalukoblastine- an alkaloid isolated from *Vinca rosea*. *Biochem Pharmacol* 1:347.

Novikova,M.A.(1960) Problems in Chemotherapy of malignant tumors. Moscow,pp 363.

Nowell,P.C. (1964) Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin in human leukocyte cultures. *Exp.Cell.Res.* 33:445-449.

Obe,G. y Beck,B. (1984) Human peripheral lymphocytes in mutation research. En: *Mutations in man*. Ed.G.Obe. Heidelberg. Springer-Verlag. pp 177-197.

Obe, G., Beck, B., Dudin, G. (1975) The human leukocyte test system, V. Dna synthesis and mitosis in PHA-Stimulated 3 day cultures. *Humangenetik* 28:295-392.

Ortiz, R. y Betancourt, M. (1990) Length of cell cycle *in vitro* and sister chromatid exchange frequency in bone marrow cells from severely malnourished rats. *Mutat res.* 232:71-76.

Orwool, E.S., Kiessling, P y Paterson, J.R. (1978) Interstitial pneumonia from mitomycin. *Ann. Intern. Med.* 89: 352-355.

Ostrosky-Wegman, P., Montero, R., Cortinas de Nava, C., Tice, R. y Albertini, R. (1987) The use of bromodeoxyuridine labeling in the human lymphocyte HGPRT somatic mutation assay. *Mutation Res.* 191:211-214.

Ostrosky-Wegman, P., Gonsebatt, M.E., Montero, R., Vega, L., Barba, H., Espinosa, J., Palau, A., Cortinas, C., Garcia-Vargas, G., del Razo, L.M. y Cebrian, M. (1991) Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutation Res.* 250:477-482.

Ostrosky-Wegman, P., Garcia, G., Arellano, L., Espinoza, J.J., Montero, R. y Cortinas de Nava, C. (1984) Genotoxicity of antiamebic, anthelmintic and antimycotic drugs in human lymphocytes. En: *Sister Chromatids Exchanges* Ed. R. Tice y A. Hollaender. Plenum Publishing Corp. pp 915-925.

Parsons, P.A. y Morrison, E.L. (1982) DNA damage and selective toxicity of DOPA and Ascorbate: copper in human melanoma cells. *Cancer Res.* 42:3783-3788.

Parsons,P.G. y Morrison,L.(1978) Melphalan induced chromosome damage in sensitive and resistant human melanoma cell lines. *Int J. Can.* 21:428-443.

Patterson,A.R.P. y Tidd,D.M. (1975) 6-Thiopurines. En:Antineoplastic and immunosuppressive agents.Par II. Ed por A.C. Sartorelli y D.C. Johns. Berlin: Springer-Verlag. pp 384-403.

Perry,P. y Wolff,S.(1974) New Giemsa method for the differential staining of sister chromatid. *Nature (London)* 251: 156-158.

Pilgrim,C., Erb,W. y Maurer,W.(1963) Diurnal fluctuations in the members of DNA synthesizing nuclei in various mouse tissues. *Nature* 199:863-865.

Pisceiotta,A.V., Westring,D.W. DePrey,C. y Walsh,B. (1967) Mitogenic effect of PHA at different ages. *Nature* 215:193.

Potter,M. y Briggs,G. (1962) Inhibition of growth of amethopterin sensitive and amethopterin resistant pairs of lymphocytic neoplasms by dietary folic acid deficiency in mice. *J. Natl. Cancer Inst.* 28: 341-351.

Povirk,L.F. (1979) Catalytic release of deoxyribonucleic bases by oxidation and reduction of an iron bleomycin complex. *Biochemistry* 18: 3989-3995.

Pratt,W.B. y Ruddon,R.(1979) *The Anticancer Drugs* Ed. Oxford University Press, pp 323.

Prescott,D.M. (1976) Reproduction of Eukaryotic cells.
Academic Press. U.S.A. p 177.

Promchainant,C. (1975) Cytogenetic effect of Bleomycin on
human leukocytes *in vitro*. Mutation Research 28: 107-112.

Quastler,H. y Sherman,G.G.(1959) Cell population kinetics
in the intestinal epithelium of the mouse. Exp.Cell Res.
17:420-438.

Registro Nacional del Cancer (1987) Secretaria de Salud
Mexico D.F.

Ringborg,V, Lambert.B.,Lewensohn,R y Turresson,I.(1981)
DNA damage in human cells treated with closely related
alkylating agents peptichemio, m-l-sarcolysin and melphalan.
Eur.J.Cancer,Clin.Oncol. 17:233-245.

Roberts,J.J. y Pascoe,J.M.(1972) Cross-linking of
complementary strands of DNA in mammalian cells by
antitumor platinum compounds. Nature 235:282.

Rosenberg,B.,Van Camp,L. y Krigas,T.(1965) Inhibition of
cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from
a platinum electrode. Nature 205:698.

Rueckert,R.R. y Mueller,G.C.(1960) Studies on unbalanced
growth in tissue culture. I. Induction and consequences of
thymidine deficiency. Cancer Res.20: 1584.

Ruiz-Ramirez,L. Solans X., Briansó, J.L. y Gasque L.(1987) Structure of (1,10- phenanthroline (salicylaldehydato) copper (II) nitrate. Acta Crystallographica C43,428.

Ruiz-Ramirez,L. y Moran,P. (1981) Estudio farmacologico de nuevos quimioterapéuticos con centro metálico. XVI Congreso Mexicano de Química Pura y Aplicada. Morelia, Michoacan. Trabajo 84.

Ruiz-Ramirez,L.(1992) Process to obtain new complexes to be used as anticancer agents. Type A. USA Patent Number 5-107,005.

Ruiz-Ramirez,L., Moreno,R., Diaz,D., Escalante,S. y Martin-Polo,J. (1980) Mixed Chelate complexes of the first row transition elements. Proc Second North American Continent Chemical Congress. Las Vegas U.S.A. (Resumen).

Ruiz-Ramirez,L., Gasque,L., Martinez,A., Moreno,R. y Solans, X. (1992) Copper (II) hydrate mixed chelate complexes. Part I and Part III. Acta Crystallographica, C48.

Santi,D.v. McHenry,C.S. y Sommer,H.(1974)Mechanism of interaction of thymidilate synthetase with 5-fluorodeoxyuridylate. Biochemistry 13: 471.

Sausville,E.A.Peisach,J. y Horwitz,S.B.(1978) Effects of chelating agents and metals ions on the degradation of DNA by bleomycin. Biochemistry 17:2740-2745.

Schneider,E.L. (1982) Aging and sister Chromatid exchange. En: Sister Chromatid Exchange, Ed.A.A.Sandberg. Liss Nueva York. pp 195-203.

Scott,D., Galloway,S.,Marshall,R. Ishidate,M., Brusick,D.,
Ashby,J. y Myhr,B. (1991) ICPEMC Genotoxicity under
extreme culture conditions. Mutation Res. 257:147-204.

Seeger,D.R., Cosulich D.B.,Smith,J.M. y
Hultquist,E.M.(1949) Analogs of pteroylglutamic acid. III. 4-
amono derivatives. J.Am.Chem.Soc. 71:1753.

Shabel,F.M., Griswold,D.P.,Laster,W.R., Corbett,T.H. y
Lloyd, H.H.(1977) Quantitative evaluation of anticancer
agent activity in experimental animals. Pharmac.Ther.A.
1:411-435.

Shear, M.J., Hartwell,J.L. y Peters,V.B.(1947) Some Aspects
of a joint institutional research progam on chemotherapy of
cancer. Current Laboratory and clinical experiments with
bacterial polysaccharide and with synthetic organic
compounds. En: Approaches to tumor Chemotherapy
.Washington D.C. American Association for tha
advancement of Science pp 236-284.

Sherman,S.E.y Lippard S.S.(1987)Structural aspects of
platinum, anticancer drug interactions with DNA .Chem Rev
87:1153-1181.

Shrivastav,S., STone,K.R., Paulson,D.F. y Bonar,R.A.
(1980). Activation of cyclophosphamide for *in vitro* testing
of cell sensitivity. Cancer Res. 40:4443-4445.

Simpson-Herren,L (1987) Autoradiographic techniques for measurement of the labeling index. en : Techniques in cell Cycle Analysis. J.W. Gray y Z. Darzynkiewicz Ed. Editorial Humana. U.S.A. p 1-30.

Singh,NP., y D'Ambrosio,S.M. (1984) Sister chromatid exchange frequency and cell cycle kinetics in cancer patients treated with cytostatic drugs. Basic Life Sci. 29: 8885-893.

Skehan,P., Storeng,R.,Scudiero,D. Monks,A., McMahon,J., Vistica,D., Warren,J.T., Bokesch,H., Kenney,S. y Boyd,M.R. (1990) New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. J.Natl.Can.Inst. 82:1107-1112.

Slavutsky,I.,Mudry,M.D., Labal de Vinuesa,M., Meiss,R., Chopita,N. y Larripa,I.(1988) Sister chromatid exchange and cellular kinetics in lymphocytes of patients with adenoma and colonic cancer. Gastroenterol Clin.Biol.(France)12:935-940.

Snope,A.J. y Rary,J.M.(1979) Cell cycle duration and sister chromatid exchange in cultured human lymphocytes. Mutat. Res. 63:345-349.

Snyder,R.M., Mirabelli,Ch.K., Johnson,R.K. Sung,Ch.M., Faucette,L.F., McCabe,F.L., Zimmerman,J.P., Whitman, M., Hempel,J.C. y Crook,S.T. (1986) Modulation of the antitumor and biochemical properties of Bis(diphenylphosphine) etane with metals. Cancer Res. 46:5054-5060.

Sofuni, T., Galloway, S.M., Ishidate, M., Shelby, M.D., Murli, H., Thilagar, A., Gulati, K., Putman, D.L., Marshall, R. y Tanaka, N. (1992) A further international collaborative study on two different experimental systems of *in vitro* chromosomal aberration tests. *Env. Mol. Mutag.* 19:59 (abstract).

Spiegel, M. (1970) *Estadística*. Ed. MC-Graw Hill. México p 357.

Staquet, M.J., Byar, D.P., Green, S.B. y Rozenewig, M. (1983) Clinical predictivity of transplantable tumor systems in the selection of new drugs for solid tumors: rationales for the three-Stage Strategy. *Cancer Treat. Reports* 67:753-765.

Stockdale, F.E. (1987) V. Cancer Growth and chemotherapy. *Scientific American Inc. U.S.A.* pp 1-16.

Sztein, M.B., Cuna, W.R. y Kierszbaum, F. (1990) *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8 and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. *J. Immunol* 144: 3558-3562.

Szybalski, W. (1964) Crosslinking of DNA by enzymatically or chemically activated mitomycins and porfirinomycins bifunctionally alkylating antibiotics. *Fed. Proc.* 23: 946-957.

Szybalski, W. e Iyer, V.N. (1967) The mitomycins and porfirinomycins. En: D. Gottlieb y P.D. Shaw. *Antibiotics. Vol 1 Mechanism of action*. Springer. Nueva York pp 211-245.

Taylor, J.A., Woods, P.S. y Hughes, W.L. (1957) The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sc. U.S.A.* 43:122-128.

Tomasz, M., Lipman, R., Chowdary, D., Pawlak, J., Verdine, G.L. y Nakanishi, K. (1987) Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. *Science*, 235: 1204-1208.

Tselepi, M.R., Demopoulos, N.A. y Catsoulacos, P. (1989) Induction of sister chromatid exchanges and cell division delays in human lymphocytes. *Mutagenesis* 4: 361-364.

Turnbull, D., Popescu, N.C., DiPaolo, J.A. y Myhr, B.C. (1979) Cisplatinum(II)diamine dichloride causes mutation, transformation and sister chromatid exchanges in cultured mammalian cells. *Mutation Res.* 66:267-275.

Umezawa, H. (1973) Studies on bleomycin: chemistry and biological action. *Biomedicine* 18:459-475.

Umezawa, H., Meada, K., Takeuchi, T. y Okami, Y. (1962) New antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiotics*, 19:200-209.

Umezawa, H., Meada, K., Takeuchi, T. y Okami, Y. (1962) New Antibiotics, bleomycin A and B. *J. Antibiotics* 19:200-209.

Venditti, J.M. (1981) Preclinical Drug development: Rationale and methods. *Seminars in Oncology* 8:#4 pp 349-361.

Wakaki,S.H.,Marumo,K.,Tomioka,G.,Shimizu,E., Kato,H., Kamada,S.,Kudo,S. y Fujimoto,Y. (1958) Isolation of new fractions of antitumor mitomycins. *Antibiot.Chemother.* 8:228-240.

Waksman,S.A. y Woodruff,H.F.(1940). Bacteriostatic and Bacteriocidal substances produced by a soil actinomycetes. *Proc.Soc.Exptl Biol.* 45:609.

Webb,J.S.,Cusolich,D.B.,Mowat,J.H. Patrick I.B. Broschard,R.W.,Meyer,W.E.Williams,R.P.,Wolt,C.F., Fulmor,W.,Pidalks,C. y Lancaster,J.E. (1962) *J. Amer.Chem.Soc.* 84:3185-3186.

Wen,W.N. y Liew,T.L. (1983) The effect of age and cell proliferation on the frequency of Sister Chromatid exchange cell-cycle kinetics and mitotic index in human peripheral lymphocytes. *Mutation Research* 190: 225-228.

Westman,N.A. y Marklund,S.I.(1981) Copper and Zinc containing superoxide dismutase and manganese-containing superoxide dismutase in human tissues and human malignant tumors. *Cancer Res.* 41:2962-2966.

Williams,S.D. y Einhorn L.H.(1980) Cisplatin chemotherapy of testicular cancer: en Cisplatin: Current Status and New Developments. A.W. Prestakio, S.T. Crooke y S.T. Carter Eds. Academic Press U.S.A. pp 323-327.

Wilson,L. Anderson, K.A. y Chin,D.(1976)
Nonstoichiometric poisoning of micrutubule polymerization:
A model for the mechanims of action of the *Vinca* alkaloids,
podophyllotoxin and colchicine. En: Cold Spring Harbor
Conference on Cell Proliferation. III Cell Motility. Ed. R.
Godman,T Pollard y J. Rosenbaum. Nueva York: Cold
Spring Harbor Laboratory.pp 1051-1064.

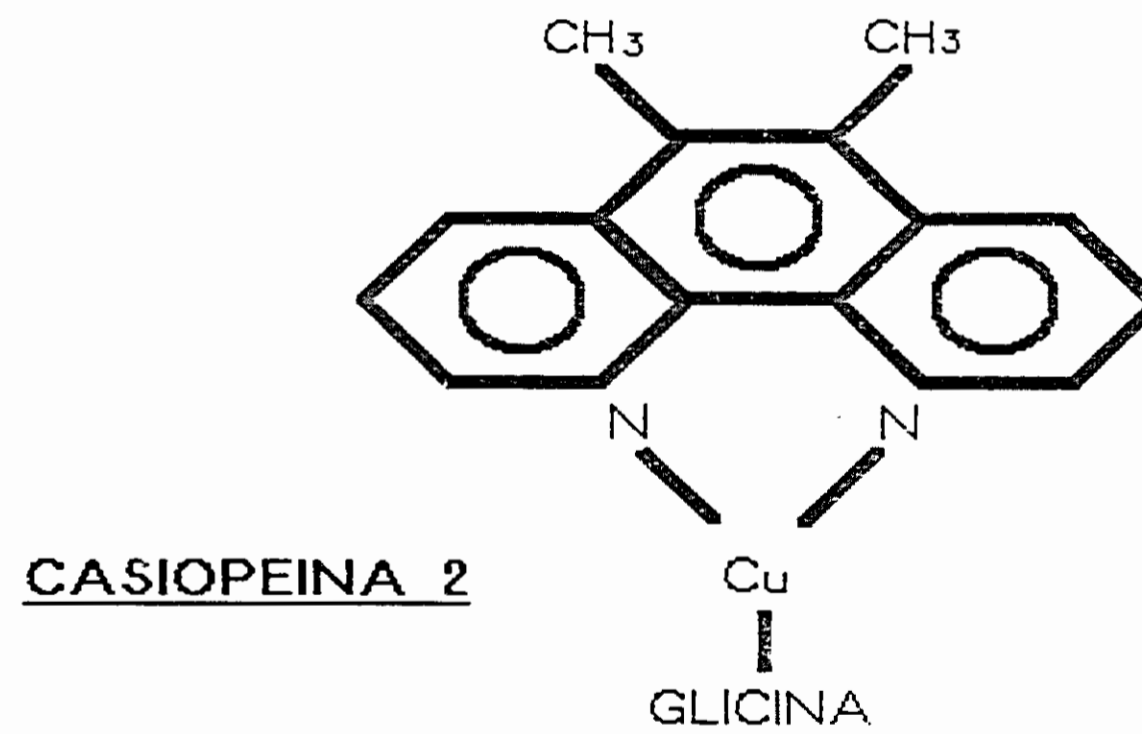
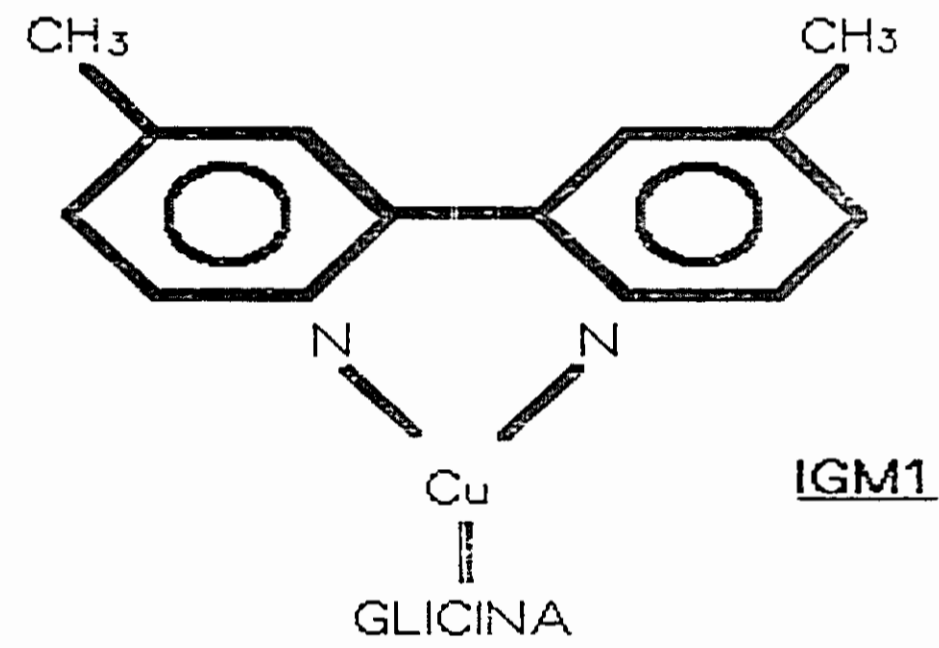
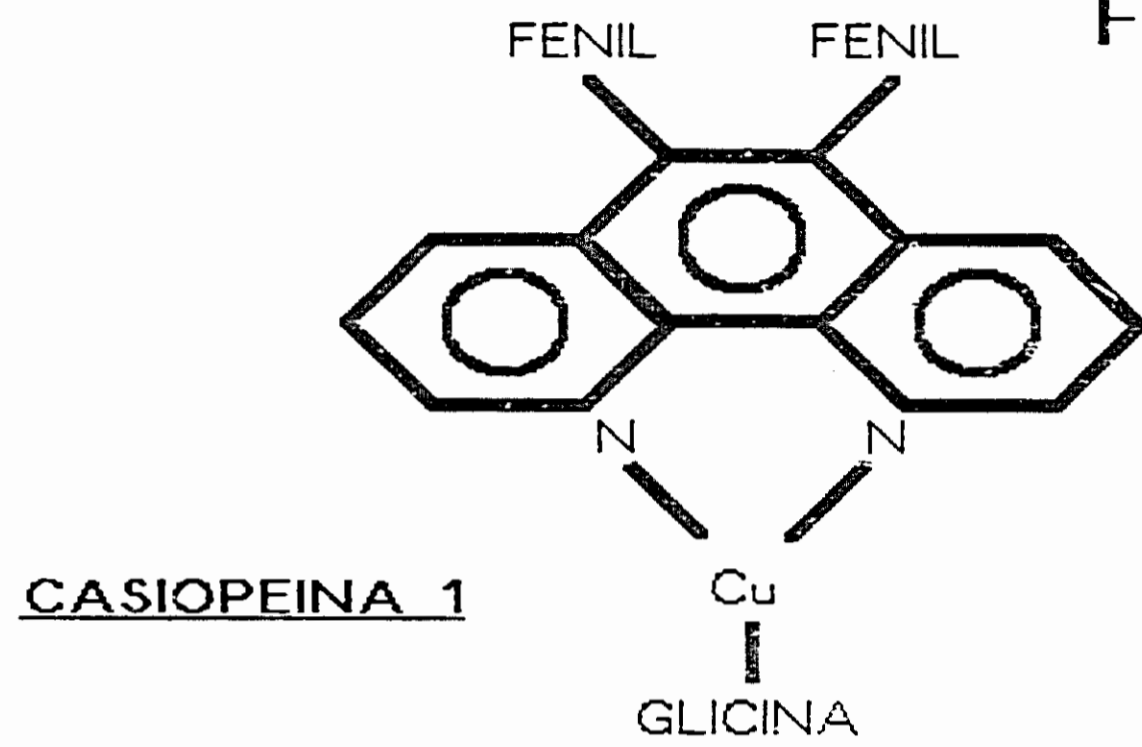
Yagoda,A. (1980) Cisplatin regimens in the treatment of
bladder and penile cancer. en: Cis-platin: current status and
new developments. A.W. Prestakio, S.T. Crooke y S.t. Carter
ED. Academic press pp 361-373.

Yajima,K.,Nakazawa,S.,Ohwaki,K. Shimura,T. e
Itoh,Y.(1981) A new treatment of malignant brain tumor 1.
local injection of bleomycin. No-Shinkei-Geka: 9(13):1487-
1493.

Zubrod,C.,Schepartz,S. y Carter,S. (1977) Historical
background of the National Cancer Institute's Drug
Development thrust. National Cancer Institute Monograph #
45. 7-12.

FIGURAS

FIGURA 1. ESTRUCTURA
SUSTANCIAS NUEVA
SINTESIS



TABLAS

TABLA 1.- FARMACOS APROBADOS EN LOS ESTADOS UNIDOS.
 ESTA LISTA NO INCLUYE AGENTES HORMONALES

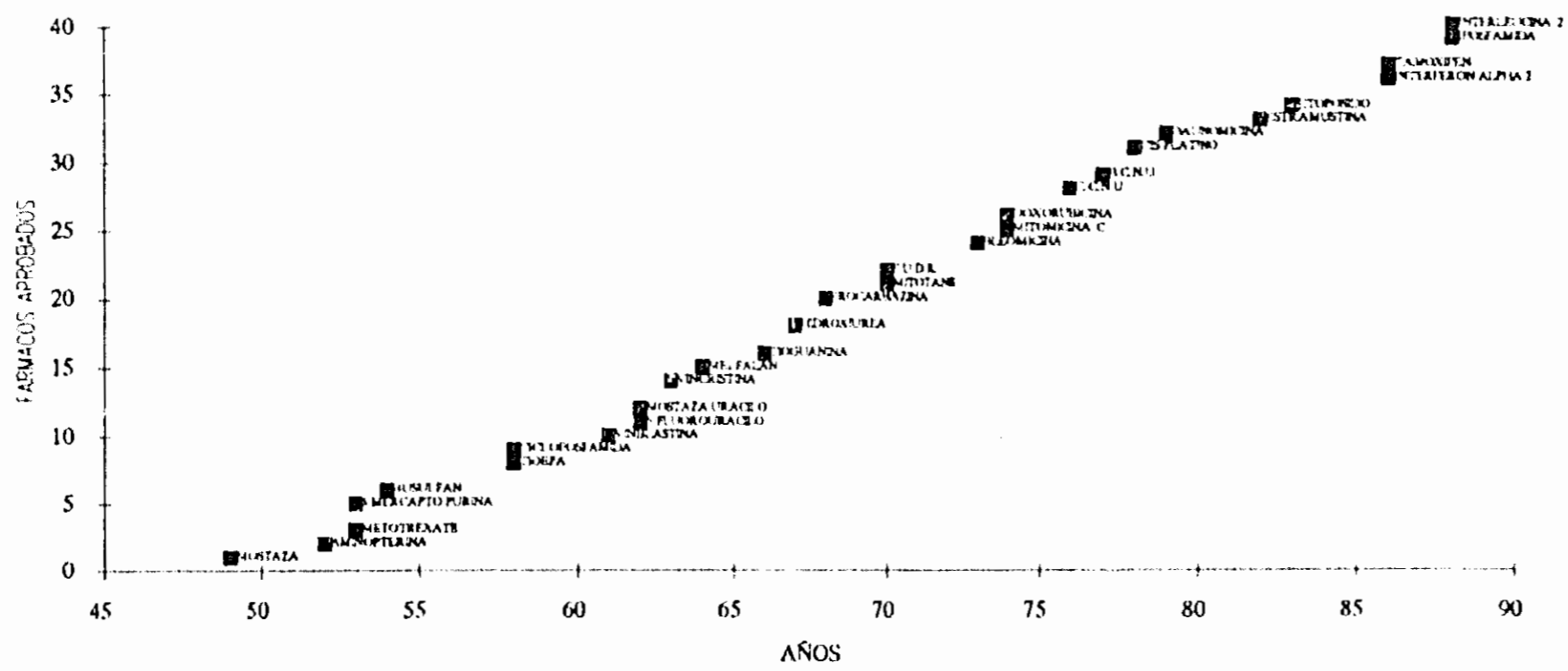


TABLA 2.- MECANISMOS DE ACCION DE LOS DIFERENTES FARMACOS.

TIPOS DE COMPUESTO	MOLECULA SUSCEPTIBLE	ALTERACION	ORIGEN DE LA MUTACION	TIPOS DE CANCER TRATADOS
CISPLATINO	ADN, HISTONAS UNION A GUANINAS	ALQUILACION ENTRECruzAMIENTO INTER E INTRA	ERROR EN EL APAREAMIENTO ENTRE BASES	TESTICULO VEJIGA, PROSTATA OVARIO PIEL Y PULMON
MITOMICINA-C	ADN, SE UNE A GUANINAS Y CITOSINAS	ENTRECruzAMIENTO ALQUILACION	ALTERACION DE LA HELICE, ERROR EN LA REPLICACION	ESTOMAGO, CERVIX COLON, RECTO PANCREAS, PECHO PULMON Y MELANOMA
MELFALAN	ADN Y PROTEINAS	ENTRECruzAMIENTO	ERROR EN EL APAREAMIENTO ENTRE BASES	MIELOMA MULTIPLE MELANOMA, PECHO Y OVARIO
BLEOMICINA	ADN	CORTE DE LA CADENA	ERROR EN EL APAREAMIENTO ENTRE BASES CADENAS ROTAS	PIEL, PULMON, LINFOMA Y TESTICULO
METOTREXATE	DIHIDROFOLATO REDUCTASA	ALTERACION DE LA ENZIMAS	INHIBICION DE LA SINTESIS DE ADN Y PROTEINAS	LEUCEMIAS, CORIOCARCINOMAS
6MP	ANALOGO DE HIPOXANTINA	CAMBIA EL POOL DE NUCLEOTIDOS	INHIBICION DE LA SINTESIS DE PURINAS	LEUCEMIA LINFOBLASTICA GRANULOCITICA CRONICA
5FU	ANALOGO DEL URACILO,	ALTERACION DE LA ENZIMA	INHIBICION DE LA SINTESIS DE ADN Y PROTEINAS	CANCER DE PECHO CANCERES DEL TRACTO GASTROINTESTINAL
COLCEMID	TUBULINA DE LOS MICROTUBULOS	BLOQUEA LA POLIMERIZACION DE LOS MICROTUBULOS	INHIBICION DEL CICLO CELULAR	LEUCEMIA, MIELOIDE CRONICA

TABLA 3- EFECTO DE LA MITOMICINA-C SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA,
INDICE MITOTICO Y CINETICA DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS (4 OCASIONES)

DOSIS (uM)	ITT	IM	M1	M2	M3	IR
DONADOR MS						
CONTROL	0	.0250 +/- .003	15	20	65	2.51
0.1	44	.0190 +/- .0043	18	23	59	2.40
1	82	.0082 +/- .0019*	25	24	51	2.28*
5	78	.0022 +/- .0012*	50	33	17	1.67*
DONADOR AB						
CONTROL	0	.0340 +/- .0035	14	17	69	2.55
0.1	45	.0252 +/- .0068	11	18	71	2.57
1	77	.0089 +/- .0015*	19	21	60	2.42
5	89	.0013 +/- .0008*	40	32	28	1.88*

ITT = INHIBICION DE LA INCORPORACION DE LA TIMIDINA TRITIADA
IM = INDICE MITOTICO
M1 = MITOSIS EN PRIMERA DIVISION
M2 = MITOSIS EN SEGUNDA DIVISION
M3 = MITOSIS EN TERCERA DIVISION
IR = INDICE DE REPLICACION
* P<0.05

TABLA 5 - EFECTO DEL CISPLATINO SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA
 INDICE MITOTICO Y CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR DE LINFOCITOS

DOSIS μ M	ITT	IM	M1	M2	M3	IR
CONTROL	0	0.0262 \pm 0.002	14.2	26	59.8	2.45
4	5.8	0.0210 \pm 0.003	18.6	21	60.4	2.41
20	60	0.0120 \pm 0.001*	41	21.6	37.4	1.96*
100	73	0.0045 \pm 0.000*	62.5	7	30.5	1.68*
DONADOR ER						
CONTROL	0	0.0330 \pm 0.001	16.71	31.14	52.15	2.35
4	8	0.0380 \pm 0.003	19.3	37.3	43.4	2.24
20	37	0.0300 \pm 0.004	23	36.5	40.5	2.17
100	63	0.0150 \pm 0.000*	37.5	38.5	24	1.86*
DONADOR HB						

* P<0.05

TABLA 4. REPRODUCIBILIDAD DE LOS EFECTOS DE LA MITOMICINA-C SOBRE EL INDICE MITOTICO Y LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR (5 DONADORES)

DONADOR 3&											DONADOR 4				
DOSIS uM	IM	M1	M2	M3	IR	IM	M1	M2	M3	IR					
0	.0153+/-0.004	14	23	63	2.51	.019+/-0.002	14	22	64	2.51					
0.1	.0107+/-0.001	28	25	47	2.19	.010+/-0.005	30	24	46	2.17					
1	.0041+/-0.001*	42	26	32	1.91	.004+/-0.001	44	23	33	1.88					
5	.0009+/-0.000*	46	31	23	1.77	.001+/-0.000	45	37	18	1.74					

DONADOR 5						DONADOR 6				
DOSIS uM	IM	M1	M2	M3	IR	IM	M1	M2	M3	IR
0	.0120+/-0.003	15	21	64	2.51	.0170+/-0.003	20	25	55	2.36
0.1	.0139+/-0.001	14	21	65	2.51	.0105+/-0.001	18	22	60	2.39
1	.0082+/-0.000	24	26	50	2.25	.0100+/-0.000	41	23	36	1.95
5	.0020+/-0.008	44	32	24	1.81	.0015+/-0.003	55	27	18	1.63

DONADOR 7					
DOSIS uM	IM	M1	M2	M3	IR
0	.0230+/-0.000	10	28	62	2.52
0.1	.0209+/-0.006	13	21	66	2.53
1	.0106+/-0.003	23	28	49	2.27
5	.0014+/-0.000	45	22	33	1.88

& HOMBRE

TABLA 6.- EFECTO DEL MELFALAN SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA,
EL INDICE MITOTICO Y LA CINETICA DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS

DOSIS μ M	ITT	I.M.	M1	M2	M3	I.R.
CONTROL.	0	0.040 +/- .0004	7	38	56	2.51
0.1	44	0.036 +/- .0004	10	36	54	2.44
1	82	0.022 +/- .0080*	7	43	50	2.43
10	74	0.009 +/- .0074*	24	31	45	2.21*
DONADOR POW						
CONTROL.	0	0.031 +/- .0008	14	28	58	2.44
0.1	65	0.019 +/- .006*	16	30	54	2.38
1	75	0.015 +/- .008*	20	33	47	2.27
10	76	0.009 +/- .0016*	30	39	31	2.01*
DONADOR MS						

*P<0.05

TABLA 7.- EFECTO DE LA BLEOMICINA SOBRE LA INCORPORACION DE LA TIMIDINA TRITIADA
EL INDICE MITOTICO Y LA CINETICA DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS

DOSIS μ M	ITT	LM.	M1	M2	M3	IR
CONTROL	0	0.033 \pm .002	15	35	50	2.35
0.003	19	0.029 \pm .001	14	33	53	2.39
0.03	69	0.029 \pm .003	25	31	44	2.19*
0.3	72	0.013 \pm .001*	41	29	30	1.89*
DONADOR HBA						
CONTROL	0	0.064 \pm .0008	7.5	29.5	63	2.55
0.003	31	0.057 \pm .0005	11.5	31.5	57	2.46
0.03	77	0.056 \pm .0008	10	30.5	59.5	2.49
0.3	86	0.035 \pm .0016*	17	34	49	2.32*
DONADOR ERC						

TABLA 8.- EFECTO DE LA 6-MERCAPTOPURINA SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA
INDICE MITOTICO Y LA CINETICA DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS

DOSIS uM	ITT	I.M.	M1	M2	M3	IR
CONTROL	0	0.033 +/- .002	17	31.5	51.5	2.34
4	-1.8	0.030 +/- .0019	30	26	44	2.14
20	4	0.031 +/- .002	34.5	16	49.5	2.14
100	63	0.017 +/- .0012*	34.5	20	45.5	2.11
DONADOR HIBA						
CONTROL	0	0.026 +/- .003	14	26	60	2.45
4	8.8	0.021 +/- .002	18	18.5	63.5	2.49
20	66	0.018 +/- .001	14	25	61	2.47
100	73	0.010 +/- .004*	8.5	30	61.5	2.5
DONADOR ERC						

*P<0.05

TABLA 9- EFECTO DEL 5 FLUORURACILO SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA
INDICE MITOTICO Y CINETICA DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS

DOSIS μ M	ITT	IM	M1	M2	M3	IR
CONTROL	0	0.033 +/- .002	16.7	31.15	52.15	2.35
4	0	0.013 +/- .007	23	48.5	28.5	2.05
20	8	0.004 +/- .001	69.3	18.3	12.4	1.43
100	54	0.003 +/- .003	---	---	---	---
DONADOR HBA						
CONTROL	0	0.026 +/- .003	14.2	26	59.8	2.45
4	40	0.022 +/- .003	12	27	61	2.48
20	41	0.015 +/- .003	14.5	17.5	68	2.5
100	72	0.010 +/- .002	16	24	60	2.44
DONADOR ERC						
CONTROL		0.030 +/- .002	7	8.5	84.5	2.77
4		0.024 +/- .004	6	18	76	2.7
20		0.017 +/- .005	12	18	70	2.58
100		0.010 +/- .002	7	10	83	2.76
DONADOR AMS						

TABLA 10- EFECTO DEL METOTREXATE SOBRE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA
 INDICE MITOTICO Y CINETICA DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS

DOSIS (uM)	ITT	IM	M1	M2	M3	IR
CONTROL	0	0.029 +/- .002	19	36	45	2.26
1	38	0.006 +/- .003*	25	40	35	2.10
10	63	0.004 +/- .001*	23	36	41	2.18
100	76	0.007 +/- .001*	30	34	36	2.05
DONADOR MS						
CONTROL	0	0.026 +/- .001	25	33	42	2.17
1	42	0.005 +/- .001*	30	41	29	1.99
10	58	0.006 +/- .003*	34	32	34	2.00
100	80	0.0075 +/- .0007*	31	35	34	2.03

DONADOR AB

* P<0.05

TABLA 11.- EFECTO DEL COLCEMID SOBRE EL INDICE MITOTICO Y LA
CINETICA DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS

DOSIS μ M	I.M.	M1	M2	M3	IR
CONTROL	0.007 \pm .004	21	36	43	2.22
0.038	0.038 \pm .003*	29.5	36.5	42	2.28
0.076	0.076 \pm .004*	32.5	32.5	35	2.10
0.11	0.11 \pm .006*	36	28.5	35.5	1.99*
DONADOR LV					
CONTROL	0.005 \pm .002	25	18	57	2.32
0.038	0.035 \pm .004*	44.5	19.5	36	1.91*
0.076	0.07 \pm .004*	46	17	37	1.91*
0.11	0.16 \pm .003*	60.5	11.5	28	1.67*
DONADOR AC					

*P<0.05

TABLA 12. EFECTO DE LA CASIOPEINA EN DMSO SOBRE EL INDICE MITOTICO Y LA CINETICA DE PROLIFERACION EN LINFOCITOS

DOSIS μ M	IM	M1	M2	M3	IR
CONTROL	.034 \pm .002	21	26	53	2.32
0.22	.034 \pm .003	25	27	48	2.23
2.2	.015 \pm .004*	32	32	36	2.04*
22	.010 \pm .006*	42	25	33	1.91*
DONADOR POW					
CONTROL	.045 \pm .002	19	24	57	2.38
0.22	.037 \pm .004	18	31	51	2.33
2.2	.014 \pm .005*	29	41	30	2.01*
22	.011 \pm .003*	32	41	27	1.95*
DONADOR ANG					

* P < 0.05

TABLA 13.- EFECTO DE LA CASIOPEINA EN AGUA ACIDULADA SOBRE EL INDICE MITOTICO Y LA CINETICA DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS

DOSIS μ M	I.M.	M1	M2	M3	IR
CONTROL	0.044 +/- .002	6	15	79	2.73
0.017	0.046 +/- .004	11	27	62	2.51
0.17	0.056 +/- .005	11	16	73	2.62
1.7	0.036 +/- .003	20	26	54	2.34*
17.9	0.009 +/- .004*	28	23	41	2.13*
DONADOR LAH					
CONTROL	0.051 +/- .002	14	21	65	2.51
0.017	0.054 +/- .006	18	23	59	2.41
0.17	0.045 +/- .004	8	20	72	2.64
1.7	0.036 +/- .006	13	28	59	2.46
17.9	0.008 +/- .008*	33	30	37	2.04*
DONADOR RM					

* P<0.05

TABLA 14.- EFECTO DE LA CASIOPEINA EN ALCOHOL BENZILICO SOBRE EL INDICE MITOTICO Y LA CINETICA DE PROLIFERACION DE LINFOCITOS.

DOSIS μ M	I.M.	M1	M2	M3	IR
CONTROL	0.044 +/- .002	6	15	79	2.73
0.02	0.046 +/- .003	15	23	62	2.47
0.2	0.045 +/- .004	17	20	63	2.46
2	0.037 +/- .002	10	23	67	2.57
20	0.011 +/- .008*	18	13	69	2.51
DONADOR LA1					
CONTROL	0.051 +/- .003	14	21	65	2.51
0.02	0.056 +/- .004	14	19	67	2.43
0.2	0.042 +/- .002	14	28	59	2.47
2	0.041 +/- .005	12	30	58	2.46
20	0.025 +/- .005*	16	29	55	2.39
DONADOR RM					

* P<0.05

TABLA 15.- EFECTO DE LA CASIOPEINA 2 SOBRE EL INDICE MITOTICO Y LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR EN LINFOCITOS.

DOSIS μ M	I.M.	M1	M2	M3	IR
CONTROL	0.036 +/- .002	14	12	74	2.6
0.22	0.020 +/- .002	14	31	55	2.41
2.2	0.030 +/- .001	13	39	48	2.35
22	0.005 +/- .000*	27	40	33	2.06*
DONADOR PO					
CONTROL	0.050 +/- .002	21	14	65	2.44
0.22	0.048 +/- .003	19	25	56	2.37
2.2	0.018 +/- .001*	22	32	45	2.21
22	0.017 +/- .000*	25	52	43	2.18*
DONADOR RM					

*P<0.05

TABLA 16- EFECTO DE LA CASIOPEINA 2 SOBRE EL INDICE MITOTICO
Y LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR EN LINFOCITOS
(LOTE CONTROLADO)

DOSIS (uM)	IM	M1	M2	M3	IR
CONTROL	0.024 +/- .002	20	21	59	2.39
4	0.010 +/- .004*	34	34	32	1.98*
20	0.004 +/- .001*	0	0	0	0
100	0.0005 +/- .001*	0	0	0	0
DONADOR HB					
CONTROL	0.023 +/- .002	8	22	70	2.62
0.8	0.015 +/- .001	8	27.5	64.5	2.60
4	0.011 +/- .003*	12.5	27	60.5	2.48
20	0.004 +/- .001*	27.5	26.5	46	2.18*
DONADOR GE					

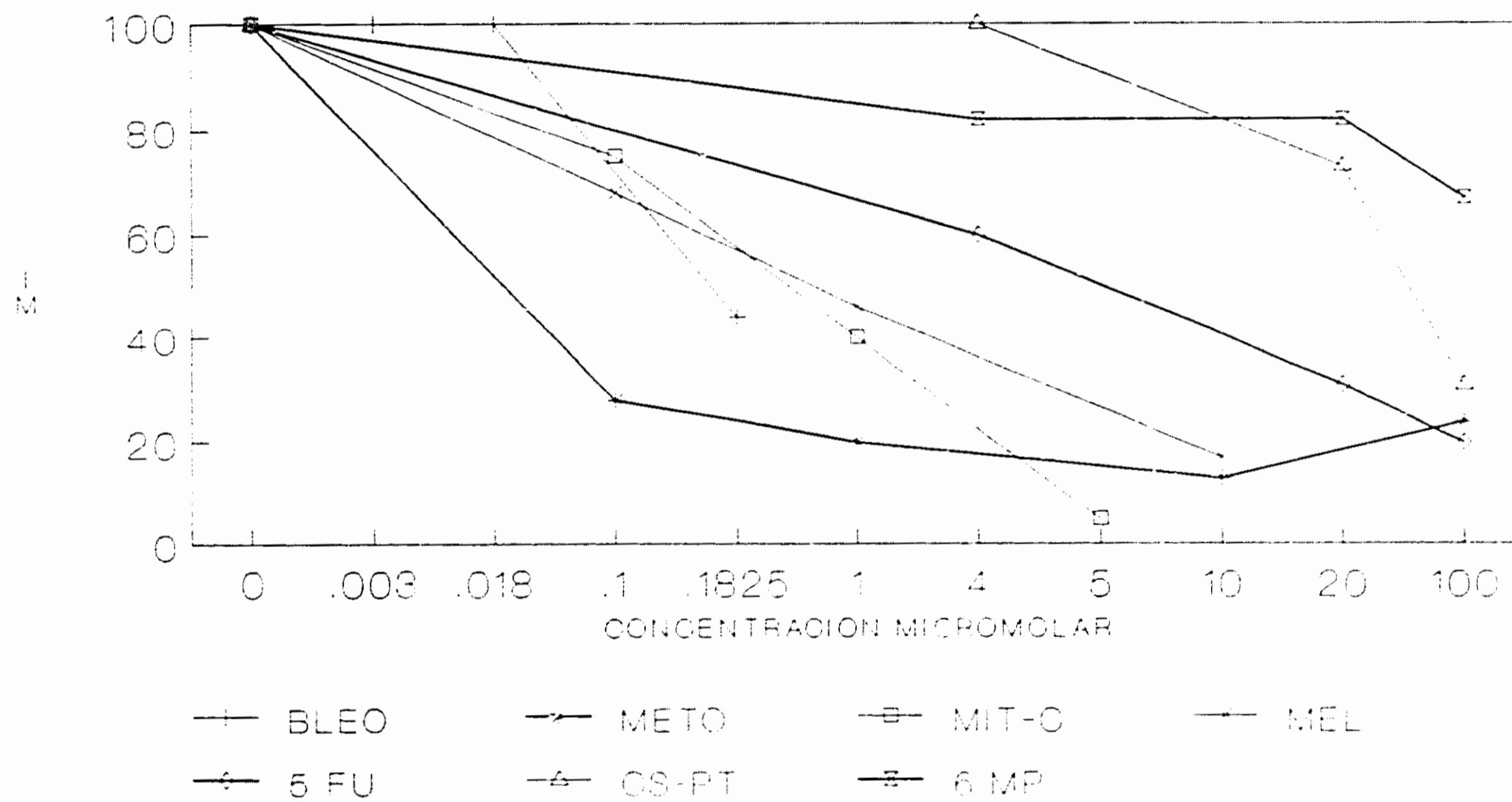
* P<0.05

TABLA 17.- EFECTO DE LA IGM1 SOBRE EL INDICE MITOTICO Y
LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR EN LINFOCITOS

DOSIS (uM)	IM	M1	M2	M3	IR
CONTROL	0.046+/- .0003	7	27	66	2.59
4	0.038+/- .008	10.5	21	68.5	2.58
20	0.048+/- .005	11	27.5	61.5	2.50
100	0.045+/- .006	10	23	67	2.57
DONADOR VB					
CONTROL	0.035+/- .0003	9	31	60	2.51
4	0.032+/- .0020	10	28	62	2.52
20	0.033+/- .0040	8	32	60	2.50
100	0.036+/- .0010	14	30	56	2.42
DONADOR ER					

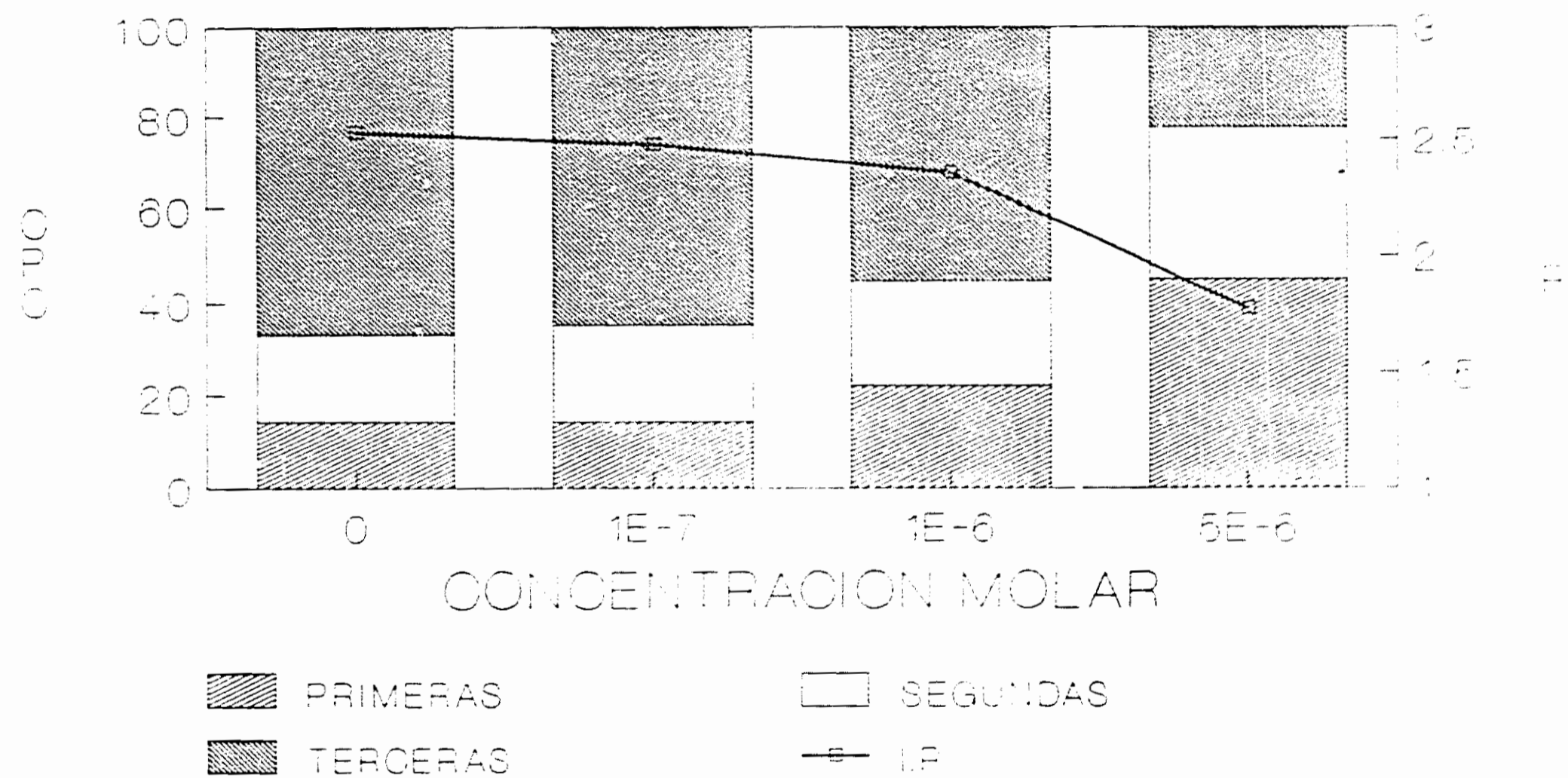
GRAFICAS

GRAFICA 1. EFECTO DE LOS DIFERENTES ANTINEOPLASICOS SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO.



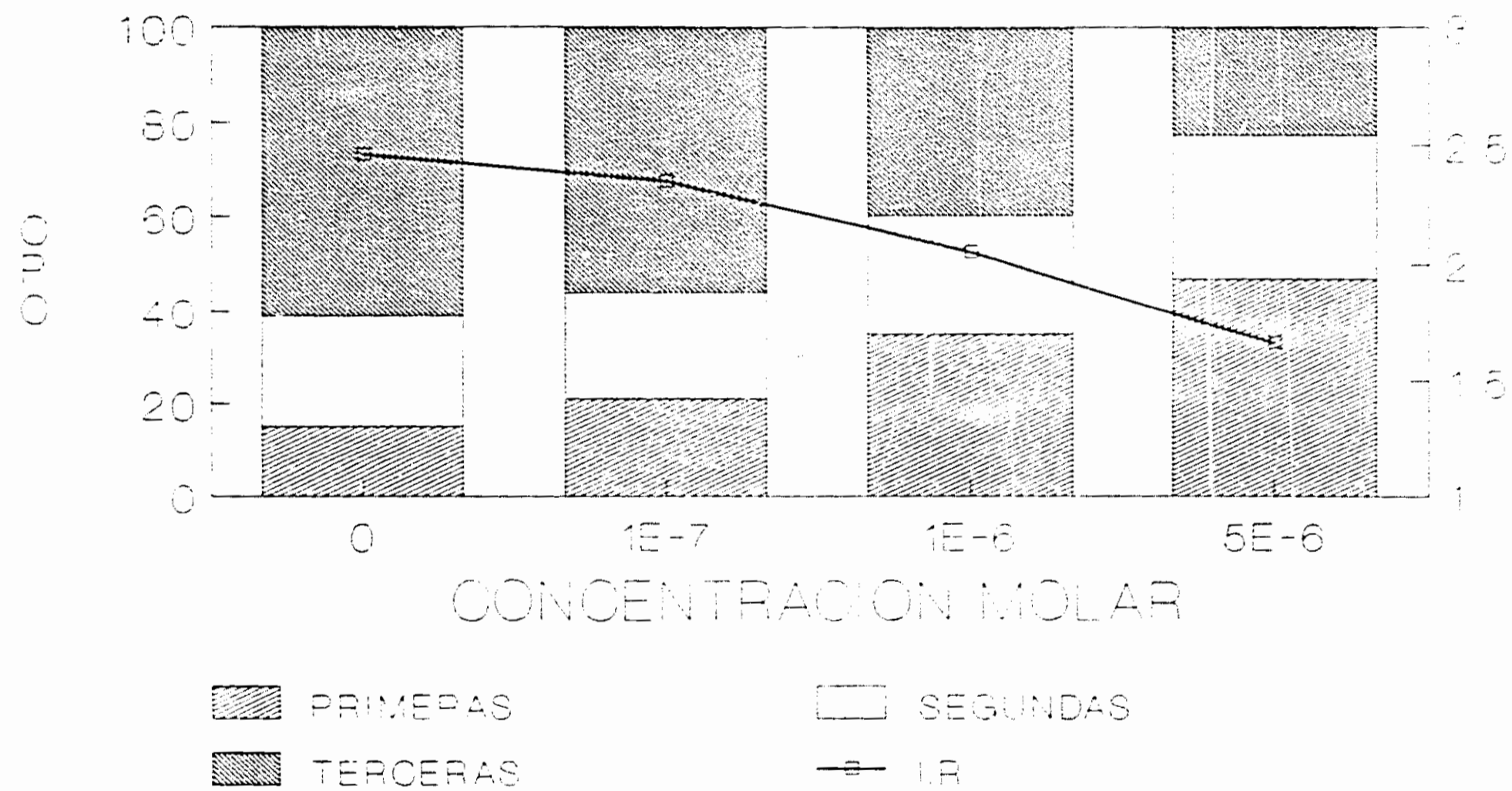
+CONTROL TOMADO COMO 100%

GRAFICA 2. EFECTO DE LA MITOMICINA-C SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR*



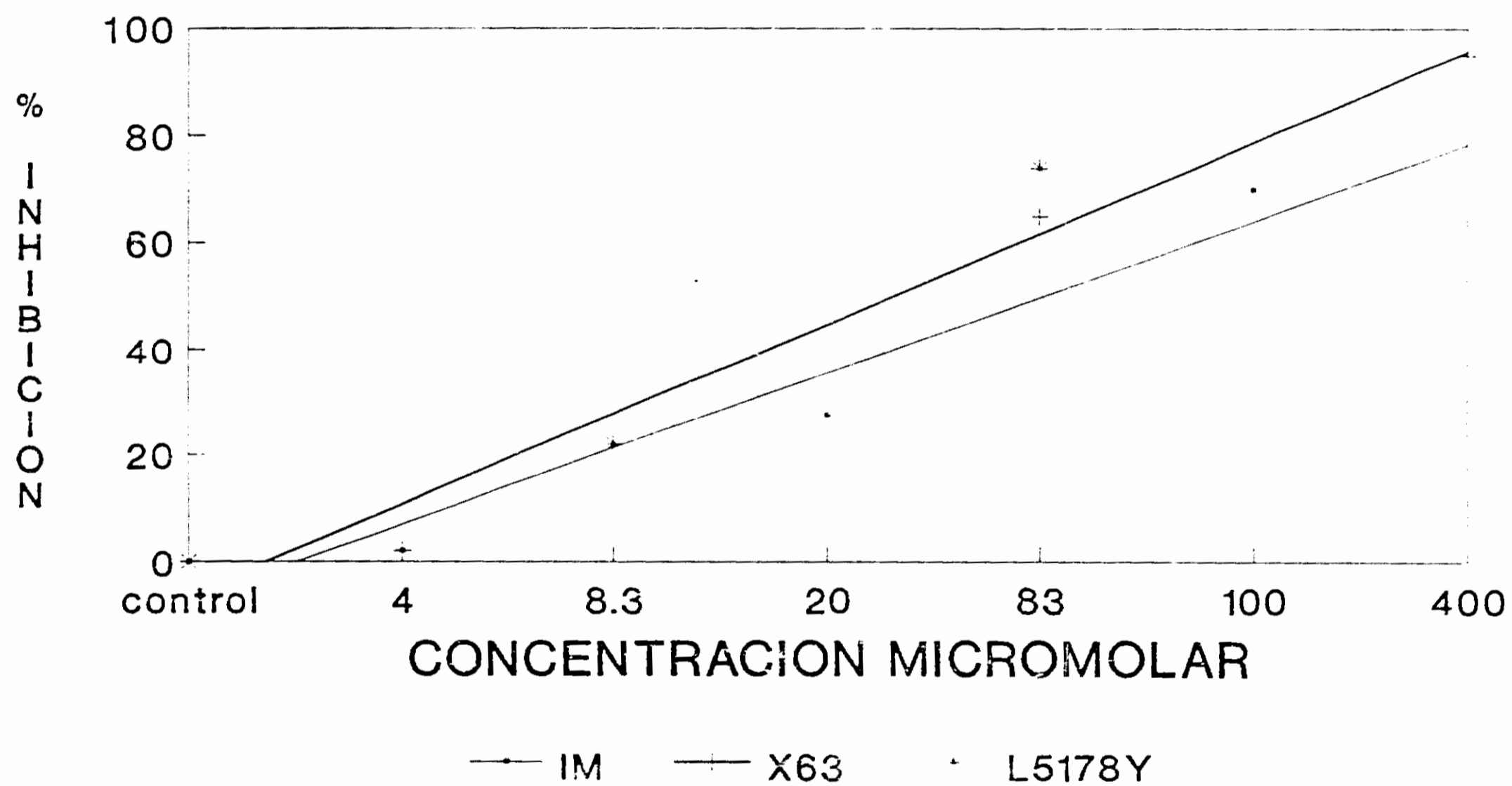
*PROMEDIO DE 4 EXPERIMENTOS
DOS DONADORES

GRAFICA 3. EFECTO DE LA MITOMICINA-C SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR *

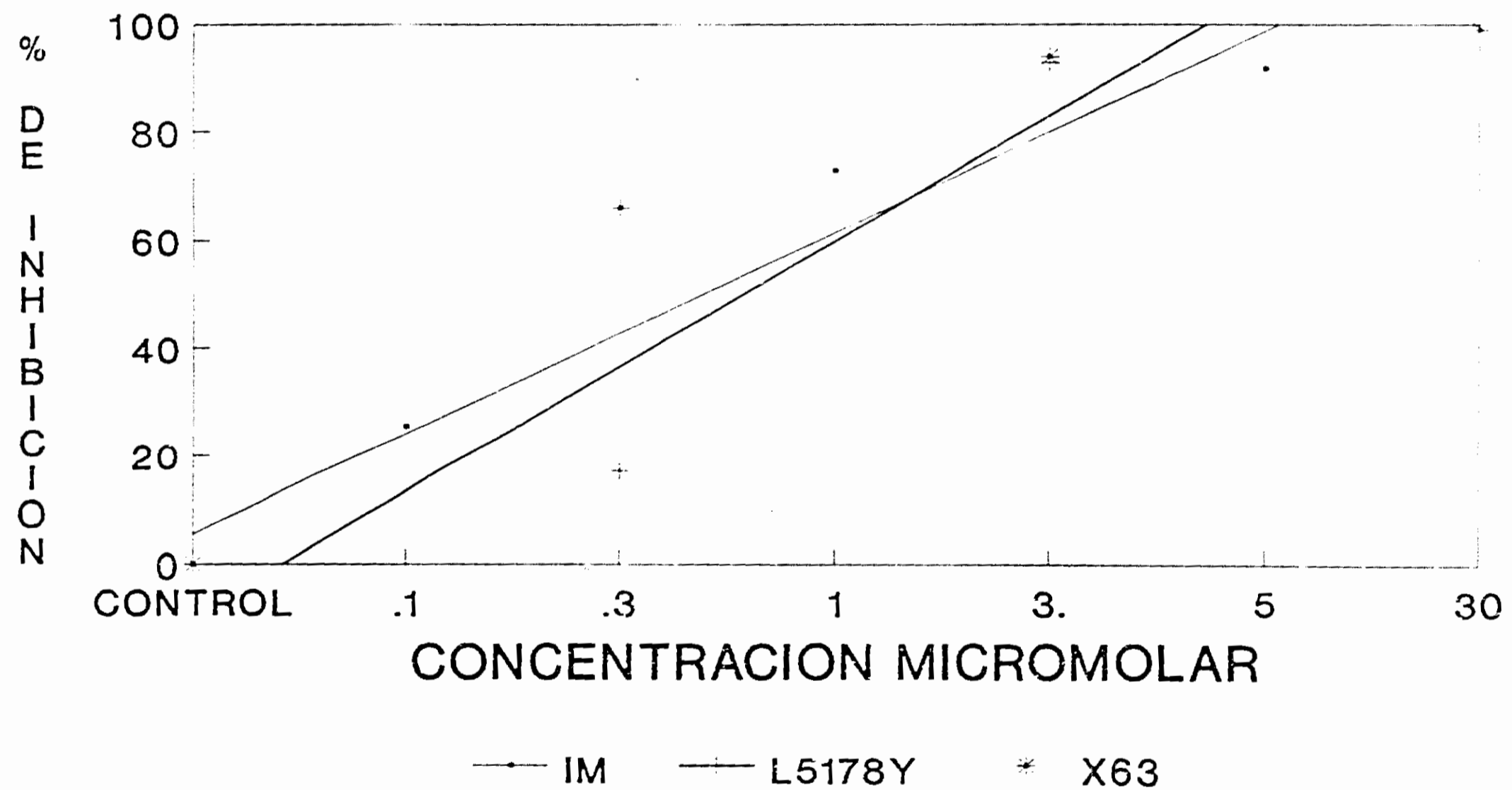


*PROMEDIO DE 5 DONADORES
UN EXPERIMENTO

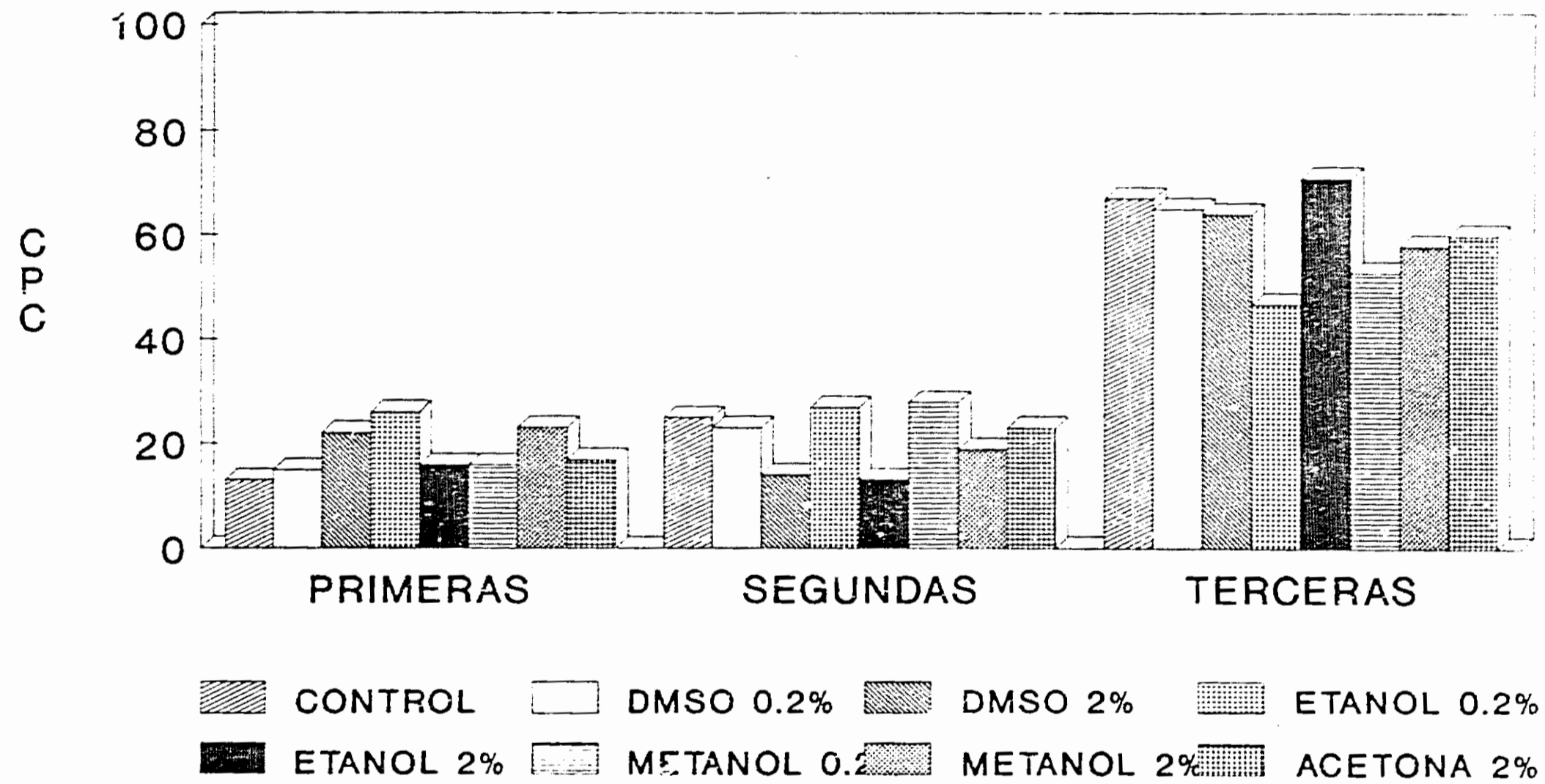
GRAFICA 4 COMPARACION DEL EFECTO DE
CIS-PLATINO SOBRE LA INHIBICION DEL IM
LA PROLIFERACION EN L5178 Y X63



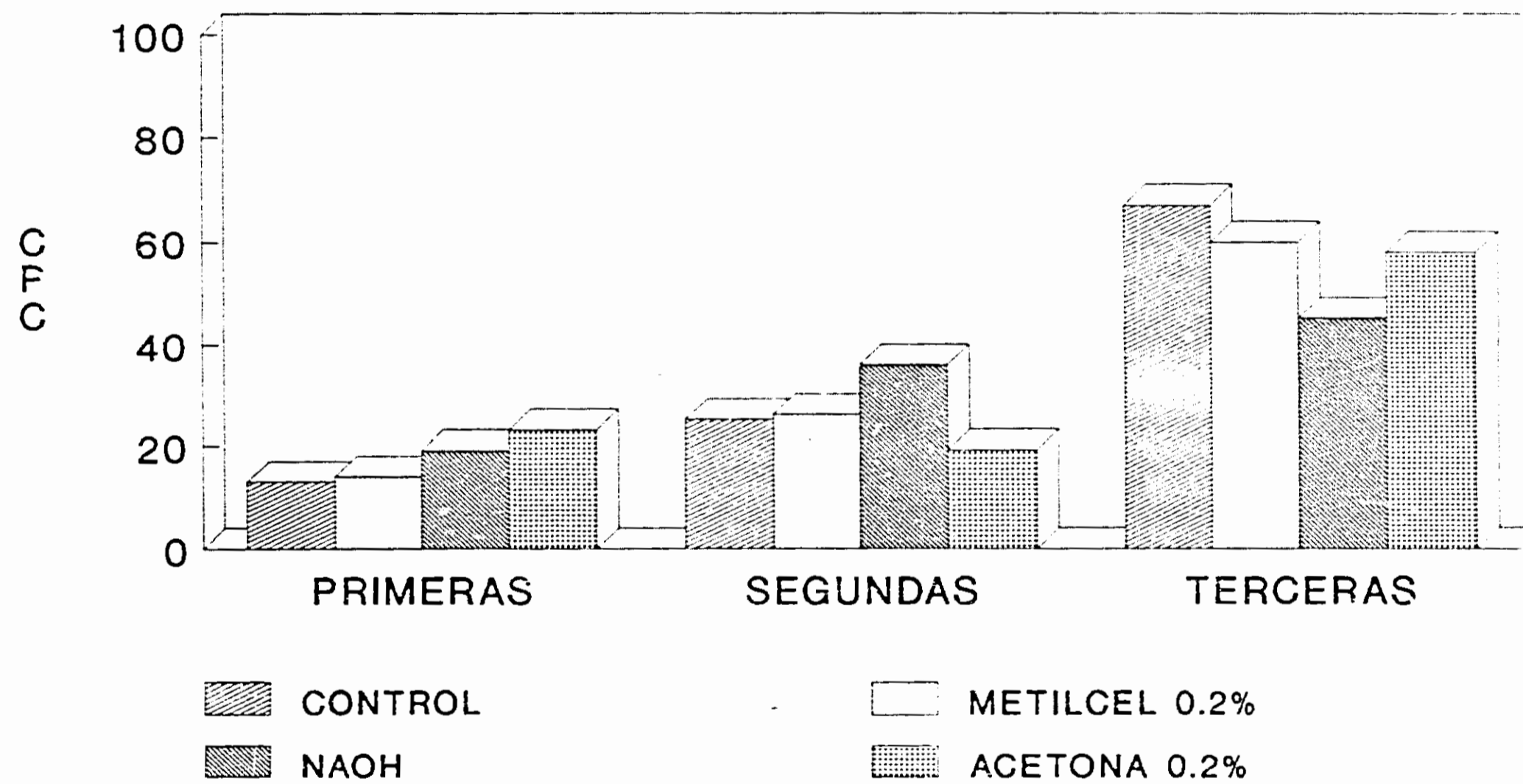
GRAFICA 5 EFECTO DE LA MITOMICINA-C
SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO
Y LA PROLIFERACION EN L5178Y Y X63



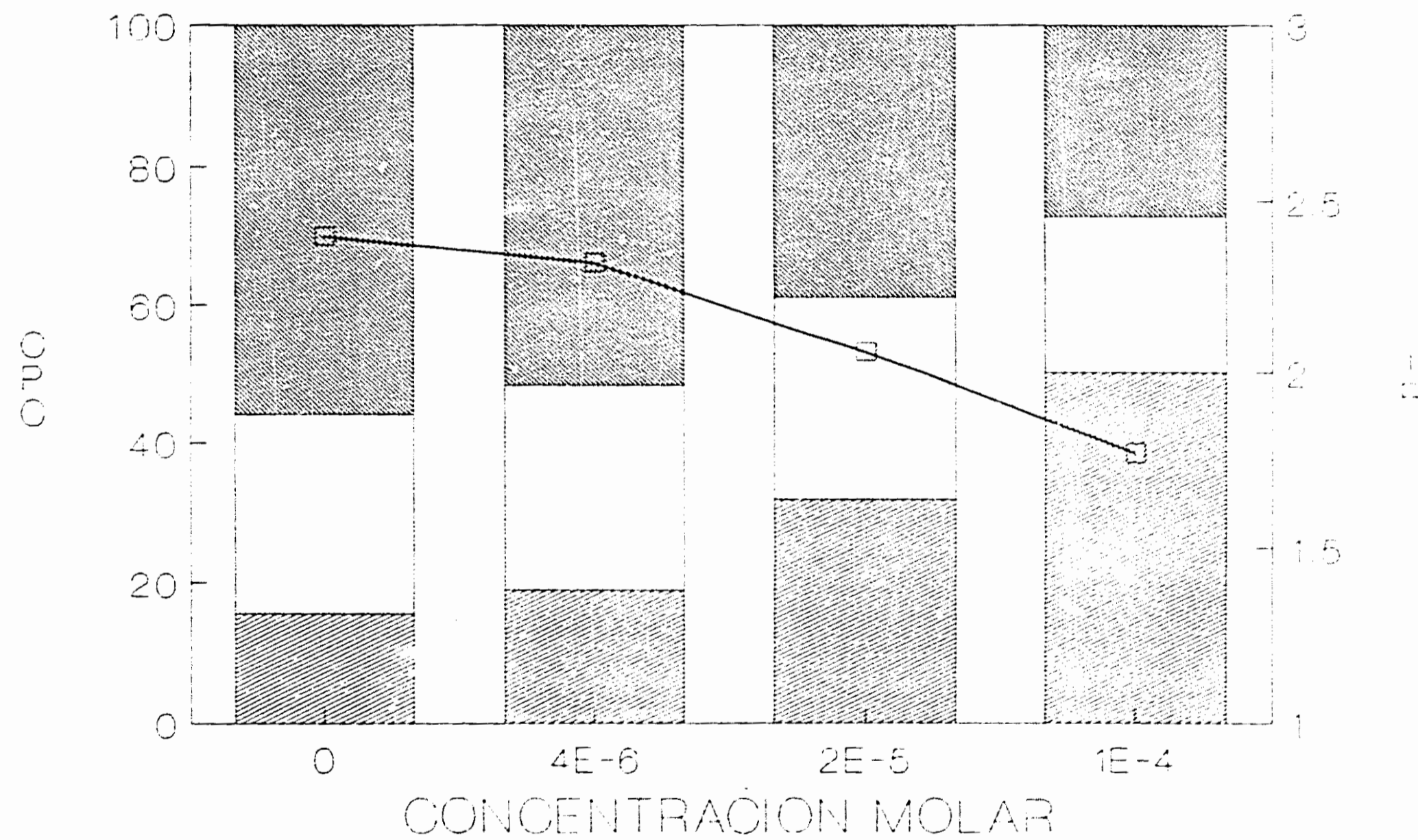
GRAFICA 6 EFECTO DE DIFERENTES VEHICULOS SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR



GRAFICA 7 EFECTO DE DIFERENTES VEHICULOS SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR

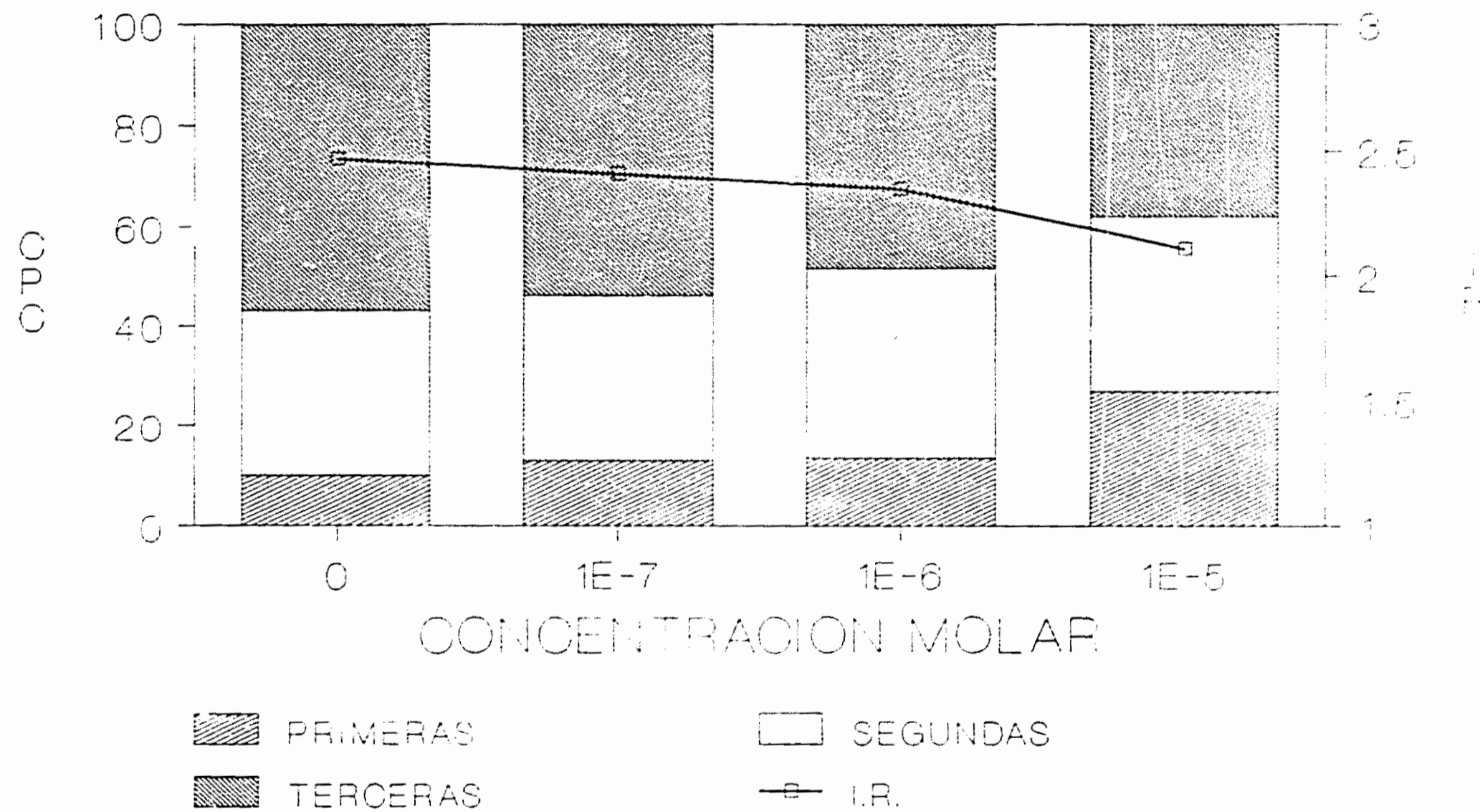


GRAFICA 8 EFECTO DEL CISPLATINO SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR+



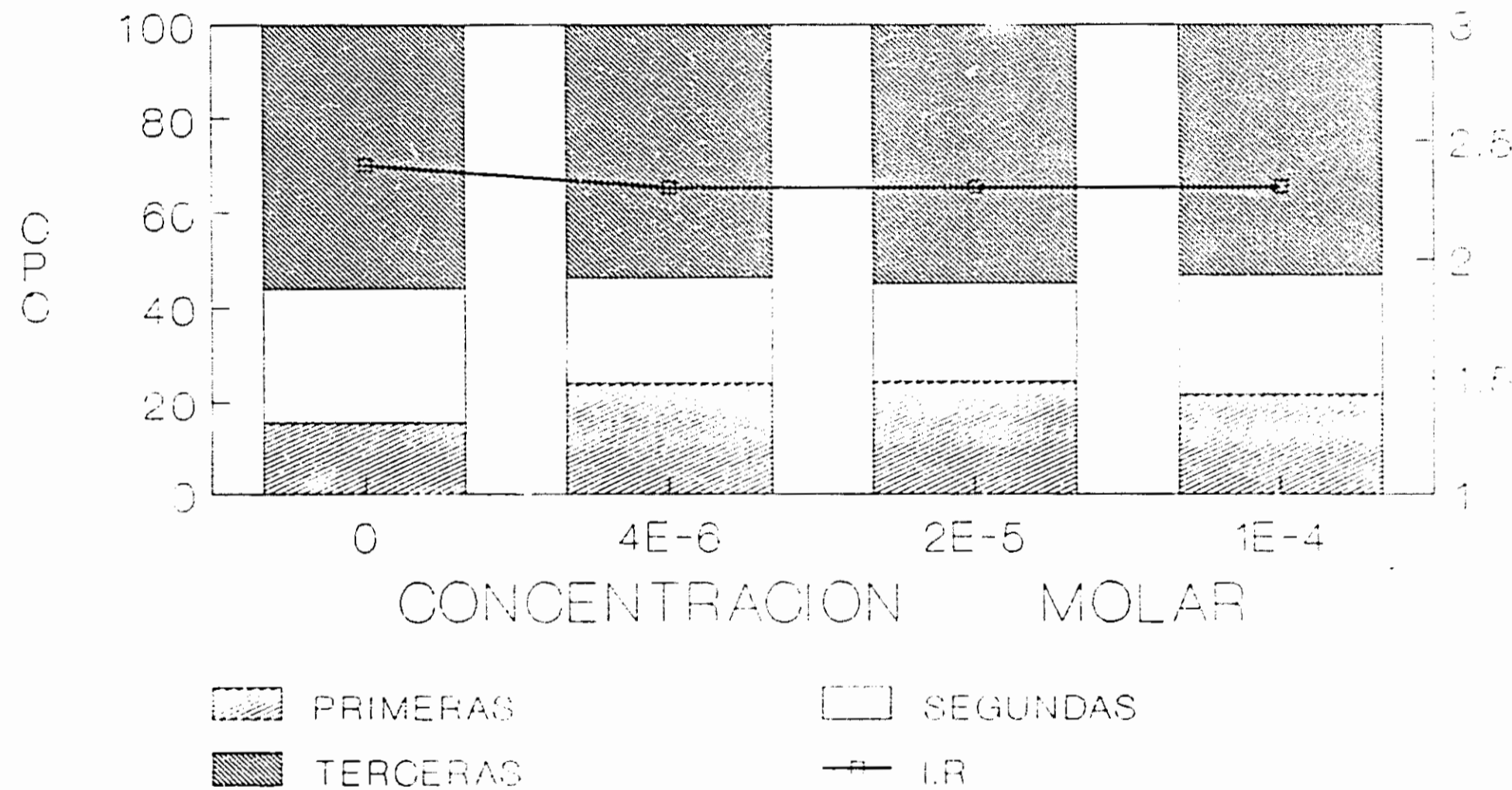
+PROMEDIO DE DOS EXPERIMENTOS
DOS DONADORES

GRAFICA 9 EFECTO DEL MELFALAN SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR+



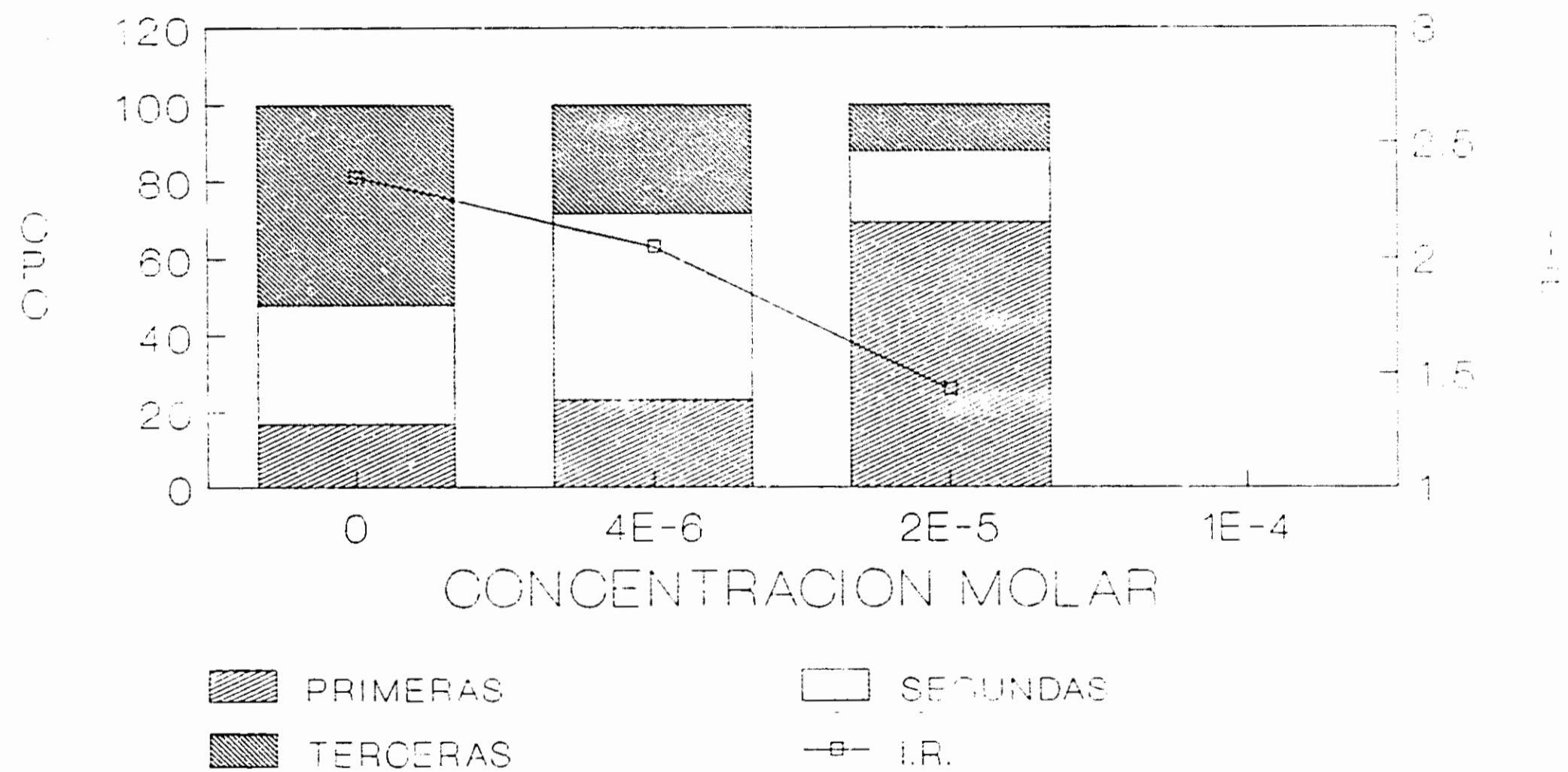
+PROMEDIO DE DOS EXPERIMENTOS
DOS DONADORES

GRAFICA 11 EFECTO DE LA 6-MERCAPTOPURINA SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR+



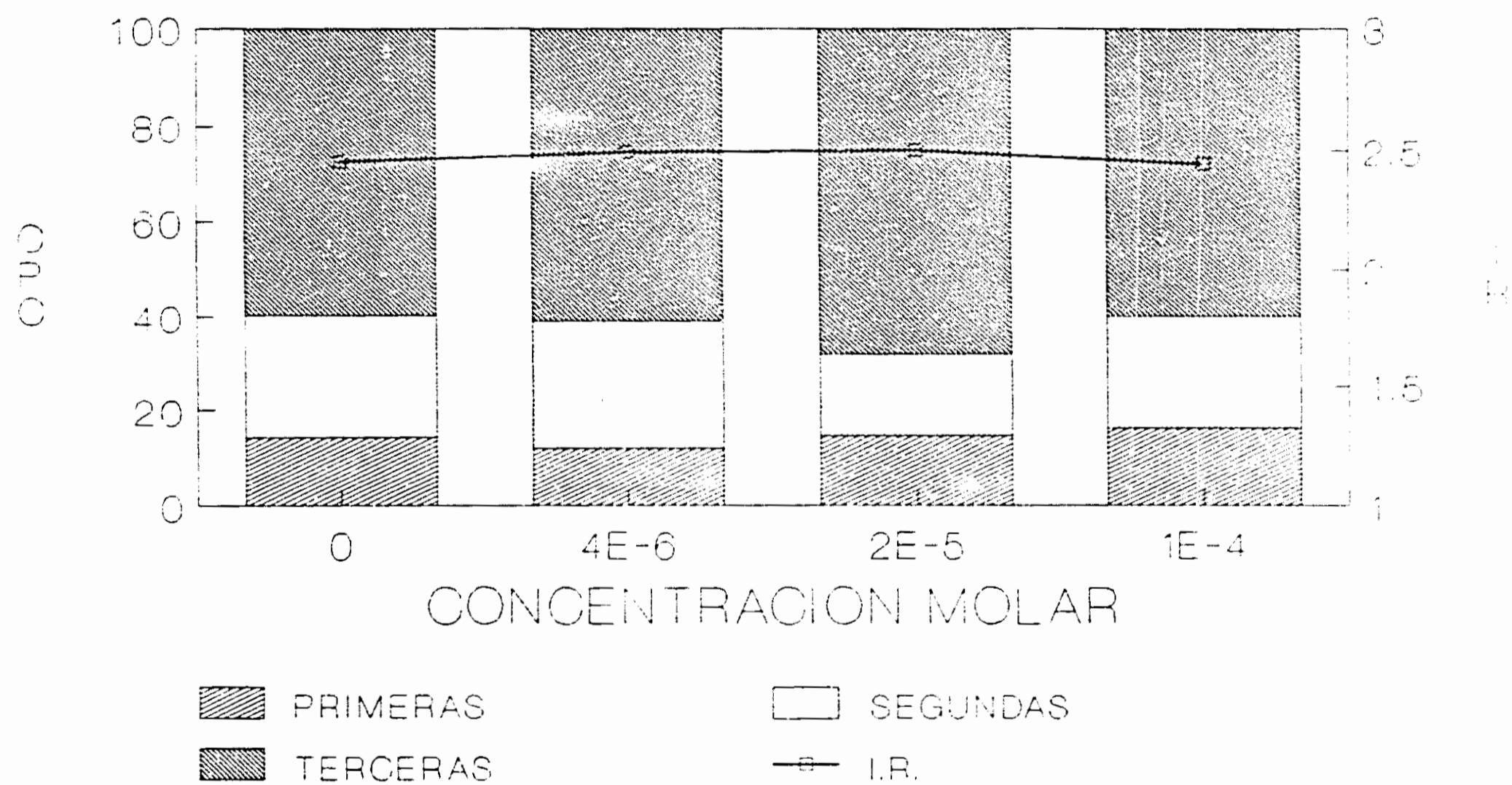
+PROMEDIO DE DOS EXPERIMENTOS
DOS DONADORES

GRAFICA 12 EFECTO DEL 5 FLOUROURACILO SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR+



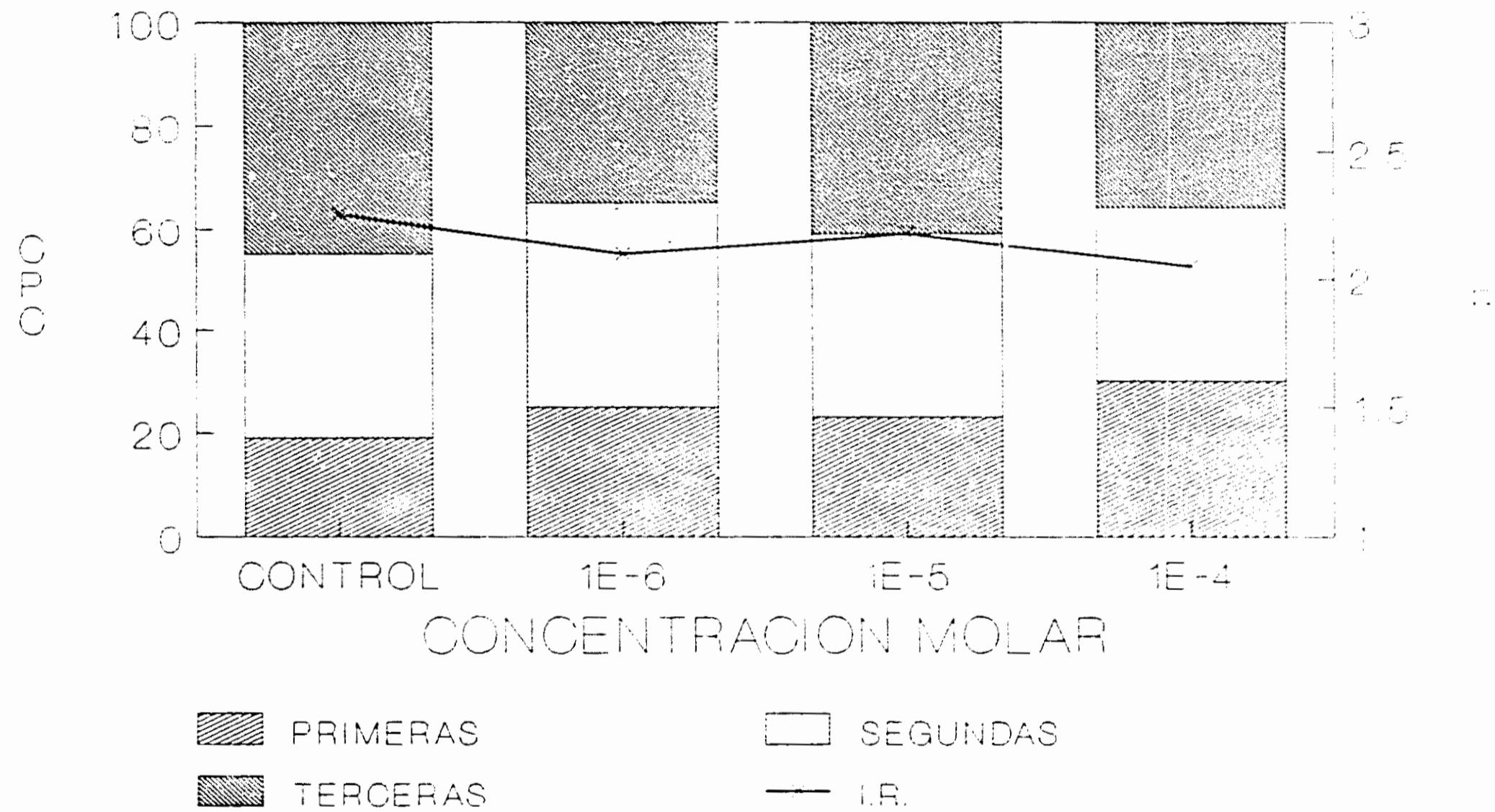
+PROMEDIO DOS EXPERIMENTOS
UN DONADOR (HBA)

GRAFICA 13 EFECTO DEL 5 FLOUROURACILO SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR+



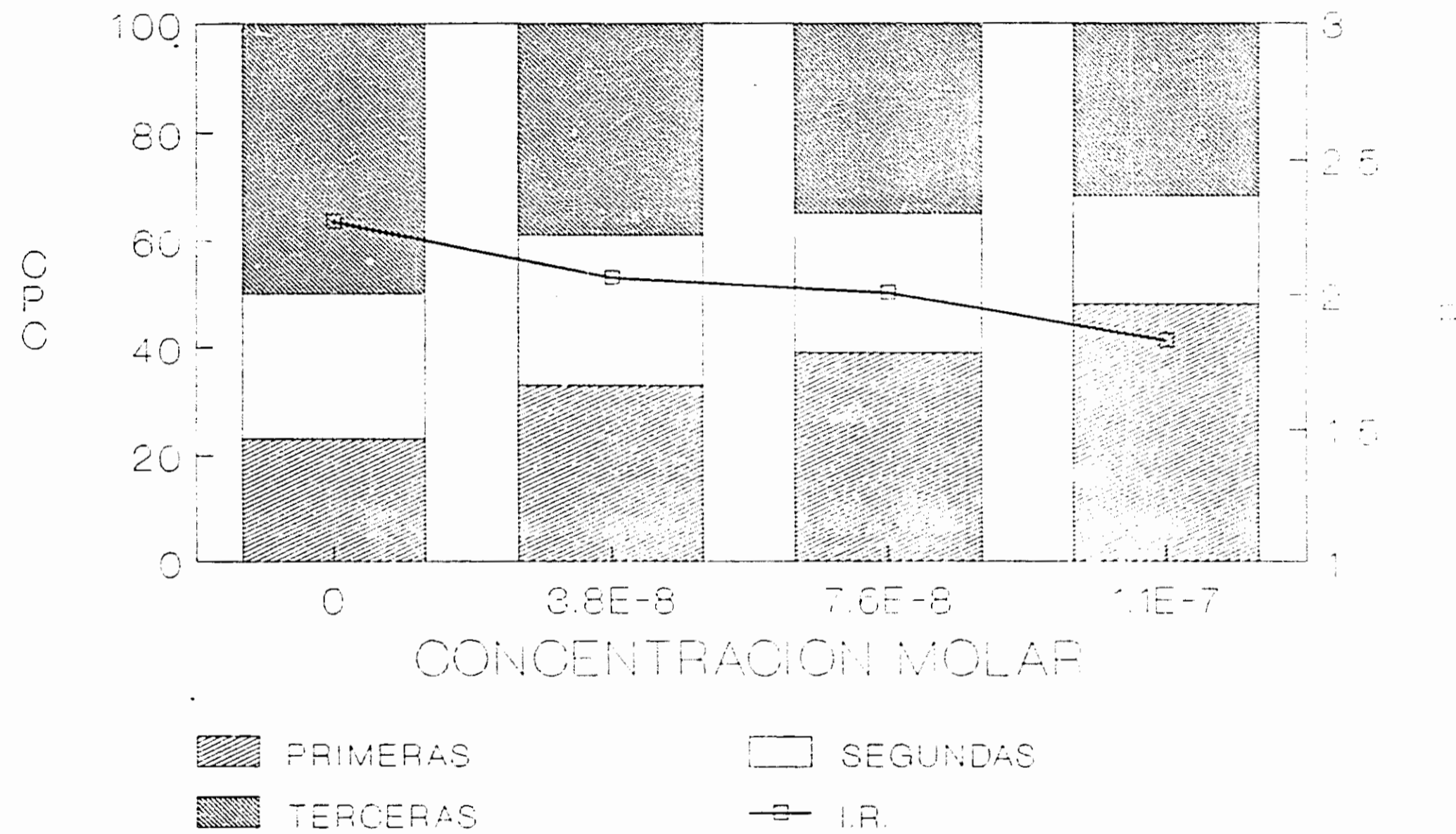
+PROMEDIO DOS EXPERIMENTOS

GRAFICA 14 EFECTO DEL METROTREXATE SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR+



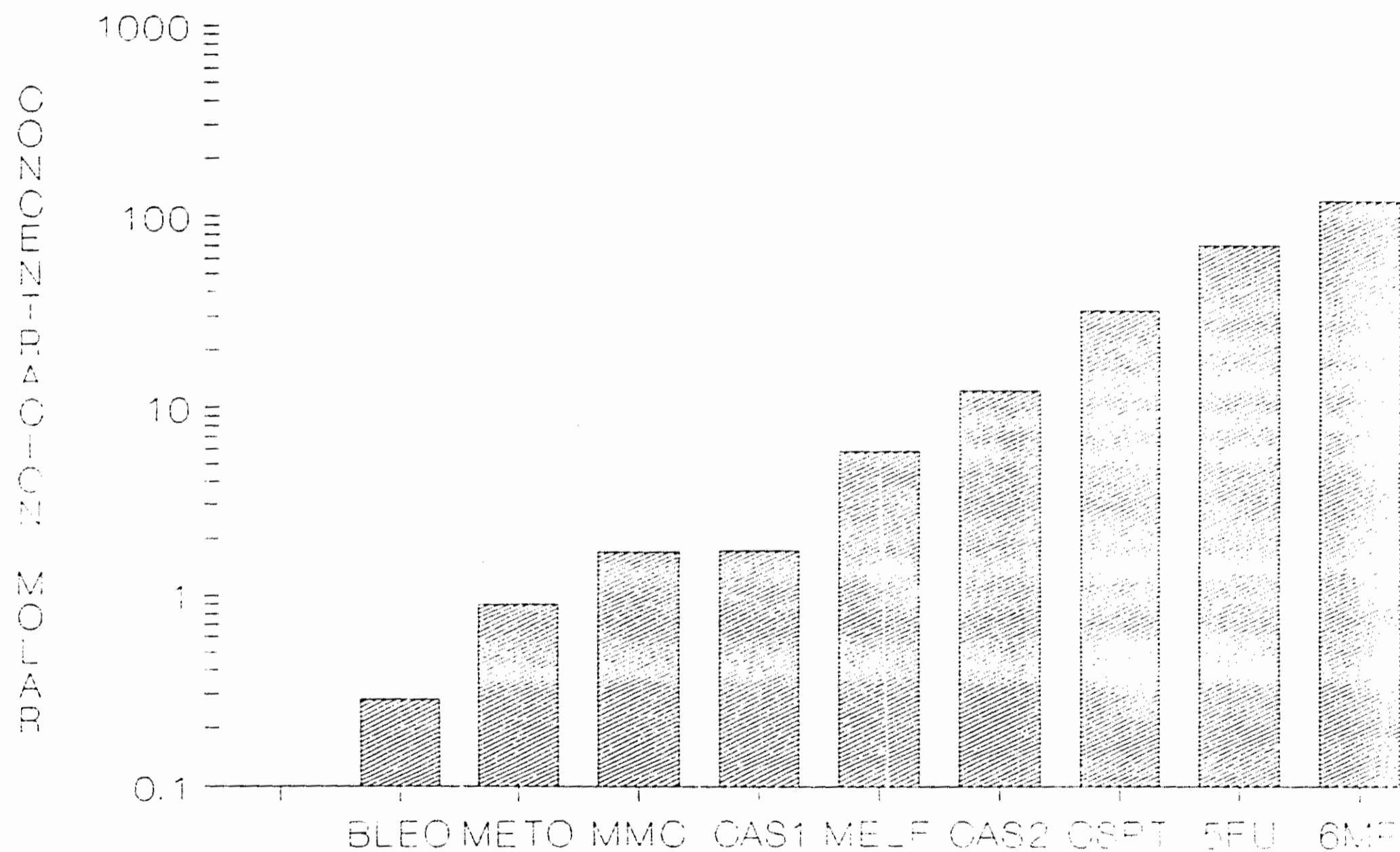
+DOS EXPERIMENTOS,
DOS DONADORES

GRAFICA 15 EFECTO DE LA COLCEMIDA SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR +

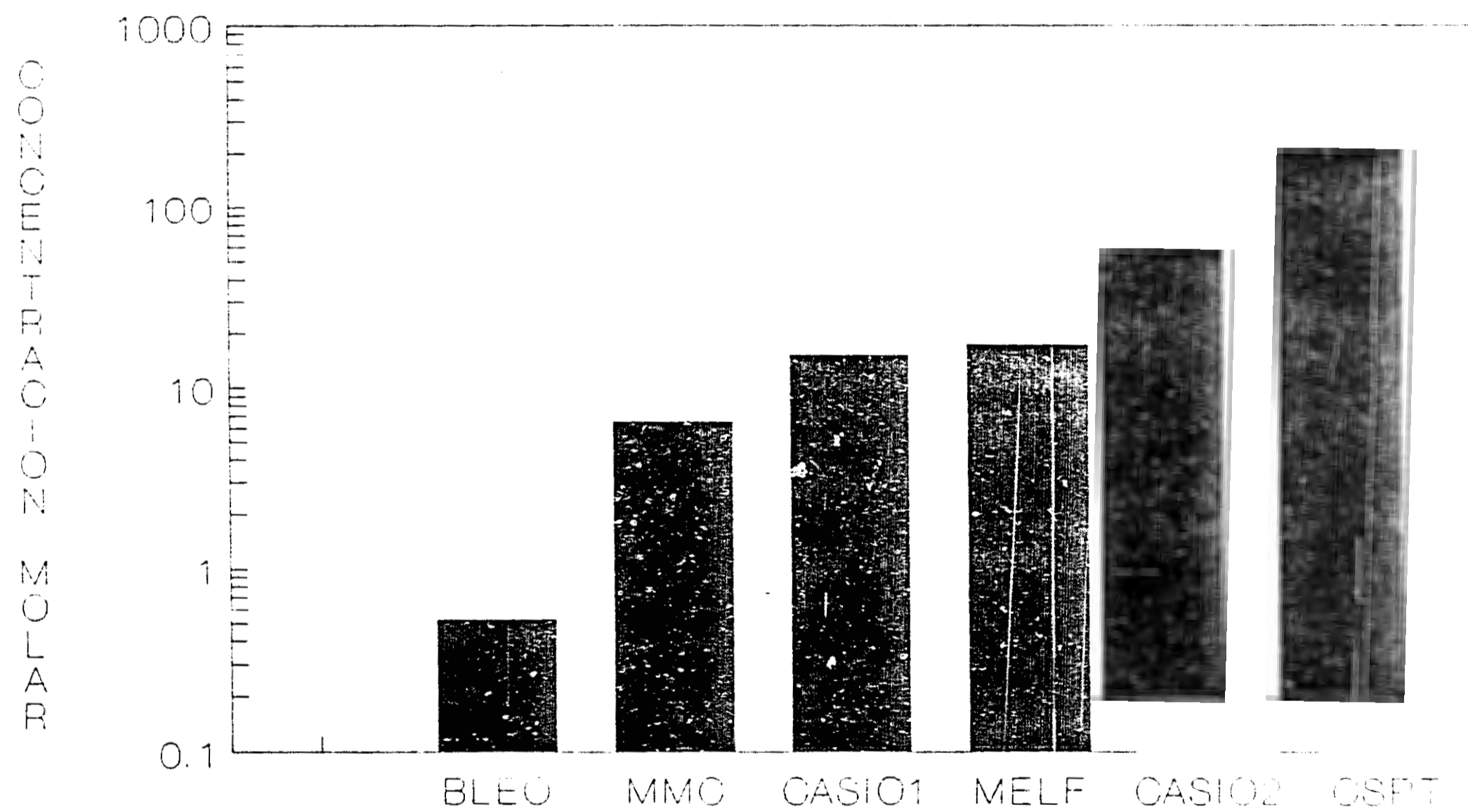


+PROMEDIO DE DOS DONADORES

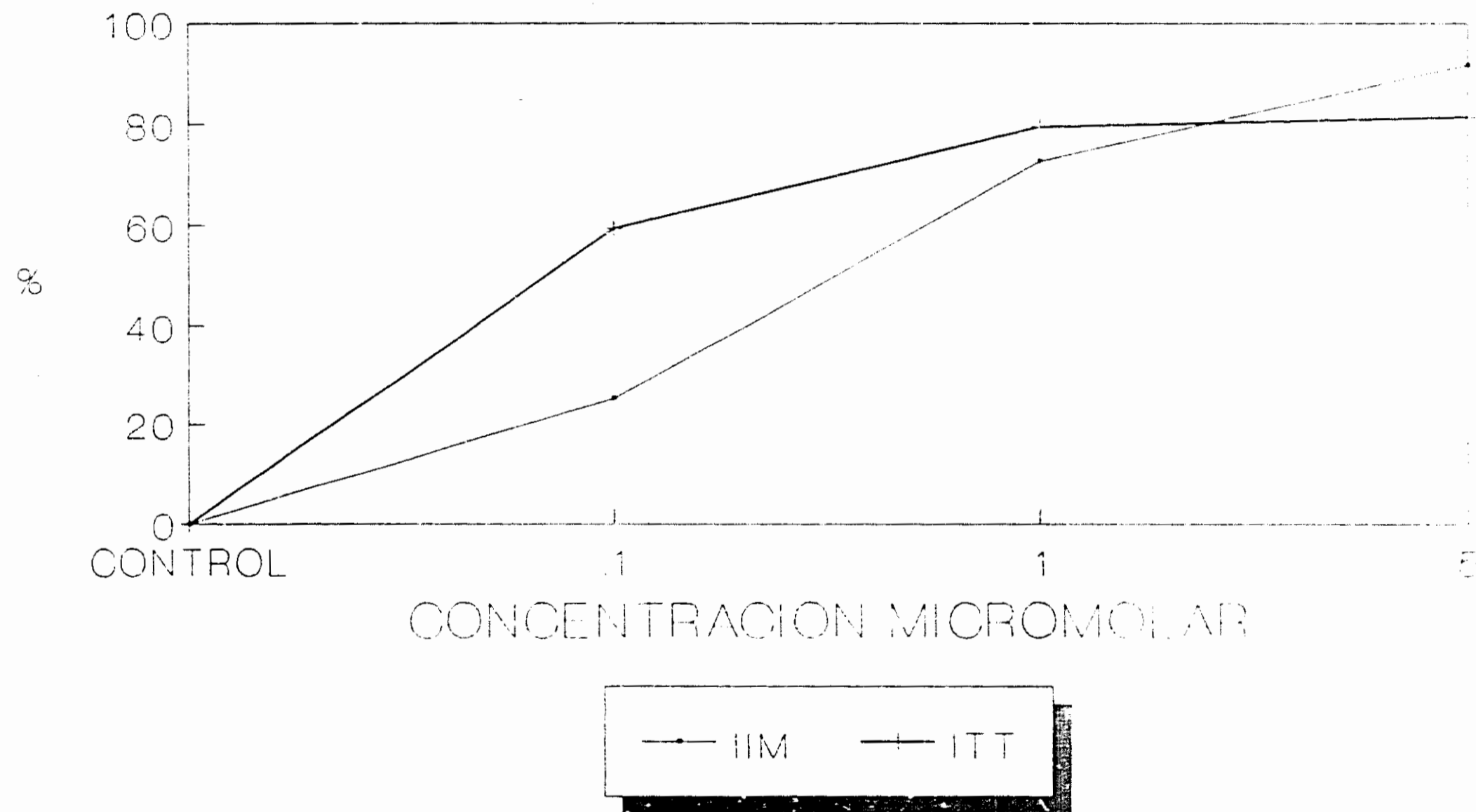
GRAFICA 16 INHIBICION DEL 50% DEL INDICE MITOTICO POR DIFERENTES SUSTANCIAS



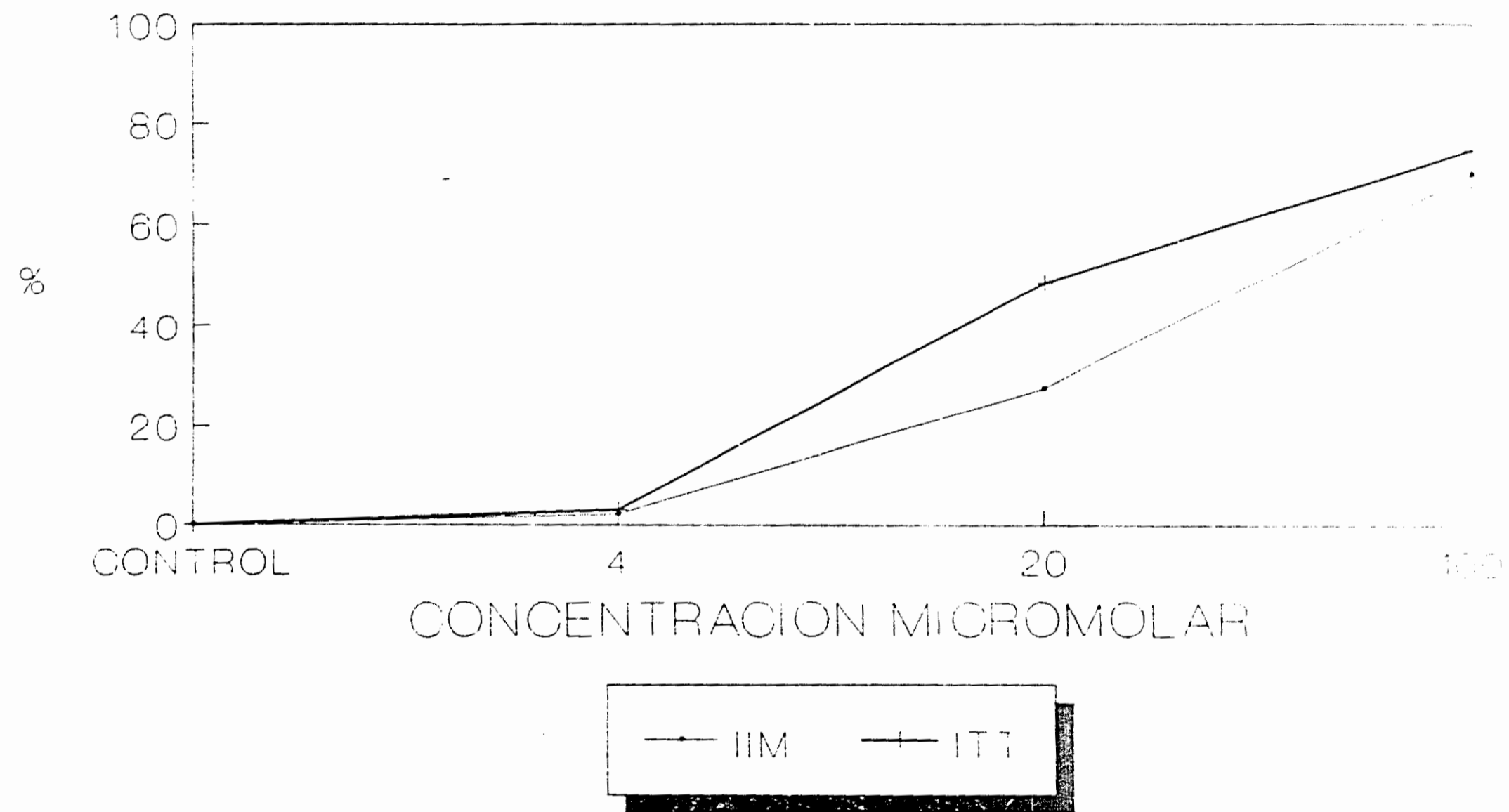
GRAFICA 17 INHIBICION DEL 50% DEL INDICE DE REPLICACION POR DIFERENTES SUSTANCIAS



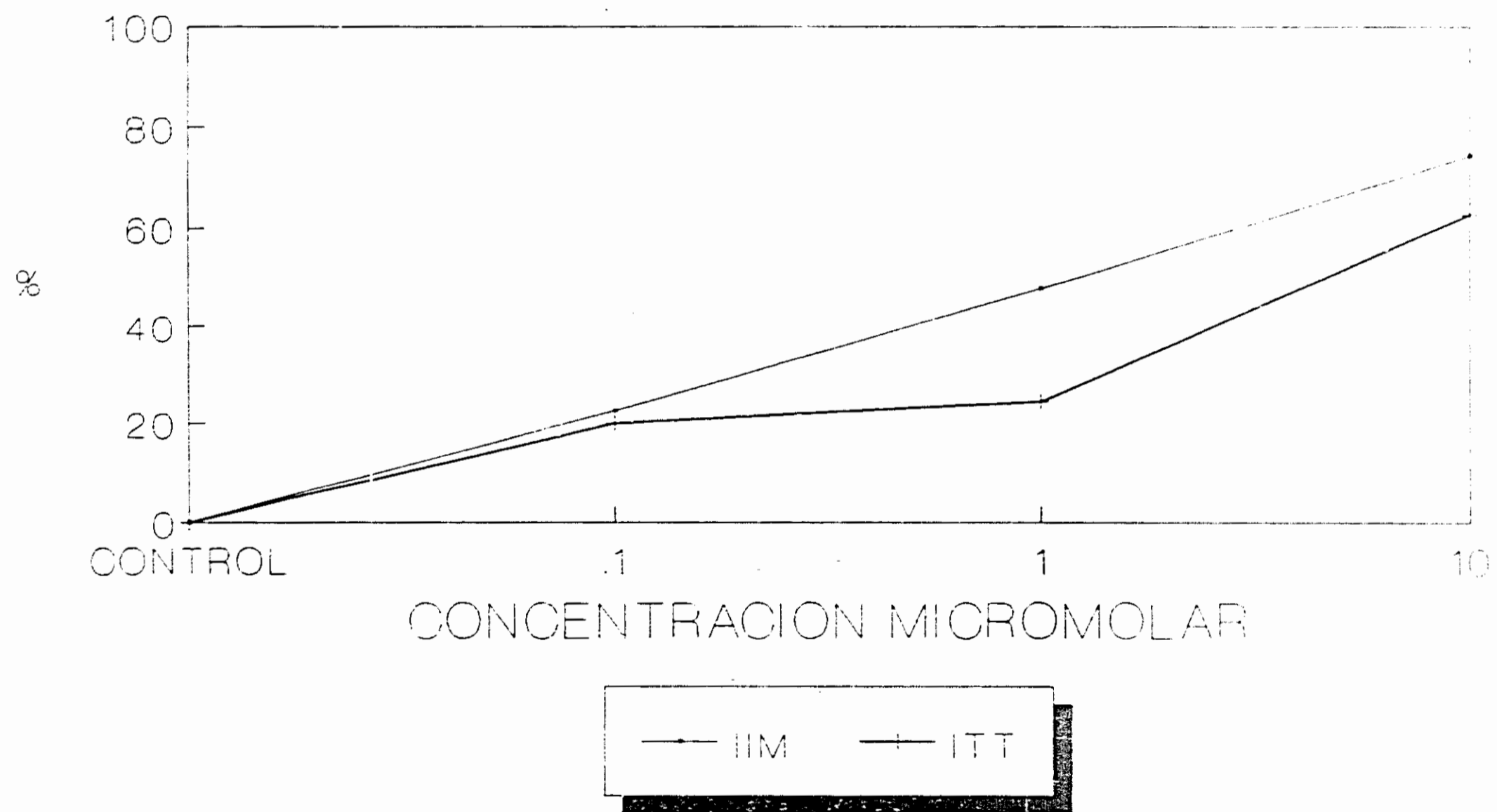
GRAFICA 18 ACCION DE LA MITOMICINA-C SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO Y LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA



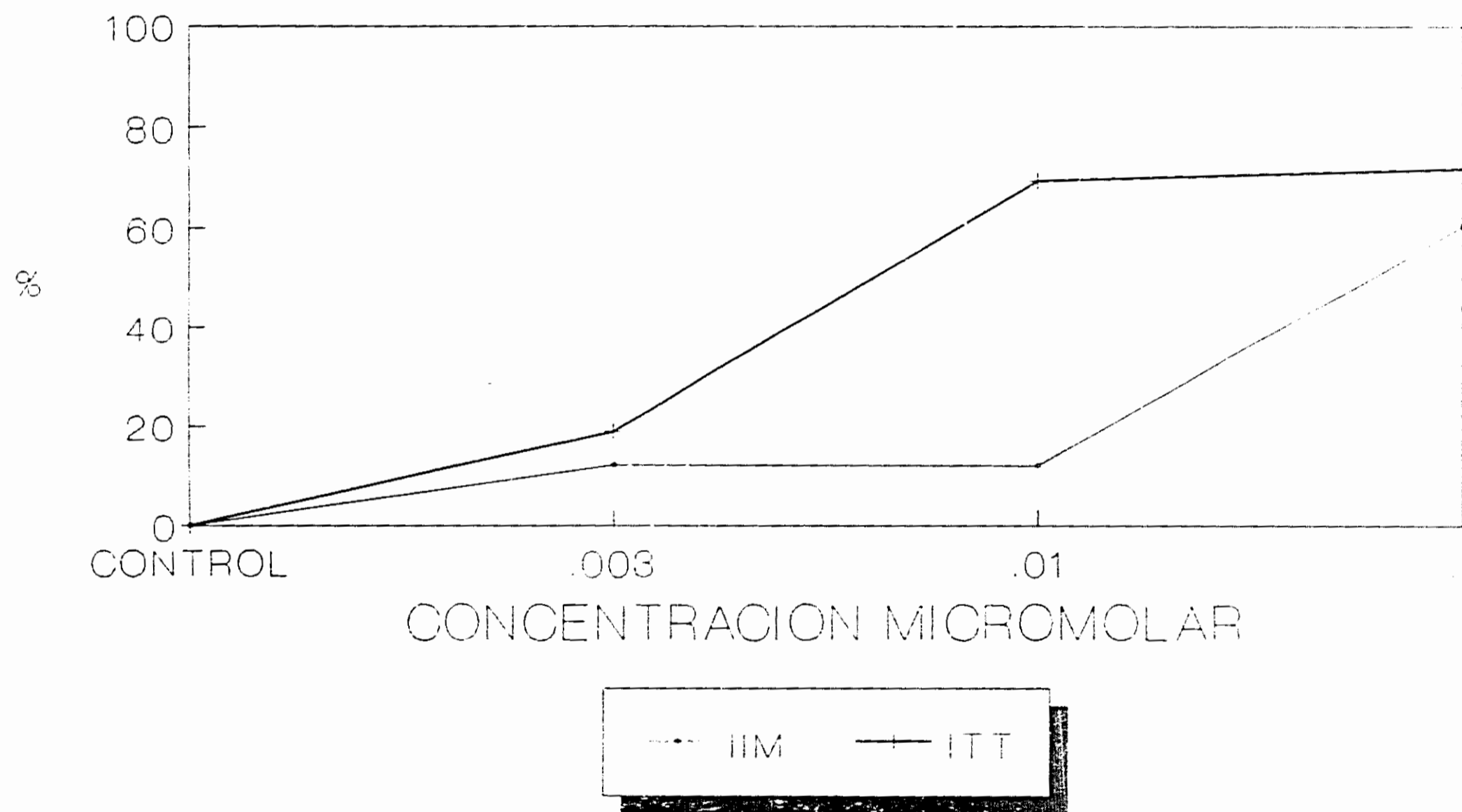
GRAFICA 19 ACCION DEL CIS-PLATINO SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO Y LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA



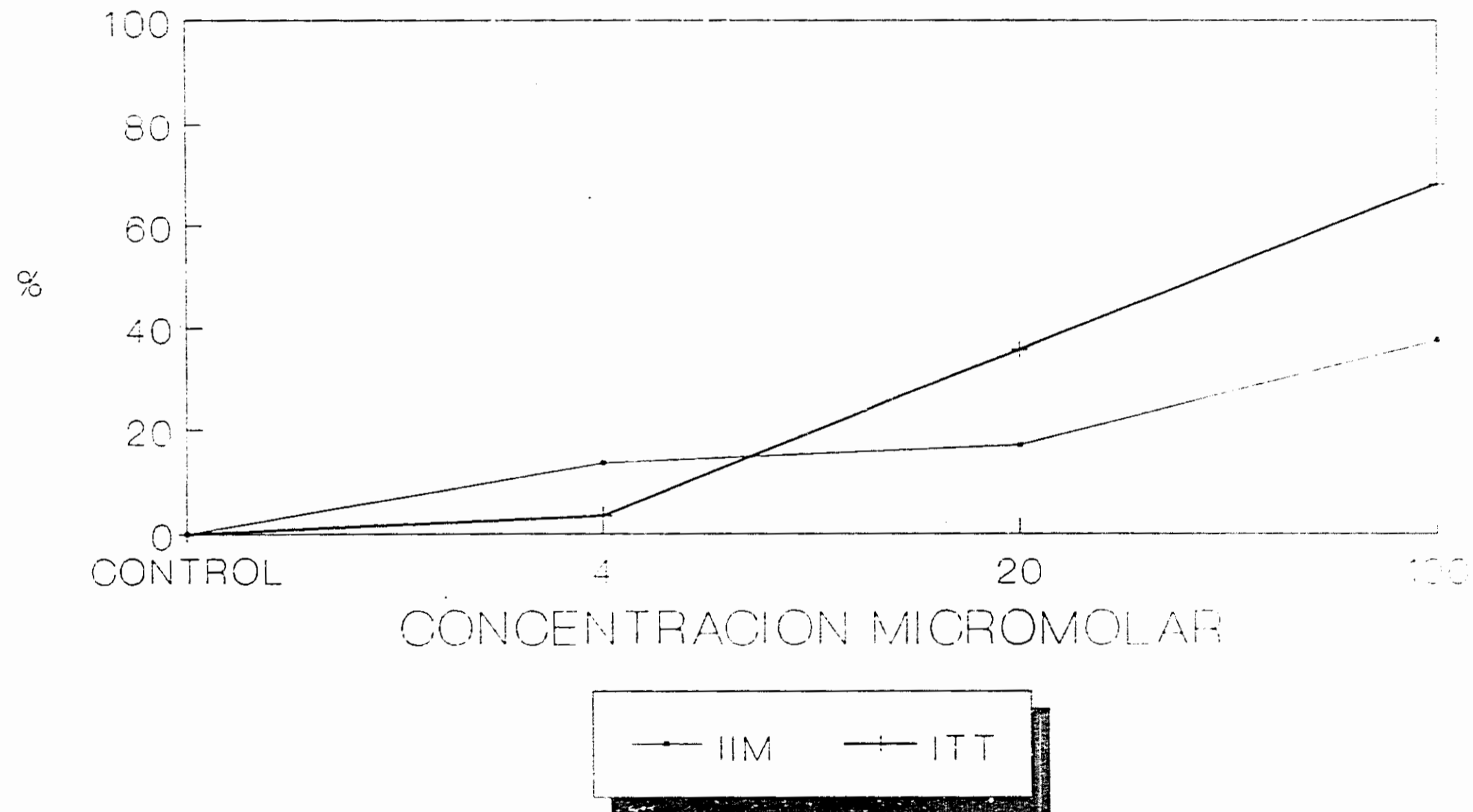
GRAFICA 20 ACCION DEL MELFALAN SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO Y DE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA.



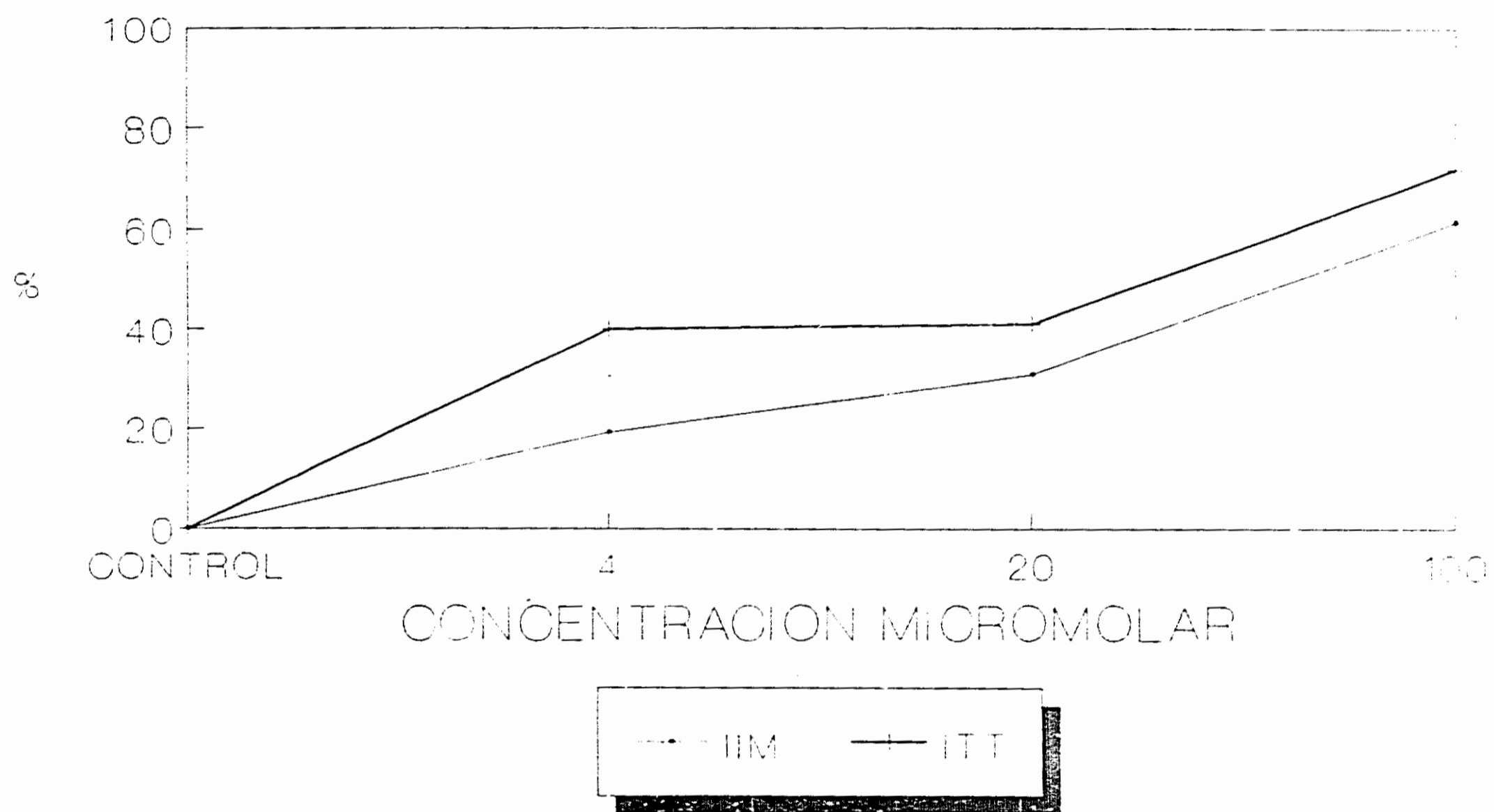
GRAFICA 21 ACCION DE BLEOMICINA SOBRE
LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO Y DE
LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA.



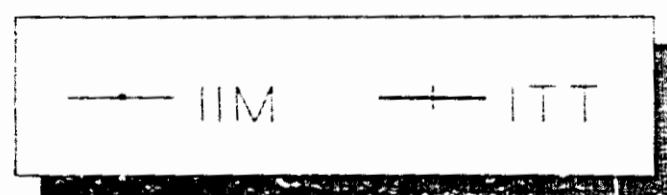
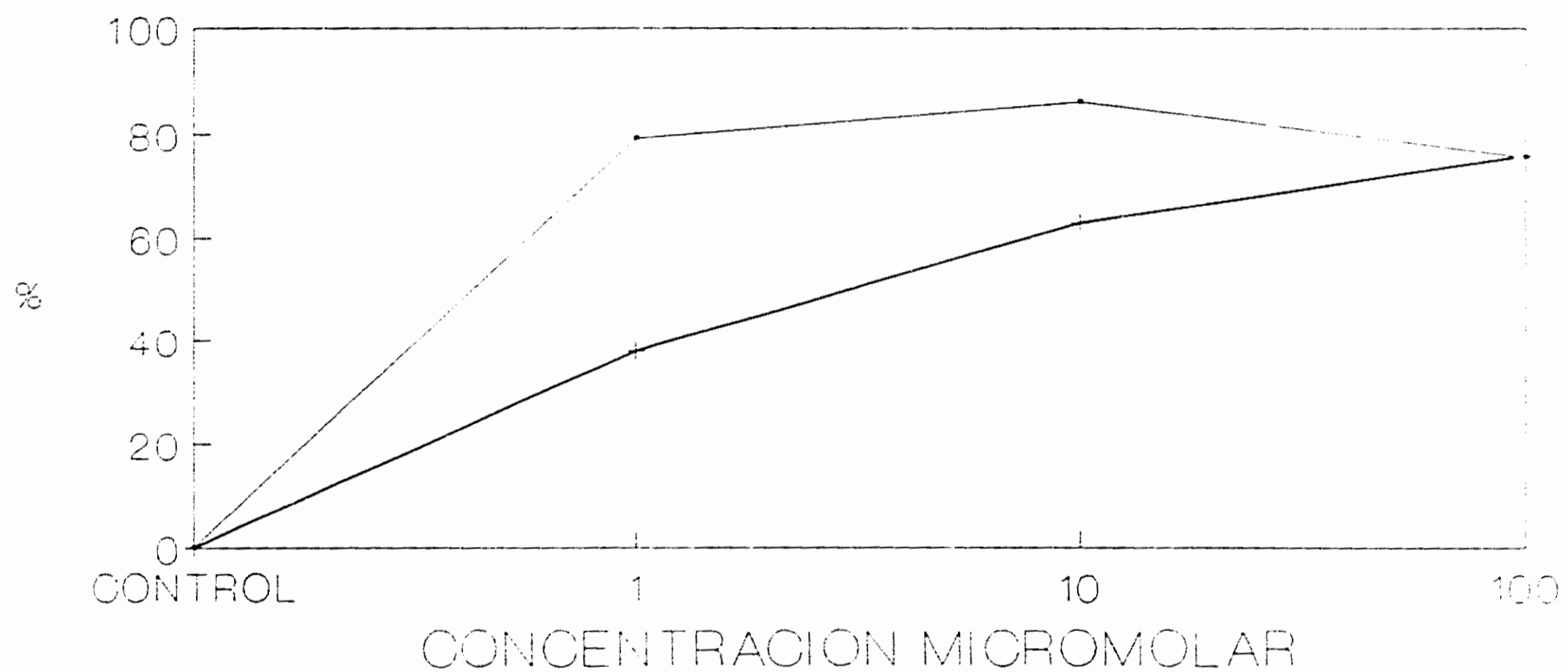
GRAFICA 22 ACCION DE LA 6MERCAPTOPURINA
SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO
Y LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA.



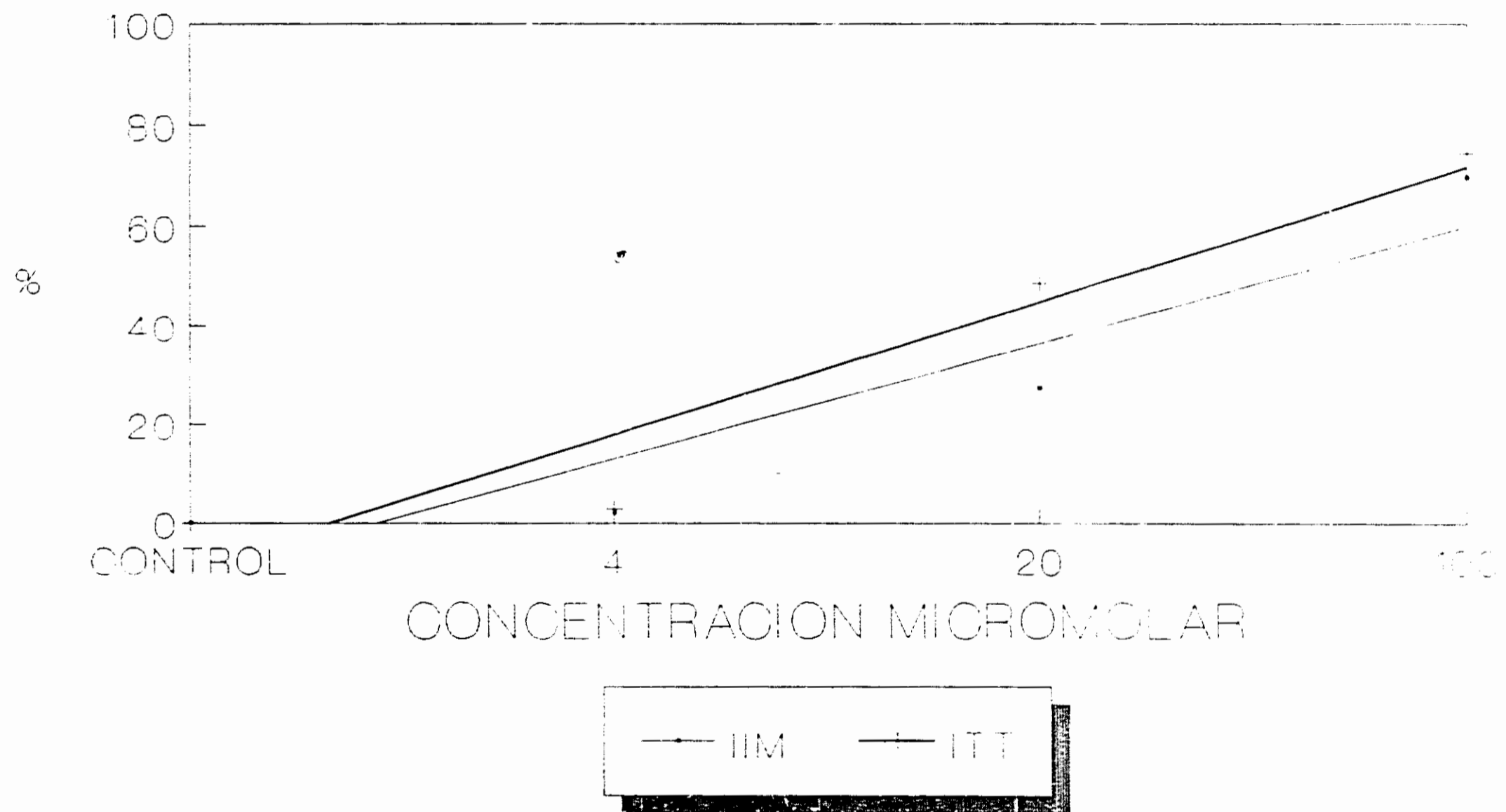
GRAFICA 23 ACCION DEL 5 FLUORURACILO SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO Y LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA



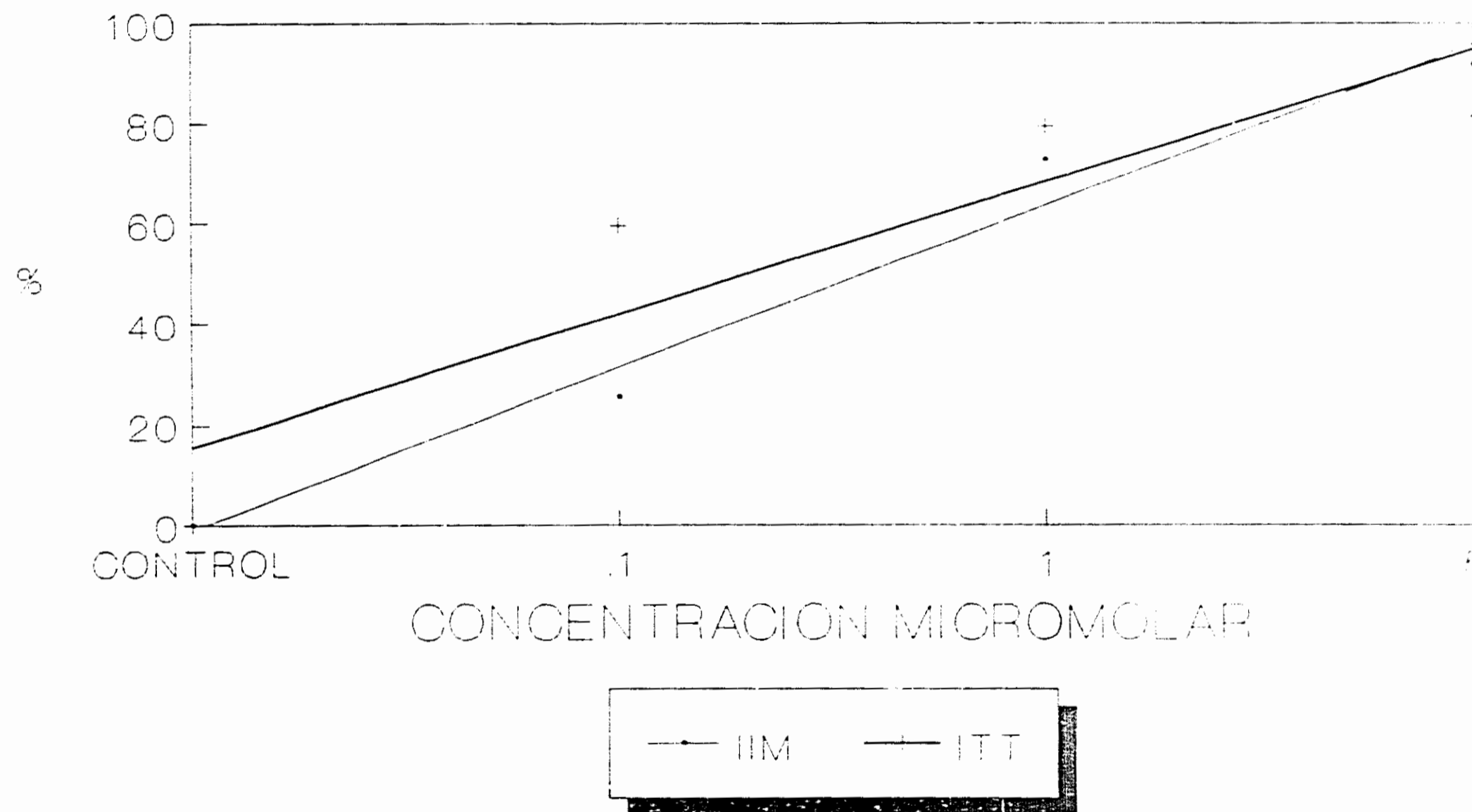
GRAFICA 24 ACCION DEL METOTREXATE SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO Y LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA



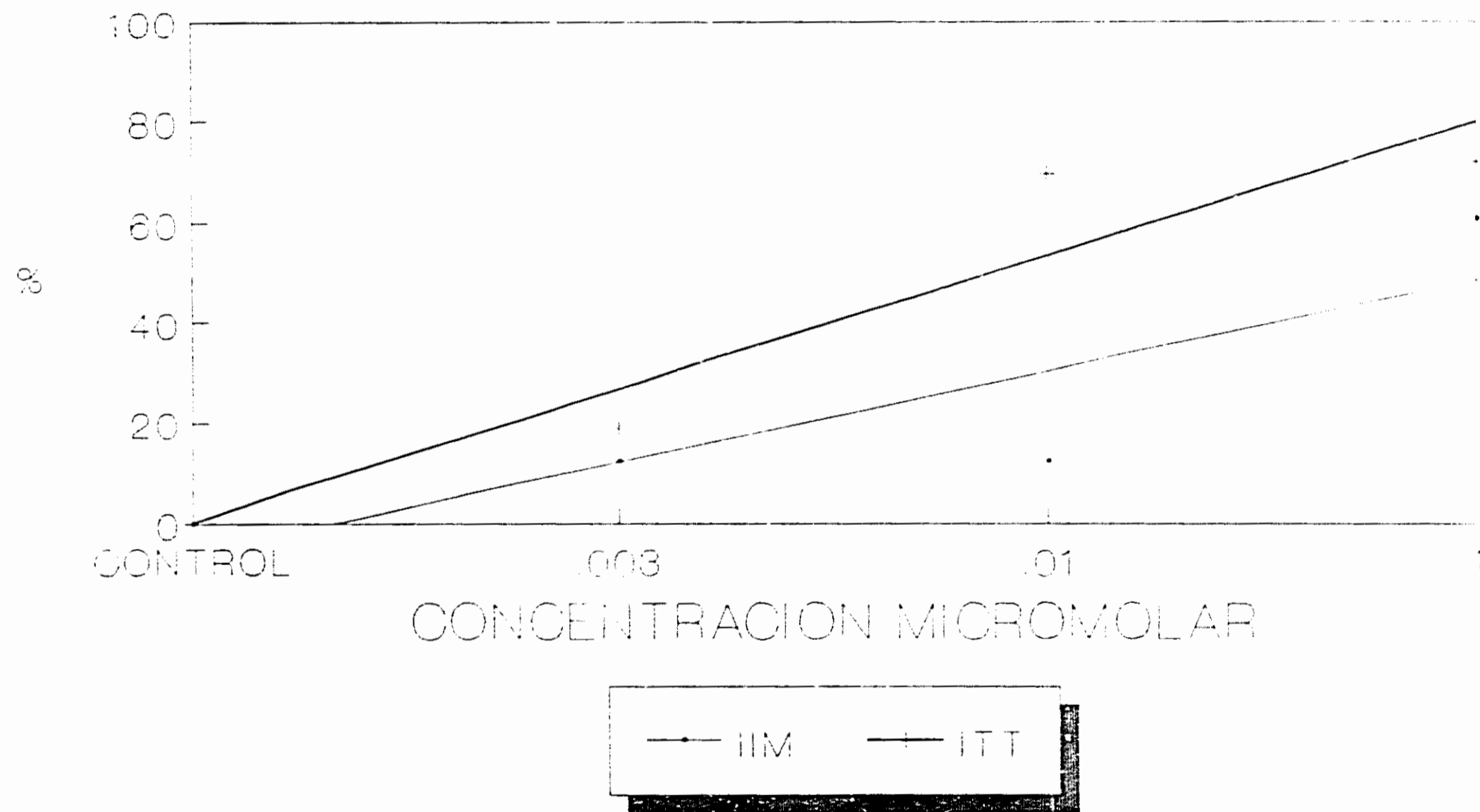
GRAFICA 25 ACCION DEL CIS-PLATINO SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO Y LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA



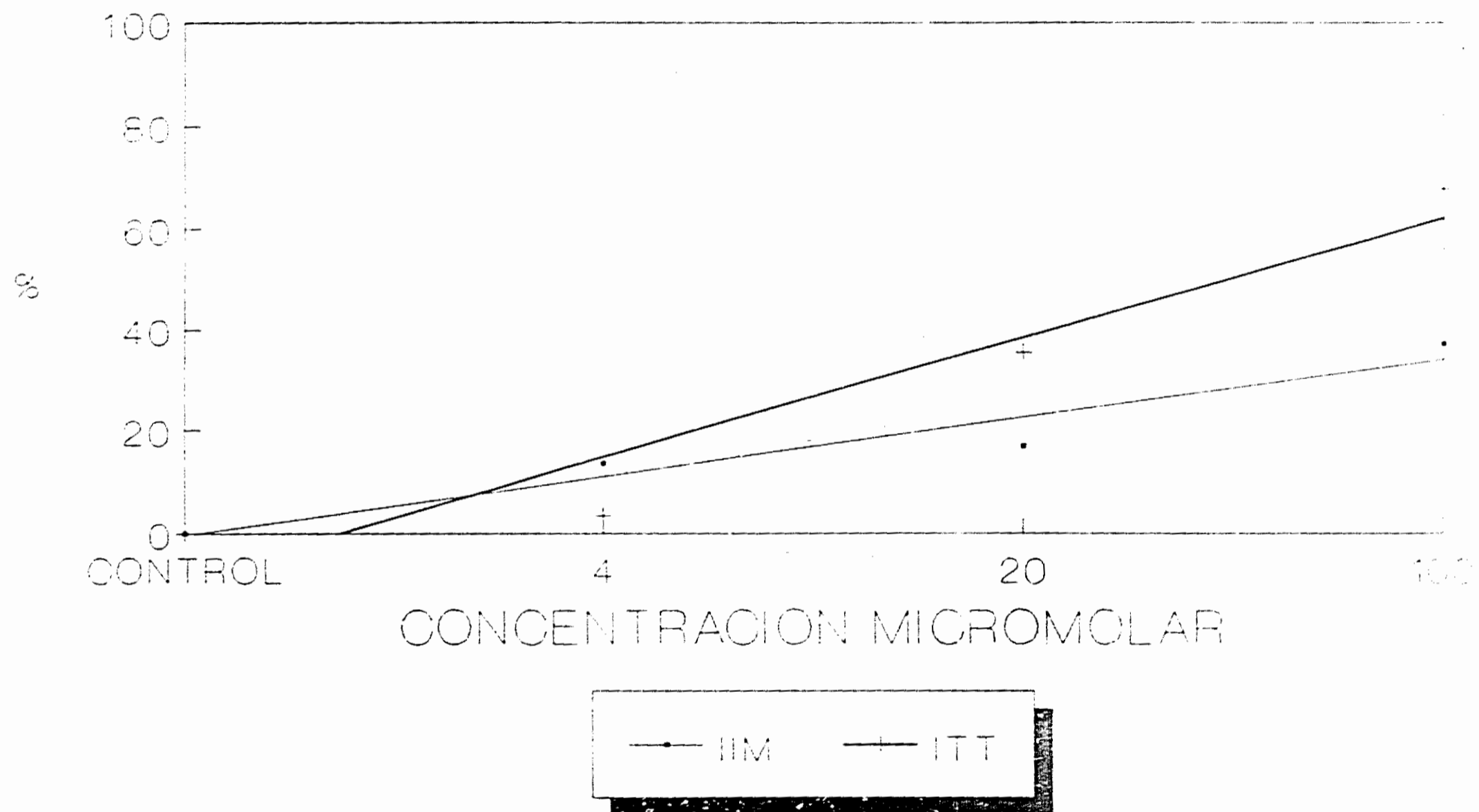
GRAFICA 26 ACCION DE LA MITOMICINA-C SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO Y LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA



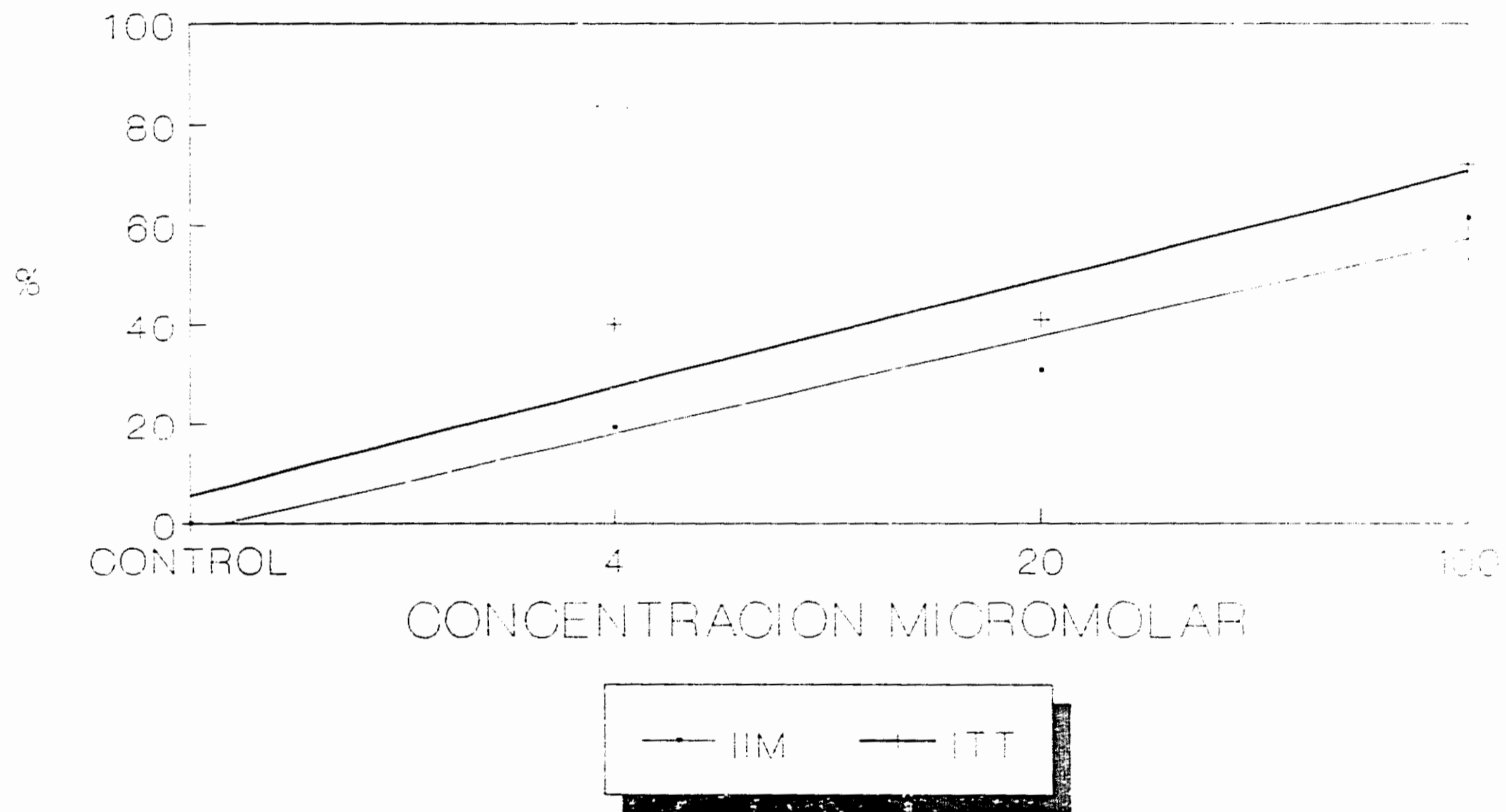
GRAFICA 27 ACCION DE LA BLEOMICINA SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO Y LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA



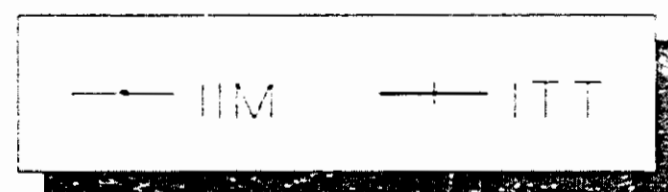
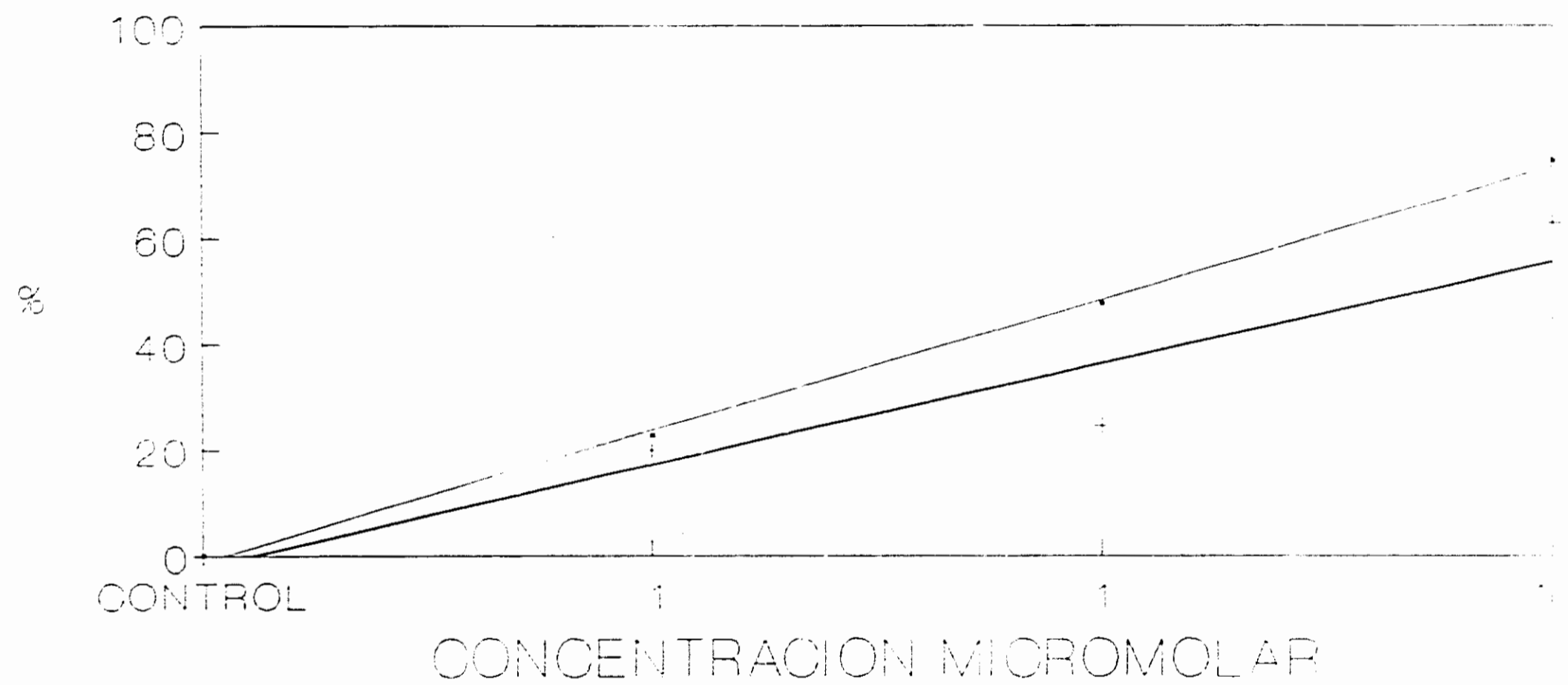
GRAFICA 28 ACCION DE LA 6MERCAPTOPURINA
SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO
Y LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA.



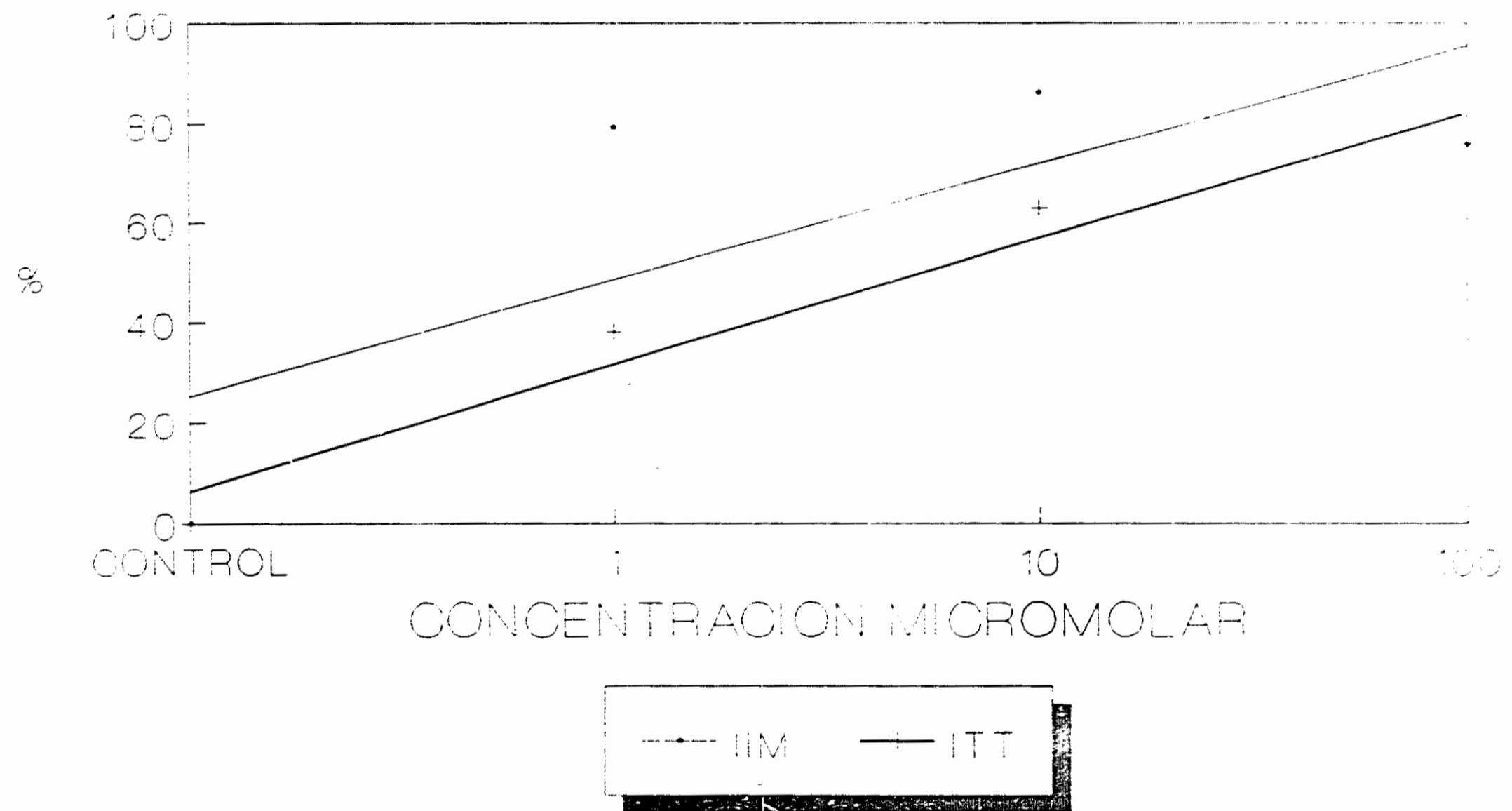
GRAFICA 29 ACCION DEL 5 FLUORURACILO SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO Y LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA



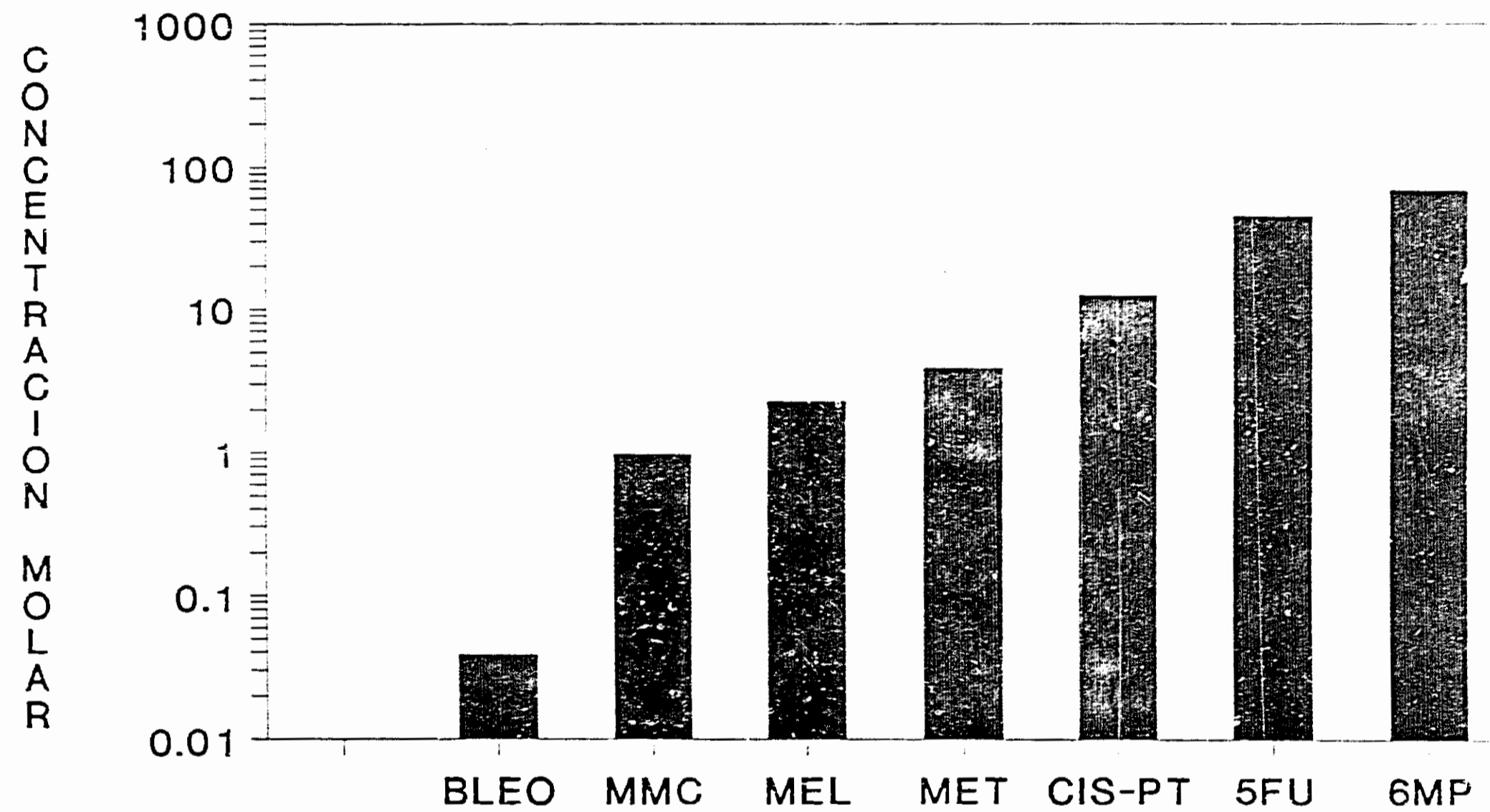
GRAFICA 30 ACCION DEL MELFALAN SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO Y LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA



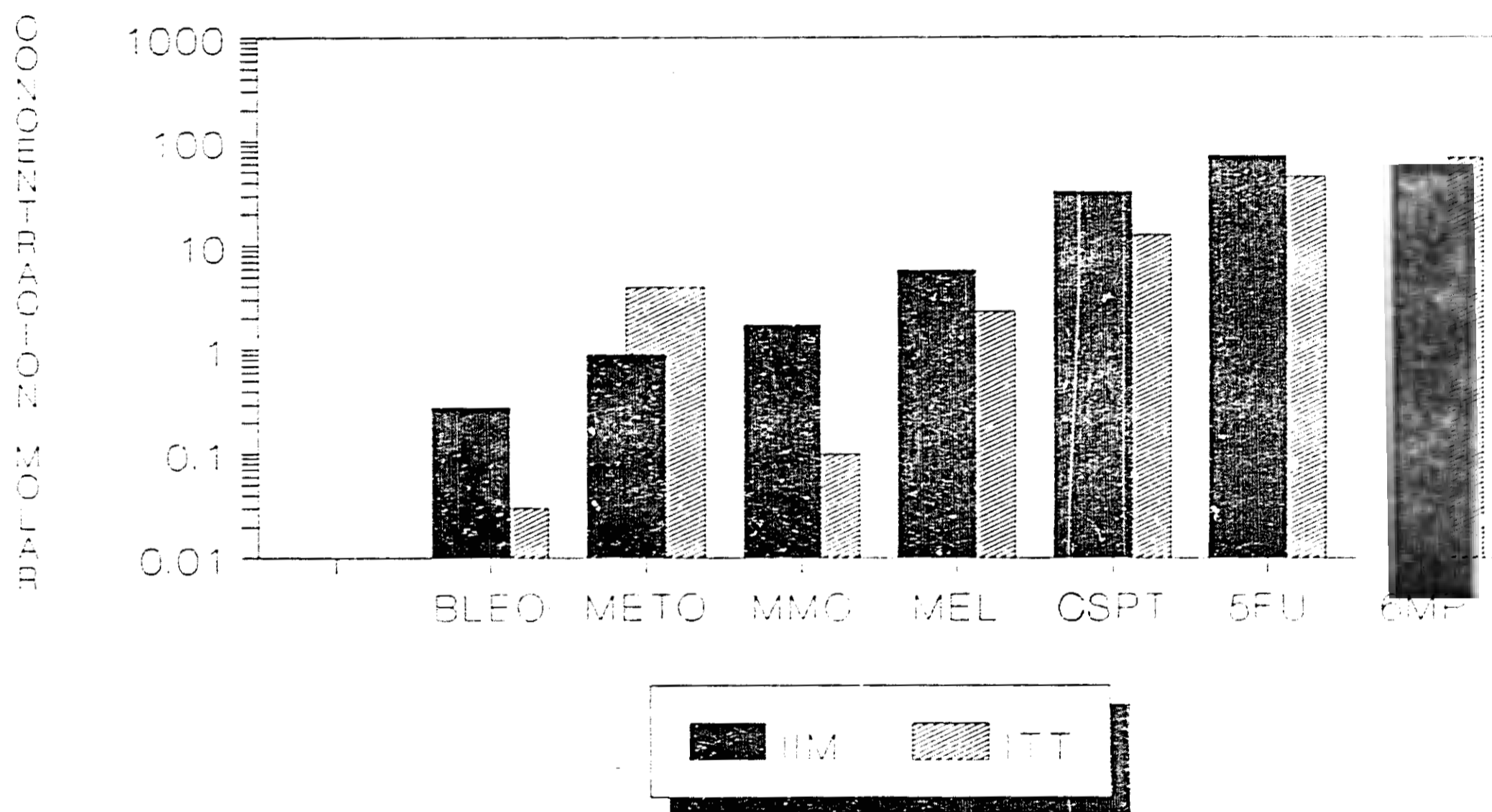
GRAFICA 31 ACCION DEL METOTREXATE SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO Y LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA



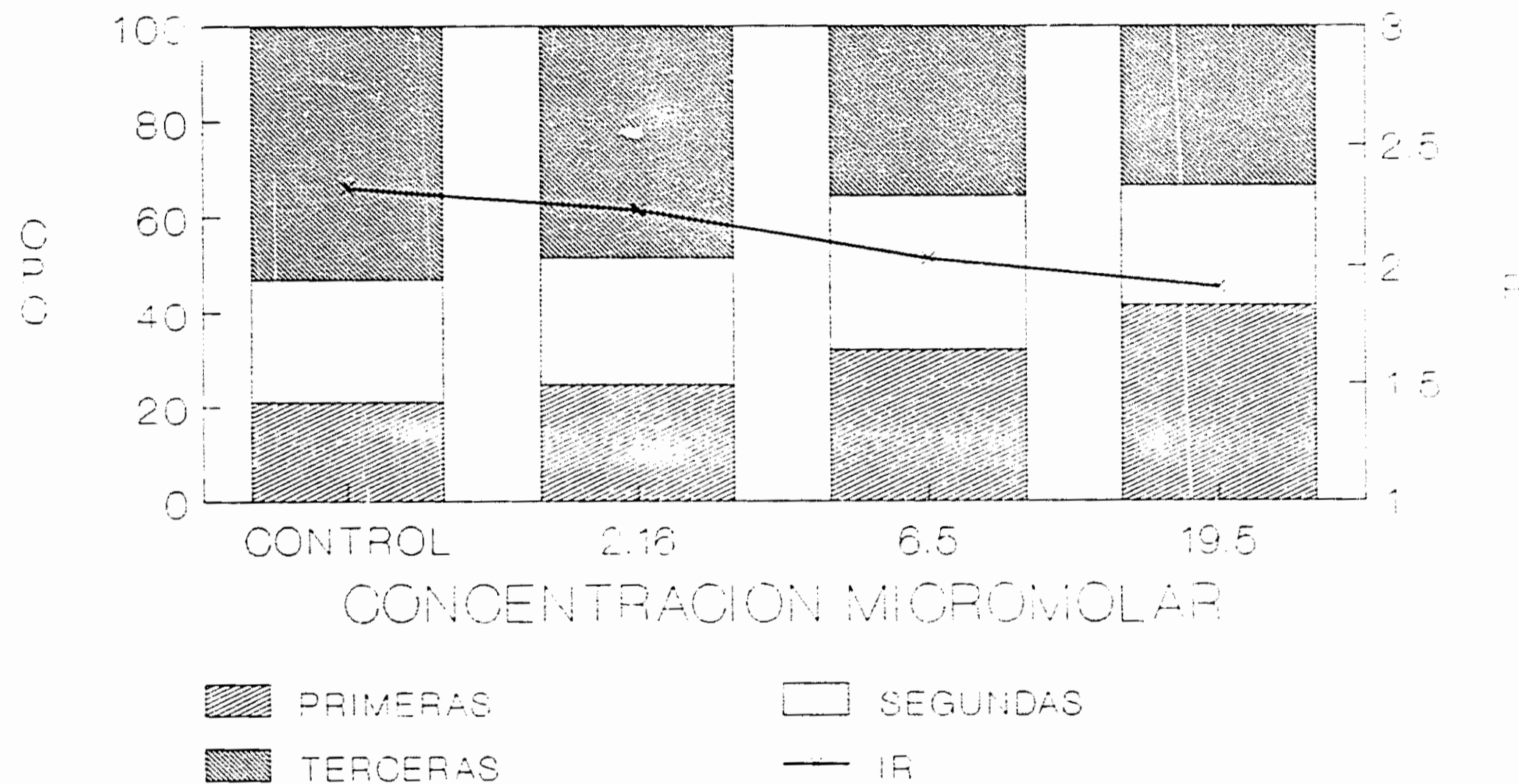
GRAFICA 32 INHIBICION DEL 50% DE LA INCORPORACION DE LA TIMIDINA TRITIADA POR LOS DIFERENTES FARMACOS



GRAFICA 33 INHIBICION DEL 50% DE LA INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA Y DEL INDICE MITOTICO

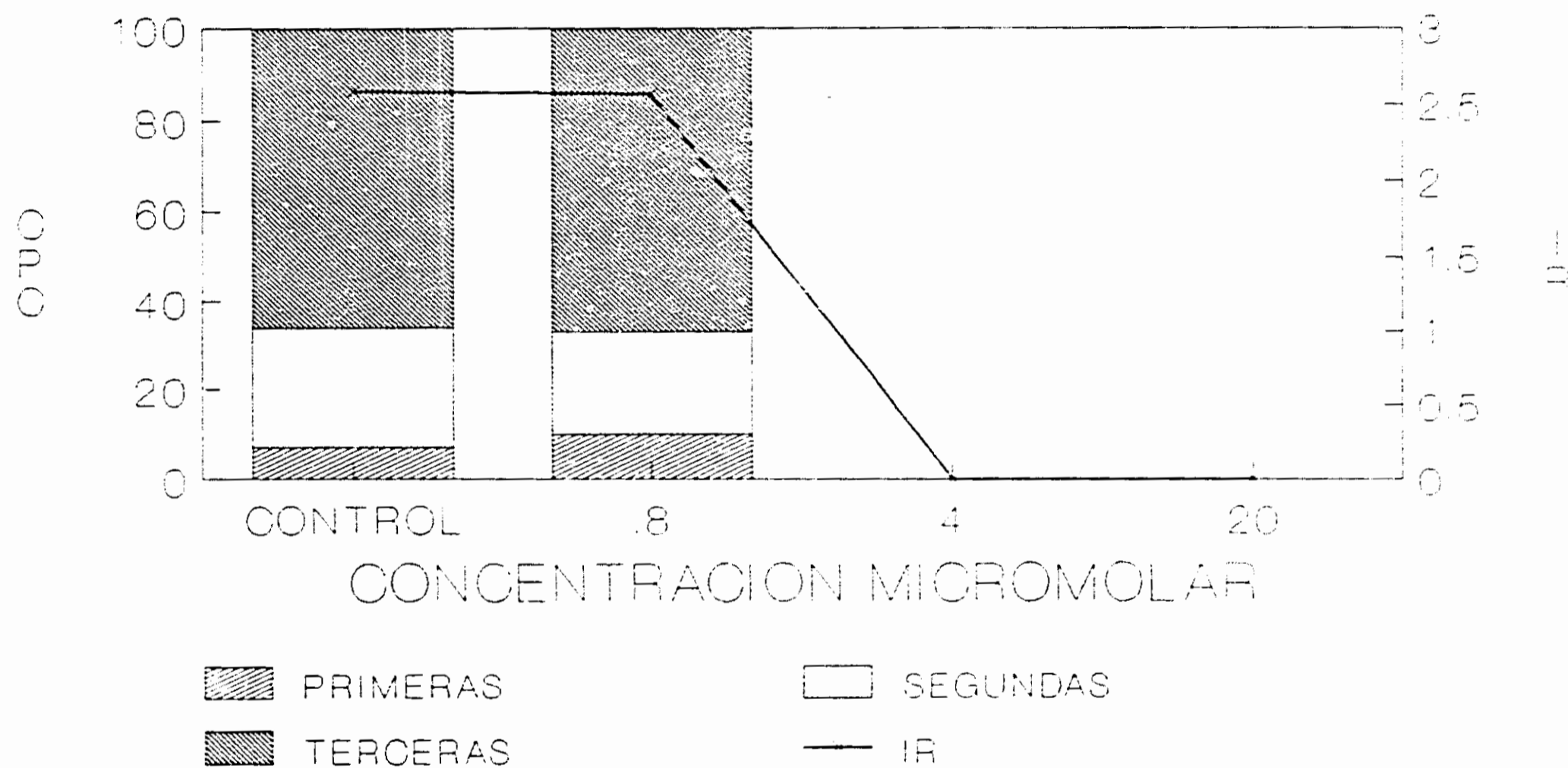


GRAFICA 34 EFECTO DE LA CASIOPEINA SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR +



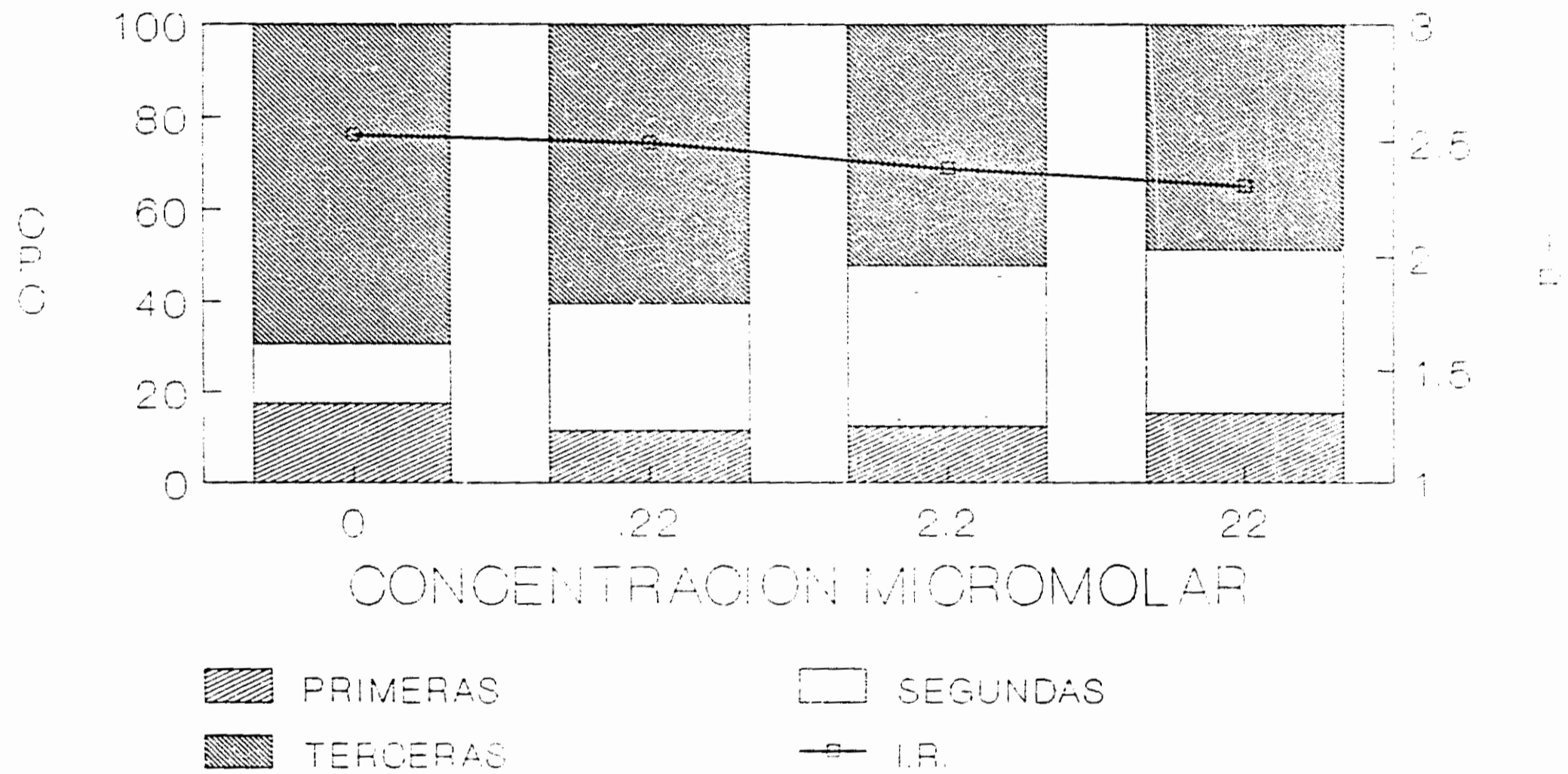
+PROMEDIO DE 3 DONADORES

GRAFICA 35 EFECTO DE LA CASIOPEINA DISUELTA EN DMSO SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR DE LINFOCITOS+



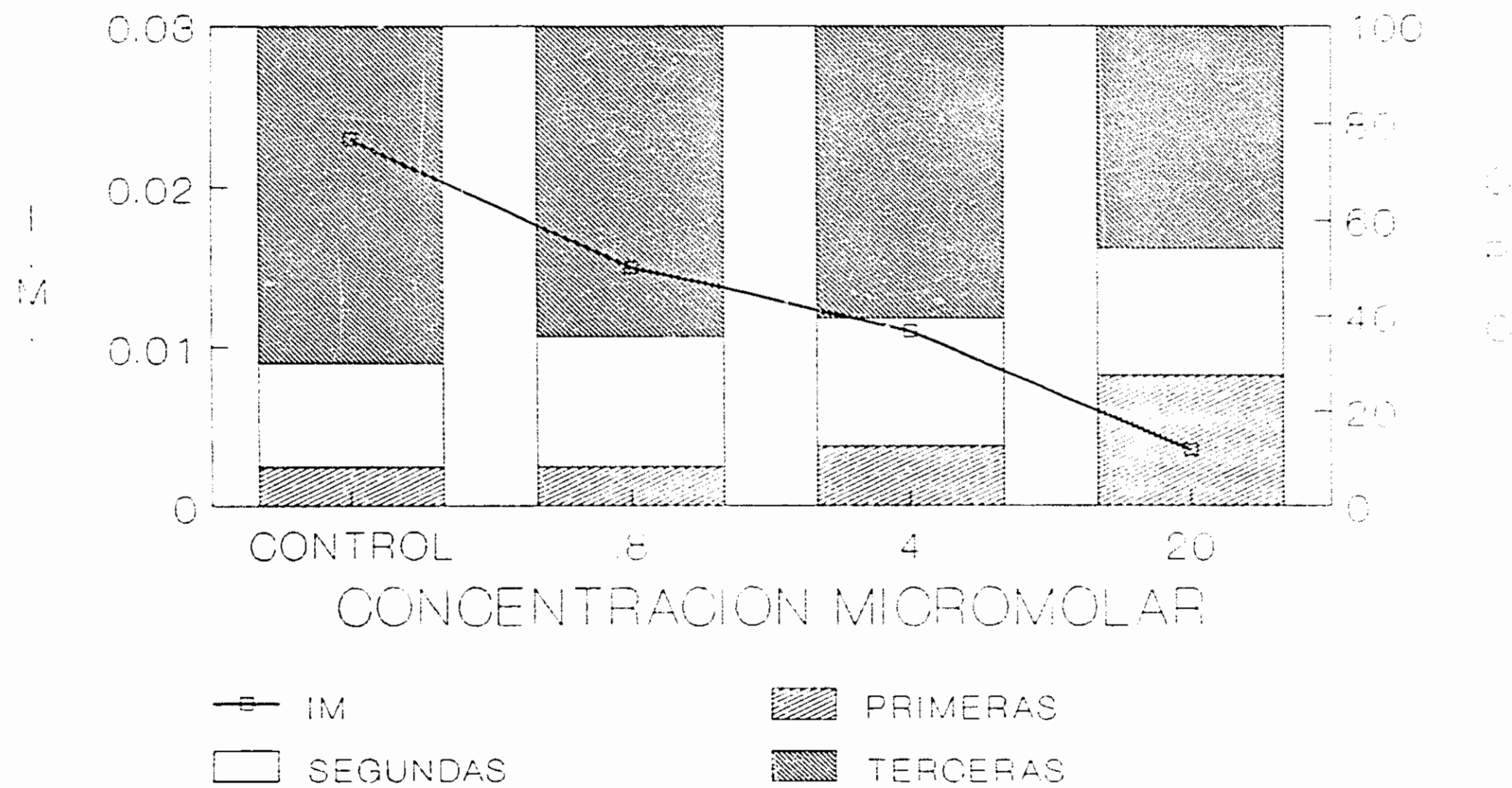
+PROMEDIO DE TRES EXPERIMENTOS
(NUEVO LOTE)

GRAFICA 36 EFECTO DE LA CASIOPEINA 2 SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR+



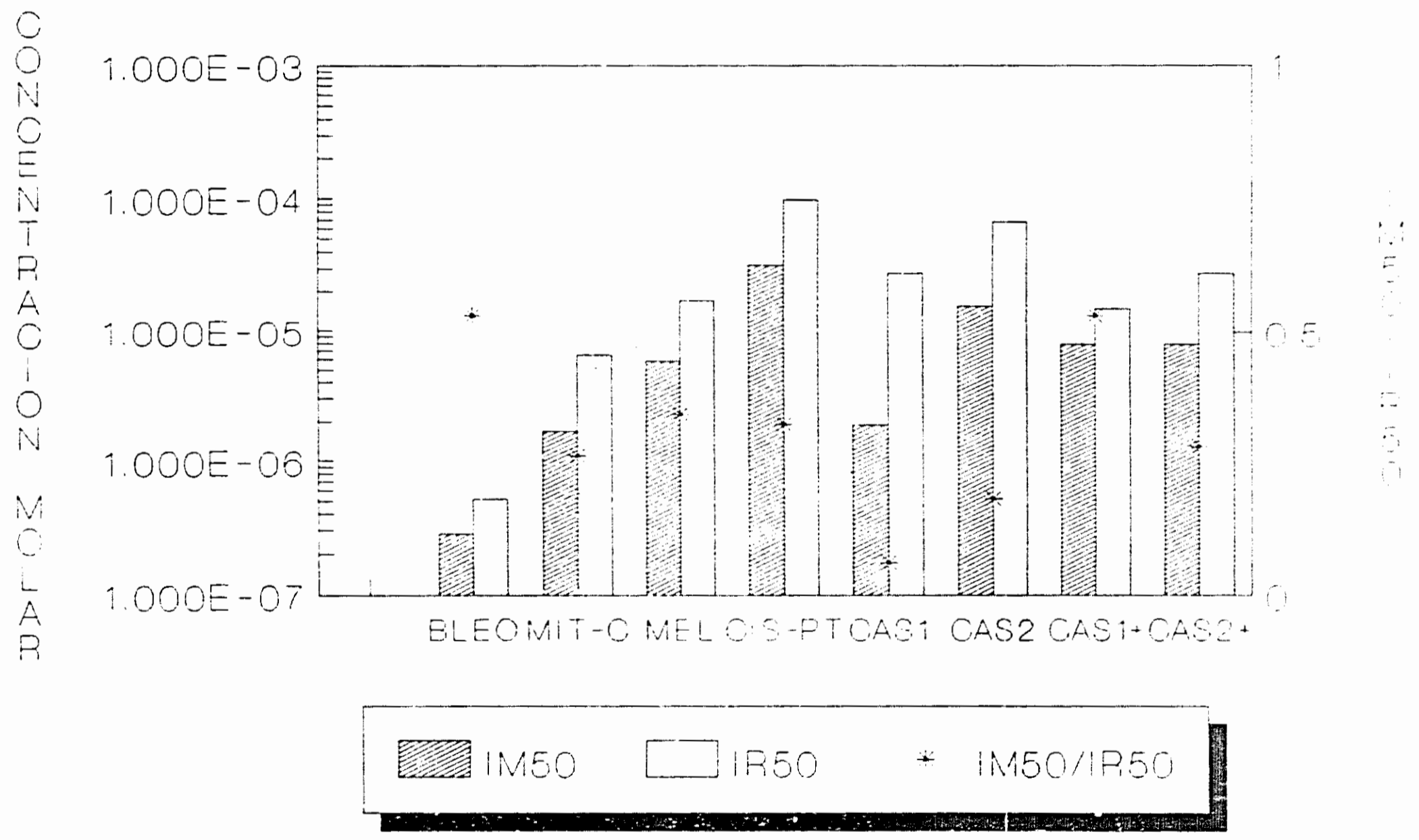
+PROMEDIO DE DOS EXPERIMENTOS
DOS DONADORES

GRAFICA 37 EFECTO DE CASIOPEINA 2 SOBRE EL INDICE MITOTICO Y LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR+



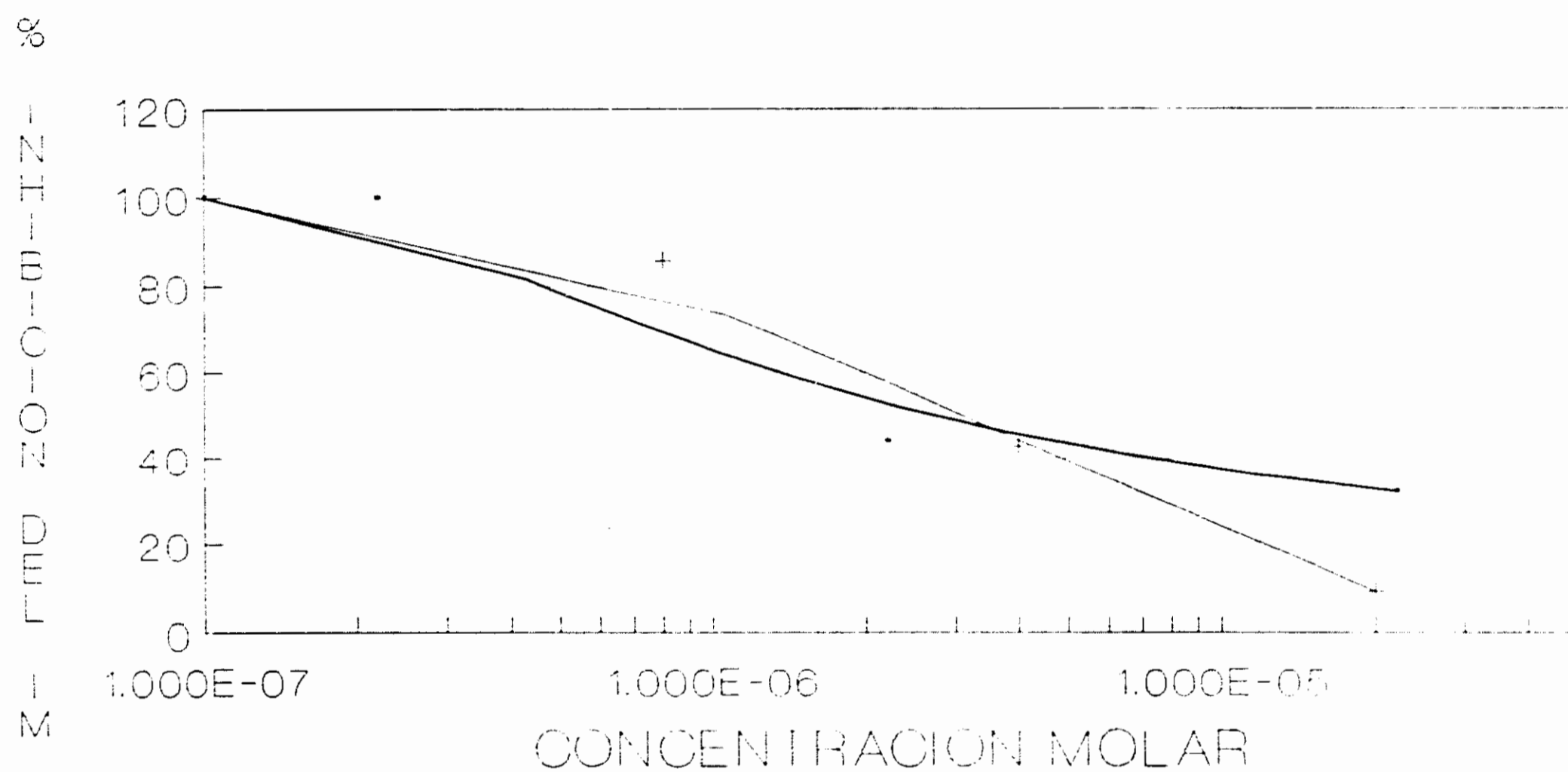
+ LOTE CONTROLADO

GRAFICA 38 COMPARACION DEL IR50 Y DEL IM50 EN EL CULTIVO DE CULTIVO DE LINFOCITOS



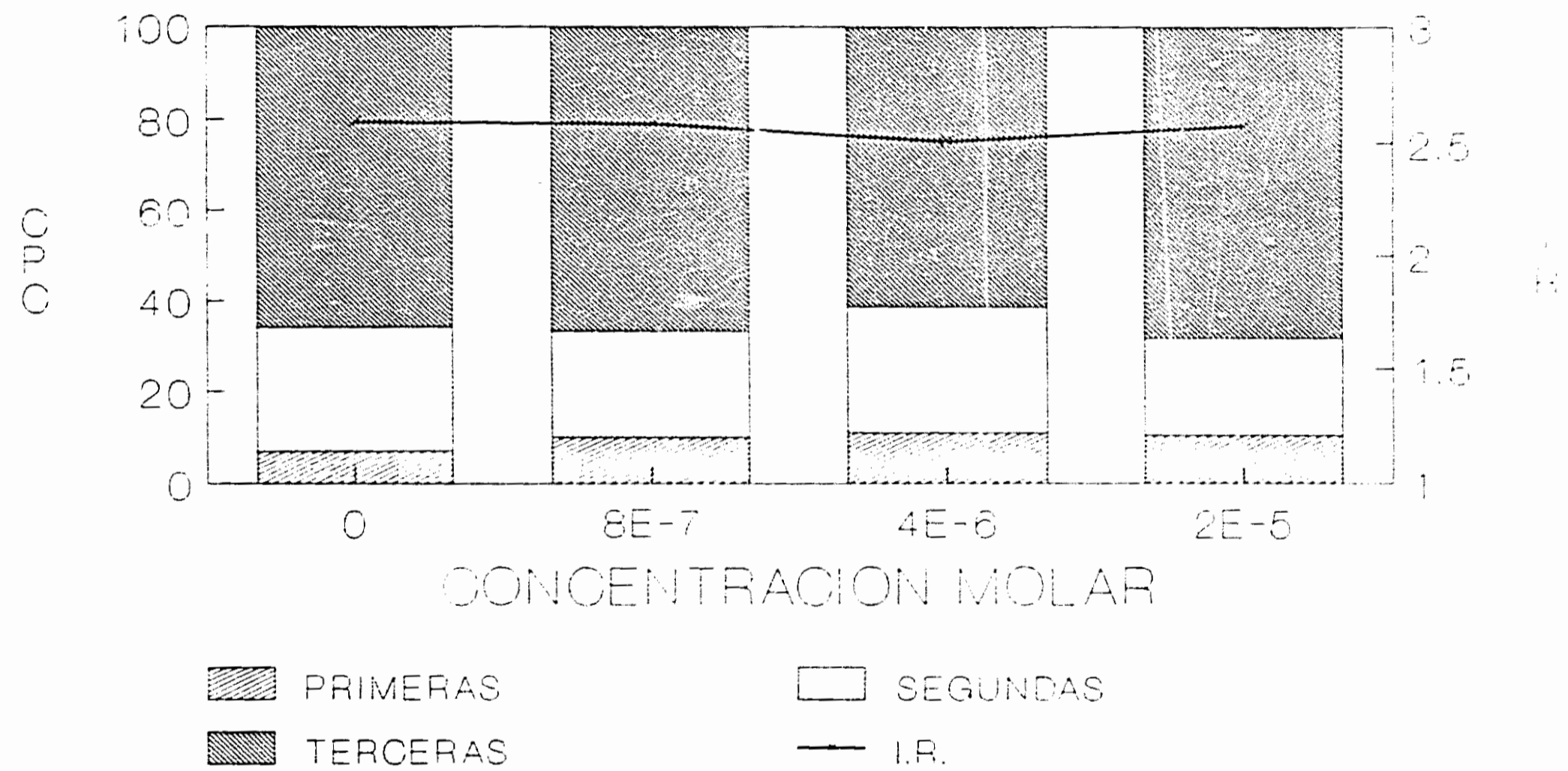
+ LOTE NUEVO

GRAFICA 39 EFECTO DE LA CASIOPEINA SOBRE LA INHIBICION DEL INDICE MITOTICO



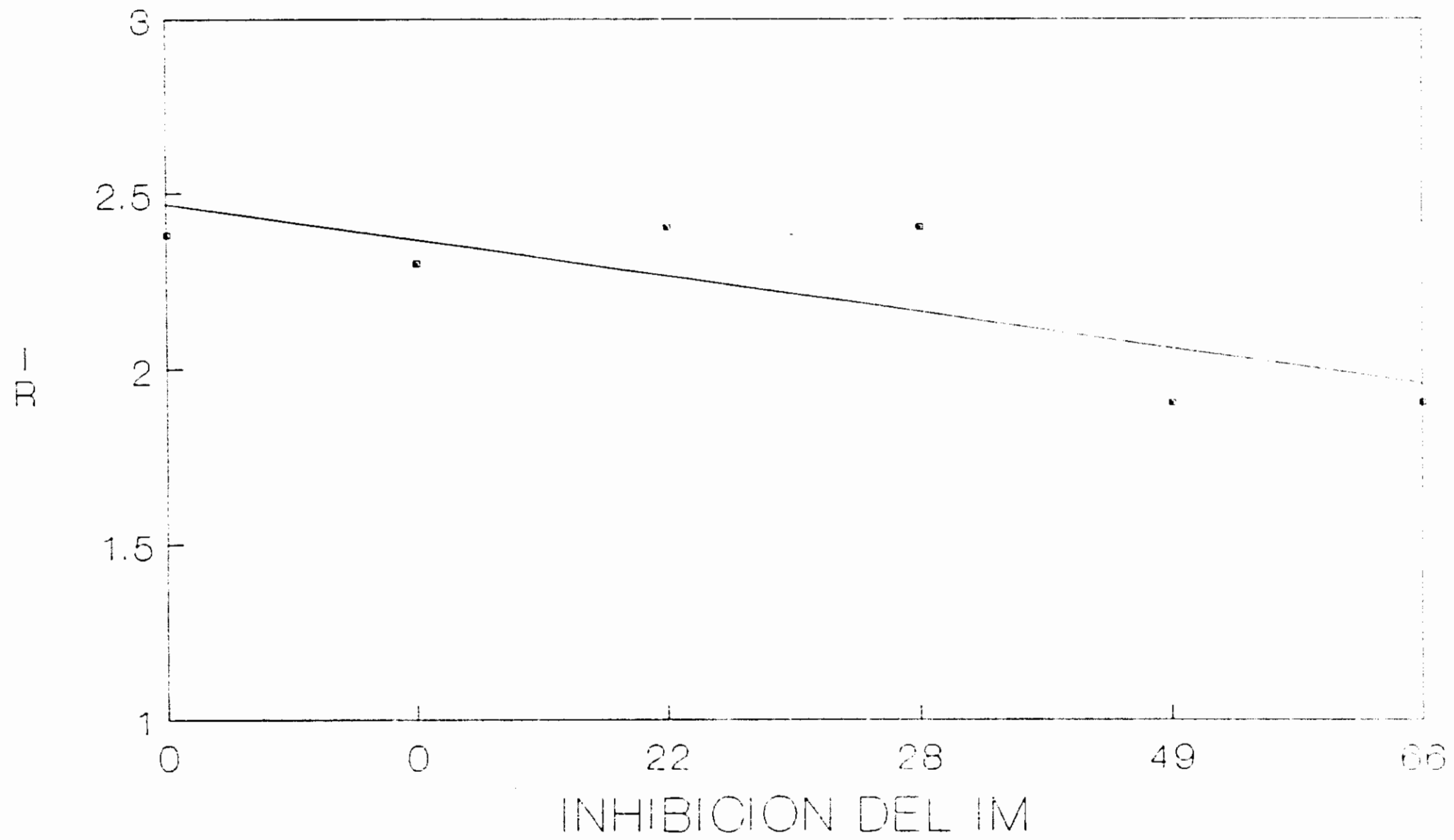
— LOTE ANTERIOR -+ LOTE CONTROLADO

GRAFICA 40 EFECTO DE IGM1 SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR +

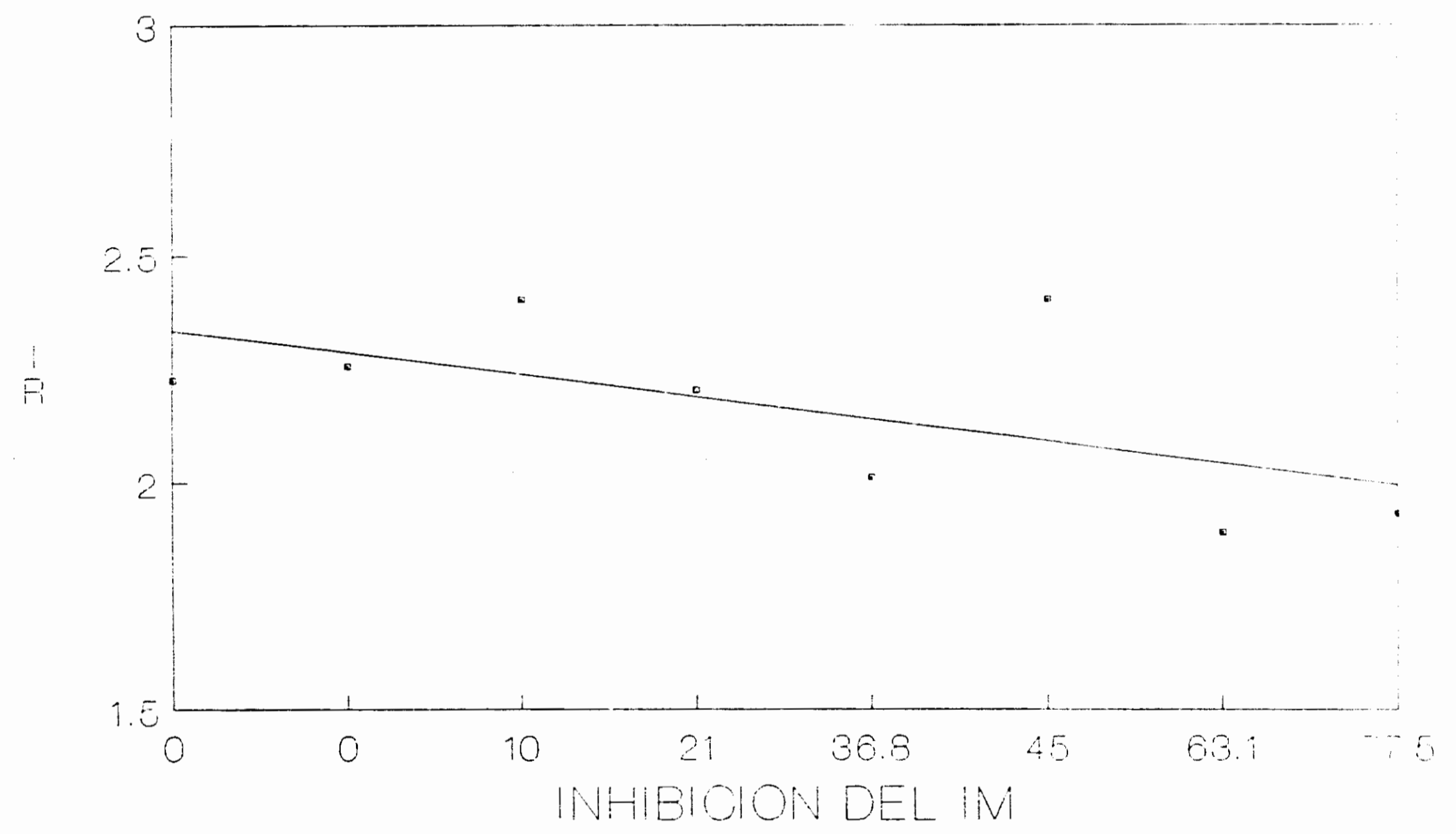


+ DOS DONADORES
DOS EXPERIMENTOS

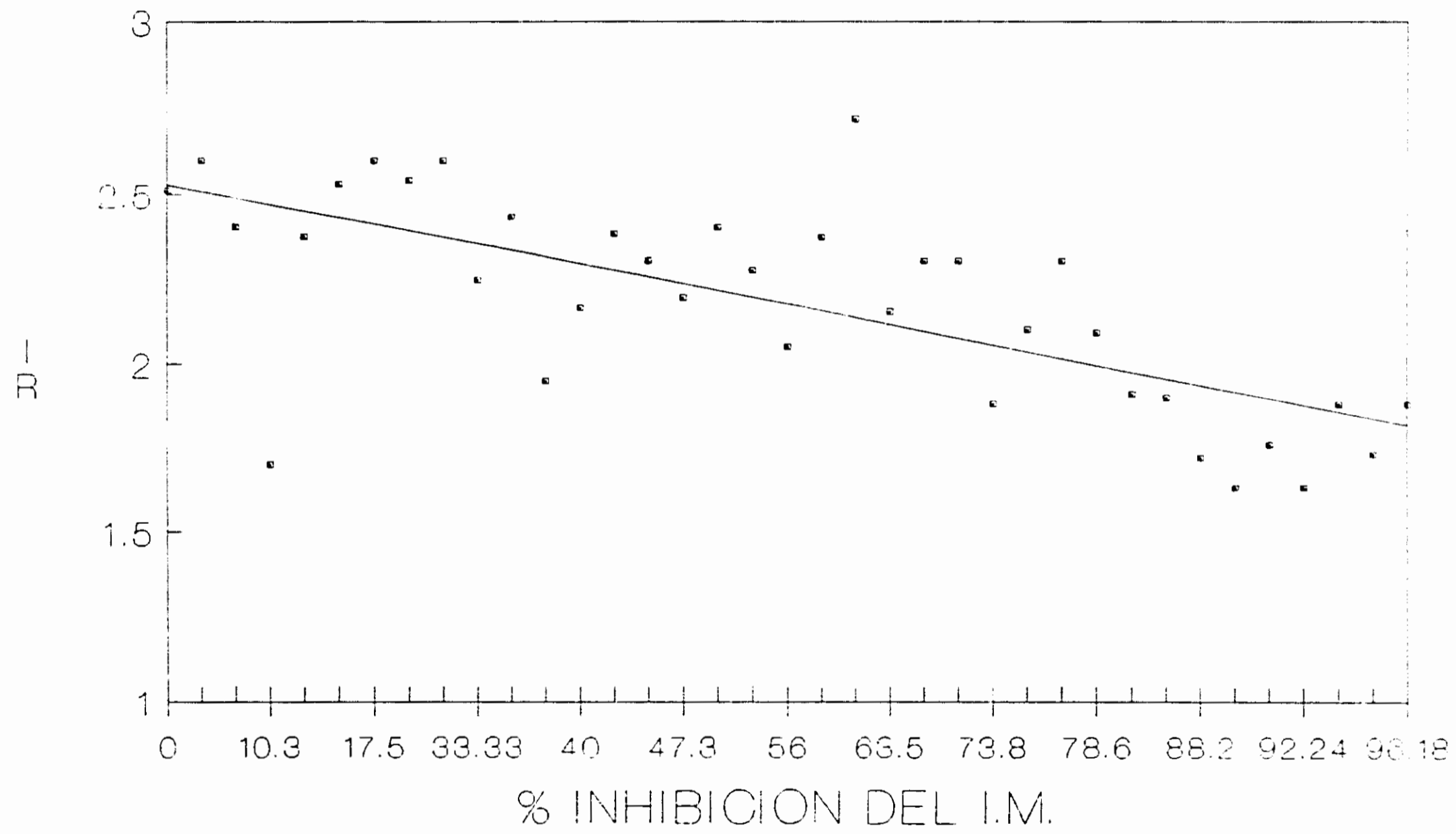
GRAFICA 41 RELACION IR E IM DEBIDA A LA ACCION DE LA BLEOMICINA



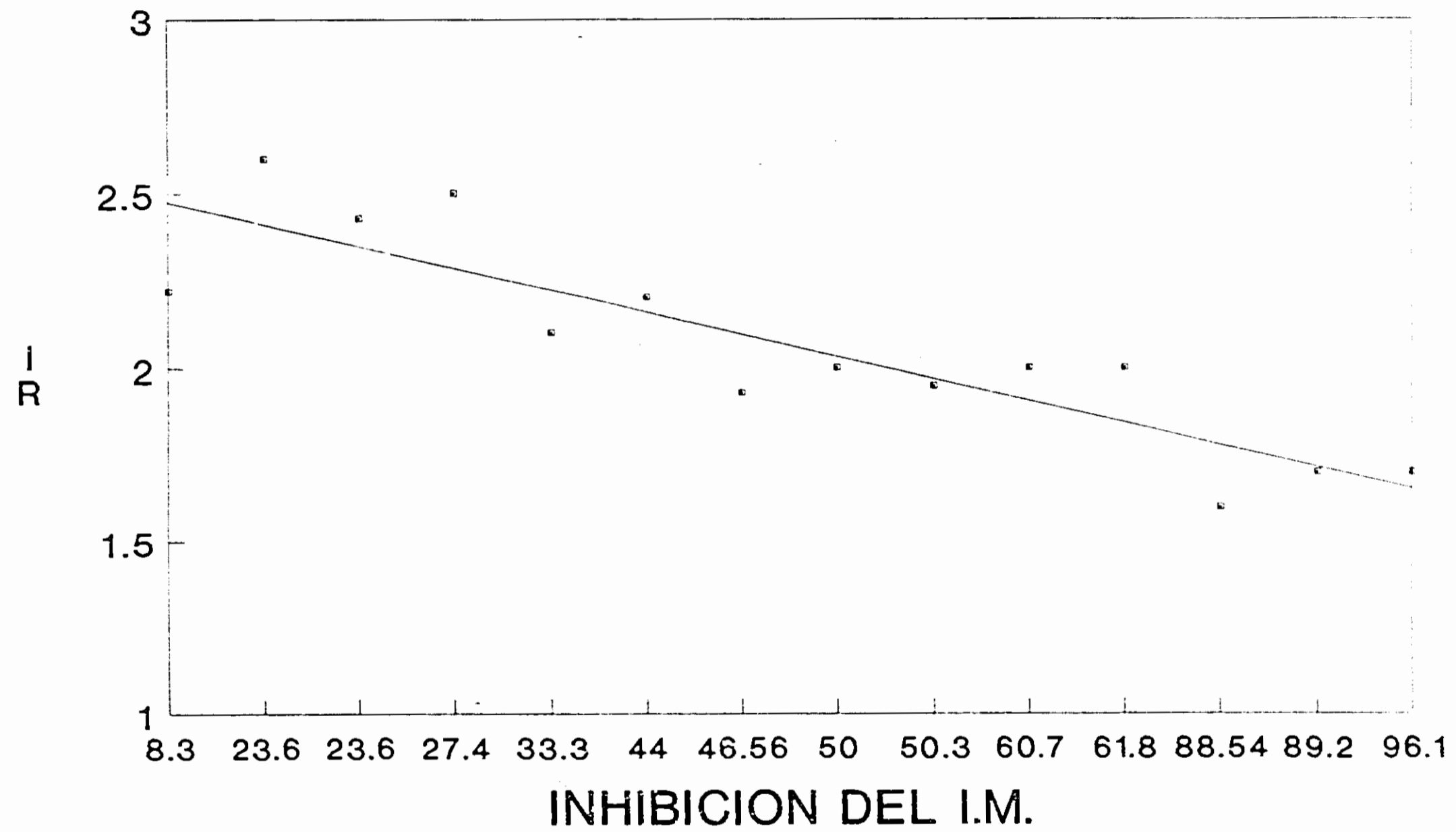
GRAFICA 42 RELACION IR E IM
DEBIDO A LA ACCION DEL MELFALAN



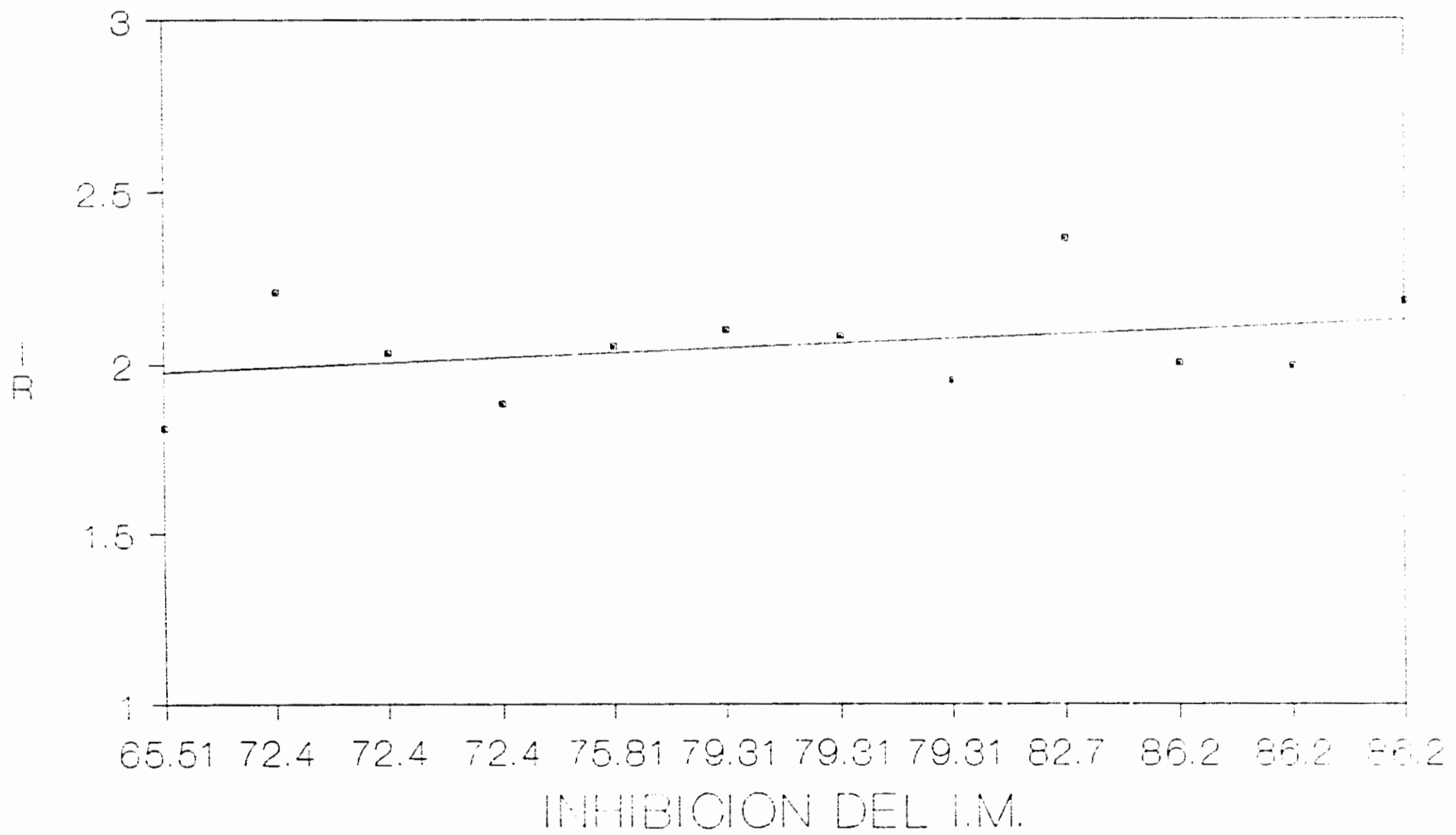
GRAFICA 43 RELACION IR E IM
DEBIDA A LA ACCION DE LA MITOMICINA-C



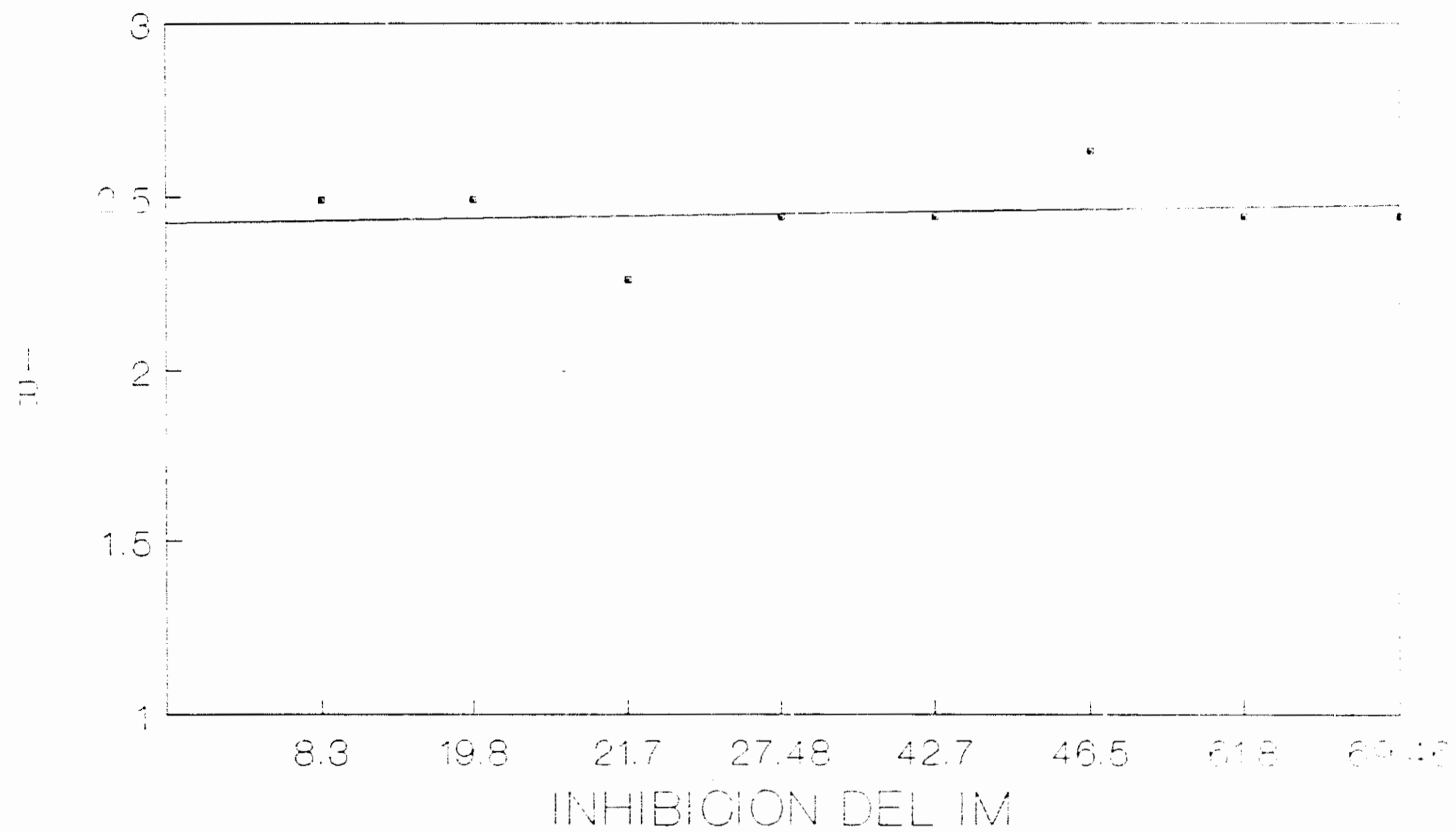
GRAFICA 44 RELACION IR E IM DEBIDA A LA ACCION DEL CISPLATINO



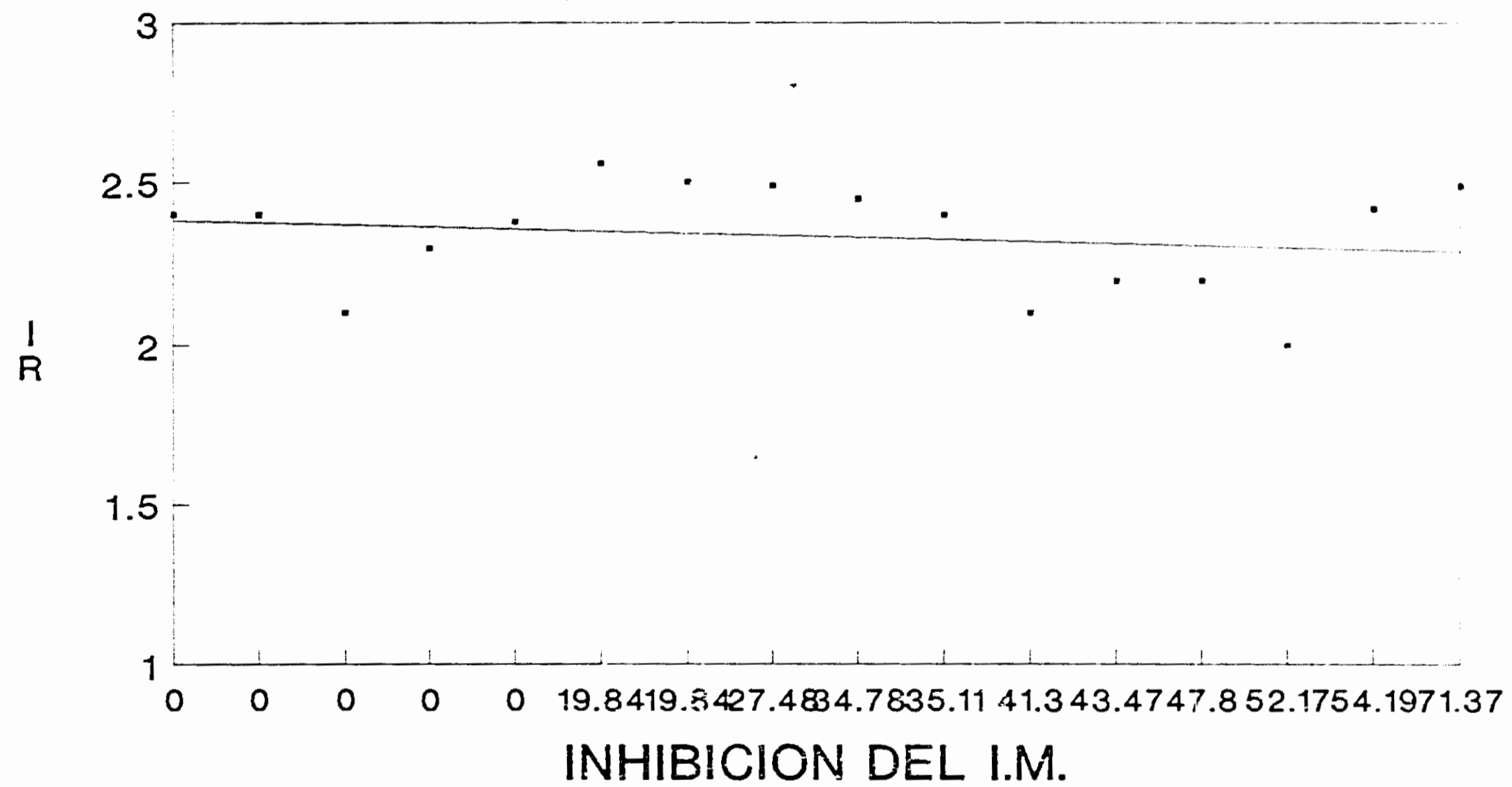
GRAFICA 45 RELACION IR E IM DEBIDA A LA ACCION DEL METOTREXATE



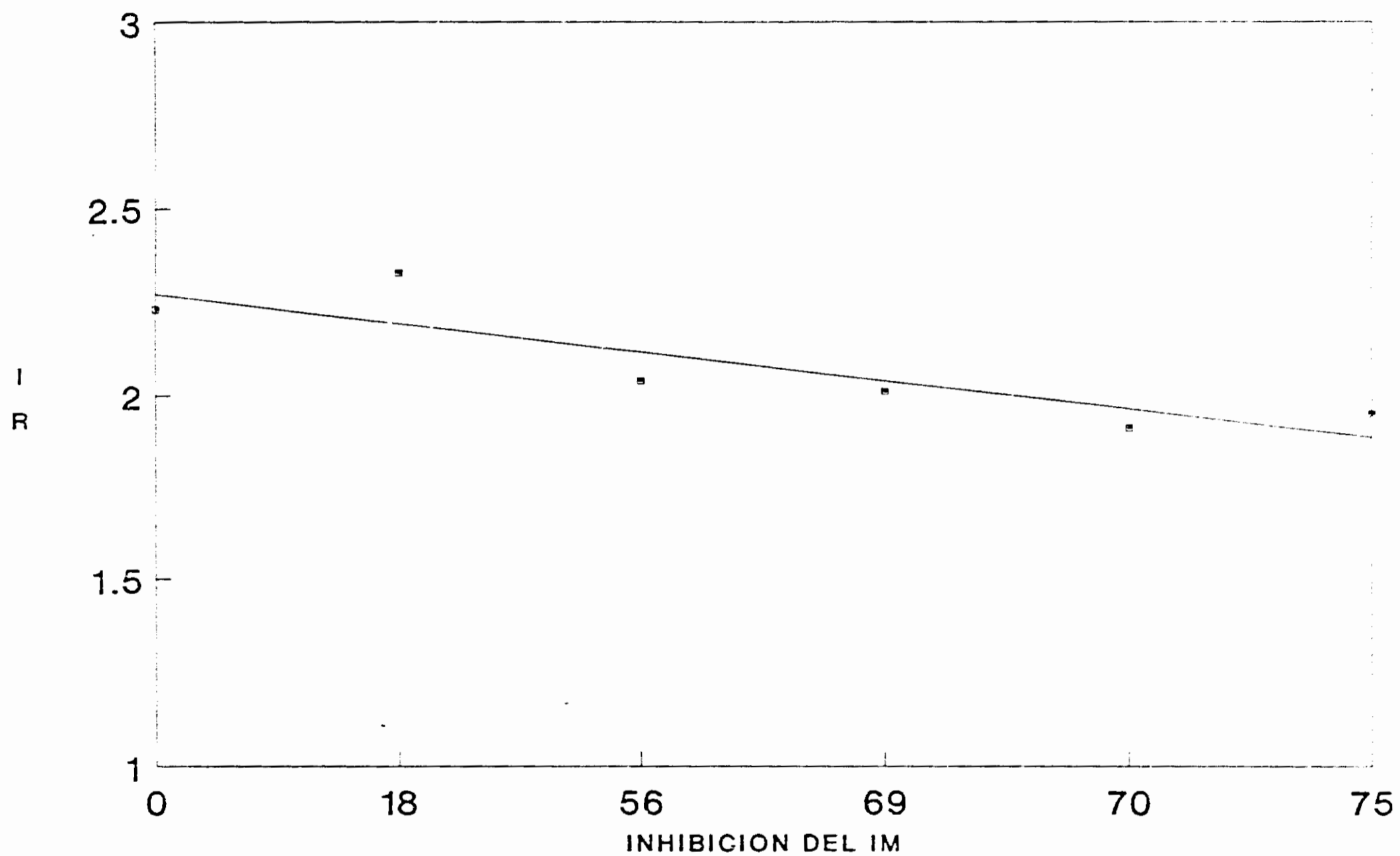
GRAFICA 46 RELACION IR E IM DEBIDA A LA ACCION DEL 5 FLUORURACILO



GRAFICA 47 RELACION IR E IM
DEBIDA A LA ACCION DE LA 6
MERCAPTOPURINA



GRAFICA 48 RELACION IR E IM
DEBIDA A LA ACCION DE LA CASIOPEINA 1



GRAFICA 49 RELACION IR E IM
DEBIDA A LA ACCION DE LA CASIOPEINA 2

