



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

99
rej

FACULTAD DE QUIMICA

DETECCION DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL
DE FARMACOS TIPO HEPARAN SULFATO EN
LINEAS CELULARES TUMORALES

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

VERONICA RIVERA LOPEZ RAYON



MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente: Prof. Angelina Quintero Ruíz

Vocal: Prof. Federico Alfredo García Jiménez

Secretario: Prof. Raúl Genaro Aguilar Caballero

1er. suplente: Prof. Helgi Helen Jung Cook

2do. suplente: Prof. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Sitio donde se desarrolló el tema:

Laboratorio de Investigación en Cáncer. Departamento de Biología. Facultad de Química. U.N.A.M.

Asesor del tema:

Angelina Quintero

Dra. Angelina Quintero Ruíz

Sustentante:

Verónica Rivera L.R.

Verónica Rivera López Rayón

AGRADECIMIENTOS:

A Dios:

Por la dicha de tener su amor y su conocimiento, y poder disfrutar de esta nueva vida en Cristo. A Él le debo todo.

A mis padres José y Lupita:

Los amo profundamente y agradezco por siempre su entrega incondicional, amor, cuidado y apoyo, pues han dado lo mejor de su vida para mí. Me siento dichosa y afortunada de que sean mis padres y tenerlos conmigo. Papi, especialmente te agradezco por haberme enseñado a buscar y a amar el verdadero conocimiento; tu cariño, sencillez, inteligencia, fortaleza y madurez han sido un invaluable ejemplo para mí.

A mis hermanos Pepe, Esther, Ricardo, Edméc y mis cuñados Jaime y Alejandra:

Por toda la vida que he tenido la dicha de compartir con ustedes, pues siempre he contado con su gran amor y apoyo. Espero seguir disfrutándolos mucho tiempo. Los amo.

A mi sobrino Daniel Abner:

Porque tu inocencia, ternura y cariño me han motivado y hecho pasar momentos felices e inolvidables.

A mi familia:

A quienes llevo en el corazón y agradezco su invaluable apoyo y cariño. Es un privilegio poder compartir mi vida y estos logros con ustedes.

A mi familia en la fe:

Por su constante amor, apoyo y motivación para seguir siempre adelante y alcanzar nuestra gran meta con los ojos puestos en el Señor.

A Julia J. Segura:

Por tu hermosa amistad y tu continuo apoyo para la realización de este trabajo. Tu nueva vida fue de gran gozo y motivación en mi vida. Muchas gracias.

Al M. en C. Luis Ignacio Terrazas, el Dr. José Pedraza y el Dr. Edgar Zenteno:

Por su invaluable apoyo para hacer posible la realización de esta tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, y especialmente a la Facultad de Química:

Por tener el privilegio de pertenecer a esta honorable y reconocida institución, pues de ella recibí una excelente formación profesional y humana.

A mis profesores:

Por toda su vida y conocimiento que me compartieron. Han sido para mí un admirable ejemplo de dedicación, entusiasmo y paciencia.

A mis compañeros y amigos de la Facultad de Química:

Por todos los momentos compartidos en la lucha por conquistar nuestras metas. Gracias por haber compartido conmigo su hermosa amistad.

A la Dra. Angelina Quintero Ruíz:

Un reconocimiento especial a su admirable entrega, dedicación, perseverancia, inteligencia y amor a la investigación. Muchas gracias por haber compartido conmigo su vida, conocimientos y amistad, y por haber dirigido de manera brillante este trabajo de investigación.

A los integrantes del Jurado:

Prof. Angelina Quintero Ruíz.
Prof. Federico Alfredo García Jiménez
Prof. Raúl Genaro Aguilar Caballero
Prof. Helgi Helen Jung Cook
Prof. Luis Ignacio Terrazas Valdés

Por sus valiosos comentarios y sugerencias hechos a este trabajo con el fin de enriquecerlo.

**“Porque escudo es la ciencia , y escudo es el dinero; mas la sabiduría
excede, en que da vida a sus poseedores”**

Eclesiastés 7:12

**“El temor de Dios es el principio de la sabiduría, y el conocimiento del
Santisimo es la inteligencia”**

Proverbios 9:10

ÍNDICE

| | Página |
|--|--------|
| 1. INTRODUCCIÓN | 1 |
| 2. OBJETIVOS | 3 |
| 3. HIPÓTESIS | 4 |
| 4. GENERALIDADES | |
| 4.1 Cáncer | 5 |
| 4.2 Heparina y heparán sulfatos | 8 |
| 4.3 Angiogénesis | 12 |
| 4.4 Papel de la angiogénesis en el mantenimiento tumoral | 13 |
| 4.5 Sistemas empleados para el estudio de la angiogénesis | 21 |
| 4.6 Terapia de metástasis por inhibición de la angiogénesis | 22 |
| 4.7 Fármacos antiangiogénicos | |
| 4.7.1 Angiostatina | 25 |
| 4.7.2 Heparina | 26 |
| 4.7.3 Pentosán polisulfato | 28 |
| 5. METODOLOGÍA | |
| 5.1 Cultivo de líneas celulares <i>in vitro</i> | 30 |
| 5.1.1 Generalidades de la línea celular HeLa | 31 |
| 5.1.2 Generalidades de la línea celular SW480 | 33 |
| 5.1.3 Generalidades de la línea celular SW620 | 34 |
| 5.1.4 Generalidades de la línea celular A204 | 36 |
| 5.2 Reactivos y materiales | 38 |
| 5.3 Preparación de reactivos y medios de cultivo | 41 |
| 5.4 Técnicas | |
| 5.4.1 Preservación de células | 52 |
| 5.4.2 Descongelamiento y recultivo | 53 |
| 5.4.3 Determinación de la viabilidad celular por la técnica de reducción de la sal de tetrazolio MTT | 54 |
| 5.4.4 Obtención de la curva de crecimiento de cada línea celular | 56 |
| 5.4.5 Realización de la curva patrón para cada línea celular | 57 |
| 5.4.6 Determinación de la actividad antitumoral directa de los fármacos tipo heparán sulfato en las líneas celulares seleccionadas | 58 |
| 5.4.7 Pruebas para determinar la actividad antiproliferativa de los heparán sulfatos sobre células endoteliales de capilar de cerebro bovino (actividad antitumoral indirecta) | 60 |

| | |
|-----------------------------|-----|
| 6. RESULTADOS | 62 |
| 7. DISCUSIÓN | 92 |
| 8. CONCLUSIONES | 100 |
| 9. APÉNDICE I. Abreviaturas | 102 |
| 10. BIBLIOGRAFÍA | 105 |

1. INTRODUCCIÓN

El cáncer es un padecimiento que ha motivado numerosas investigaciones con el fin de encontrar nuevos fármacos eficaces para combatirlo.

Las principales barreras para el tratamiento de este padecimiento son la heterogeneidad biológica de las células cancerosas (54) y la resistencia de algunas de ellas a muchos de los agentes convencionales contra el cáncer (33).

Ciertos fármacos de tipo heparinoide han mostrado tener diversos efectos biológicos, y entre éstos destaca su actividad antitumoral ya sea directa, o bien, indirecta por inhibición de la angiogénesis.

La terapia antiangiogénica constituye una de las nuevas estrategias más prometedoras para el tratamiento del cáncer, y puede llegar a ser de un valor incalculable. Es un camino nuevo y más general para el tratamiento de metástasis mediante la manipulación del microambiente del hospedero.

En los últimos años se han realizado diversos experimentos que demuestran que el crecimiento tumoral puede ser evitado por inhibición de la angiogénesis (8,18,19); un ejemplo es el tratamiento de neoplasias teniendo como blanco tanto las células tumorales (quimioterapia), como el ambiente del órgano (terapia antiangiogénica), que ha mostrado tener efectos terapéuticos sinérgicos o aditivos en tumores 3LL crecidos en ratones (12).

Los compuestos tipo heparán sulfato pueden tener o no actividad antitumoral. El efecto antitumoral depende de la estructura química y por esta razón es importante probar la actividad biológica de cada uno (37).

Los heparán sulfatos probados en este trabajo son mezclas de sacáridos con bajo peso molecular (500 - 6 000 Da). Se sabe que algunos compuestos tipo heparina de bajo peso molecular mejoran sus actividades biológicas y de ahí el interés por probar la actividad antitumoral de estos compuestos (2).

Se hizo la detección de la posible actividad antitumoral de los fármacos H1, H2, H3 y H4 empleando diversas líneas celulares tumorales humanas: HeLa (cáncer cervicouterino), SW480 (cáncer de colon), SW620 (metástasis a ganglios linfáticos de cáncer de colon) y A204 (rabdomyosarcoma). Se realizaron pruebas para conocer la actividad antitumoral directa midiendo la inhibición de la proliferación de las células tumorales. Además se realizaron pruebas para detectar la actividad antitumoral indirecta en experimentos con cultivos de células endoteliales de capilar de cerebro bovino y medio acondicionado de células tumorales, y se midió la proliferación de estas últimas para observar su posible inhibición.

2. OBJETIVOS

- Detectar la posible actividad antitumoral directa *in vitro* de los fármacos tipo heparán sulfato: H1, H2, H3 y H4, utilizando las líneas celulares HeLa, SW480, SW620 y A204.
- Detectar la posible actividad antitumoral indirecta de los fármacos mencionados utilizando cultivos de células endoteliales de capilar de cerebro bovino (A023 BBE) y medio acondicionado de células tumorales.
- Confirmar o descartar la información acerca de la actividad antitumoral de los compuestos heparán sulfatos (34), en la cual se menciona que: a) H2, H3 y H4 fueron probados a una concentración de 20 $\mu\text{g/mL}$, reduciendo considerablemente la proliferación de células HeLa, y la presencia de proteínas oncogénicas *in vitro* (myc 60 KDa y 115 KDa). b) Concentraciones mayores (200 $\mu\text{g/mL}$) impidieron totalmente la proliferación de las células HeLa. c) Estos fármacos inducen la diferenciación celular de las células HeLa (estudios histoquímicos confirmados con microscopía electrónica) sobre la línea celular HeLa.

3. HIPÓTESIS

Uno o más de los fármacos tipo heparán sulfato H1, H2, H3 y H4 podrán presentar:

- actividad antitumoral directa sobre una o más de las siguientes líneas celulares tumorales: SW480, SW620, HeLa y A204, lo cual se hará notorio por inhibición en la proliferación de dichas células en presencia de los fármacos;
- actividad antitumoral indirecta detectada por inhibición de la proliferación de las células endoteliales A023 en presencia de los fármacos y medio acondicionado de células tumorales.

Dada la heterogeneidad biológica de las células tumorales, se tendrá un comportamiento distinto con las diferentes líneas celulares empleadas y los fármacos, a las dosis y a los tiempos probados.

4.GENERALIDADES

4.1 CÁNCER

El cáncer puede definirse como la pérdida de la regulación metabólica, debida a alteraciones en el genoma celular que afectan la expresión o función de genes que controlan el crecimiento y la diferenciación celular.

Una célula normal crece, se divide y lleva a cabo funciones específicas de acuerdo al órgano o tejido del cual forma parte; dichas funciones se encuentran perfectamente reguladas. Sin embargo, la regulación metabólica de la célula puede alterarse por diversos factores, entre los que se encuentran agentes físicos (radiaciones), químicos (fármacos o inclusive alimentos), biológicos (virus), o una combinación de los anteriores, de modo que se produce una modificación genética que da origen a una célula tumoral. Entre las características generales de las células tumorales se encuentran la proliferación descontrolada y la formación de metástasis (en células cancerosas). Las alteraciones que presentan a nivel citológico son:

- Alteración en la permeabilidad y transporte a nivel membranar.
- Modificación en la adhesión y en la inhibición por contacto.
- Pérdida o alteración de glicoproteínas y glicolípidos.
- Deterioro en la comunicación intercelular y de la inhibición del crecimiento.
- Alteración en la actividad de algunas enzimas.
- Morfológicamente presentan un gran núcleo en relación al citoplasma y pocas estructuras especializadas.

La proliferación descontrolada de las células puede dar origen a un tumor benigno o a un tumor maligno (cáncer). La característica que distingue a un tumor maligno es la capacidad de establecerse en sitios distantes al crecimiento tumoral primario. En este caso la masa tumoral puede separarse del crecimiento tumoral

primario y viajar a través del sistema circulatorio o por vía linfática para establecerse en otros tejidos adecuados para su desarrollo, dando lugar a una metástasis. Cuando las células se mantienen dentro de una localización estable y no invaden otros tejidos se forma un tumor benigno.

Los principales obstáculos para el tratamiento de las metástasis son la heterogeneidad biológica de las células cancerosas (54) y la pronta aparición de células tumorales con resistencia a los agentes convencionales contra el cáncer (33). Ante esto, la inhibición de la angiogénesis constituye una estrategia nueva que puede aplicarse de manera más general para el tratamiento de las metástasis mediante la manipulación del microambiente del hospedero (8). Las células endoteliales de los vasos sanguíneos tumorales se dividen rápidamente, lo que no ocurre con aquellas que se encuentran en los tejidos normales. La división de células endoteliales es inducida por una gran variedad de mitógenos conocidos como factores angiogénicos.

La observación experimental de que un incremento en el tamaño de un tumor puede estar precedido por un incremento en la formación de nuevos capilares dentro y alrededor del tumor, condujo a J. Folkman en 1971 a establecer la hipótesis de que los tumores sólidos son dependientes de la angiogénesis. Esta hipótesis puede explicar las diversas observaciones clínicas, como el estado de latencia tumoral, la naturaleza clínica benigna de un carcinoma *in situ* y la estrecha correlación de la metástasis de melanoma con la profundidad de la invasión de tumores primarios de más de 0.7 mm.

Se ha demostrado que la administración sistémica de anticuerpos dirigidos contra el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (18), y contra el factor de crecimiento endotelial vascular (19) inhibe el crecimiento *in vivo* de células tumorales, lo que no ocurre en experimentos *in vitro*. El tratamiento de neoplasias teniendo como blanco tanto a las células tumorales (quimioterapia) como al ambiente del órgano (terapia antiangiogénica) ha mostrado tener efectos

aditivos o sinérgicos en tumores 3LL crecidos en ratones (8). Esto sugiere que el crecimiento tumoral puede ser inhibido indirectamente impidiendo la angiogénesis.

El desarrollo de estrategias antiangiogénicas exitosas puede dividirse básicamente en tres líneas de investigación:

- 1.- Ciertos compuestos naturales o sintéticos pueden ser probados para detectar su actividad antiangiogénica en sistemas biológicos.
- 2.- Desarrollo de inhibidores específicos de los factores angiogénicos.
- 3.- Desarrollo de inhibidores específicos de las respuestas endoteliales vasculares que sean parte integral del proceso angiogénico (por ejemplo, mitogénesis, migración y generación de proteasas).

Mientras la heparina promueve la angiogénesis tumoral en algunos sistemas, se descubrió por serendipia que la combinación de heparina y cortisona es un inhibidor de la angiogénesis tumoral, demostrándose esto con ensayos en membrana corioalantoidea de embrión de pollo y en algunos modelos tumorales murinos (5, 22). En forma interesante, este efecto no está ligado con la actividad anticoagulante de la heparina ni con la actividad glucocorticoide de la cortisona. Un fragmento hexasacárido de heparina sin actividad anticoagulante, de 1600 Da y un esteroide sintético sin actividad glucocorticoide ni mineralocorticoide (11 α -hidroxicortisona), pueden reemplazar a los compuestos naturales con una potencia igual o mayor en sus efectos antiangiogénicos (21).

De la misma forma, cierta región hexasacáridica de la heparina, en forma aislada, ha inostrado tener efectos antiproliferativos en monocapas confluentes de células tumorales dependientes del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) (20).

4.2 HEPARINA Y HEPARÁN SULFATOS

Las heparinas y los heparán sulfatos pertenecen a un grupo de compuestos denominados proteoglicanos. Los proteoglicanos son compuestos constituidos por unidades de polisacárido (aproximadamente un 95 %) y proteína (aproximadamente un 5 %). Estos voluminosos polianiones retienen agua y cationes y así forman la sustancia base del tejido conjuntivo.

Los glicosaminoglicanos son las cadenas polisacáridicas de los proteoglicanos y están formados de unidades repetidas de un disacárido que contiene a su vez un derivado amino-azúcar, glucosamina o galactosamina. Por lo menos uno de los azúcares del disacárido tiene un grupo carboxilato o sulfato cargado negativamente.

Los principales glicosaminoglicanos son: hialuronidato, condroitín sulfato, keratán sulfato, heparán sulfato y heparina. El heparán sulfato es un glicosaminoglicano muy similar a la heparina excepto que tiene menos grupos sulfato unidos a N y a O y tiene más grupos N-acetilo; se sabe que participa en el reconocimiento intercelular (1).

A pesar de sus usos diversos para combatir un gran número de padecimientos, la estructura de la heparina no se conoce completamente; tampoco su actividad biológica se comprende en su totalidad. Se sabe que la heparina está constituida por una mezcla heterogénea de polisacáridos sulfatados y es biosintetizada como un proteoglicano (PG); éste a su vez está constituido por un pequeño núcleo central proteico del cual se extienden largas cadenas de polisacáridos (38). El núcleo proteico, rico en residuos de serina-glicina, se sintetiza primero en el retículo endoplásmico rugoso, y posteriormente en el aparato de Golgi sufre modificaciones en las cuales pequeñas regiones de enlace que contienen azúcares neutros se unen a los residuos de serina del núcleo proteico. En esta región de unión un copolímero de repetición con enlaces 1-4 de ácido glucurónico y N-acetilglucosamina se ensambla a través de la adición secuencial de azúcares

activados. Estas cadenas lineales de polisacáridos se extienden hasta llegar a 300 unidades de azúcar antes de que su síntesis termine. Cada cadena es parcialmente des-N-acetilada y secuencialmente N- y O-sulfatada. La variabilidad estructural en el polímero de heparina es el resultado de la naturaleza incompleta de esas modificaciones posteriores a la polimerización (2). Figura 1.

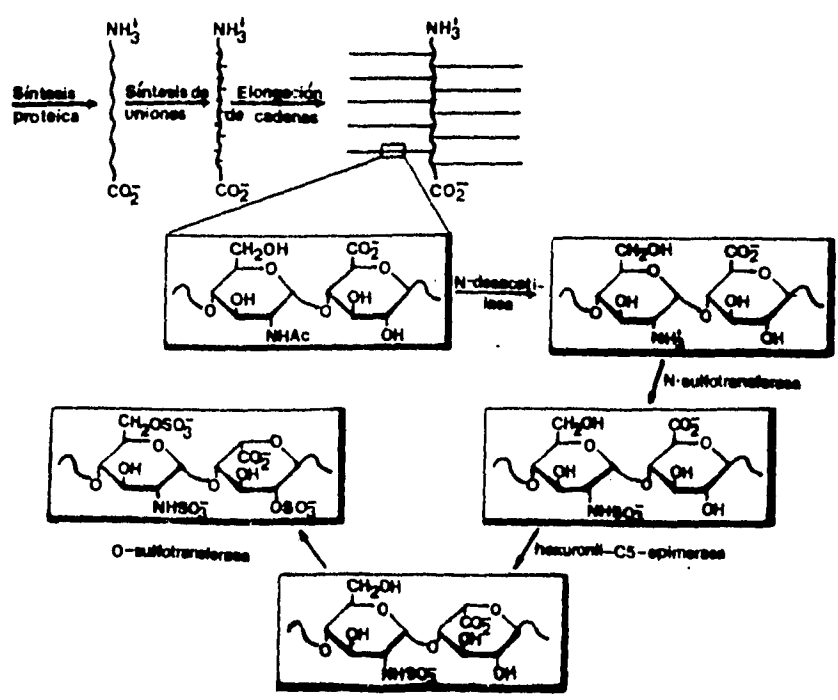


Figura 1. Mecanismo propuesto de biosíntesis de la heparina. (2)

Después de la biosíntesis de PG, peptidasas específicas liberan las cadenas polisacáridas. Endoglicosidasas presentes en los tejidos actúan en esas cadenas polisacáridas libres reduciendo su peso molecular promedio a 13 000 Da. Esas cadenas polisacáridas son llamadas glicosaminoglicanos de heparina (GAG's de heparina). Los GAG's de heparina son preparados comercialmente a partir de tejidos animales que son ricos en células cebadas, como mucosa intestinal porcina y pulmón bovino. Otros mamíferos, aves e inclusive invertebrados como langostas y almejas contienen heparina.

La naturaleza incompleta de las modificaciones posteriores a la polimerización en la biosíntesis de la heparina dan como resultado una gran diversidad en el polímero de heparina. El principal disacárido trisulfatado repite unidades que comprenden hasta un 60-90% de la secuencia de la heparina, mientras que una variedad de disacáridos diferentes comprende el 10-40% remanente del polímero (2). Figura 2.

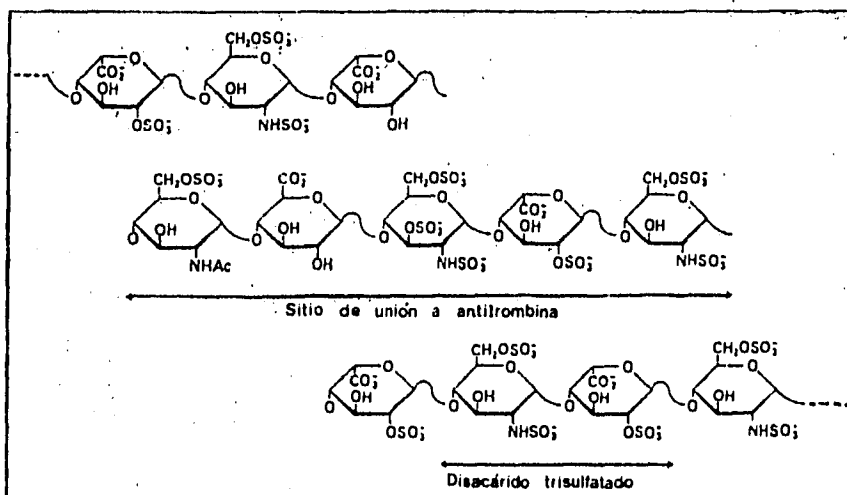


Figura 2. Principales disacáridos componentes en el polímero de heparina y variabilidad en su secuencia. (2)

Las cadenas de heparina tienen una conformación helicoidal extendida principalmente debida a su alta densidad de carga. La heparina está estrechamente enrollada, pero no es rígida debido a un equilibrio entre los diferentes conformeros, de energía equivalente, del residuo α -L-iduronato. La heparina aprovecha esta flexibilidad conformacional en su interacción con proteínas responsables de la actividad biológica heparínica (2).

Los métodos para el procesamiento comercial de la heparina son diversos y generalmente se mantienen en secreto. El proceso básicamente involucra la recolección del tejido apropiado, tratamiento proteolítico, extracción y formación de un complejo utilizando reactivos de apareamiento iónico y precipitación fraccionada. Un tratamiento con bases y decoloración con agentes oxidantes remueve el núcleo proteico remanente obteniéndose un fármaco puro y blanco que corresponde a la heparina (2). La actividad biológica de la heparina y su estructura química pueden diferir dependiendo del proceso utilizado para extraer la porción activa del tejido (37, 45).

Los métodos desarrollados para examinar las propiedades de la heparina incluyen viscometría, dispersión de luz láser, cromatografía de exclusión en gel y electroforesis en gel de poliacrilamida. Con estas técnicas se determina el peso molecular de la heparina y su polidispersidad (2). Esta caracterización está teniendo una importancia creciente, ya que estudios clínicos muestran que ciertas heparinas de peso molecular bajo tienen mejores propiedades biológicas (2). Se han preparado heparinas de bajo peso molecular (LMW) mediante despolimerización parcial controlada, química o enzimática, de los GAG's de heparina comercial. Estas heparinas son polidispersas, con peso molecular promedio de 5 000 Da y un intervalo de peso molecular de 2 000 - 10 000 Da (2).

La heparina es un fármaco natural con múltiples e importantes funciones, y entre ellas la más conocida es quizá su actividad anticoagulante (2,44). La coagulación de la sangre comprende una cascada de reacciones, en las cuales

precursores inactivos de proteasas se transforman en proteasas activas. En la etapa final de la cascada la trombina convierte el fibrinógeno en fibrina. La polimerización espontánea de los monómeros de fibrina produce un coágulo. El proceso entero está bajo el control de un grupo de inhibidores de proteasas, de los cuales el más importante es la antitrombina III, cofactor de la heparina. La antitrombina inhibe las proteasas de los factores de coagulación al formar con ellos complejos equimolares estables. En ausencia de heparina estas reacciones son lentas; en presencia del fármaco, se aceleran mil veces (3). Esta propiedad de la heparina es aprovechada cuando se incrementa la propensión normal de la sangre a coagularse, evitándose la hemostasis, que es la detención espontánea del sangrado proveniente de la ruptura de un vaso sanguíneo.

La heparina posee asimismo actividad antitrombótica y recientemente se ha descubierto que puede desempeñar diversos papeles en la regulación de la angiogénesis (4) y como un cofactor antiproliferativo para factores de crecimiento (5).

Particularmente notable es la actividad antiviral de la heparina. Algunos estudios han demostrado que la heparina se une a un péptido consenso del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV), bloqueando su replicación *in vitro* (35,36) Aún queda mucho por estudiar en este último campo.

4.3 ANGIOGÉNESIS

La angiogénesis se puede definir como la formación de vasos capilares nuevos a partir de vasos sanguíneos preexistentes. En ella se involucran una serie de eventos como son: la degradación de la membrana basal por la acción de proteasas, la migración y proliferación de células endoteliales y la formación de redes capilares (5).

La angiogénesis no se efectúa usualmente en los adultos normales, exceptuando aquella que se realiza en la reparación de heridas, ovulación, menstruación y la formación de la placenta. Ha sido también asociada con ciertos padecimientos entre los que se incluyen la angiogénesis tumoral, artritis reumatoide, retinopatía diabética, aterosclerosis, glaucoma neovascular y hemangiomas (5).

Aunque el mecanismo por el cual se presenta la angiogénesis tumoral parece ser muy similar al que ocurre en condiciones fisiológicas normales, puede ser distinguido por su pérdida de regulación (48). Esto significa que la angiogénesis tumoral continuará hasta que el tumor sea removido o muera el hospedero, en tanto que la angiogénesis que ocurre durante los eventos fisiológicos normales **está regulada en tiempo y espacio.**

4.4 PAPEL DE LA ANGIOGÉNESIS EN EL MANTENIMIENTO TUMORAL

La angiogénesis tumoral parece estar estrechamente relacionada con el crecimiento tumoral progresivo y la metástasis (47,49). Aunque los tumores de 1 a 2 mm. de diámetro pueden recibir todos los nutrientes por difusión, requieren para su crecimiento posterior de un adecuado aporte de sangre a través de la angiogénesis, esto debido a una pérdida deliberada de oxígeno y nutrientes esenciales, así como a la acumulación de desechos tóxicos en el tumor no vascularizado (7, 31, 47).

La inducción de la angiogénesis es mediada por diversas moléculas angiogénicas liberadas por células tumorales y células del hospedero (48).

La angiogénesis es un proceso multietapas que involucra la producción de una cascada de respuestas de las células endoteliales vasculares para regenerar capilares preexistentes o pequeñas vénulas (47,50). Esas respuestas celulares endoteliales eventualmente llevan a la formación de nuevos vasos capilares. El primer evento morfológico observable es que las células endoteliales de los vasos preexistentes comienzan a migrar hacia el estímulo angiogénico. Sin embargo,

antes de que la migración pueda ocurrir, la membrana basal de los vasos debe ser degradada para permitir la migración de las células endoteliales hacia el exterior del vaso sanguíneo. La disolución de la membrana se efectúa mediante la acción de proteasas derivadas de células endoteliales. Aunque las células endoteliales en migración no proliferan, en la región situada inmediatamente atrás de estas células se efectúa la proliferación endotelial. Finalmente, los brotes permanecen juntos para formar asas, estableciendo un circuito completo, que es seguido por un flujo sanguíneo. Figura 3.

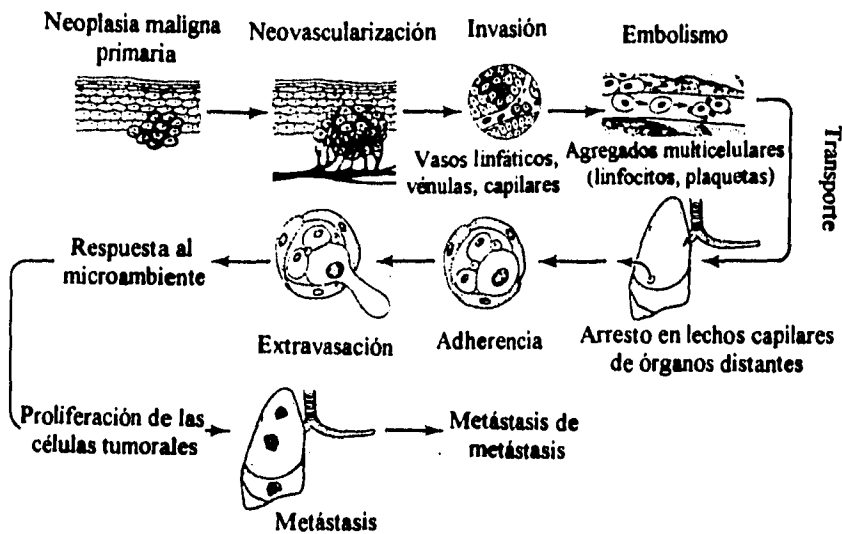


Figura 3. El proceso de metástasis. (8)

La degradación de la matriz extracelular del vaso sanguíneo preexistente sugiere que uno de los aspectos de la respuesta celular endotelial es la elaboración de proteasas. Se ha demostrado que el tratamiento de células endoteliales capilares con factores angiogénicos derivados de células tumorales y no tumorales, estimula la producción de colagenasa y activador de plasminógeno en esas células (11). El activador de plasminógeno es responsable de la segmentación del plasminógeno para dar plasmina, que es una serina proteasa de amplio espectro. Tanto el activador de plasminógeno, como la colagenasa, podrían ser usados por las células endoteliales para degradar la membrana basal circundante. La habilidad de esos mismos factores angiogénicos para estimular la movilidad fue demostrado por Mullins y Rifkin (15) con el ensayo de vía fagocinética, en el cual las células migratorias se colocan en una superficie cubierta con oro coloidal de manera que, al ir migrando, fagocitan o empujan a un lado las partículas de oro coloidal, dejando así un rastro en la superficie. Con esto se demostró que los factores que habían estimulado la proliferación celular endotelial y la producción de proteasas, también estimulaban la migración celular endotelial capilar. Fig 4.

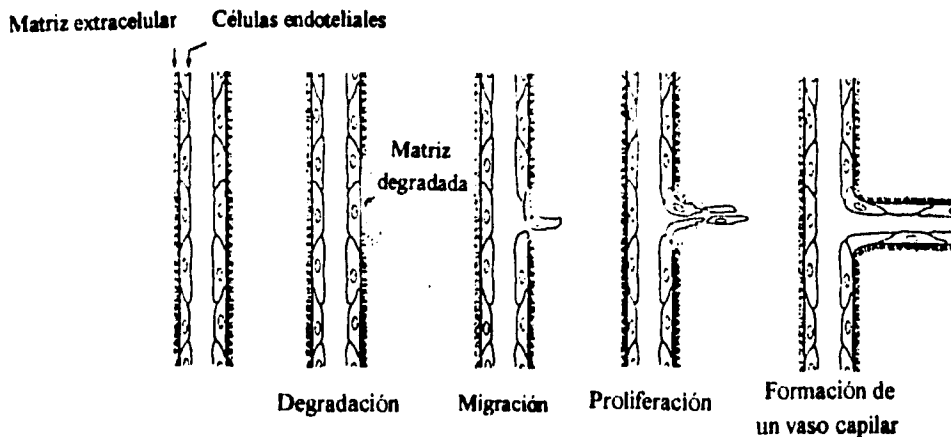


Figura 4. Formación de un vaso capilar sanguíneo. (39)

Sin embargo, algunos factores angiogénicos no actúan estimulando directamente las células endoteliales, sino atrayendo y/o estimulando otros tipos de células, como las células inflamatorias, para elaborar y liberar factores que actúan directamente en las células endoteliales.

Factores angiogénicos

Se han identificado diversos factores angiogénicos, y de especial interés son aquellos que han sido identificados tanto en células tumorales como en células que se encuentran rutinariamente en áreas de crecimiento celular de tumores sólidos, como células cebadas y macrófagos.

El primer intento para aislar un factor angiogénico de un tumor sólido fue realizado por Folkman y cols. en 1971 (31). Ellos identificaron una fracción angiogénica activa de un carcinoma de rata compuesto por más del 50% de carbohidratos, 25% RNA, 10% proteína, así como lípidos, y ellos le llamaron Factor de Angiogénesis Tumoral (TAF). Recientemente, se ha aislado un componente no proteico de bajo peso molecular (aproximadamente 200 Da) del TAF, que es angiogénico y estimula la proliferación de células endoteliales.

Los factores angiogénicos mejor caracterizados hasta la fecha son los factores de crecimiento que se unen a heparina (HBGF's), que son conocidos también como factores de crecimiento de fibroblastos (FGF's). Esas proteínas de aproximadamente 16 000-19 000 de peso molecular han sido bien caracterizadas estructuralmente, y sus cDNA clonados y secuenciados. Existen principalmente dos especies de FGF distinguidos por su afinidad relativa por la heparina, su carga y su secuencia de aminoácidos. La forma catiónica (FGF básico ó HBGF II) ha sido identificada en una gran variedad de tejidos cancerosos y normales, incluyendo condrosarcomas, hepatomas y melanomas. También ha sido encontrada en macrófagos, que se piensa tienen un papel en la angiogénesis tumoral (7). La forma aniónica (FGF ácido ó HBGF I) se encuentra principalmente en cerebro y

tejido nervioso. Además de estimular la angiogénesis en experimentos *in vivo*, los FGF's estimulan la producción de proteasa celular endotelial, la proliferación y la migración *in vitro* (7). Los efectos angiogénicos de los FGF's son iniciados presumiblemente por su interacción con receptores de proteína específicos de las membranas celulares endoteliales. Esos receptores no han sido aún completamente caracterizados a nivel molecular.

Se ha obtenido un factor angiogénico del medio acondicionado obtenido de células de carcinoma de colon, al cual se le ha llamado angiogenina (7). Esta proteína presenta una notable homología con la ribonucleasa pancreática y posee actividad de ribonucleasa; sin embargo la relación entre su actividad enzimática y su actividad angiogénica es desconocida. De manera interesante, los únicos ensayos utilizados para la identificación de este factor han sido los realizados en CAM (membrana corioalantoidea de embrión de pollo), y a diferencia de los HBGF's, no ha sido demostrado que la angiogenina sea un factor de crecimiento celular endotelial. Así, la actividad angiogénica de la angiogenina podría llevarse a cabo en forma indirecta.

Se ha sugerido un papel del factor de crecimiento transformante α (TGF α) en la angiogénesis tumoral, mediante estudios que demuestran la localización de esta proteína en células de tumores sólidos, las cuales bordean los capilares infiltrantes del hospedero (16). El TGF α fue un factor que se identificó en un principio por su capacidad de producir en las células normales un fenotipo transformado; es un homólogo del factor de crecimiento epidérmico (EGF) y probablemente interactúa con el receptor para EGF. Está presente en una gran variedad de células transformadas viralmente, así como en tumores y en algunos tejidos embrionarios normales. Este factor no sólo estimula la angiogénesis en experimentos *in vivo*, sino que es mitogénico para las células endoteliales por estimulación de la síntesis de DNA (16).

TGF β , al igual que TGF α , produce un fenotipo transformado en células de cultivo normales y es angiogénico *in vitro*. Además, sorpresivamente, inhibe la proliferación celular endotelial inducida por FGF en experimentos *in vitro*. Este factor ha sido identificado en una variedad de tejidos transformados y normales. Su papel en la angiogénesis puede involucrar su capacidad para actuar como quimioatrayente para macrófagos y como estimulador de la secreción de macrófagos. Estas células, junto con las células cebadas, están presentes en grandes cantidades en algunas áreas de tumores sólidos en crecimiento. Es posible que el TGF β derivado de tumor actúe para reclutar macrófagos y estimular la liberación de factores angiogénicos derivados de macrófagos, como bFGF y TNF α .

Los factores angiogénicos mencionados pueden ser aislados de células tumorales, aunque no es la única fuente. Otros factores que son angiogénicos por sí mismos o que potencian la angiogénesis han sido identificados en macrófagos y/o en células cebadas. Un ejemplo es el factor de necrosis tumoral (TNF) o caquectina, que es un factor angiogénico derivado de macrófagos. Este factor no sólo estimula la neovascularización en los experimentos en córnea, sino que también estimula la migración celular endotelial *in vitro*. La heparina, que también estimula la migración celular endotelial, es secretada por células cebadas; también potencia la neovascularización de tumores en el ensayo CAM. De manera interesante, se conoce que la heparina interactúa con los FGF's, que son factores angiogénicos potentes.

Tabla 1. Factores angiogénicos (7)

| FACTOR ANGIOGÉNICO | CARÁCTER MOLECULAR | FUENTE | ACTIVIDAD EN CELULAS ENDOTELIALES | MECANISMO ANGIOGÉNICO |
|----------------------------|--|---|--|-----------------------|
| bFGF (HBGF II) | Proteína catiónica (16-19 KDa) | Variedad de células normales y tumorales | Mitogénico, quimiotáctico, producción de proteasa | Directo |
| aFGF (HBGF I) | Proteína aniónica (17-20 KDa) | Tejidos normales, especialmente ojo y cerebro | Mitogénico, quimiotáctico, producción de proteasa | Directo |
| TAF | RNA, proteína, carbohidrato, componentes lipídicos | Carcinoma | No probadas | Desconocido |
| TAF de bajo peso molecular | 200 Da, no caracterizado | Carcinoma | Mitogénico | Desconocido |
| Angiogenina | Proteína de 14.4 KDa | Adenocarcinoma humano | No reportadas | Indirecto (?) |
| TGF α | Proteína de 5.6 KDa | Tejidos embrionarios normales y tumores sólidos | Mitogénico | Directo |
| TGF β | Proteína homodimérica unida por puente disulfuro | Tejidos normales y transformados | Inhibe mitogénesis y migración | Indirecto |
| TNF α | Proteína de 17 KDa | Macrófagos | Quimiotáctico, estimula la liberación de interleucina 1 y cambios morfológicos, inhibe mitogénesis | Indirecto |
| Heparina | Mucopolisacárido | Células cebadas | Migración | Indirecto |

La vascularización de un tumor es muy importante en el desarrollo de la metástasis, proveyendo la ruta para la diseminación de las células tumorales (7). Si se retarda o evita la vascularización, se presenta un estado de latencia en el tumor.

El estado prevascularizado de un tumor está asociado con tumores benignos locales, mientras que el estado vascularizado está asociado con tumores capaces de producir metástasis (8). Estudios realizados en diferentes tipos de cáncer utilizando microscopio de luz e inmunohistoquímica han mostrado que el número y la densidad de los microvasos en los diferentes cánceres humanos se correlacionan directamente con su capacidad de invadir y producir metástasis (9). No todos los tumores angiogénicos producen metástasis, pero la inhibición de la angiogenesis evita el crecimiento de células tumorales en sitios primarios y secundarios y así puede evitar el surgimiento de metástasis (8).

El proceso de metástasis consiste en una serie de etapas secuenciales (8) (figura 3) que siguen los siguientes principios: primero, para producir metástasis, las células tumorales deben completar todas las etapas en el proceso. Como un todo, la metástasis es altamente selectiva y favorece la sobrevivencia de una subpoblación minoritaria de células metastásicas preexistentes en la neoplasia primaria. Segundo, las neoplasias muestran propiedades metastásicas y biológicas heterogéneas (10). Tercero, la metástasis resulta tanto de las propiedades de las células tumorales como de factores del hospedero (8). Cada una de estas etapas es un posible blanco para la intervención farmacológica en la angiogénesis tumoral y la metástasis.

En algunos pacientes se pueden desarrollar metástasis muchos años después de la extirpación de la neoplasia primaria y una cura aparente. Se han desarrollado diversas hipótesis para explicar el estado de latencia de las metástasis. La conversión repentina de células quiescentes a células que se dividen activamente podría ocurrir por un cambio en el ciclo celular con progresión de G0 a G1 (8). El

factor que podría iniciar esa conversión es desconocido. Alternativamente, el tamaño de las metástasis tumorales puede ser controlado por la inmunidad específica y no específica del hospedero, por lo cual un cambio en la antigenicidad o la supresión de la inmunidad del hospedero pueden inclinar el balance en favor de las células tumorales. Un trauma en tejidos normales es seguido generalmente por inflamación y reparación que depende de la producción de factores de crecimiento órgano-específicos. Esos factores pueden también estimular la proliferación de células tumorales que poseen los receptores adecuados (10). No está claro aún si un trauma produce un cambio hacia el fenotipo angiogénico en las células tumorales, pero el conocimiento creciente del proceso de angiogénesis ha dado lugar a la hipótesis reciente que dice que el final de la latencia del tumor puede ser explicada por una repentina conversión de un tumor al fenotipo angiogénico. Eso puede ocurrir por un incremento en los estimuladores de la angiogénesis, un decremento en los inhibidores de la angiogénesis o una combinación de ambos (8). La elucidación de los factores que gobiernan la angiogénesis tumoral puede ayudar a resolver este fenómeno.

4.5 SISTEMAS EMPLEADOS PARA EL ESTUDIO DE LA ANGIOGÉNESIS

Aunque la inducción mutua de proliferación vascular del hospedero y el crecimiento tumoral fue observada desde hace más de 80 años, no fue sino hasta 1967 cuando se desarrolló el primer experimento para estudiar la vascularización inducida por el tumor. Algunas investigaciones hicieron posible el estudio de la angiogénesis con el desarrollo de modelos animales *in vivo* e introdujeron el concepto de que los tumores producen (o promueven la producción efectuada por células no malignas) algún factor o factores responsables de la proliferación vascular.

Dos de los métodos más utilizados para estudiar la angiogénesis *in vivo* son el ensayo con membrana corioalantoidea de embrión de pollo (CAM) y el ensayo en córnea de conejo. El crecimiento de vasos capilares extraembrionarios del ave en el ensayo CAM puede ser observado y cuantificado poniendo un embrión de 4 días en cultivo. En el ensayo en córnea de conejo, los vasos sanguíneos capilares son estimulados a crecer en la córnea avascular implantando en su interior una tableta de liberación lenta que contenga un factor angiogénico, como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) o bien, células tumorales. Este último ensayo es muy caro y consume mucho tiempo para ser de uso práctico por la gran cantidad de muestras que es necesario analizar para estudios detallados.

Otros modelos que se han utilizado son los ensayos en córnea de ratas. La disponibilidad de tener ratones genéticamente alterados permite realizar eventualmente pruebas del papel de genes específicos en la angiogénesis.

Para ampliar el conocimiento con los estudios *in vivo*, ha sido necesario aislar células capilares microvasculares, crecerlas en cultivo, y desarrollar ensayos para medir separadamente la degradación de la matriz, migración, proliferación y la formación de tubos tipo capilar ("formación de tubos"). Ensayos específicos y cuantitativos han permitido la identificación de estimuladores angiogénicos e inhibidores que afecten dichas etapas. En contraste, los ensayos que miden la formación de tubos requieren frecuentemente la degradación de la matriz y/o la migración celular antes de que las células endoteliales se puedan alinear en tubos capilares. Así, estos últimos ensayos miden la suma de diversas actividades celulares endoteliales.

4.6 TERAPIA DE METÁSTASIS POR INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS

Las dificultades más grandes para el tratamiento de metástasis son la heterogeneidad biológica de las células cancerosas y el surgimiento rápido de

células tumorales con resistencia a muchos agentes anticancerígenos convencionales. La inhibición de la angiogénesis, sin embargo, provee un avance nuevo y más general para el tratamiento de metástasis mediante la manipulación del microambiente del hospedero. Las células endoteliales en vasos sanguíneos tumorales se dividen rápidamente, lo que no ocurre en los tejidos normales (8). La angiogénesis está regulada en forma endógena por un gran número de factores. La división de células endoteliales es inducida por una gran variedad de mitógenos llamados factores angiogénicos (8). Tabla 2.

Tabla 2. Reguladores endógenos de la angiogénesis

Factores estimulantes:

Factor ácido de crecimiento de fibroblastos (aFGF)
Factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF)
Angiogenina
Heparinasa
Factor de crecimiento de hepatocitos
Interleucina-8
Factor de crecimiento de placenta
**Factor de crecimiento de células endoteliales derivado de
plaquetas**
Pleotropina
Prostaglandinas E1 y E2
Factor de crecimiento transformante α
Factor de crecimiento transformante β
Factor de necrosis tumoral α
**Factor de crecimiento endotelial vascular/ Factor de
permeabilidad vascular**

Factores inhibitorios:**Angiostatina****Inhibidor derivado del cartilago****Heparinasa****IFN α** **IFN β** **Factor 4 de plaquetas****Fragmento de prolactina****Protamina****Trombospondina****Inhibidor tisular de metaloproteinasa**

La administración sistémica de anticuerpos contra el factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF) (18), factor de crecimiento endotelial vascular (19), o de angiogenina (8) ha mostrado producir inhibición *in vivo* (pero no *in vitro*) del crecimiento de células tumorales, sugiriendo que el crecimiento tumoral puede ser suprimido indirectamente por inhibición de la angiogénesis. El tratamiento de neoplasias dirigido simultáneamente contra las células tumorales (quimioterapia) y el medio ambiente del órgano ha producido un efecto terapéutico aditivo o sinérgico en ratones portadores del tumor 3LL (12).

En los adultos, la angiogénesis fisiológica (reparación de heridas) está regulada por un balance de moléculas positivas y negativas (8). Diversos factores que pueden regular negativamente o inhibir la angiogénesis han sido incorporados en los tratamientos clínicos; el más ampliamente estudiado ha sido el interferón α (IFN α). La administración diaria en forma crónica de dosis bajas de IFN α ha inducido una regresión completa de hemangiomas que amenazaban la vida de infantes y sarcoma de Kaposi altamente vascularizado (8). Los efectos del interferón α son debidos probablemente a una regulación negativa de la expresión

de mRNA del bFGF y producción de la proteína (8). Otros inhibidores de la angiogénesis, como la trombospondina-1 (TSP1), funcionan antagonizando a bFGF o a otros factores angiogénicos. La producción de TSP1 está regulada por p53 tipo silvestre. La mutación o pérdida de p53 tipo silvestre está asociada con la pérdida de la producción de TSP1 y una inclinación del balance hacia la estimulación de la angiogénesis (8).

Los mecanismos que controlan la angiogénesis en los diferentes tumores son probablemente muy diversos. Para maximizar la eficacia terapéutica, debe determinarse primero el llamado perfil angiogénico de cada tumor para utilizar agentes antiangiogénicos específicos.

4.7 FÁRMACOS ANTIANGIOGÉNICOS

4.7.1 ANGIOSTATINA

O'Reilly y sus colaboradores reportaron el aislamiento y caracterización de un factor antiangiogénico producido por el carcinoma de pulmón Lewis (3LL) transplantable murino que se hizo crecer en ratones singénicos (23). Se trata de un fragmento de plasminógeno de 38 KDa que ha sido llamado angiostatina. La angiostatina tiene una vida media larga en la circulación y puede actuar de manera endócrina o parácrina para inhibir la proliferación de células endoteliales. Cuando se realiza la resección de un tumor local, entonces repentinamente se disminuye o elimina la angiostatina circulante, y las células endoteliales que rodean pequeñas metástasis pueden proliferar y la masa tumoral puede expandirse. Además reportaron que la administración sistémica de angiostatina (no así de plasminógeno intacto) inhibe la vascularización y el crecimiento de metástasis de pulmón (23). Estos hallazgos tienen gran valor para la comprensión de la patogénesis de la metástasis y para el diseño racional de métodos para el tratamiento de metástasis establecidas.

4.7.2 HEPARINA

Recientemente se ha descubierto que la heparina posee diversos papeles en la regulación de la angiogénesis. La heparina se une a varios factores de crecimiento, que reciben el nombre de: factores de crecimiento de unión a heparina (HBGF), aumentando la actividad y estabilidad de éstos. Un ejemplo es el factor de crecimiento celular endotelial (ECFG), que estimula la angiogénesis.

En presencia de ciertos esteroides que inclusive no poseen actividad glucocorticoide ni mineralocorticoide, la heparina, o fragmentos específicos de heparina sin actividad anticoagulante, pueden inhibir la angiogénesis (5, 21, 22, 51, 52). Judah Folkman y Mike Klagsbrun propusieron que en presencia de ciertos esteroides, los GAG's heparinoides recubren las paredes vasculares restringiendo el crecimiento capilar. Esta microvascularización puede responder rápidamente a factores de crecimiento que se unen a heparina producidos durante la ovulación, heridas, reacciones inmunológicas de inflamación y por tumores.

La heparina también une e inactiva proteínas catiónicas proinflamatorias, incluyendo las citotoxinas derivadas de eosinófilos. Agonistas de los adrenorreceptores β_2 pueden aumentar la proliferación de músculo liso indirectamente suprimiendo la degranulación de las células cebadas, evitando de este modo la liberación de heparina con una pérdida de sus efectos antiproliferativos y antiinflamatorios (24)

Los heparán sulfatos, que son glicosaminoglicanos estrechamente relacionados con la heparina, desempeñan un papel central en el mantenimiento del músculo liso vascular en un estado estable. La degradación de los heparán sulfatos en la matriz del músculo liso se efectúa por la heparanasa que liberan los monocitos infiltrados de la lesión aterosclerótica, y se ha propuesto como una etapa permisiva para la respuesta proliferativa subsecuente del músculo liso vascular a factores de crecimiento (24).

Por otro lado, la heparina actúa en una etapa de proliferación dependiente de proteína quinasa C (PKC). Un número de mitógenos importantes de músculo liso vascular, incluyendo el factor de crecimiento epidérmico y el factor alfa de crecimiento transformante (TGF α), son resistentes a los efectos de la heparina (24).

Paradójicamente la heparina potencia los efectos de diversos mitógenos mediante su unión y previniendo su inactivación rápida, sugiriendo que sus efectos inhibitorios podrían ser observados solamente bajo condiciones donde los factores de crecimiento que se unen a la heparina no proveen el estímulo mitogénico. La evaluación del papel de la heparina es aún más complicado por su habilidad de unir e inhibir al factor de crecimiento transformante β (TGF β), una citocina que reduce la respuesta de crecimiento de músculo liso bajo diversas condiciones.

Secuencias específicas en el polímero de heparina pueden interactuar con pequeños péptidos consenso altamente conservados encontrados en muchas proteínas que se unen a heparina. A través de esas secuencias consenso, la heparina activa o inhibe proteínas entre las que se incluyen ciertas enzimas.

Se ha demostrado que cierta región heparínica hexasacárida aislada, cuya estructura es: [IdoA(2-OSO₃) α 1-4GlcNSO₃(6-OSO₃) α 1-4]2IdoA(2-OSO₃) α 1-4AManR(6-OSO₃), puede actuar como un antagonista en la proliferación de algunas células dependientes del factor básico de crecimiento de fibroblastos (bFGF); tal es el caso de las células endoteliales adrenocorticales (ACE) de las cuales evita la unión *in vitro* de este factor a monocapas confluentes de dichas células (20).

Utilizando modelos celulares, se ha visto que otra región específica de la heparina, (ISMS)₃, con la estructura [IdoA(2-OSO₃) α 1-4AManR(6-OSO₃)₃], se une estrechamente a bFGF e inhibe su actividad en receptores (5). Dos análogos de (ISMS)₃, GM1306 y GM1474, cuyas estructuras aún no han sido publicadas, inhiben la proliferación dependiente de bFGF de células endoteliales

adrenocorticales *in vitro*, sin influenciar la proliferación de células pancreáticas humanas o células de adenocarcinoma mamario. Se ha reportado que ambos heparinoides inhiben la angiogénesis en estudios realizados en membrana corioalantoidea de embrión de pollo (CAM), y suprimen el crecimiento de adenocarcinoma de mama (células MDA-231) y del adenocarcinoma pancreático humano multirresistente a fármacos (células CaPan-2) en ratones desnudos.

Recientemente se ha demostrado que la heparina puede inhibir la expresión del gen de colagenasa. Esto es de gran importancia, ya que la colagenasa es una enzima proteolítica importante para la degradación de la membrana basal de los vasos sanguíneos y la matriz extracelular en el proceso de angiogénesis (53).

De esta manera, los oligosacáridos de heparina que inhiben la angiogénesis pueden tener un potencial terapéutico indicado para el tratamiento de tumores sólidos malignos en humanos (5).

4.7.3 PENTOSÁN POLISULFATO (PPS)

Estudios realizados por Zugmaier y cols., demostraron que el heparinoide pentosán polisulfato (PPS) puede bloquear el crecimiento de injertos tumorales humanos subcutáneos en ratones desnudos, y la angiogénesis inducida por el factor de crecimiento de fibroblastos derivado del sarcoma de Kaposi, que se une a la heparina (K-FGF). Estos investigadores comprobaron también que las líneas celulares tumorigénicas MDA-MB-231, MDA-MB-435 y MDA-MB-468 (cáncer de mama), DU-145 (cáncer de próstata), A-549 (cáncer de pulmón), A-204 (rabdiosarcoma) y A-431 (carcinoma epidermoide) liberan al medio factores de crecimiento que estimulan el crecimiento de células endoteliales, epiteliales y fibroblastos. Mostraron que los factores de crecimiento que se unen a la heparina contribuyen sustancialmente a esa actividad parácrina y que PPS inhibe ese estímulo (17).

A pesar de que seis de las siete líneas celulares probadas fueron resistentes al PPS en experimentos de clonación en agar blando y parecieron no depender de la estimulación autócrina de los factores de crecimiento que se unen a la heparina, el crecimiento subcutáneo de tumores de todas las líneas celulares mencionadas, en ratones desnudos atímicos, fue inhibido por inyecciones diarias intraperitoneales de PPS en una relación dosis-dependiente (17).

5. METODOLOGÍA

5.1 CULTIVO DE LÍNEAS CELULARES TUMORALES IN VITRO.

Las células que se encuentran dentro de un organismo pueden crecer debido a que reciben todos los nutrientes necesarios para su desarrollo. Las células tumorales pueden crecer *in vitro* empleando un medio de cultivo que contenga todos los elementos necesarios para su crecimiento, como son: una fuente de carbono, como la glucosa, una fuente de nitrógeno y cofactores, aminoácidos esenciales y vitaminas, así como oligoelementos y factores de crecimiento que aporta el suero fetal bovino. Además existen células que requieren de ciertos factores especiales que deben ser adicionados al medio para el crecimiento adecuado.

De acuerdo a la procedencia y al tipo de subcultivo, los cultivos se clasifican en:

- 1.- Cultivo primario: es aquel que se obtiene directamente del tejido animal; está constituido por células bien diferenciadas cuya permanencia en cultivo es corta.
- 2.- Cultivo secundario: se obtiene a partir de un cultivo primario, y se comporta de la misma forma que éste.
- 3.- Cepa celular: se trata de un cultivo celular bien caracterizado. Consta básicamente de tres fases: inicio, reproducción (división celular) y muerte.
- 4.- Línea celular: se refiere a una estirpe celular, que se divide aceleradamente, y que muestra un tiempo de vida indefinido, es decir, que es inmortal bajo condiciones de cultivo establecidas.

En el presente trabajo se seleccionaron las líneas celulares HeLa, SW480, SW620 y A204 para detectar la posible actividad antitumoral directa de los fármacos tipo heparán sulfato H1, H2, H3 y H4.

5.1.1 GENERALIDADES DE LA LÍNEA CELULAR HeLa (Carcinoma epitelioide de cérvix humano)(11)

HeLa fue la primera línea celular epitelioide de tipo aneuploide derivada de un tejido humano y mantenida continuamente por una serie de cultivos celulares. Fue aislada en 1951 de un carcinoma de cérvix de una mujer negra de 31 años de edad (Cancer Res. 12:264, 1952). Una reexaminación reciente de las muestras originales efectuadas por Jones et al., (Obstet. Gynecol. 38:945-949, 1971) diagnosticaron el tumor como un adenocarcinoma. Desde su origen, esta ha sido una de las líneas celulares más estudiadas. Después de varios congelamientos y recultivos, la línea fue reactivada en noviembre de 1961 por la American Type Culture Collection. La línea fue sometida a aproximadamente 76-88 pases y fue considerada muy similar a las características descritas en los estudios clásicos de Scherer, Syverton y Gey (J. Exp. Med. 97:695, 1953).

Datos generales de las células HeLa:

- **Número de subcultivos seriados del tejido de origen:** Desconocido; 90-102 desde el cultivo recibido por W. F. Scherer en 1952.
- **Características de crecimiento de células descongeladas:** Un inóculo de $0.5-1.0 \times 10^5$ células viables/mL en medio de cultivo, a 37°C , con una atmósfera de 5% de dióxido de carbono y 95% de aire, se multiplica aproximadamente 15 veces en 7 días.
- **Morfología:** Tipo epitelial.
- **Cariología:** Distribución de frecuencia cromosómica en 50 células: $2n=4$

| | | | | | | | | | | | | |
|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|----|----|-----|-----|
| CÉLULAS: | 1 | 5 | 2 | 5 | 9 | 13 | 8 | 3 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| CROMOSOMAS: | 70 | 78 | 79 | 80 | 81 | 82 | 83 | 84 | 85 | 86 | 147 | 164 |

Hay un cromosoma telocéntrico en 98% de las células, 100% de aneuploidía en 1385 células examinadas. Han sido reportados en la literatura 4 marcadores cromosómicos característicos de HeLa: M1 es un rearrreglo de brazo largo y centrómero del cromosoma 1 y el brazo largo del cromosoma 3; M2 es una combinación del brazo corto del cromosoma 3 y el brazo largo del cromosoma 5; M3 es un isocromosoma del brazo corto del cromosoma 5; M4 consiste en el brazo largo del cromosoma 11 y un brazo del cromosoma 19.

- **Marcadores cromosómicos de HeLa:** Una copia de M1, una copia de M2, 4-5 copias de M3 y 2 copias de M4 reveladas por patrones de bandeó G.
- **Esterilidad:** Resultaron negativas las pruebas para *Mycoplasma*, bacterias y hongos.
- **Especie:** confirmada como humana con pruebas de inmunofluorescencia.
- **Susceptibilidad a virus:** Es susceptible a poliovirus tipo 1 y adenovirus tipo 3.
- **Transcriptasa reversa:** No detectada.
- **Isoenzimas:** G6PD tipo A.
- **Proporcionada por:** W.F. Scherer, Departamento de Microbiología, Cornell University School of Medicine, Nueva York, N.Y.
- **Preparada y caracterizada por:** Child Research Center of Michigan, Detroit, Mi, y ATCC, Rockville, MD.
- **Medio de cultivo:** D-MEM suplementado con glutamina, HEPES, insulina, aminoácidos no esenciales, antibiótico-antimicótico y 10% de suero fetal bovino.

5.1.2 GENERALIDADES DE LA LÍNEA CELULAR SW480 (Adenocarcinoma de colon humano) (11)

SW480 es una de las 11 líneas celulares de adenocarcinoma colorrectal que fueron aisladas por A. Leibovitz y colaboradores durante el periodo de 1971- 1975 (A. Leibovitz, et al., Cancer Res. 36: 4562-4569, 1976). El tumor de origen (adenocarcinoma de colon grado III-IV) fue fragmentado y varias fracciones fueron sembradas en cajas de cultivo con derivados del medio L-15 suplementado con 10% de suero fetal bovino, insulina (0.01 U/mL) y cortisol (10 U/mL). La población creció inicialmente como una mezcla de pequeñas islas de células epiteliales y células bipolares individuales que llegaron a ser células epiteloides una vez establecidas. El microvilli fue evidente, fue producido antígeno carcinoembrionario (CEA) y las células fueron tumorigénicas en ratones desnudos.

Un cultivo del pase 91 fue aportado a la ATCC por A. Leibovitz en noviembre de 1978.

Datos generales de las células SW480:

- **Número de subcultivos seriados a partir del tejido de origen:** 96.
- **Características de crecimiento de las células descongeladas:** Un inóculo de 10^5 células viables/mL en el medio de cultivo se multiplica aproximadamente 5 veces en 7 días a una temperatura de 37° C, renovándose el medio después de 3 días.
- **Morfología:** Tipo epitelial.
- **Cariología:** Distribución de frecuencia cromosómica en 50 células: $2n=46$

CÉLULAS: 1 1 3 12 7 12 10 1 1 1

CROMOSOMAS: 51 53 54 55 56 57 58 59 110 111

El número de cromosomas de la línea germinal es hipotriploide y 11-12 marcadores cromosómicos fueron comunes.

- **Esterilidad:** Las pruebas para *Mycoplasma*, bacterias, hongos, protozoarios y virus resultaron negativas.
- **Especie:** Confirmada como humana por inmunofluorescencia y análisis de isoenzimas (G6PD tipo B y LDH típica).
- **Perfil HLA:** A2, B8, B17.
- **Grupo sanguíneo:** A.
- **Tumorigenicidad:** Los tumores se desarrollan en un mes con una frecuencia del 100% (5/5) en ratones desnudos inoculados subcutáneamente con 10^7 células.
- **Transcriptasa reversa:** No detectada.
- **Producción de antígeno carcinoembrionario:** 0.7 ng/ 10^6 células en 10 días.
- **Antígeno Específico de Colon (CSAp):** Negativo.
- **Antígeno 3 de Colon:** Negativo.
- **Isoenzimas:** G6PD, B; PGM1, 2; PGM3, 1; PGD, A; PEP-D, 1; ES D, 1.
- **Proporcionada por:** A. Leibovitz, Clínica Scott White, Temple, TX.
- **Preparada y caracterizada por:** ATCC, Rockville, MD.
- **Medio de cultivo:** D-MEM suplementado con glutamina, HEPES, insulina, aminoácidos no esenciales, antibiótico-antimicótico y 10% de suero fetal bovino.

5.1.3 GENERALIDADES DE LA LÍNEA CELULAR SW620 (Metástasis a nódulo linfático de adenocarcinoma de colon humano) (11)

SW620 fue aislado del tejido de un hombre caucásico de 51 años de edad (Grupo sanguíneo A, Rh+), el mismo individuo mencionado en la línea celular SW480. Una recurrencia del padecimiento resultó en una metástasis diseminada del colon a una masa abdominal. SW620 fue iniciada por A. Leibovitz y cols., (Cancer Res. 36:4562-4569, 1976) a partir de un nódulo linfático, en la misma forma en que se

derivó SW480 a partir del adenocarcinoma primario el año anterior. La línea celular establecida consistió principalmente en células bipolares y esféricas pequeñas e individuales sin microvilli. Las células sintetizan solamente pequeñas cantidades de antígeno carcinoembrionario (CEA) y son altamente tumorigénicas en ratones desnudos. (J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 59:221-226, 1977).

Un cultivo del pase 79 fue aportado a la ATCC por A. Leibovitz en noviembre de 1978.

Datos generales de SW620:

- **Número de subcultivos seriados a partir del tejido de origen:** 96.
- **Características de crecimiento de las células descongeladas:** Un inóculo de 10^5 células/mL se multiplica aproximadamente 30 veces en 9 días a 37°C renovando el medio de cultivo al menos dos veces.
- **Morfología:** Tipo epitelial.
- **Cariología:** Distribución de frecuencia cromosómica en 50 células: $2n=46$

| | | | | | | | | |
|-------------|----|----|----|----|----|----|----|----|
| CÉLULAS: | 1 | 1 | 4 | 14 | 19 | 7 | 3 | 1 |
| CROMOSOMAS: | 45 | 47 | 48 | 49 | 50 | 51 | 52 | 53 |

El número de cromosomas de la línea germinal es hiperdiploide con el componente 2S presentado en el 12% y 11 cromosomas marcadores fueron comunes a metafases S. Uno de los 11 marcadores [7 (7p; 11p)] fue disómico.

- **Esterilidad:** Las pruebas para *Mycoplasma*, bacterias, hongos, protozoarios y virus resultaron negativas.
- **Especie:** Confirmada como humana mediante pruebas de inmunofluorescencia y análisis de isoenzimas.
- **Grupo sanguíneo:** A.

- **Tumorigenicidad:** Los tumores se desarrollan en 21 días con una frecuencia del 100% (5/5) en ratones desnudos inoculados subcutáneamente con 10^7 células.
- **Transcriptasa reversa:** No detectada.
- **Producción de Antígeno Carcinoembrionario:** 0.15 ng/ 10^6 células en 10 días.
- **Antígeno Específico de Colon (CSAp):** Negativo.
- **Antígeno 3 de Colon:** Negativo.
- **Isoenzimas:** G6PD, B; PGM₁, 2; PGM₃, 1; PGD, A; PEP-D, 1; ES D,1.
- **Proporcionada por:** A. Leibovitz, Clínica Scott White, Temple, TX.
- **Preparada y caracterizada por:** ATCC, Rockville, MD.
- **Medio de cultivo:** D-MEM suplementado con glutamina, HEPES, insulina, aminoácidos no esenciales, antibiótico-antimicótico y 10% de suero fetal bovino.

5.1.4 GENERALIDADES DE LA LÍNEA CELULAR A204 (*Rabdomiosarcoma humano*) (11)

La línea A204 fue obtenida por D.J. Giard, y fue una de las 13 líneas aisladas y parcialmente caracterizadas a través de estudios de tratamientos en una serie de 200 tumores humanos. Se utilizó el medio D-MEM con 15% de suero fetal bovino para aislamiento y propagación (Giard, et al., J. Natl. Cancer Inst. (Bethesda) 51: 1417-1423, 1973). Un cultivo de un pase desconocido fue provisto por el creador en 1973.

La progenie fue propagada en medio de McCoy 5A con 15% de suero fetal bovino.

Datos generales de A204:

- **Información del paciente:** 1 año de edad; sexo femenino.
- **Crecimiento:** En monocapa; transferido 1:6 semanalmente.

- **Morfología:** Tipo epitelial.
- **Tumorigenicidad:** Forma tumores malignos de células pequeñas en ratones desnudos correspondientes al rhabdomyosarcoma embrionario.
- **Número de subcultivos seriados a partir del tejido de origen:** 10 desde el depósito inicial.
- **Cariología:** Distribución de la frecuencia cromosómica de 30 células: $2n=46$

| | | | |
|-------------|----|----|----|
| CÉLULAS: | 3 | 5 | 22 |
| CROMOSOMAS: | 44 | 45 | 46 |

La línea celular corresponde a un individuo humano de sexo femenino (XX) aneuploide; muchos cromosomas contabilizan en un intervalo cercano al diploide. También se encuentra presente una cantidad considerable (30%) de población tetraploide. La mayor anormalidad presentada es un segmento adicional encontrado en el brazo p del cromosoma N22. El resto de los cromosomas parece ser normal. En todos los cariotipos se encontró un marcador cromosómico 22p+.

- **Isoenzimas:** PGM3, 1; PGM1,1; ES D,1;Me-2, 1; AK1, 1; GLO-1, 1; G6PD, B.
- **Esterilidad:** Las pruebas para *Mycoplasma*, bacterias y hongos resultaron negativas.
- **Especie:** Confirmada como humana por análisis de isoenzimas.
- **Medio de cultivo:** Constituido por una mezcla de 50% de D-MEM suplementado con glutamina, HEPES, insulina, aminoácidos no esenciales, antibiótico-antimicótico y 10% de suero fetal bovino; y 50% de medio de McCoy suplementado con 10% de suero fetal bovino y antibiótico-antimicótico.

5.2 REACTIVOS Y MATERIALES:**MEDIO DE CULTIVO PARA LAS LÍNEAS CELULARES HeLa , SW620, SW480, A204* Y LAS CÉLULAS ENDOTELIALES DE CAPILAR DE CEREBRO BOVINO A023 BBE****

| | |
|---|-------|
| Medio D-MEM | GIBCO |
| Glutamina | SIGMA |
| HEPES | SIGMA |
| Aminoácidos no esenciales | GIBCO |
| Piruvato de sodio | SIGMA |
| Suero fetal bovino | SIGMA |
| Insulina | LILLY |
| Antibiótico-antimicótico: Penicilina G sódica, sulfato de estreptomina y anfotericina B | GIBCO |
| NaHCO ₃ | BAKER |
| Factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)** | GIBCO |

MEDIO DE CULTIVO PARA LA LÍNEA CELULAR A204*

| | |
|---|-------|
| Medio de McCoy | GIBCO |
| NaHCO ₃ | GIBCO |
| Antibiótico-antimicótico: Penicilina G sódica, sulfato de estreptomina y anfotericina B | GIBCO |

* La línea celular A204 utilizó como medio de cultivo una mezcla de 50% de D-MEM y 50% de medio de McCoy.

**Las células endoteliales, además del medio de cultivo D-MEM, requieren del factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF) recombinante humano, marca GIBCO BRL a una concentración de 1 ng/mL, que es almacenado en una solución de PBS y 0.1% de albúmina sérica bovina marca SIGMA.

REACTIVO PARA LAVADO DE LAS CÉLULAS EN LA CAJA DE CULTIVO**PBS:**

| | |
|--|-------|
| Cloruro de sodio | BAKER |
| Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) | SIGMA |
| Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) | BAKER |
| Cloruro de potasio | MERCK |

REACTIVOS PARA DESPRENDER LAS CÉLULAS DE LA CAJA DE CULTIVO

| | |
|--|-------|
| TRIPSINA-EDTA | GIBCO |
| PBS-EDTA: | |
| Cloruro de sodio | BAKER |
| Fosfato de potasio monobásico (KH_2PO_4) | SIGMA |
| Fosfato de sodio dibásico (Na_2HPO_4) | BAKER |
| Cloruro de potasio | MERCK |
| EDTA (Sal disódica dihidratada: $\text{Na}_2\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_8 \cdot \text{H}_2\text{O}$) | BAKER |

MEDIO DE CONGELAMIENTO A:

| | |
|--------------------|-------|
| Suero fetal bovino | SIGMA |
| Glicerol | MERCK |

MEDIO DE CONGELAMIENTO B:

| | |
|--------------------|--------------|
| Suero fetal bovino | SIGMA |
| Dimetilsulfóxido | MALLINCKRODT |

EXPOSICIÓN DE CÉLULAS A FÁRMACOS Y DETERMINACIÓN DE LA**VIABILIDAD:**

| | |
|---|-------------------|
| Sal de bromuro de tetrazolio (MTT) | SIGMA |
| Dimetil sulfóxido (DMSO) | SIGMA |
| Cloruro de sodio | MERCK |
| 5-Fluorouracilo (para las líneas SW480 y SW620) | ROCHE |
| Citarabina (arabinósido de citosina) | FARMITALIA |
| Oncovin (Vincristina) | LILLY |
| Genoxal (Ciclofosfamida) | SANFER |
| Heparán sulfatos H1, H2, H3 y H4 | MUESTRA COMERCIAL |

COMPOSICIÓN DE LOS HEPARÁN SULFATOS*:

| SACÁRIDOS | PESO MOLECULAR | PORCENTAJE EN H2 | PORCENTAJE EN H3 | PORCENTAJE EN H4 |
|-------------------|-----------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| Disacárido | 564 | 1 | 1.2 | 0.6 |
| Tetrasacárido | 1128-1300 | 6.5 | 7.6 | 6.8 |
| Hexasacárido | 1846 | 10.5 | 11 | 10 |
| Octasacárido | 2256-2600 | 14.5 | 13.3 | 15 |
| Decasacárido | 2820-3026 | 24.5 | 23 | 25 |
| Dodecasacárido | 3384-3600 | 22.5 | 22 | 23 |
| Tetradecasacárido | 4146 | 10.5 | 11.4 | 10 |
| Hexadecasacárido | 4242 | 7.4 | 7.8 | 7.5 |
| Octadecasacárido | 4884 | 1.6 | 2 | 1.2 |
| Eicosacárido | 5526 | 0.8 | 0.6 | 0.9 |

*La composición de H1, que es un producto de origen chino, no se conoce.

5.3 PREPARACIÓN DE REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

PREPARACIÓN DEL MEDIO D-MEM (*Dulbecco's Modified Eagle Media*)

| Composición: | mg/L |
|--|---------|
| • Sales inorgánicas: | |
| CaCl ₂ (anhidro) | 200.00 |
| Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O | 0.10 |
| KCl | 400.00 |
| MgSO ₄ | 97.67 |
| NaCl | 6400.00 |
| NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | 125.00 |
| • Otros componentes: | |
| D-Glucosa | 4500.00 |
| Rojo de fenol | 15.00 |
| • Aminoácidos: | |
| L-Arginina·HCl | 84.00 |
| L-Cistina·2HCl | 62.57 |
| L-Glutamina | 584.00 |
| Glicina | 30.00 |
| L-Histidina·HCl·H ₂ O | 42.00 |
| L-Isoleucina | 105.00 |
| L-Leucina | 105.00 |
| L-Lisina·HCl | 146.00 |
| L-Metionina | 30.00 |
| L-Fenilalanina | 66.00 |
| L-Serina | 42.00 |

| | |
|----------------------------------|--------|
| L-Treonina | 95.00 |
| L-Triptofano | 16.00 |
| L-Tirosina·2Na·2H ₂ O | 103.75 |
| L-Valina | 94.00 |

- **Vitaminas:**

| | |
|-------------------------|------|
| D-Pantotenato de calcio | 4.00 |
| Cloruro de colina | 4.00 |
| Acido fólico | 4.00 |
| <i>D</i> -Inositol | 7.20 |
| Niacinamida | 4.00 |
| Piridoxal·HCl | 4.00 |
| Riboflavina | 0.40 |
| Tiamina·HCl | 4.00 |

- **Suplementos para 1 L de medio:**

| | |
|--|-------------|
| Glutamina solución 200 mM | 2.00 mL |
| NaHCO ₃ | 3.70 g |
| HEPES | 2.20 g |
| Insulina (Solución inyectable 100 UI/mL) | 10.00 mL |
| Aminoácidos no esenciales solución 10 mM | 10.00 mL |
| Antibiótico-antimicótico (10 000 U/mL de Penicilina G sódica, 10 000 µg/mL de sulfato de estreptomina y 25 µg/mL de anfotericina B como Fungizone ^R en solución salina 0.85%) | 10.00 mL |
| Suero fetal bovino inactivado con calor | 10.00 % v/v |

1. Medir 700 mL de agua desionizada con una temperatura de 15-30 °C y adicionar el contenido de un sobre de medio D-MEM (13.4 g/sobre). Enjuagar

- el interior del paquete con agua desionizada para remover todas las trazas del medio en polvo.
2. Adicionar todos los suplementos del medio, exceptuando el suero fetal bovino. Agitar hasta disolución completa.
 3. Ajustar el pH del medio de 0.2 a 0.3 unidades debajo del pH final de trabajo (pH 7.4) con NaCl 1N ó HCl 1N. Completar con agua desionizada hasta un volumen de 900 mL.
 4. Esterilizar inmediatamente por filtración con membrana.
 5. Suplementar el medio con suero fetal bovino (previamente esterilizado por filtración con membrana) a medida que se vaya utilizando. Conservar el medio en refrigeración.
 6. Como control de contaminación es recomendable incubar una alícuota del medio a 37 °C durante dos días. Si al término de este tiempo hay turbidez en el medio y vira el indicador a color amarillo, es señal de que hay contaminación.

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE McCoy 5A (MODIFICADO)

| Composición: | mg/L |
|--|---------|
| ● Sales inorgánicas: | |
| CaCl ₂ (anhidro) | 100.00 |
| KCl | 400.00 |
| MgSO ₄ | 97.67 |
| NaCl | 6460.00 |
| NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O | 580.00 |
| ● Otros componentes: | |
| Bactopeptona | 600.00 |

| | |
|----------------------------------|----------|
| D-Glucosa | 3 000.00 |
| Glutati3n (reducido) | 0.50 |
| Rojo de fenol | 10.00 |
| • Amino3cidos: | |
| L-Alanina | 13.90 |
| L-Arginina·HCl | 42.10 |
| L-Asparagina | 45.00 |
| 3cido L-asp3rtico | 19.97 |
| L-Ciste3na | 31.50 |
| 3cido L-glut3mico | 22.10 |
| L-Glutamina | 219.20 |
| Glicina | 7.50 |
| L-Histidina·HCl·H ₂ O | 20.96 |
| L-Hidroxiprolina | 19.70 |
| L-Isoleucina | 39.36 |
| L-Leucina | 39.36 |
| L-Lisina·HCl | 36.50 |
| L-Metionina | 14.90 |
| L-Fenilalanina | 16.50 |
| L-Prolina | 17.30 |
| L-Serina | 26.30 |
| L-Treonina | 17.90 |
| L-Triptofano | 3.10 |
| L-Tirosina·2Na·2H ₂ O | 26.10 |
| L-Valina | 17.60 |
| • Vitaminas: | |
| 3cido asc3rbico | 0.50 |
| Biotina | 0.20 |

| | |
|--------------------------|-------|
| Cloruro de colina | 5.00 |
| D-Pantotenato de calcio | 0.20 |
| Ácido fólico | 10.00 |
| i-Inositol | 36.00 |
| Niacinamida | 0.50 |
| Ácido nicotínico | 0.50 |
| Ácido para-aminobenzoico | 1.00 |
| Piridoxal·HCl | 0.50 |
| Piridoxina·HCl | 0.50 |
| Riboflavina | 0.20 |
| Tiamina·HCl | 0.20 |
| Vitamina B ₁₂ | 2.00 |

• Suplementos para 1L de medio:

| | |
|--|-------------|
| NaHCO ₃ | 2.20 g |
| Antibiótico-antimicótico (10 000 U/mL de Penicilina G sódica, 10 000 µg/mL de sulfato de estreptomicina y 25 µg/mL de anfotericina B como Fungizone ^R en solución salina 0.85%) | 10.00 mL |
| Suero fetal bovino inactivado con calor | 10.00 % v/v |

1. Medir 700 mL de agua desionizada con una temperatura de 15-30 °C y adicionar el contenido de un sobre de medio de McCoy. Enjuagar el interior del paquete con agua desionizada para remover todas las trazas del medio en polvo.
2. Adicionar todos los suplementos del medio, exceptuando el suero fetal bovino. Agitar hasta disolución completa.

3. Ajustar el pH del medio de 0.2 a 0.3 unidades debajo del pH final de trabajo (pH 7.4) con NaCl 1N ó HCl 1N. Completar con agua desionizada hasta un volumen de 900 mL.
4. Esterilizar inmediatamente por filtración con membrana.
5. Suplementar el medio con suero fetal bovino (previamente esterilizado por filtración con membrana) a medida que se vaya utilizando. Conservar el medio en refrigeración.
6. Como control de contaminación es recomendable incubar una alícuota del medio a 37 °C durante dos días. Si al término de este tiempo hay turbidez en el medio y vira el indicador a color amarillo, es señal de que hay contaminación.

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CONGELAMIENTO A

1. Al medio de cultivo adecuado para cada línea celular, adicionarle 20% v/v de suero fetal bovino.
2. Adicionar a la mezcla anterior 15% v/v de glicerol estéril.
3. Guardar en recipientes estériles y congelar a -20°C. Cuando sea requerido, descongelar a temperatura ambiente y utilizar tan pronto como sea posible.

PREPARACIÓN DEL MEDIO DE CONGELAMIENTO B:

Otro medio de congelamiento que también se utilizó, obteniéndose buenos resultados, fue el siguiente:

1. Adicionar al suero fetal bovino estéril un 10% v/v de DMSO.
2. Almacenar en recipientes estériles y congelar a -20°C. Cuando sea requerido, se debe descongelar a temperatura ambiente y utilizar tan pronto como sea posible.

PREPARACIÓN DE PBS

Para preparar 1L de PBS:

| | |
|----------------------------------|---------|
| NaCl | 8.015 g |
| KCl | 0.224 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.272 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.136 g |

1. Disolver las sales anteriores en 900 mL de agua desionizada.
2. Ajustar el pH a 7.4 con HCl 1 N
3. Adicionar agua desionizada hasta completar un volumen de 1L.
4. Repartir la solución en alícuotas y esterilizar por autoclave durante 20 minutos a 15 lb/in².
5. Guardar la solución a temperatura ambiente, o bien, en refrigeración.

PREPARACIÓN DE PBS-EDTA (13)

Para preparar 1L de PBS-EDTA :

| | |
|----------------------------------|---------|
| NaCl | 8.000 g |
| KH ₂ PO ₄ | 0.240 g |
| Na ₂ HPO ₄ | 1.440 g |
| KCl | 0.200 g |
| EDTA (sal disódica dihidratada) | 0.372 g |
| Agua desionizada c.b.p. | 1.00 L |

1. Disolver las sales anteriores en 900 mL de agua desionizada.
2. Ajustar el pH a 7.4 con HCl 1 N

3. Adicionar agua desionizada hasta completar un volumen de 1L.
4. Repartir la solución en alcuotas y esterilizar por autoclave durante 20 minutos a 15 lb/in².
5. Guardar la solución a temperatura ambiente, o bien, en refrigeración.

PREPARACIÓN DE SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA (SSI)

Para preparar 100 mL:

| | |
|-------------------------|-----------|
| NaCl | 0.85 g |
| Agua desionizada c.b.p. | 100.00 mL |

1. Disolver la sal en el agua desionizada.
2. Repartir la solución en alcuotas y esterilizar por autoclave durante 20 minutos a 15 lb/in².
3. Guardar la solución a temperatura ambiente, o bien, en refrigeración.

PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN DE MTT

Para preparar 1 mL:

| | |
|----------------------------------|------|
| Sal de bromuro de tetrazolio | 5 mg |
| Solución salina isotónica c.b.p. | 1 mL |

1. Disolver la sal de tetrazolio en la solución salina isotónica. (Evitar el contacto del MTT con la piel)
2. Esterilizar la solución por filtración con membrana.

3. Envolver con papel aluminio el recipiente que contiene la solución de MTT para proteger la solución de la luz. Almacenar en refrigeración.

Una vez preparada la solución de MTT permanece estable por un periodo de un mes. Pasado este tiempo no debe ser utilizada.

PREPARACIÓN DE FÁRMACOS

Heparán sulfatos:

1. Disolver 20 mg del heparán sulfato en 10 mL de agua desionizada estéril, de modo que se obtiene una concentración de 2 mg/mL.
2. Esterilizar la solución por filtración con membrana.
3. Almacenar la solución en refrigeración. La solución de heparán sulfatos es sumamente estable, y puede ser utilizada por periodos prolongados.

5-Fluorouracilo:

1. Tomar 20 μ L del contenido de una ampolleta del fármaco (concentración del fármaco en la ampolleta= 50 mg/mL) y completar con agua desionizada estéril hasta tener un volumen de 10 mL. De este modo se obtiene una solución con una concentración de 100 ng de 5FU/ μ L.
2. Almacenar la solución en refrigeración hasta su utilización. En caso de que la solución presente precipitación de los cristales del fármaco debida a las bajas temperaturas, puede calentarse en baño maría a 60 °C hasta que los cristales se disuelvan completamente. La dosis efectiva recomendada en humanos es de 15 mg/Kg de peso vía i.v.(40); esto equivaldría aproximadamente a 750 ng/ mL de células.

Citarabina (arabinósido de citosina):

1. Tomar 10 μL de la ampollita del fármaco (concentración del fármaco en la ampollita = 20 mg/mL) y completar con agua desionizada estéril hasta tener un volumen de 10 mL. Realizar otra dilución tomando 0.5 mL de la solución anterior y completando con agua desionizada estéril hasta tener un volumen de 10 mL. De esta forma se obtiene una solución con una concentración de 1 ng de citarabina/ μL . La dosis reportada como efectiva en humanos es de 100-200 mg/m² de superficie corporal (7), y en líneas celulares tumorales es de 10 ng/mL de células (15).
2. Almacenar la solución en refrigeración hasta su utilización.

Vincristina:

1. Pesar 1.1 mg del medicamento (concentración del fármaco = 1 mg de vincristina /11 mg de medicamento).
2. Completar con agua desionizada estéril hasta tener un volumen de 10 mL. Tomar de esta solución 1 mL y completar con agua desionizada estéril hasta tener un volumen de 10 mL. De esta forma se tiene una solución con una concentración de 1ng de vincristina/ μL .
3. Almacenar la solución en refrigeración hasta su utilización. La dosis reportada como efectiva en humanos es de 1.4 mg/m² de superficie corporal (7) y en líneas celulares tumorales es de 10 ng/mL de células (15).

Ciclofosfamida:

1. Tomar 50 μL de la ampollita (concentración del fármaco en la ampollita= 20 mg de ciclofosfamida /mL) y completar con agua desionizada estéril hasta tener un volumen de 10 mL. De esta forma se obtiene una solución con una concentración de 0.1 μg de ciclofosfamida/ μL .

2. Almacenar la solución en refrigeración hasta su utilización. La dosis reportada como efectiva en humanos es de 3-6 mg/kg de peso vía i.v. y requiere de activación microsomal, por lo cual se le utilizó únicamente para ver el efecto sobre la línea celular HeLa, que muestra repetida resistencia a la quimioterapia.

PREPARACIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS BÁSICO (bFGF)

1. Diluir los 10 µg de bFGF recombinante humano, marca GIBCO, en 100 µL de una solución de PBS suplementada con 0.1% de albúmina sérica bovina.
2. Hacer alícuotas de 5 µL (500 ng) y congelarlas a -70 °C en criotubos estériles.
3. Deben evitarse los congelamientos y descongelamientos repetidos, por lo cual es recomendable que, cuando se vaya a utilizar, se descongele un criotubo y se lleve a un volumen de 2.5 mL con PBS suplementado con 0.1% de albúmina sérica bovina, para tener 0.2 ng/mL, y se distribuya en alícuotas de 250 µL (50 ng) en tubos estériles que pueden guardarse a -20°C. Las células endoteliales A023 BBE requieren para su crecimiento 1 ng de bFGF /mL de medio de cultivo, cada 2 días.

PREPARACIÓN DEL MEDIO ACONDICIONADO DE LÍNEAS CELULARES TUMORIGÉNICAS

1. A una caja de cultivo con la línea celular tumorigénica creciendo casi en confluencia, extraerle el medio de cultivo, de aproximadamente 3 días de incubación con las células, recolectándolo en un frasco estéril.

2. Inmediatamente, filtrarlo dos veces utilizando membrana de 0.45 μm , con el fin de eliminar las células tumorigénicas y dejar en el medio los probables factores angiogénicos secretados por las células tumorigénicas (17,31).
3. Utilizar este medio lo más pronto posible, pues los factores angiogénicos, como el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), pueden degradarse rápidamente.

5.4 TÉCNICAS

5.4.1 PRESERVACIÓN DE CÉLULAS (15)

Las líneas celulares humanas pueden ser preservadas por años en condición viable en bancos celulares fríos. Sin embargo, ellas deben ser procesadas con extremo cuidado, pues pueden morir si son centrifugadas y dejadas en una ampula apretadas, o pueden resultar dañadas por una exposición prolongada a frío extremo. El proceso debe realizarse en condiciones de esterilidad y en el menor tiempo posible para que las células resulten menos afectadas. Los cultivos a ser congelados deben tener una viabilidad superior al 85%.

La técnica de congelamiento utilizada en este trabajo fue la siguiente:

1. Lavar las células con 2 mL de PBS a 37°C. Si se trata de cultivos con células adherentes, como es el caso de las líneas HeLa, SW480, SW620 y A204, desechar el PBS mediante vacío. Si se trata de células no adherentes, es necesario centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos y desechar el sobrenadante.
2. Para desprender las células de la superficie de cultivo, adicionar 3 mL de PBS-EDTA, o bien, 2 mL de tripsina-EDTA e incubar a 37°C con agitación cuidadosa durante 15 minutos o hasta que las células se despeguen completamente. Adicionar 3 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina-

EDTA remanente. Centrifugar la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos y descartar el sobrenadante cuidadosamente.

3. Resuspender las células con el medio de congelamiento necesario para tener aproximadamente 1×10^6 células/mL. Transferir una alícuota de 1-1.5 mL a los respectivos criotubos estériles.
4. Enfriar gradualmente los criotubos con la suspensión celular hasta llegar aproximadamente a una temperatura de -70 °C, dejándose así por espacio de 2 horas. Pasado este tiempo se guardan en criocajas y se introducen en un tanque con nitrógeno líquido (Temperatura aproximada: -195.79 °C)

5.4.2 DESCONGELAMIENTO Y RECULTIVO (15)

El procedimiento completo debe realizarse tan pronto como sea posible y bajo condiciones de esterilidad.

1. Adicionar 3 mL de medio de cultivo fresco a la caja donde crecerán las células e incubarla 10 minutos a 37°C , 5% de CO_2 , 95% de aire y 100% de humedad relativa.
2. Sacar los criotubos del nitrógeno líquido y descongelarlos en baño de agua a temperatura de 37 °C. Preferentemente no descongelar completamente, sino únicamente hasta que el bloque de hielo se desprenda del criotubo.
3. Transferir cuidadosamente el contenido del criotubo a la caja de cultivo.
4. Incubar las células a 37°C , 5% de CO_2 y 95% de aire y 100% de humedad relativa.*
5. Cambiar el medio de cultivo con la frecuencia que lo requiera cada línea celular (por lo general, cada dos días).
6. Una vez que las células lleguen a confluencia, es necesario sembrarlas transfiriendo una alícuota de suspensión celular a otras cajas de cultivo. Si se trata de células adherentes, desprenderlas con 3 mL de PBS-EDTA, o bien, 2mL de tripsina-EDTA; inactivar la tripsina EDTA con 2 mL de medio de

cultivo y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos; descartar el sobrenadante y resuspender las células con medio de cultivo; transferir una alícuota de la suspensión celular a una caja y con medio de cultivo completar al volumen correspondiente al tamaño de la caja.

***NOTA:** Si el medio de congelamiento contenía DMSO, se debe cambiar el medio de cultivo celular después de 2 horas del descongelamiento, ya que el DMSO es tóxico y puede dañar las células.

5.4.3 DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR POR LA TÉCNICA DE REDUCCIÓN DE LA SAL DE TETRAZOLIO MTT (14, 15, 25, 26,27, 28)

Fundamento:

Mosmann describió esta técnica semiautomatizada por primera vez en 1983. Una forma modificada de ésta técnica está siendo utilizada exitosamente por el National Cancer Institute USA para la prueba de sensibilidad a nuevos fármacos en líneas celulares (25, 27, 28).

El reactivo bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio, también conocido como MTT, es reducido a formazán por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables en la cadena respiratoria (29). El formazán producido se disuelve completamente en DMSO y absorbe a una longitud de onda de 540 nm. La cantidad de células viables es directamente proporcional a la absorbancia del formazán a 540 nm (25,26,27).

Las ventajas de utilizar esta técnica colorimétrica son, entre otras:

- Es sensible y reproducible para medir el crecimiento celular, así como la sensibilidad a fármacos de diversas estirpes celulares, incluyendo las líneas celulares provenientes de tumores sólidos humanos, mostrando una estrecha correlación con los resultados obtenidos por otras técnicas como exclusión de colorante y ensayo clonogénico (25,26,27,28).

- La solubilización del formazán en DMSO proporciona lecturas de absorbancia estables y relativamente grandes que son directamente proporcionales a la cantidad de células viables (14,25,26,27).
- No requiere de las múltiples etapas de lavados (como en las técnicas de tinción con cristal violeta o rojo neutro) , ni de los procesos de conteo celular (que son tardados y están sujetos a errores del observador), ni del manejo de radioisótopos.
- Es una técnica precisa y relativamente rápida y sencilla, y al ser efectuada en microplacas facilita el manejo de un gran número de muestras y se emplea un menor volumen de reactivos que el empleado en técnicas de conteo celular.

Entre los parámetros que afectan la producción de formazán se encuentran:

- Un decremento en la concentración de D-glucosa del medio de cultivo está acompañado por un decremento en la actividad específica a MTT (formazán de MTT/ μ g de proteína celular) (30).
- Un decremento en la concentración celular de los nucleótidos de piridina reducidos NADH y NADPH trae consigo un decremento en la producción de formazán (30).
- Entre líneas celulares varía significativamente la cinética de formación de MTT y el grado de saturación mostrado (25,26,30).

Lo anterior indica que las condiciones experimentales deben ser establecidas adecuadamente para minimizar los efectos de los parámetros anteriores.

Técnica:

1. Resuspender cuidadosamente el contenido de cada pozo de las placas de cultivo y colocar en tubos para microcentrifuga estériles. En el caso de células que se adhieren a la superficie de cultivo, una vez extraído el contenido del pozo, se debe adicionar 0.2 mL de PBS, los cuales se retiran depositándose en el correspondiente tubo para microcentrifuga; adicionar 0.5 mL de PBS-EDTA o

bien, de tripsina-EDTA e incubar a 37°C durante 15 min con agitación cuidadosa; pasado este tiempo, se vuelve a resuspender el contenido de cada pozo colocándose en el tubo para microcentrifuga correspondiente junto con el contenido de la primera resuspensión.

2. Centrifugar los tubos a 3000 rpm durante 4 minutos.
3. Descartar el sobrenadante y resuspender las células en 200 μ L de medio de cultivo fresco. Adicionar 20 μ L de una solución de MTT a una concentración de 5 mg de MTT/mL de solución salina isotónica (14, 25).
4. Tapar los tubos y hacerles una pequeña perforación en la tapa. Incubar las células a 37°C, 95% de aire, 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa durante 4 horas.
5. Centrifugar los tubos a 5 000 rpm durante 5 minutos.
6. Descartar el sobrenadante y disolver la pastilla con 0.5 mL de DMSO.
7. Determinar la absorbancia a 540 nm. (El valor de absorbancia es directamente proporcional a la concentración de células viables).

Las lecturas de absorbancia se efectuaron en un espectrofotómetro Beckman DU-64.

5.4.4 OBTENCIÓN DE LA CURVA DE CRECIMIENTO DE CADA LÍNEA CELULAR

1. Crecer las células hasta llegar a confluencia.
2. Quitar el medio de cultivo de la caja. Lavar las células con 2 mL de PBS. Para desprender las células de la superficie de cultivo, adicionar 3 mL de PBS-EDTA, o bien, 2 mL de tripsina-EDTA e incubar a 37°C con agitación cuidadosa durante 15 minutos o hasta que las células se despeguen completamente. Adicionar 3 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina-EDTA remanente. Centrifugar la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos y descartar el sobrenadante cuidadosamente.

3. Hacer las diluciones correspondientes con medio de cultivo hasta tener 10^4 células/100 μ L, realizando el conteo celular con una cámara de Neubauer (contar las células existentes en los cuatro cuadros para recuento de leucocitos y sacar el valor promedio por cuadro, multiplicar dicho valor por 10^4 y obtener de esta forma el número de células por mL).
4. En 18 pozos de una caja de cultivo celular, depositar alícuotas de 100 μ L para tener la curva de crecimiento de 6 días seguidos, por triplicado.
5. Adicionar a cada pozo 900 μ L de medio de cultivo fresco; cerrar la caja e incubar a 37°C, 5% de CO₂, 95% de aire y 100% de humedad relativa.
6. Después de pasado un día, determinar la viabilidad de las células de los tres primeros pozos utilizando la técnica de reducción de MTT.
7. Repetir el procedimiento anterior para los días 2, 3, 4, 5 y 6.
8. Graficar absorbancia contra tiempo y determinar la fase exponencial de crecimiento de la línea celular.

5.4.5 REALIZACIÓN DE LA CURVA PATRÓN PARA CADA LÍNEA CELULAR

1. Quitar el medio de cultivo de la caja. Lavar con 2 mL de PBS.
2. Para desprender las células de la superficie de cultivo, adicionar 3 mL de PBS-EDTA, o bien, 2 mL de tripsina-EDTA e incubar a 37°C con agitación cuidadosa durante 15 minutos o hasta que las células se despeguen completamente. Adicionar 3 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina-EDTA remanente. Centrifugar la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos y descartar el sobrenadante cuidadosamente.
3. Hacer las diluciones correspondientes con medio de cultivo hasta tener:
 - a) 10 000 células

- b) 50 000 células
- c) 10 000 células
- d) 5 000 células
- e) 1 000 células

en un volumen no mayor de 150 μL y no menor de 5 μL , realizando el conteo celular con una cámara de Neubauer (contar las células existentes en los cuatro cuadros para recuento de leucocitos y sacar el valor promedio por cuadro, multiplicar dicho valor por 10^4 y obtener de esta forma el número de células por mL).

4. Colocar cada alícuota en su correspondiente tubo para microcentrifuga estéril y completar con medio de cultivo hasta tener un volumen final de 200 μL .
5. Determinar la viabilidad por la técnica de reducción de MTT.
6. Graficar absorbancia contra número de células.

5.4.6 DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DIRECTA DE LOS FÁRMACOS TIPO HEPARÁN SULFATO EN LAS LÍNEAS CELULARES SELECCIONADAS (15, 25, 26, 27, 28)

1. Quitar el medio de cultivo de la caja. Lavar con 2 mL de PBS.
2. Para desprender las células de la superficie de cultivo, adicionar 3 ml de PBS-EDTA, o bien, 2 mL de tripsina-EDTA e incubar a 37°C con agitación cuidadosa durante 15 minutos o hasta que las células se despeguen completamente. Adicionar 3 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina-EDTA remanente. Centrifugar la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos y descartar el sobrenadante cuidadosamente.
3. Hacer las diluciones necesarias con medio de cultivo para tener una concentración de 10^4 células/ 100 μL (realizando el conteo celular en la cámara de Neubauer).

4. Adicionar una alícuota de 100 μL en cada uno de los pozos de la placa de cultivo y completar con medio de cultivo para tener un volumen final de 1 mL. Realizar cada experimento por triplicado.
5. Incubar la placa de cultivo a 37°C, 95% de aire, 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa hasta que las células alcancen la fase exponencial de crecimiento.
6. Adicionar los fármacos a las concentraciones elegidas (10, 20, 50 y 100 $\mu\text{g/mL}$ en el caso de los heparán sulfatos) en cada uno de los pozos. Dejar sin fármaco los pozos que serán controles. Probar simultáneamente algún fármaco con actividad antitumoral conocida sobre el tipo de células empleado, utilizando la dosis reportada como efectiva.
7. Incubar nuevamente las células a 37°C, 95% de aire, 5% de CO_2 y 100% de humedad relativa durante los tiempos determinados (12, 24, 48, 72 y 96 horas).
8. Después de cada tiempo, determinar la viabilidad de las células de los pozos con sus correspondientes controles (sin fármaco) empleando la técnica de reducción de MTT.
9. Obtener el valor promedio y la desviación estándar de los valores de absorbancia obtenidos para cada sistema.
10. Determinar el porcentaje de inhibición de cada sistema con respecto al control, empleando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ inhibición} = \left(1 - \frac{\bar{X}_{\text{con fármaco}}}{\bar{X}_{\text{control}}} \right) \times 100$$

donde: \bar{X} = Absorbancia promedio

11. Graficar las curvas dosis-respuesta, así como respuesta contra tiempo de acción, para cada línea celular.

5.4.7 PRUEBAS PARA DETERMINAR LA ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA DE LOS HEPARÁN SULFATOS SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES DE CAPILAR DE CEREBRO BOVINO (ACTIVIDAD ANTITUMORAL INDIRECTA)(17)

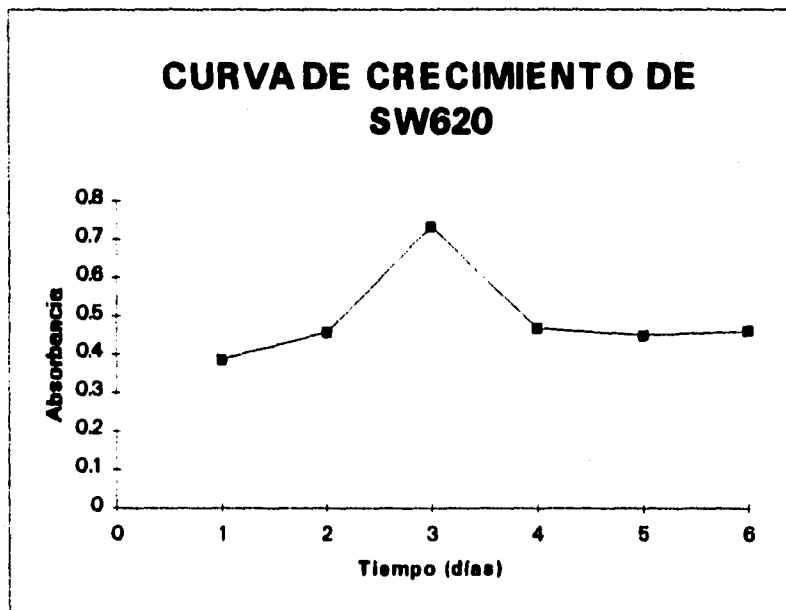
1. Quitar el medio de cultivo de la caja de células endoteliales. Lavar con 2 mL de PBS.
2. Para desprender las células de la superficie de cultivo, adicionar 3 mL de PBS-EDTA, o bien, 2 mL de tripsina-EDTA e incubar a 37°C con agitación cuidadosa durante 15 minutos o hasta que las células se despeguen completamente. Adicionar 3 mL de medio de cultivo para neutralizar la tripsina-EDTA remanente. Centrifugar la suspensión celular a 1500 rpm durante 5 minutos y descartar el sobrenadante cuidadosamente.
3. Hacer las diluciones necesarias con medio de cultivo para tener una concentración de 10^4 células/100 μ L (realizando el conteo celular en la cámara de Neubauer).
4. Colocar en cada pozo de la caja de cultivo una alícuota de 100 μ L de células endoteliales, y disponer lo siguiente:
 - 3 pozos con células endoteliales únicamente.
 - 3 pozos con células endoteliales y 200 μ L/pozo de medio de cultivo acondicionado de la línea celular tumorigénica elegida.
 - 3 pozos con células endoteliales y 100 μ g/pozo del heparán sulfato correspondiente.
 - 3 pozos con células endoteliales, 100 μ g/pozo del heparán sulfato correspondiente y 200 μ L/pozo de medio acondicionado.
 - 3 pozos con células endoteliales y 2 ng/pozo de bFGF.

- 3 pozos con células endoteliales, 2 ng/pozo de bFGF y 100 μ g/pozo del heparán sulfato correspondiente.
5. Completar con medio de cultivo fresco cada pozo para tener un volumen final de 1 mL. Incubar durante 72 horas a 37°C, 95% de aire, 5% de CO₂ y 100% de humedad relativa.
 6. Determinar la viabilidad celular en cada pozo por la técnica de reducción de MTT.
 7. Obtener el valor promedio y la desviación estándar de los valores de absorbancia obtenidos para cada sistema, así como el % de inhibición con respecto al control.
 8. Graficar la respuesta de las células endoteliales con cada tratamiento.

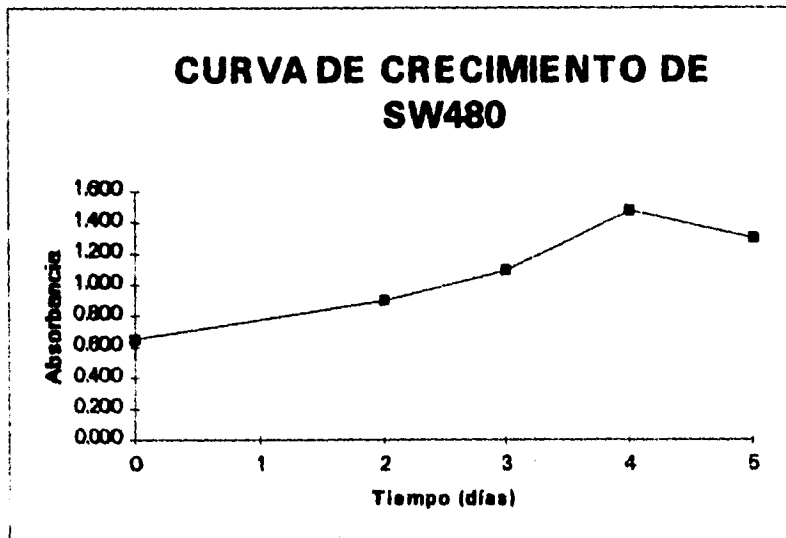
6. RESULTADOS

Con el objeto de establecer el tiempo adecuado para exponer cada línea celular al fármaco, se determinaron las curvas de crecimiento de cada una de ellas, obteniéndose los resultados mostrados en las gráficas 1, 2, 3 y 4, donde se puede observar que la fase exponencial de crecimiento se alcanza en el segundo día en las cuatro líneas celulares: SW620, SW480, HeLa y A204. En base a esto se eligió el día dos para exponer las líneas celulares a cada fármaco. De este modo los fármacos ejercen su acción predominantemente en la fase exponencial de cada línea celular.

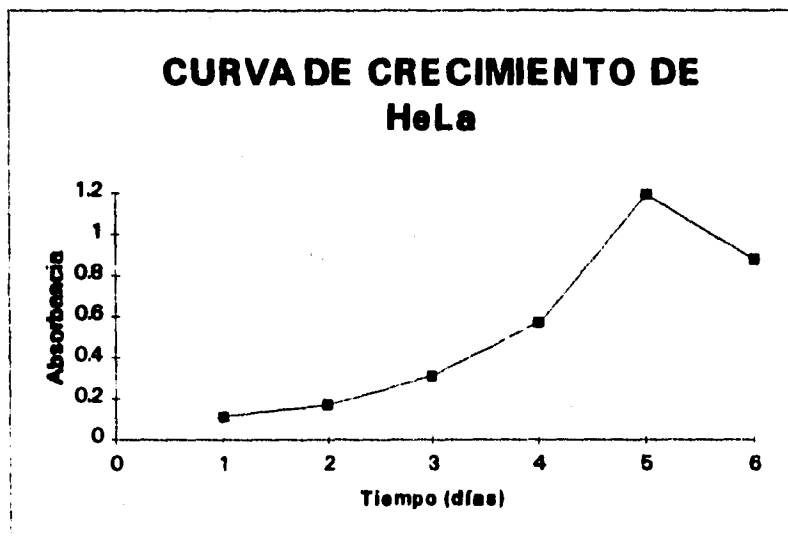
Para verificar que las lecturas de absorbancia del formazán a 540 nm fueran directamente proporcionales al número de células viables (técnica de reducción de MTT), se realizaron las curvas patrón correspondientes para cada línea celular, obteniéndose los resultados mostrados en las gráficas 5, 6, 7 y 8. Allí se observa una buena correlación entre ambos parámetros con las cuatro líneas celulares en las condiciones experimentales del presente trabajo.



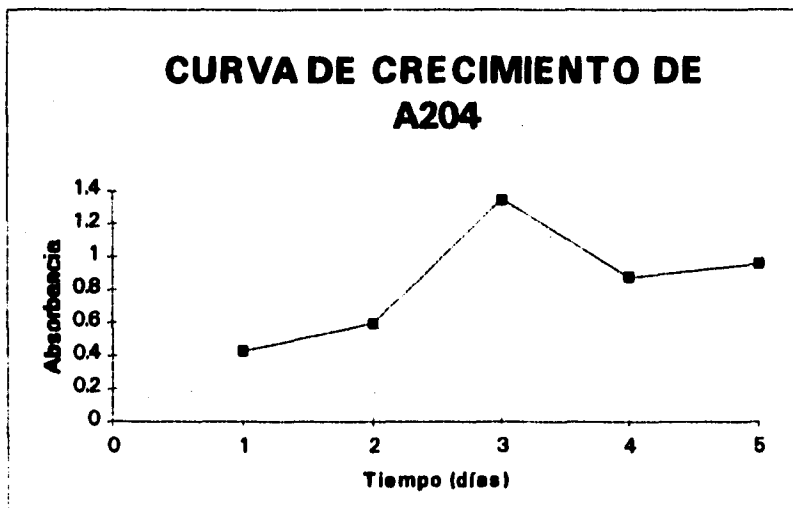
Gráfica 1. Curva de crecimiento de SW620. El experimento se llevó a cabo con un inóculo inicial de 7.0×10^4 células/pozo. Las absorbancias se midieron en los tiempos indicados en la gráfica y las lecturas son el promedio de tres determinaciones.



Gráfica 2. Curva de crecimiento de SW480. El experimento se llevó a cabo con un inóculo inicial de 0.8125×10^4 células/pozo. Las absorbancias se midieron en los tiempos indicados en la gráfica y las lecturas son el promedio de tres determinaciones.

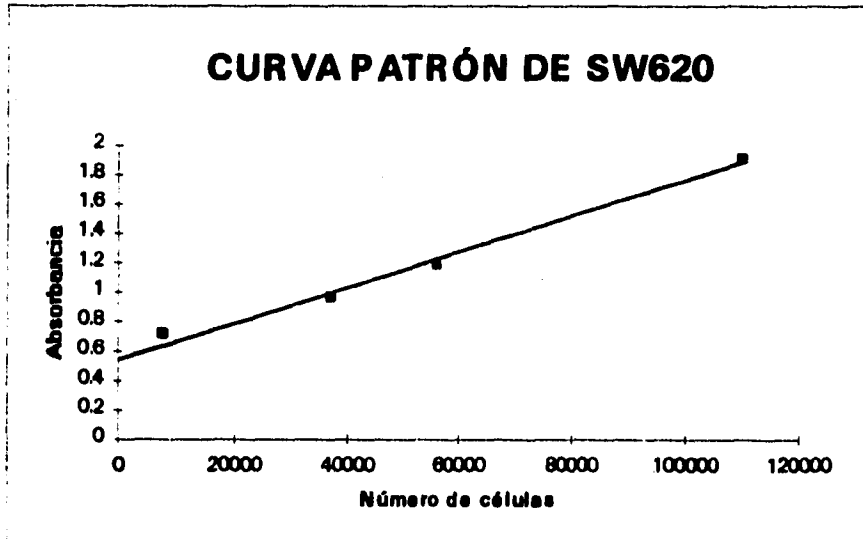


Gráfica 3. Curva de crecimiento de HeLa. El experimento se llevó a cabo con un inóculo inicial de 0.9×10^4 células/pozo. Las absorbancias se midieron en los tiempos indicados en la gráfica y las lecturas son el promedio de tres determinaciones.



Gráfica 4. Curva de crecimiento de A204. El experimento se llevó a cabo con un inóculo inicial de 1.58×10^4 células/pozo. Las absorbancias se midieron en los tiempos indicados en la gráfica y las lecturas son el promedio de tres determinaciones.

Gráfica 5. Curva patrón de SW620. Las lecturas de absorbancia son el promedio de tres determinaciones.



| NÚMERO DE CÉLULAS | ABSORBANCIA (540 nm) |
|--------------------------|-----------------------------|
| 7462 | 0.724 |
| 37000 | 0.972 |
| 56000 | 1.194 |
| 110000 | 1.915 |

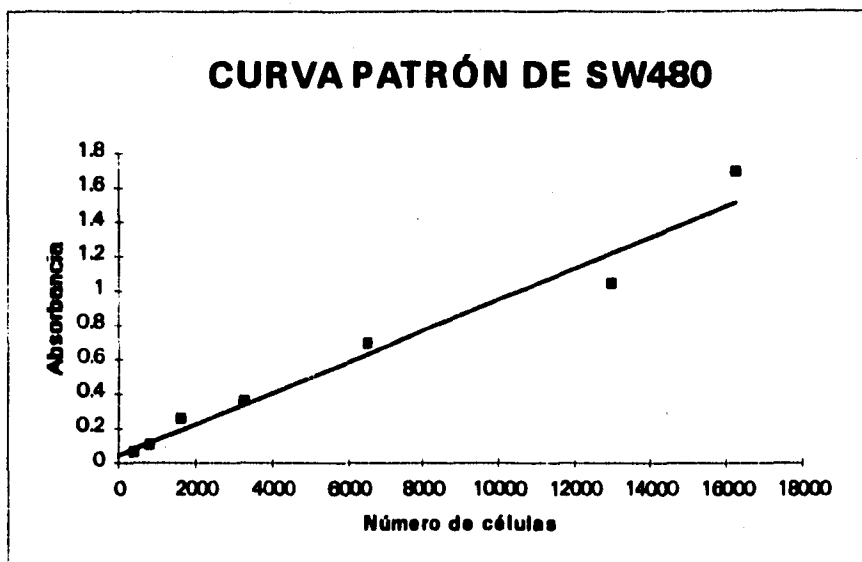
REGRESIÓN LINEAL:

$$b = 0,5791$$

$$m = 0,000012$$

$$r = 0,9945$$

Gráfica 6. Curva patrón de SW480. Las lecturas de absorbancia son el promedio de tres determinaciones.



| NÚMERO DE CÉLULAS | ABSORBANCIA (540 nm) |
|--------------------------|-----------------------------|
| 406 | 0.070 |
| 812 | 0.111 |
| 1625 | 0.259 |
| 3250 | 0.365 |
| 6500 | 0.692 |
| 13000 | 1.048 |
| 16250 | 1.693 |

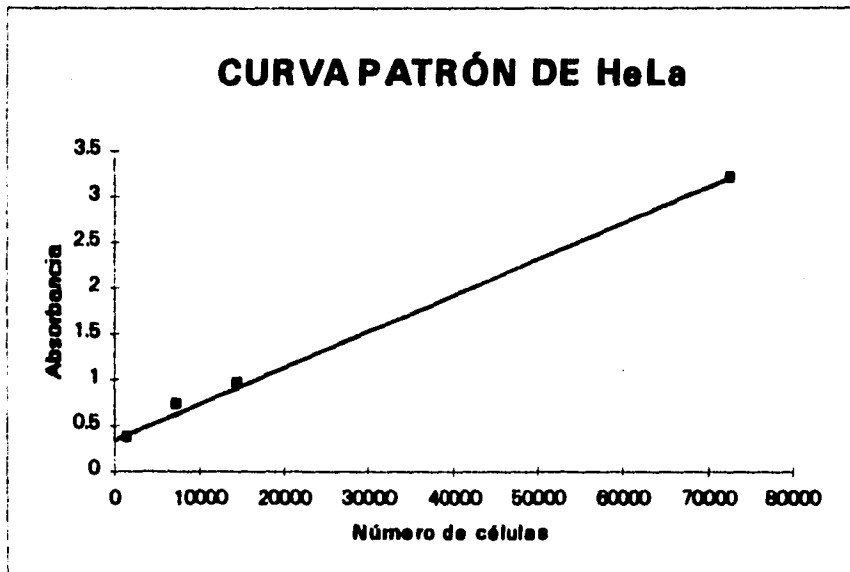
REGRESIÓN LINEAL:

$$b = 0.0551$$

$$m = 0.000092$$

$$r = 0.984$$

Gráfica 7. Curva patrón de HeLa. Las lecturas de absorbancia son el promedio de tres determinaciones.



| NÚMERO DE CÉLULAS | ABSORBANCIA (540 nm) |
|--------------------------|-----------------------------|
| 1450 | 0.386 |
| 7250 | 0.748 |
| 14500 | 0.969 |
| 72500 | 3.214 |

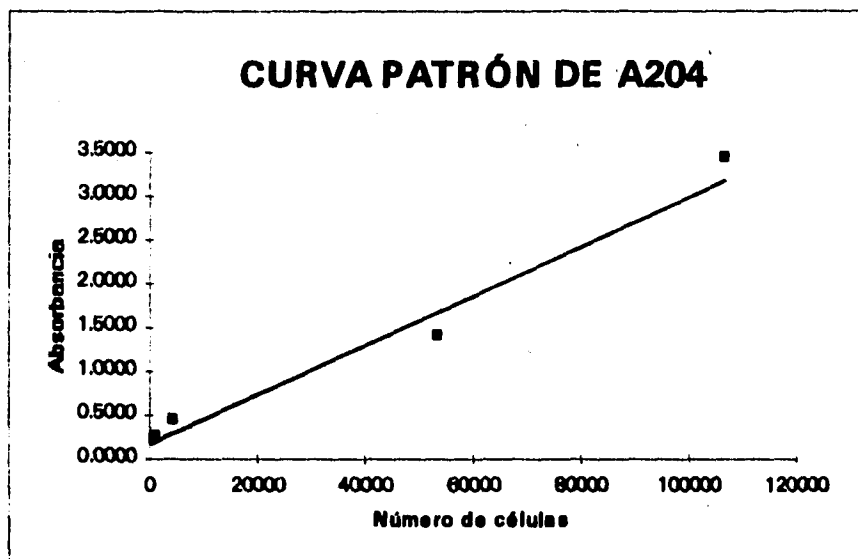
REGRESIÓN LINEAL:

$$b = 0.3975$$

$$m = 0.000039$$

$$r = 0.9991$$

Gráfica 8. Curva patrón de A204. Las lecturas de absorbancia son el promedio de tres determinaciones.



| NÚMERO DE CÉLULAS | ABSORBANCIA (540 nm) |
|--------------------------|-----------------------------|
| 1067 | 0.2702 |
| 4270 | 0.4650 |
| 53375 | 1.4199 |
| 106750 | 3.4530 |

REGRESIÓN LINEAL:

$$b = 0.2051$$

$$m = 0.000029$$

$$r = 0.988$$

Con el fin de demostrar su probable actividad antitumoral directa, se probaron los fármacos tipo heparán sulfato H1, H2, H3 y H4 en las líneas celulares tumorales SW480, SW620, HeLa y A204, utilizando diferentes dosis y diferentes tiempos de acción de los fármacos. Los resultados obtenidos se muestran en las tablas 3 a 20, y gráficas 9 a 16. Como se observa en el cálculo de % de inhibición con respecto al control, la gran mayoría de resultados son negativos, lo que indica una estimulación a proliferar en prácticamente todas las líneas celulares con los cuatro heparán sulfatos, a las dosis y a los tiempos probados. Las excepciones fueron: a) la línea celular A204 con la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a las 24 horas, ya que aquí hubo inhibición de la proliferación celular con los cuatro heparán sulfatos; la máxima inhibición se presentó con H2, siendo ésta del 33 % (tabla 19 y gráfica 16) b) la línea celular SW620 con el fármaco H4 a las 96 horas con las dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con % de inhibición de 7.9 y 22.6 respectivamente (tabla 6, 8 y gráfica 10); c) la línea celular HeLa con el fármaco H1 a la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 72 horas.

**Tabla 3. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR SW620
A 15 HORAS**

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)</i> | H2 <i>(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)</i> | H3 <i>(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)</i> | H4 <i>(100 $\mu\text{g}/\text{mL}$)</i> | SFU <i>(3.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$)</i> |
|--|--|--|--|--|---|
| 0.967 | 0.991 | 1.091 | 0.931 | 1.039 | 0.877 |
| 0.973 | 0.759 | 1.121 | 0.879 | 0.996 | 0.799 |
| 0.849 | 0.917 | 1.116 | 1.208 | 1.183 | 0.845 |
| $\bar{X}=0.930$ | $\bar{X}=0.889$ | $\bar{X}=1.109$ | $\bar{X}=1.006$ | $\bar{X}=1.073$ | $\bar{X}=0.840$ |
| $\sigma=0.070$ | $\sigma=0.119$ | $\sigma=0.016$ | $\sigma=0.177$ | $\sigma=0.098$ | $\sigma=0.039$ |
| % inhibición | 4.41 | -19.25 | -8.17 | -15.38 | 9.68 |

**Tabla 4. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR SW620
A 24 HORAS**

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(100 µg/mL)</i> | H2 <i>(100 µg/mL)</i> | H3 <i>(100 µg/mL)</i> | H4 <i>(100 µg/mL)</i> | SFU <i>(3.6 µg/mL)</i> |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 0.702 | 0.933 | 0.850 | 1.034 | 1.012 | ----- |
| 0.823 | 1.157 | 0.856 | 1.184 | 0.720 | 0.523 |
| 0.751 | 0.899 | 0.862 | 0.948 | 0.880 | 0.655 |
| $\bar{X}=0.759$ | $\bar{X}=0.996$ | $\bar{X}=0.856$ | $\bar{X}=1.055$ | $\bar{X}=0.871$ | $\bar{X}=0.589$ |
| $\sigma=0.061$ | $\sigma=0.140$ | $\sigma=0.006$ | $\sigma=0.119$ | $\sigma=0.146$ | $\sigma=0.093$ |
| % inhibición | -31.23 | -12.78 | -39.00 | -14.76 | -22.40 |

**Tabla 5. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR SW620
A 48 HORAS**

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(100 µg/mL)</i> | H2 <i>(100 µg/mL)</i> | H3 <i>(100 µg/mL)</i> | H4 <i>(100 µg/mL)</i> | SFU <i>(3.6 µg/mL)</i> |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| 1.834 | 1.817 | 1.872 | 2.227 | 2.296 | 0.917 |
| 1.350 | 2.159 | 1.452 | 2.167 | 1.855 | 0.885 |
| 1.423 | 1.792 | 1.481 | 2.096 | 1.894 | 0.839 |
| $\bar{X}=1.536$ | $\bar{X}=1.923$ | $\bar{X}=1.602$ | $\bar{X}=2.163$ | $\bar{X}=2.015$ | $\bar{X}=0.880$ |
| $\sigma=0.261$ | $\sigma=0.205$ | $\sigma=0.235$ | $\sigma=0.066$ | $\sigma=0.244$ | $\sigma=0.039$ |
| % inhibición | -25.20 | -4.30 | -40.82 | -31.18 | 42.71 |

**Tabla 6. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR SW620
A 96 HORAS**

| CONTROL (sin fármaco) | H1 (10 µg/mL) | H2 (10 µg/mL) | H3 (10 µg/mL) | H4 (10 µg/mL) | Citarabina (10 ng/mL) |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------------------------|
| 0.861 | 0.758 | 0.837 | 0.892 | 0.619 | 0.548 |
| 0.941 | 0.788 | 1.195 | 1.231 | 1.005 | 0.712 |
| 0.760 | 0.891 | 0.807 | 0.784 | 0.736 | 0.763 |
| $\bar{X}=0.854$ | $\bar{X}=0.812$ | $\bar{X}=0.946$ | $\bar{X}=0.969$ | $\bar{X}=0.787$ | $\bar{X}=0.674$ |
| $\sigma=0.091$ | $\sigma=0.070$ | $\sigma=0.216$ | $\sigma=0.233$ | $\sigma=0.198$ | $\sigma=0.092$ |
| % inhibición | 4.92 | -10.77 | -13.47 | 7.85 | 21.08 |

**Tabla 7. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR SW620
A 96 HORAS**

| CONTROL (sin fármaco) | H1 (20 µg/mL) | H2 (20 µg/mL) | H3 (20 µg/mL) | H4 (20 µg/mL) | Citarabina (10ng/mL) |
|---------------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|--------------------------------|
| 0.861 | 0.653 | 1.048 | 0.935 | 0.792 | 0.582 |
| 0.941 | 1.910 | 0.714 | 1.195 | 0.986 | 0.675 |
| 0.760 | 0.965 | 0.720 | 0.795 | 0.829 | 0.590 |
| $\bar{X}=0.854$ | $\bar{X}=1.176$ | $\bar{X}=0.827$ | $\bar{X}=0.975$ | $\bar{X}=0.869$ | $\bar{X}=0.616$ |
| $\sigma=0.091$ | $\sigma=0.655$ | $\sigma=0.191$ | $\sigma=0.203$ | $\sigma=0.103$ | $\sigma=0.042$ |
| % inhibición | -37.70 | 3.16 | -14.17 | -1.76 | 27.87 |

Tabla 8. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR SW620
96 HORAS

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(50 µg/mL)</i> | H2 <i>(50 µg/mL)</i> | H3 <i>(50 µg/mL)</i> | H4 <i>(50 µg/mL)</i> | Citarabina <i>(10 ng/mL)</i> |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| 0.938 | 1.048 | 0.967 | 1.156 | 0.619 | 0.519 |
| 1.084 | 1.321 | 1.036 | 0.965 | 1.005 | 0.851 |
| 0.963 | 1.068 | 1.016 | 0.841 | 0.736 | 0.693 |
| $\bar{X}=0.995$ | $\bar{X}=1.146$ | $\bar{X}=1.006$ | $\bar{X}=0.987$ | $\bar{X}=0.787$ | $\bar{X}=0.688$ |
| $\sigma=0.078$ | $\sigma=0.152$ | $\sigma=0.036$ | $\sigma=0.159$ | $\sigma=0.198$ | $\sigma=0.166$ |
| % inhibición | -15.18 | -1.11 | 0.80 | 22.6 | 11.56 |

Tabla 9. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR SW620
A 48 HORAS

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(20 µg/mL)</i> | H2 <i>(20 µg/mL)</i> | H3 <i>(20 µg/mL)</i> | H4 <i>(20 µg/mL)</i> | Citarabina <i>(10 ng/mL)</i> |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| 2.164 | 1.300 | 1.519 | 1.966 | 2.002 | 2.495 |
| 1.782 | 1.915 | 2.362 | 1.797 | 1.661 | 1.910 |
| 1.582 | 2.216 | 1.840 | 1.697 | 2.339 | 2.216 |
| $\bar{X}=1.843$ | $\bar{X}=1.810$ | $\bar{X}=1.907$ | $\bar{X}=1.820$ | $\bar{X}=2.001$ | $\bar{X}=2.207$ |
| $\sigma=0.296$ | $\sigma=0.467$ | $\sigma=0.425$ | $\sigma=0.136$ | $\sigma=0.339$ | $\sigma=0.293$ |
| % inhibición | 1.79 | -3.47 | 1.25 | -8.57 | -19.75 |

Tabla 10. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR SW480**A 24 HORAS**

| CONTROL (sin fármaco) | H1 (100 µg/mL) | H2 (100 µg/mL) | H3 (100 µg/mL) | H4 (100 µg/mL) | SFU (4µg/mL) |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| 0.618 | 1.252 | 1.838 | 1.761 | 1.607 | 1.670 |
| 0.724 | 0.603 | 1.496 | 1.432 | 1.917 | 2.040 |
| 0.750 | 0.792 | 1.322 | 1.430 | 1.743 | 1.636 |
| $\bar{X}=0.697$ | $\bar{X}=0.882$ | $\bar{X}=1.552$ | $\bar{X}=1.541$ | $\bar{X}=1.756$ | $\bar{X}=1.782$ |
| $\sigma=0.070$ | $\sigma=0.334$ | $\sigma=0.263$ | $\sigma=0.191$ | $\sigma=0.155$ | $\sigma=0.224$ |
| % inhibición | -26.54 | -122.67 | -121.09 | -151.94 | -155.67 |

Tabla 11. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR SW480**A 48 HORAS**

| CONTROL (sin fármaco) | H1 (100 µg/mL) | H2 (100 µg/mL) | H3 (100 µg/mL) | H4 (100 µg/mL) | SFU (4mg/mL) |
|---------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|------------------------|
| 0.800 | 1.768 | 2.071 | 1.920 | 2.168 | 1.650 |
| 0.874 | 1.861 | 2.325 | 2.025 | 2.934 | 1.900 |
| 1.279 | 1.963 | 2.452 | 2.185 | 2.570 | 1.763 |
| $\bar{X}=0.984$ | $\bar{X}=1.864$ | $\bar{X}=2.283$ | $\bar{X}=2.043$ | $\bar{X}=2.557$ | $\bar{X}=1.771$ |
| $\sigma=0.258$ | $\sigma=0.098$ | $\sigma=0.194$ | $\sigma=0.133$ | $\sigma=0.383$ | $\sigma=0.125$ |
| % inhibición | -89.43 | -132.01 | -107.62 | -159.86 | -79.98 |

Tabla 12. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR SW480
A 96 HORAS

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(100 µg/mL)</i> | H2 <i>(100 µg/mL)</i> | H3 <i>(100 µg/mL)</i> | H4 <i>(100 µg/mL)</i> | 5FU <i>(4 µg/mL)</i> |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1.567 | 2.377 | 2.320 | 2.304 | 2.605 | 1.355 |
| 1.523 | 2.998 | 2.785 | 3.284 | 3.240 | 1.421 |
| 2.538 | 3.045 | 3.080 | 3.041 | 2.907 | 1.828 |
| $\bar{X}=1.876$ | $\bar{X}=2.807$ | $\bar{X}=2.728$ | $\bar{X}=2.876$ | $\bar{X}=2.917$ | $\bar{X}=1.528$ |
| $\sigma=0.574$ | $\sigma=0.373$ | $\sigma=0.383$ | $\sigma=0.510$ | $\sigma=0.318$ | $\sigma=0.263$ |
| % inhibición | -49.63 | -45.42 | -53.30 | -55.49 | 18.55 |

Tabla 13. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR HeLa
A 24 HORAS

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(100 µg/mL)</i> | H2 <i>(100 µg/mL)</i> | H3 <i>(100 µg/mL)</i> | H4 <i>(100 µg/mL)</i> | Ciclofosfamida <i>(3 µg/mL)</i> |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|
| 0.613 | 0.454 | 0.446 | 0.472 | 0.538 | 1.009 |
| 0.416 | 0.450 | 0.447 | 0.413 | 0.679 | 1.064 |
| 0.412 | 0.591 | 0.559 | 0.613 | 0.892 | 0.778 |
| $\bar{X}=0.480$ | $\bar{X}=0.498$ | $\bar{X}=0.484$ | $\bar{X}=0.499$ | $\bar{X}=0.703$ | $\bar{X}=0.950$ |
| $\sigma=0.115$ | $\sigma=0.080$ | $\sigma=0.065$ | $\sigma=0.103$ | $\sigma=0.178$ | $\sigma=0.152$ |
| % inhibición | -3.75 | -0.83 | -3.96 | -46.46 | -97.92 |

**Tabla 14. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR HeLa
A 48 HORAS**

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(50 µg/mL)</i> | H2 <i>(50 µg/mL)</i> | H3 <i>(50 µg/mL)</i> | H4 <i>(50 µg/mL)</i> | Vincristina <i>(15 ng/mL)</i> |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|
| 0.417 | 0.671 | 0.681 | 0.667 | 0.709 | 0.586 |
| 0.411 | 0.731 | 0.629 | 0.657 | 0.636 | 0.586 |
| 0.469 | 0.593 | 0.635 | 0.766 | 0.696 | 0.570 |
| $\bar{X}=0.432$ | $\bar{X}=0.665$ | $\bar{X}=0.648$ | $\bar{X}=0.697$ | $\bar{X}=0.680$ | $\bar{X}=0.581$ |
| $\sigma=0.032$ | $\sigma=0.069$ | $\sigma=0.028$ | $\sigma=0.060$ | $\sigma=0.039$ | $\sigma=0.009$ |
| % inhibición | -53.94 | -50.00 | -61.34 | -57.41 | -34.49 |

**Tabla 15. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR HeLa
A 72 HORAS**

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(50 µg/mL)</i> | H2 <i>(50 µg/mL)</i> | H3 <i>(50 µg/mL)</i> | H4 <i>(50 µg/mL)</i> | Vincristina <i>(15 ng/mL)</i> |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|
| 0.570 | 0.510 | 0.587 | 0.599 | 0.725 | 0.653 |
| 0.557 | 0.462 | 0.665 | 0.622 | 0.834 | 0.651 |
| 0.500 | 0.423 | 0.620 | 0.673 | 0.835 | 0.648 |
| $\bar{X}=0.542$ | $\bar{X}=0.465$ | $\bar{X}=0.624$ | $\bar{X}=0.631$ | $\bar{X}=0.798$ | $\bar{X}=0.651$ |
| $\sigma=0.037$ | $\sigma=0.044$ | $\sigma=0.039$ | $\sigma=0.038$ | $\sigma=0.063$ | $\sigma=0.003$ |
| % inhibición | 14.21 | -15.13 | -16.42 | -47.23 | -20.11 |

**Tabla 16. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR HeLa
A 96 HORAS**

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(50 µg/mL)</i> | H2 <i>(50 µg/mL)</i> | H3 <i>(50 µg/mL)</i> | H4 <i>(50 µg/mL)</i> | Vincristina <i>(15 ng/mL)</i> |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|
| 0.455 | 0.763 | 0.872 | 0.704 | 0.827 | 0.641 |
| 0.510 | 0.740 | 0.868 | 0.848 | 0.530 | 0.604 |
| 0.563 | 0.589 | 0.800 | 0.661 | 0.732 | 0.575 |
| $\bar{X}=0.509$ | $\bar{X}=0.697$ | $\bar{X}=0.847$ | $\bar{X}=0.738$ | $\bar{X}=0.696$ | $\bar{X}=0.607$ |
| $\sigma=0.054$ | $\sigma=0.095$ | $\sigma=0.040$ | $\sigma=0.098$ | $\sigma=0.152$ | $\sigma=0.027$ |
| % inhibición | -36.94 | -66.40 | -44.99 | -36.74 | -19.25 |

**Tabla 17. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR A204
A 24 HORAS**

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(50 µg/mL)</i> | H2 <i>(50 µg/mL)</i> | H3 <i>(50 µg/mL)</i> | H4 <i>(50 µg/mL)</i> | Vincristina <i>(100ng /mL)</i> |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| 0.7544 | 1.2700 | 0.8562 | 0.8861 | 0.8110 | 0.9496 |
| 0.7992 | 0.8871 | 1.0050 | 1.3120 | 0.9412 | 1.4560 |
| 0.8557 | 0.7966 | 0.8690 | 1.1060 | 1.0850 | 1.2610 |
| $\bar{X}=0.8031$ | $\bar{X}=0.9846$ | $\bar{X}=0.9101$ | $\bar{X}=1.1010$ | $\bar{X}=0.9460$ | $\bar{X}=1.2220$ |
| $\sigma=0.051$ | $\sigma=0.251$ | $\sigma=0.082$ | $\sigma=0.213$ | $\sigma=0.137$ | $\sigma=0.255$ |
| % inhibición | -22.60 | -13.32 | -37.09 | -17.79 | -52.16 |

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

79

Tabla 18. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR A204 A

48 HORAS

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(50 µg/mL)</i> | H2 <i>(50 µg/mL)</i> | H3 <i>(50 µg/mL)</i> | H4 <i>(50 µg/mL)</i> | Vincristina <i>(100ng /mL)</i> |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--|
| 0.5114 | 0.6247 | 0.6026 | 0.5698 | 0.6844 | 0.4581 |
| 0.5775 | 0.5802 | 0.6571 | 0.6256 | 0.5740 | 0.5725 |
| 0.5547 | 0.5477 | 0.5988 | 0.6677 | 0.5636 | 0.6216 |
| $\bar{X}=0.5479$ | $\bar{X}=0.5842$ | $\bar{X}=0.6195$ | $\bar{X}=0.6210$ | $\bar{X}=0.6073$ | $\bar{X}=0.5597$ |
| $\sigma=0.034$ | $\sigma=0.039$ | $\sigma=0.033$ | $\sigma=0.049$ | $\sigma=0.067$ | $\sigma=0.069$ |
| % inhibición | -6.63 | -13.07 | -13.34 | -10.84 | -2.15 |

Tabla 19. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR A204

A 24 HORAS

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(100 µg/mL)</i> | H2 <i>(100 µg/mL)</i> | H3 <i>(100 µg/mL)</i> | H4 <i>(100 µg/mL)</i> | Vincristina <i>(100ng/mL)</i> |
|--|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|---|
| 1.344 | 0.9318 | 0.8181 | 0.8819 | 0.7480 | 0.7784 |
| 1.101 | 1.4150 | 0.8885 | 0.8802 | 1.2900 | 0.8731 |
| 1.453 | 0.9097 | 0.8952 | 0.9169 | 0.9095 | 1.0530 |
| $\bar{X}=1.299$ | $\bar{X}=1.0860$ | $\bar{X}=0.8670$ | $\bar{X}=0.8930$ | $\bar{X}=0.9825$ | $\bar{X}=0.9015$ |
| $\sigma=0.180$ | $\sigma=0.286$ | $\sigma=0.043$ | $\sigma=0.021$ | $\sigma=0.278$ | $\sigma=0.139$ |
| % inhibición | 16.40 | 33.26 | 31.25 | 24.36 | 30.60 |

**Tabla 20. EFECTO DE LOS FÁRMACOS EN LA LÍNEA CELULAR A204
A 48 HORAS**

| CONTROL <i>(sin fármaco)</i> | H1 <i>(100µg/mL)</i> | H2 <i>(100µg/mL)</i> | H3 <i>(100µg/mL)</i> | H4 <i>(100µg/mL)</i> | Vincristina <i>(100ng/mL)</i> |
|--|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---|
| 0.5114 | 0.6229 | 0.7118 | 0.5428 | 0.6311 | 0.5307 |
| 0.5775 | 0.7499 | 0.6761 | 0.5650 | 0.6678 | 0.7142 |
| 0.5547 | 0.6328 | 0.5302 | 0.5745 | 0.6795 | 0.6219 |
| $\bar{X}=0.5479$ | $\bar{X}=0.6685$ | $\bar{X}=0.6394$ | $\bar{X}=0.5608$ | $\bar{X}=0.6595$ | $\bar{X}=0.6223$ |
| $\sigma=0.034$ | $\sigma=0.071$ | $\sigma=0.096$ | $\sigma=0.016$ | $\sigma=0.025$ | $\sigma=0.092$ |
| % inhibición | -22.01 | -16.70 | -2.35 | -20.37 | -13.58 |

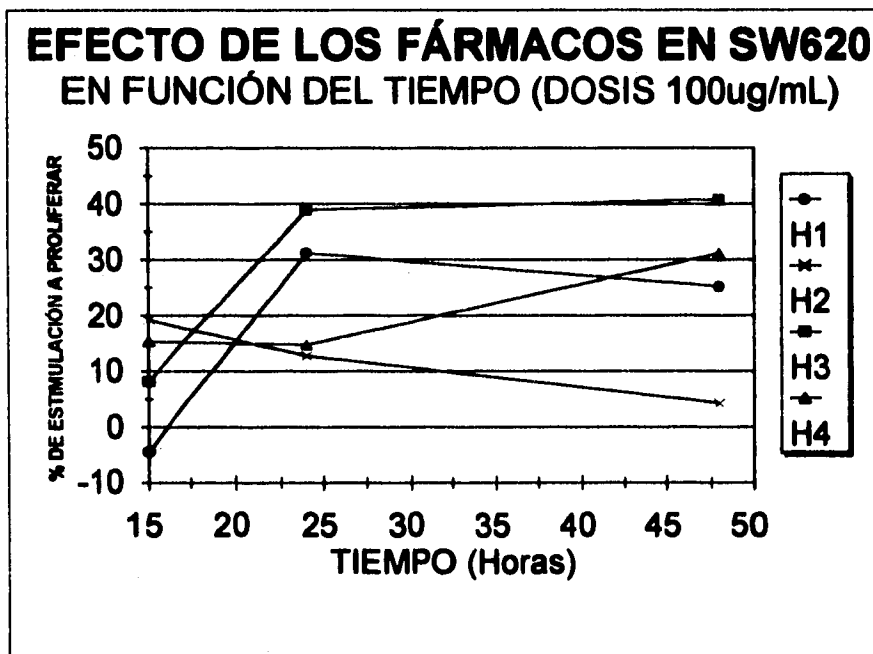
Con el fin de apreciar mejor los resultados anteriores y observar los efectos de los fármacos en función del tiempo y en función de la dosis, se realizaron las gráficas correspondientes, mostradas a continuación.

En la gráfica 9 se observa el efecto de los fármacos en SW620 en función del tiempo a la dosis de 100 µg/mL. En todos los casos se presentó estimulación en la proliferación celular.

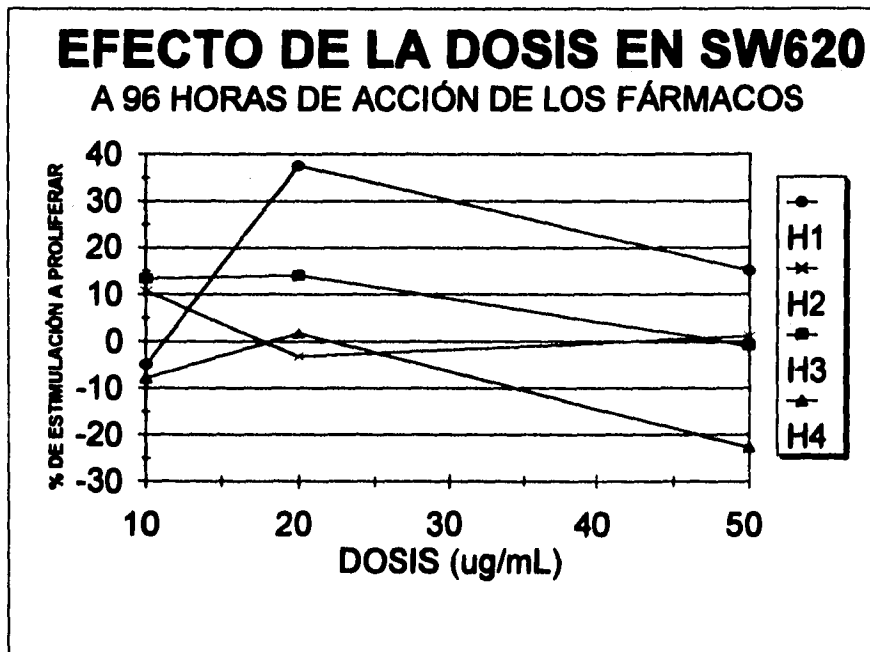
En la gráfica 10 se observa el efecto de los fármacos en SW620 en función de la dosis a 96 horas. Puede observarse que sólo H4 presentó inhibición en la proliferación a 10 y 50 µg/mL.

En la gráfica 11 se muestra el efecto de los 4 fármacos a una dosis y un tiempo: 20 µg/mL y 48 horas. Aquí se observa un efecto de estimulación en la proliferación con los fármacos H2 y H4. En el caso de H1 y H3, el ligero efecto inhibitorio no es significativo.

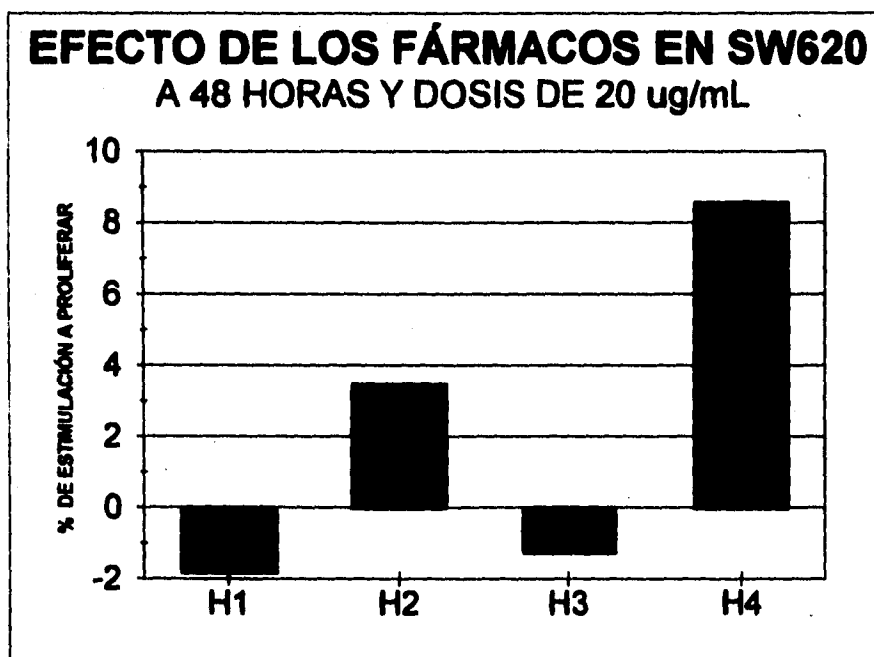
Gráfica 9.



Gráfica 10.

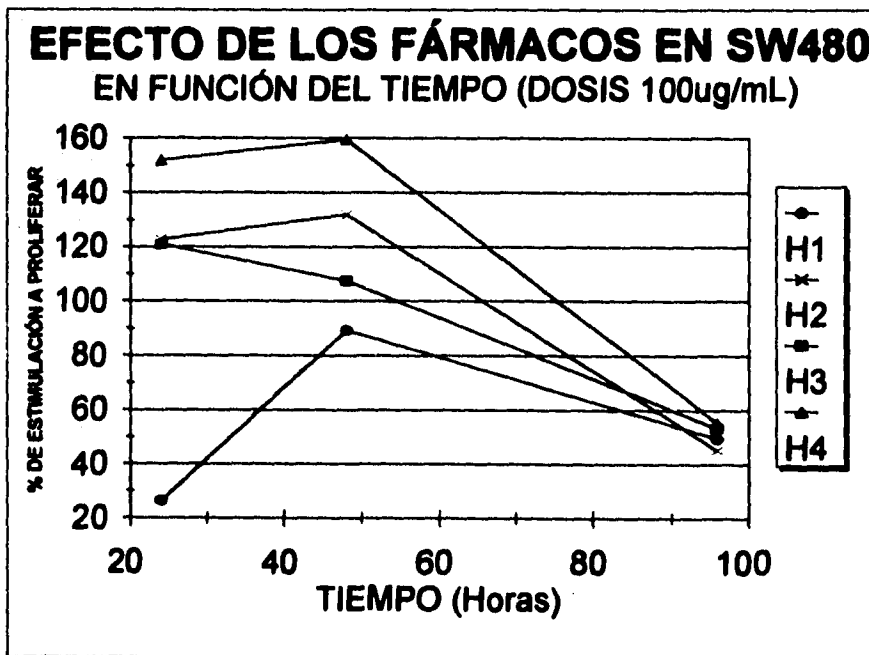


Gráfica 11.



La gráfica 12 muestra el efecto de los fármacos en SW480 en función del tiempo, a la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En todos los casos es muy notable el efecto de estimulación a proliferar.

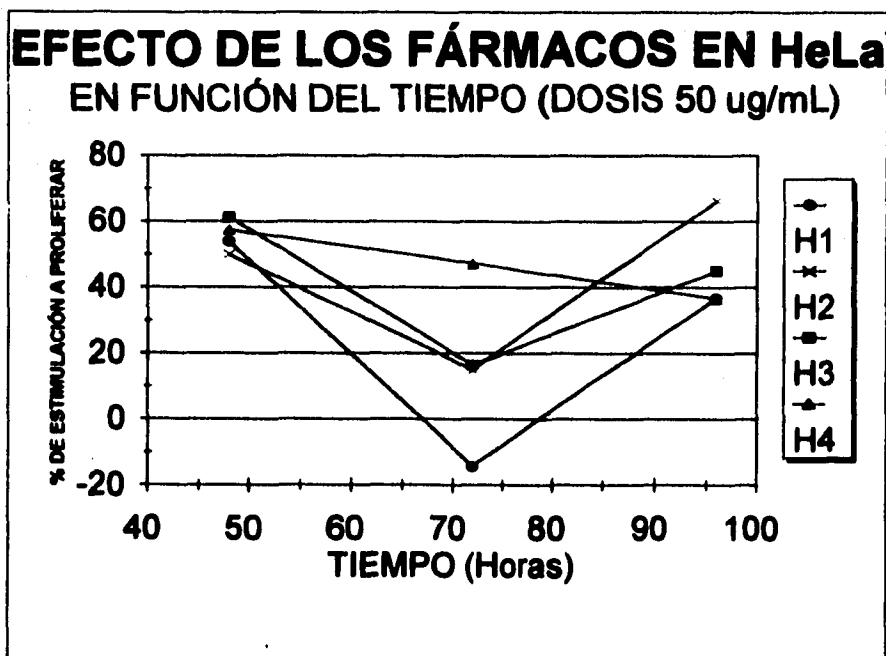
Gráfica 12.



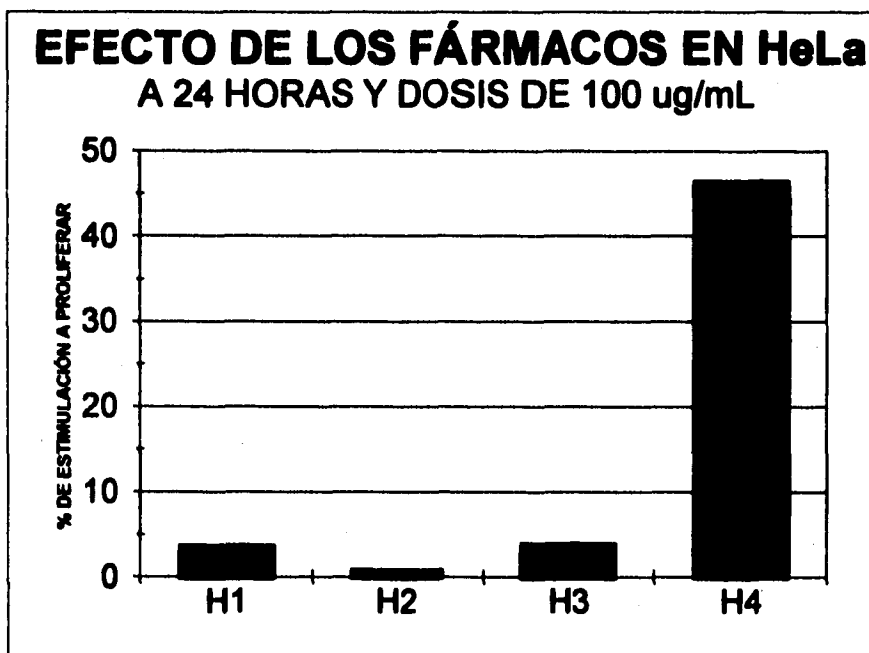
En la gráfica 13 se muestra el efecto de los fármacos en la línea celular HeLa en función del tiempo, a la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los fármacos H2, H3 y H4 produjeron un efecto de estimulación en la proliferación. H1 produjo un efecto peculiar, ya que a las 48 y 96 horas estimuló la proliferación, pero a las 72 horas produjo un efecto de inhibición.

La gráfica 14 muestra el efecto de los fármacos en HeLa a 24 horas a la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Aquí se observa en todos los casos un estímulo en la proliferación, siendo éste más notable con H4.

Gráfica 13.

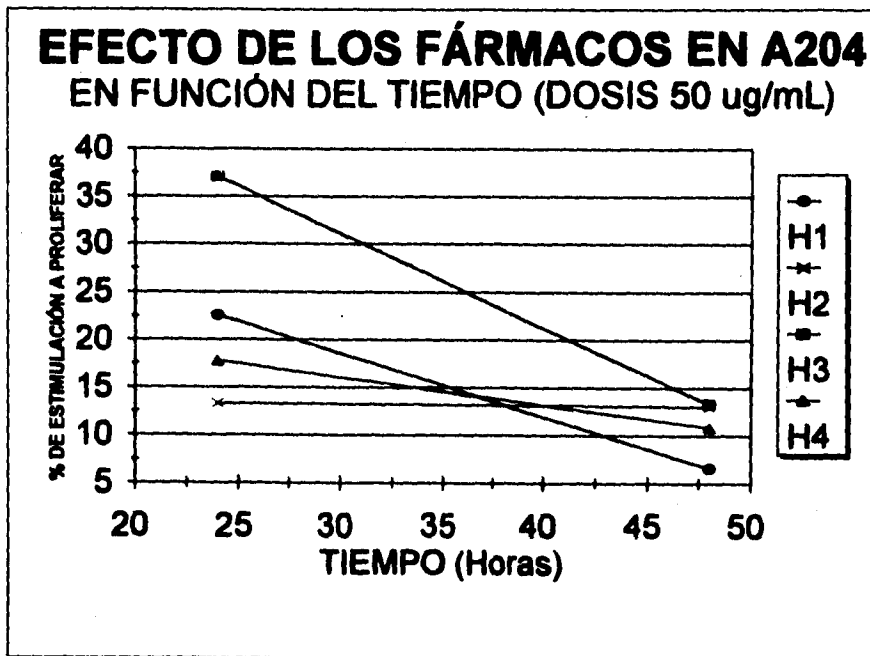


Gráfica 14.

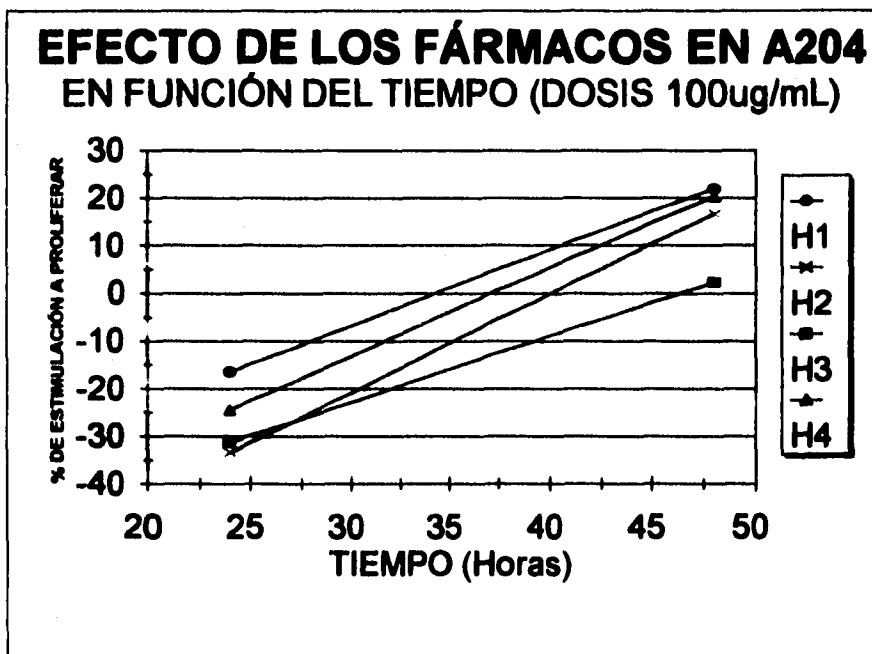


En las gráficas 15 y 16 se muestra el efecto de los fármacos en la línea celular A204 en función del tiempo, a las dosis de 50 y 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente. Aquí se observa un comportamiento muy singular de esta línea celular, ya que a la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 24 horas mostró inhibición en la proliferación con los cuatro fármacos; y en el resto de los casos mostrados se presentó estimulación en la proliferación.

Gráfica 15.



Gráfica 16.

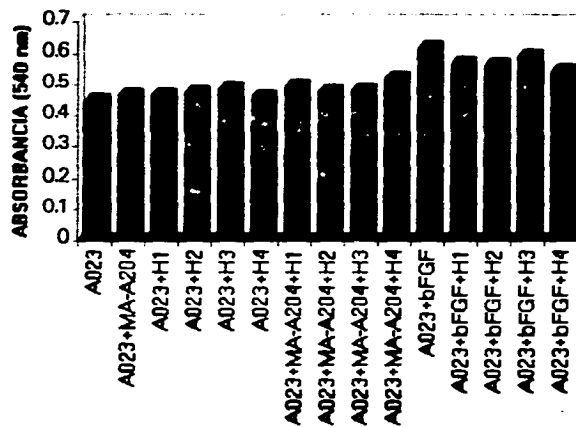


Debido a que los resultados anteriores no mostraron que los fármacos tuvieran un efecto antitumoral directo, y en base a los antecedentes de que ciertos fármacos tipo heparinoide, como el pentosán polisulfato, poseen actividad antitumoral indirecta por inhibición del crecimiento de las células endoteliales dependientes de factores de crecimiento que se unen a la heparina (HBGF) que son secretados al medio por diversas células tumorigénicas (17), se procedió a realizar los experimentos de actividad antitumoral indirecta. Para ello se utilizaron las células endoteliales A023 y se les sometió a diferentes tratamientos: a) medio acondicionado de la línea celular tumorigénica A204, b) cada uno de los heparán sulfatos c) combinación de medio acondicionado con cada heparán sulfato, d) factor de crecimiento bFGF y e) combinación del bFGF con cada heparán sulfato. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 21 y en la gráfica 17.

Tabla 21.
CRECIMIENTO DE CÉLULAS ENDOTELIALES A023 EN PRESENCIA DE MEDIO ACONDICIONADO
OBTENIDO DE LA LÍNEA TUMORAL A204, LOS HEPARÁN SULFATOS (100 µg/pozo),
Y/O DEL bFGF DESPUÉS DE 72 HRS.

| A023 | A023 + MA | A023 + H1 | A023 + H2 | A023 + H3 | A023 + H4 | A023 + MA + H1 | A023 + MA + H2 | A023 + MA + H3 | A023 + MA + H4 | A023 + bFGF | A023 + bFGF + H1 | A023 + bFGF + H2 | A023 + bFGF + H3 | A023 + bFGF + H4 |
|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------------|----------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|
| 0.4936 | 0.4800 | 0.4562 | 0.4899 | 0.5158 | 0.4989 | 0.5352 | 0.4944 | 0.4758 | 0.5223 | 0.5917 | 0.5662 | 0.5303 | 0.6452 | 0.5470 |
| 0.4270 | 0.4600 | 0.4889 | 0.4910 | 0.4839 | 0.4337 | 0.4806 | 0.4652 | 0.4688 | 0.5297 | 0.5575 | 0.5665 | 0.5984 | 0.6059 | 0.5605 |
| 0.4226 | 0.4526 | 0.4477 | 0.4381 | 0.4563 | 0.4406 | 0.4617 | 0.4684 | 0.4938 | 0.5046 | 0.5975 | 0.5724 | 0.5621 | 0.5202 | 0.5251 |
| X=0.4477 | X=0.4642 | X=0.4643 | X=0.4730 | X=0.4853 | X=0.4577 | X=0.4925 | X=0.4760 | X=0.4795 | X=0.5189 | X=0.6171 | X=0.5684 | X=0.5636 | X=0.5904 | X=0.5442 |
| $\sigma=0.040$ | $\sigma=0.014$ | $\sigma=0.022$ | $\sigma=0.030$ | $\sigma=0.030$ | $\sigma=0.036$ | $\sigma=0.038$ | $\sigma=0.016$ | $\sigma=0.013$ | $\sigma=0.013$ | $\sigma=0.060$ | $\sigma=0.003$ | $\sigma=0.034$ | $\sigma=0.064$ | $\sigma=0.018$ |
| % Δ μ | -3.69 | -3.70 | -5.65 | -8.40 | -2.23 | -10.01 | -6.32 | -7.10 | -15.90 | -37.83 | -26.96 | -25.89 | -31.87 | -21.55 |

Gráfica 17. EFECTO DE DIFERENTES TRATAMIENTOS EN LAS CÉLULAS ENDOTELIALES A023



7. DISCUSIÓN

Durante el cultivo de cada línea celular, pudimos ver un comportamiento distinto con cada una de ellas. Algunas fueron fáciles de cultivar, no fueron muy sensibles a eventuales variaciones en las condiciones de crecimiento, como la concentración de CO₂ en el aire, mostraron un crecimiento rápido, y llegaron a confluencia en un periodo corto. En este caso se encuentran las líneas celulares SW620, SW480 y HeLa. Por el contrario, la línea celular A204 fue más difícil de cultivar, requirió de cuidados extremos para su crecimiento, como fue un control muy estricto de la temperatura, la humedad y el porcentaje de CO₂ en el aire, así como de nutrientes en el medio.

Las células endoteliales A023, por el hecho de no estar transformadas ni inmortalizadas, también requirieron de muchos cuidados para su crecimiento, fueron muy sensibles a pequeñas variaciones en la concentración de CO₂, temperatura y a la presencia de detritos de las mismas células, así como a pequeñas cantidades de endotoxinas bacterianas provenientes de eventuales contaminaciones, lo que provocaba inhibición del crecimiento y muerte celular.

Con cada una de las líneas celulares cultivadas se realizaron las curvas de crecimiento, y se observó que en general todas las líneas celulares alcanzaron la fase logarítmica de crecimiento a los dos días (gráficas 1-4), tiempo que se eligió para probar los fármacos y detectar su posible actividad antitumoral.

Pudimos comprobar una vez más las ventajas de la técnica de reducción del MTT para medir viabilidad celular. Esta técnica fue sensible y reproducible para medir el crecimiento de cada línea celular utilizada, así como de las células endoteliales; el formazán producido por la reducción del MTT en las deshidrogenasas mitocondriales se solubilizó fácilmente con el DMSO, proporcionando lecturas de absorbancia estables que fueron directamente proporcionales a la cantidad de células viables, como lo demostraron las curvas

patrón realizadas con cada línea celular (gráficas 5-8). La técnica fue precisa y relativamente rápida y sencilla, permitiéndonos manejar un gran número de muestras simultáneamente.

Al efectuar las pruebas de actividad antitumoral directa de los fármacos tipo heparán sulfato H1, H2, H3 y H4 con la línea celular SW620, observamos que, sorpresivamente, en lugar de tener la inhibición de la proliferación que se esperaba, hubo una estimulación a proliferar en la mayoría de los casos (gráficas 9-11). Esto fue observado predominantemente con los fármacos H1 y H3 a 24 y 48 horas de tiempo de acción con la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, llegando a ser el porcentaje de estimulación de alrededor del 40 %. También fue notable la estimulación con H1 a dosis de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 96 horas, en que fue del 37 %. Los fármacos H2 y H4 tuvieron un comportamiento un tanto diferente al de H1 y H3, mostrando una estimulación menor a los tiempos y las dosis probadas. Las únicas excepciones, en las que sí hubo efecto de inhibición en la proliferación, se presentaron con el fármaco H4 a las 96 horas con las dosis de 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, siendo el % de inhibición de 7.9 y 22.6 respectivamente.

Con la línea celular SW480 y la prueba de acción directa, nuevamente se observó una estimulación a proliferar, y en esta ocasión fue de una magnitud mayor (gráfica 12). Todos los fármacos presentaron la mayor estimulación a las 48 horas con la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. H4 presentó el mayor efecto de estimulación con un 160 %, siguiéndole H2 con 130 %.

En el caso de la línea celular HeLa, contrariamente a la información obtenida previamente (34), presentó un notable efecto de estimulación con los cuatro fármacos probados. A la dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, la máxima estimulación se presentó a las 48 horas en proporciones similares con los cuatro heparán sulfatos, siendo ésta de 50 y 60 %; a las 72 horas se observa un descenso en el porcentaje de estimulación, más acentuado en el caso de H1, en que se presentó efecto de inhibición; posteriormente a las 96 horas se observa una recuperación del estímulo

proliferativo en las células, llegando a ser máximo con H2 (alrededor del 40 %). Con las dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 24 horas, el porcentaje de estimulación fue máximo, siendo del 46 % (gráficas 13 y 14).

La prueba directa con la línea celular A204 mostró resultados interesantes (gráficas 15 y 16), ya que con las dosis de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ se presentó un estímulo de proliferación máximo a las 24 horas, decayendo gradualmente a las 48 horas. Sin embargo, a la dosis de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 24 horas hubo una inhibición de la proliferación, más notorio en H3 y H4 (30 % de inhibición). La inhibición disminuye con el tiempo hasta llegar a convertirse en estimulación a las 48 horas, siendo máxima con H1 y H4 (alrededor del 20 %). Esta fue la única línea celular que presentó inhibición en la prueba directa con los fármacos, y esto es consistente con los resultados reportados previamente con un fármaco tipo heparinoide, el pentosán polisulfato (17). Zugmaier y cols. (1992) utilizando las líneas celulares humanas tumorigénicas MDA-MB-231 (cáncer de mama), MDA-MB-468 (cáncer de mama), A-549 (cáncer de pulmón), DU-145 (cáncer de próstata), A-431 (carcinoma epidermoide) y A-204 (rabdomyosarcoma); así como las líneas celulares no tumorigénicas SW-13 (carcinoma adrenal), fibroblastos de riñón de rata normal (NRK) y células endoteliales de corazón fetal bovino (FBHE), observaron que seis de las siete líneas celulares probadas mostraron resistencia al pentosán polisulfato (PPS), con 50 % de inhibición del crecimiento tumoral (IC_{50}) a dosis mayores de 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Sólo la línea celular A204 no mostró resistencia al fármaco, con un IC_{50} de tan sólo 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (17). Esto indica que en especial esta línea celular tumoral presenta un comportamiento distinto al resto de las líneas celulares tumorigénicas probadas, esto debido, quizá a mecanismos de crecimiento distintos, respuesta diferente a los factores de crecimiento, etc.

En vista de los resultados obtenidos con la prueba directa, se procedió a realizar la prueba indirecta con medio acondicionado de las células A204 y las células endoteliales A023(tabla 21 y gráfica 17). Los resultados mostraron que el medio

acondicionado de las células tumorales A204 no contiene factores de crecimiento que produzcan efecto proliferativo sobre las células endoteliales A023, pues el valor obtenido de viabilidad celular es muy semejante al del control (células A023 sin el medio acondicionado). Lo mismo ocurrió con los heparán sulfatos y las células endoteliales, en que no hubo efecto de inhibición ni de proliferación. El tratamiento combinado de medio acondicionado con los heparán sulfatos tampoco mostró efecto en el crecimiento de las células endoteliales, como se esperaba de acuerdo a la hipótesis planteada. Como controles del experimento se utilizaron los pozos en los cuales se adicionó el factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF), ya que se sabe que éste sí produce un efecto proliferativo en las células endoteliales A023. Los resultados obtenidos con las células endoteliales en presencia del bFGF fueron los esperados, pues se obtuvo un mayor número de células en los cultivos crecidos en presencia del factor en comparación con aquellos con las células endoteliales sin este tratamiento. Se pudo observar que ninguno de los cuatro heparán sulfatos inhibió el efecto proliferativo del factor bFGF en forma significativa.

Lo anterior nos permite pensar que los fármacos tipo heparán sulfato probados poseen un efecto dual. Por un lado presentaron un efecto proliferativo sobre la mayoría de las líneas celulares probadas; y por el otro, un efecto inhibitorio a una dosis alta (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$) y en tiempo relativamente breve (24 horas) con la línea celular A204, y en el caso de la línea celular SW620 con el fármaco H4 a las 96 horas con las dosis de 10 y 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Esto puede deberse a la naturaleza de los fármacos, así como a las diferentes respuestas biológicas de cada una de las líneas celulares probadas. De este modo la hipótesis planteada se cumplió en general, al observarse la heterogeneidad biológica de las células tumorales y ciertos casos de inhibición en la proliferación de algunas de ellas.

Los heparán sulfatos probados en este trabajo están constituidos por una mezcla de sacáridos con distintos pesos moleculares. Recientemente se descubrió

que las heparinas son requeridas por el FGF para la estimulación de sus respuestas biológicas. El aFGF forma un complejo 1:1 con el dominio extracelular soluble del receptor para FGF (FGFR). La heparina ejerce su efecto uniendo a muchas moléculas de aFGF. El complejo aFGF-heparina resultante, permite la dimerización del FGFR, la activación de tirosincinasas, la transcripción de mRNA de c-fos y la proliferación celular (32). Spivak-Kroizman y cols. (1994) utilizando dos líneas celulares que habían perdido el heparán sulfato endógeno: la mutante CHO-pgsD-677 y la línea celular hematopoyética BaF3, demostraron que la heparina exógena es requerida para la dimerización de FGFR, la activación de tirosincinasas, la transcripción de mRNA de c-fos y la proliferación celular. Sin embargo, un análogo de heparina sintético: la sacarosa octasulfato, que se une monovalentemente al aFGF, bloquea la dimerización del FGFR, así como la activación y la señalización vía FGFR (32). Figura 5.

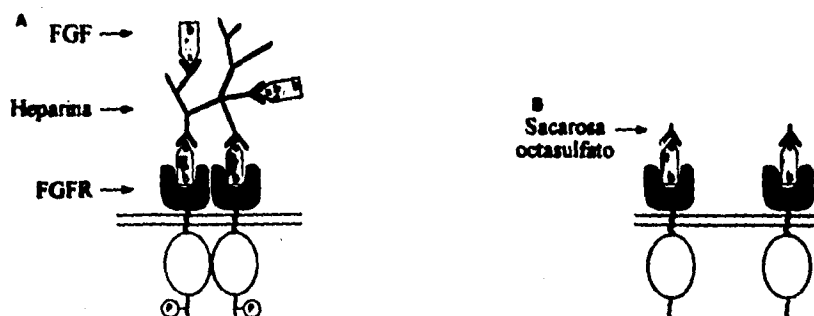


Figura 5. Un modelo para la oligomerización inducida por heparina de las moléculas FGF y activación de los FGFR's. (A) Representación esquemática de la acción de la heparina como una molécula accesoria en la activación del FGFR inducida por aFGF. La heparina une a varias moléculas de aFGF, oligomerizándolas. La unión monovalente independiente de varias de esas moléculas de aFGF al FGFR produce la oligomerización del receptor. (B) Representación esquemática de la forma en la cual la sacarosa octasulfato podría actuar como un antagonista de la acción de la heparina. La sacarosa octasulfato une sólo una molécula de aFGF y por ello no puede inducir su oligomerización. El complejo aFGF-sacarosa octasulfato no es capaz de inducir la dimerización del FGFR.

Abreviaturas: a, sitio de unión a la heparina del aFGF; b, sitio de unión al receptor del aFGF; P, fósforo. (32)

Esto nos hace pensar que los heparán sulfatos H1, H2, H3 y H4 estudiados en el presente trabajo, presentan una combinación de efectos debidos a los sacáricos contenidos en las fracciones que componen cada uno de los fármacos. Por un lado, hay sacáridos de la mezcla, muy probablemente los de peso molecular más alto, que unen en forma polivalente al aFGF estimulando sus respuestas biológicas, y por el otro lado se tienen sacáridos que unen en forma monovalente al aFGF, inhibiendo sus efectos. Esto también es consistente con los reportes de respuestas duales de las heparinas que se han publicado, ya que las preparaciones heparínicas probadas son heterogéneas y no uniformes en composición, peso molecular, estructura, posición de los sustituyentes (N-sulfato, O-sulfato y ácido glucurónico) y secuencia (22).

Por otro lado, pudimos comprobar la heterogeneidad biológica de las células tumorales manifestada en la respuesta de cada línea frente a los fármacos y en la resistencia de algunas de ellas a ciertos fármacos con actividad antitumoral conocida. Tal fue el caso de la línea celular HeLa (carcinoma de cérvix humano) con la vincristina. Este fármaco ha mostrado actividad antitumoral con linfomas, leucemia linfocítica aguda y sarcomas de la niñez, pero también se ha observado resistencia de algunos tumores a su acción, por mecanismos diversos como alteraciones en las membranas celulares y en el transporte de los fármacos. En el caso de cáncer cérvico-uterino se ha encontrado repetidamente una notable resistencia a la quimioterapia (7), lo que pudo ser comprobado en estos experimentos. Lo mismo ocurrió con la línea celular SW480, en que se observó resistencia al 5-fluorouracilo, que ha mostrado tener actividad antitumoral en ciertos tipos de cáncer de colon, mama, ovario, estómago y páncreas (7); sin embargo también se ha reportado resistencia a este fármaco mediante mecanismos consistentes en una insuficiente activación del 5-FU (33).

En base a nuestra experiencia y a lo reportado en la literatura en relación a que los heparán sulfatos con menor peso molecular mejoran sus propiedades biológicas

y son capaces de inactivar los efectos de los factores de crecimiento que se unen a la heparina (2, 32), pensamos que las fracciones componentes de los heparán sulfatos H1, H2, H3 y H4 con menor peso molecular tienen mayor probabilidad de presentar un efecto antitumoral. De esto se desprende la necesidad de efectuar la purificación parcial de los sacáridos componentes de cada fármaco con el fin de homogeneizar lo más posible cada una de las fracciones. Por ejemplo, podrían agruparse las fracciones siguientes:

I) Disacáridos, tetrasacáridos y hexasacáridos (PM 564-1846 Da)

II) Octasacáridos, decasacáridos y dodecasacáridos (PM 2256-3600 Da)

III) Tetradecasacáridos, hexadecasacáridos, octadecasacáridos y eicosacáridos (PM 4146-5526 Da),

y realizar pruebas con las fracciones I y II, que contienen los fragmentos con menor peso molecular.

Asimismo se deben seleccionar las líneas celulares con las cuales se trabajará. Los mecanismos que controlan la angiogénesis en los diferentes tumores deben ser muy diversos, por lo que, para maximizar la eficacia terapéutica puede ser necesario determinar el llamado perfil angiogénico de cada tumor, antes de usar agentes antiangiogénicos específicos (8).

Los mecanismos que regulan la proliferación celular y el desarrollo de metástasis son diversos (48), pero se ha demostrado que los compuestos tipo heparina desempeñan un papel muy importante en estos procesos. Conociendo la actividad proliferativa de la heparina y la actividad antiproliferativa de los heparán sulfatos (41, 42) pensamos que los mecanismos de regulación de la proliferación y metástasis podrían efectuarse mediante la enzima heparanasa, una endo- β -D-glucuronidasa que degrada específicamente los heparán sulfatos y participa en la degradación de las membranas basales efectuada por tumores invasivos y células normales (42). Las actividades de la heparanasa en células malignas como melanomas, fibrosarcomas, rhabdomyosarcomas y carcinomas de colon se

correlacionan con el potencial de esos tumores para formar metástasis (41, 42). Creemos que esto se debe en gran parte a la degradación de los heparán sulfatos, con actividad antiproliferativa y antitumoral, y a la prevalencia de heparina, con actividad proliferativa. La suramina, que es una naftilurea polisulfatada, en experimentos *in vivo* ha mostrado ser un inhibidor potente de la heparanasa, evitando la degradación de los heparán sulfatos e incrementando su concentración en sangre y en la orina (41). Al efectuar la purificación de los heparán sulfatos excretados en la orina de los pacientes tratados con suramina y probar su actividad en líneas celulares tumorales, se observó un efecto citotóxico contra dos líneas celulares de carcinoma humano: la SW13 (adrenal) y la LNCaP-FGC (próstata) (41). De aquí se infiere que ciertos heparán sulfatos pueden tener actividad antitumoral por sí mismos por su capacidad de unir y secuestrar factores de crecimiento y angiogénicos, competir con los GAG's de la matriz extracelular por las heparanasas secretadas por tumores metastásicos y posibilidad de servir como reguladores de la función nuclear, funciones que se han visto también con la suramina (41, 42 y 43).

8. CONCLUSIONES

Con este trabajo se pudo demostrar que los heparán sulfatos probados: H1, H2, H3 y H4, en la mayoría de los casos no presentan actividad antitumoral directa con las líneas celulares probadas (con excepción de los casos presentados con la línea A204 y SW620). Tampoco mostraron actividad antitumoral indirecta con las células endoteliales A023. Contrariamente a lo que se esperaba de acuerdo a la hipótesis, se manifestó predominantemente un efecto estimulador en la proliferación de las células tumorales SW480, SW620 y HeLa con los cuatro fármacos. Sin embargo, también se presentó el efecto contrario: la inhibición, con la línea celular A204 a 24 horas y dosis de 100 µg/mL, y la línea celular SW620 con el fármaco H4 a las 96 horas con las dosis de 10 y 50 µg/mL. Esta dualidad puede ser una consecuencia de la combinación de efectos opuestos de los diferentes sacáridos componentes de cada uno de los heparán sulfatos sobre los factores de crecimiento que se unen a la heparina, tales como los FGF, así como a la diversidad de respuestas biológicas de las células tumorales.

De esto se desprende la necesidad de efectuar la purificación parcial de los sacáridos componentes de cada fármaco, con el fin de homogeneizar lo más posible cada una de las fracciones. Por ejemplo, podrían agruparse las fracciones siguientes:

- I) Disacáridos, tetrasacáridos y hexasacáridos (PM 564-1846 Da)
- II) Octasacáridos, decasacáridos y dodecasacáridos (PM 2256-3600 Da)
- III) Tetradecasacáridos, hexadecasacáridos, octadecasacáridos y eicosacáridos (PM 4146-5526 Da),

y realizar pruebas con las fracciones que tengan mayores probabilidades de presentar efecto antiproliferativo en las células tumorales o endoteliales, que en este caso serían las fracciones I y II, que contienen los fragmentos con menor peso molecular, pues algunas investigaciones han demostrado que estos compuestos

mejoran sus propiedades biológicas y son capaces de inactivar los efectos de los factores de crecimiento que se unen a la heparina (2, 32).

La terapia antiangiogénica continúa siendo de especial interés para el tratamiento del cáncer por la heterogeneidad biológica de los tumores y la presencia de células tumorales resistentes al tratamiento con ciertos fármacos, pues provee una opción terapéutica importante mediante la manipulación del microambiente del hospedero y un efecto antitumoral indirecto (8). De ahí la relevancia del estudio de los fármacos tipo heparina, cuyo interés ha continuado creciendo, pues se ha demostrado su papel importante en la regulación de la proliferación celular y el desarrollo de metástasis.

Por ello, el estudio de los heparán sulfatos H1, H2, H3 y H4 debe continuarse, haciendo especial énfasis en el estudio de los llamados perfiles angiogénicos de los tumores para así maximizar la eficacia terapéutica.

9. APÉNDICE I. Abreviaturas

| | |
|-------------------------|---|
| aFGF | Factor de crecimiento de fibroblastos ácido |
| AK1 | Adenilato cinasa |
| AMan₆ | 2,5-anhidro-D-manitol |
| ATCC | American Type Culture Collection |
| b | Ordenada al origen (regresión lineal) |
| bFGF | Factor de crecimiento de fibroblastos básico |
| CAM | Ensayo en membrana corioalantoidea de embrión de pollo |
| cDNA | DNA complementario |
| CEA | Antígeno carcinoembrionario |
| °C | Grados centígrados |
| Da | Daltones |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| D-MEM | Medio Eagle Modificado de Dulbecco |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| ECFG | Factor de crecimiento celular endotelial |
| EDTA | Ácido etilendiaminotetracético |
| EGF | Factor de crecimiento epidérmico |
| ES D | Esterasa-D |
| FGF | Factor de crecimiento de fibroblastos |
| FGFR | Receptor del factor de crecimiento de fibroblastos |
| 5-FU | 5-Fluorouracilo |
| g | Gramo |
| GAG's | Glicosaminoglicanos |
| GLO-1 | Glioxilasa-1 |
| G6PD | Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa |
| HBGF's | Factores de crecimiento que se unen a la heparina |

| | |
|------------------------|--|
| HEPES | Ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etansulfónico |
| HIV | Virus del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida |
| IC₅₀ | Dosis del fármaco que produce 50% de inhibición |
| IdoA | Ácido L-idurónico |
| IFN | Interferón |
| in | Pulgada |
| KDa | Kilodaltones |
| K-FGF | FGF derivado del sarcoma de Kaposi |
| L | Litro |
| lb | Libra |
| LDH | Lactato deshidrogenasa |
| LMW | Heparinas de bajo peso molecular |
| m | Metro |
| m | Pendiente (regresión lineal) |
| MA | Medio acondicionado obtenido de células tumorigénicas |
| Me-2 | Enzima málica |
| mg | Miligramo |
| min | Minuto |
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mm | Milímetro |
| mRNA | RNA mensajero |
| MTT | Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio |
| N | Normal (concentración) |
| NADH | Dinucleótido de nicotinamida y adenina (reducido) |
| NADPH | Fosfato del dinucleótido de nicotinamida y adenina (reducido) |
| ng | Nanogramo |
| nm | Nanómetro |

| | |
|------------------|---|
| PBS | Solución amortiguadora de fosfatos |
| PEP A,C,D | Peptidasas A, C y D |
| PG | Proteoglicano |
| PGD | Fosfogluconato deshidrogenasa |
| PGM1,2,3 | Fosfoglucomutasa locus 1, 2 y 3 |
| PKC | Proteína cinasa C |
| PPS | Pentosán polisulfato |
| r | Coefficiente de correlación (regresión lineal) |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| SSI | Solución salina isotónica |
| TAF | Factor de angiogénesis tumoral |
| TGF | Factor de crecimiento transformante |
| TNF | Factor de necrosis tumoral |
| TSP | Trombospondina |
| U | Unidades |
| UI | Unidades internacionales |
| % v/v | Por ciento en volumen |
| X | Promedio |
| µg | Microgramo |
| µL | Microlitro |
| µm | Micrómetro |
| σ | Desviación estándar |

10. BIBLIOGRAFÍA

- 1.-Stryer L. Bioquímica. Ed. Reverté, España. 3a. ed., pp 267-287, 337-354, (1988).
- 2.-Linhardt R. J. , Heparin: An Important Drug Enters Its Seventh Decade. Chem. Ind. London, 50: 45-48, (1991).
- 3.-Katzung B. G., Farmacología Básica y Clínica. Ed. El Manual Moderno, 3ª ed. México. pp 388-390, (1987).
- 4.-Folkman J., et al., Angiogenesis Inhibition and Tumor Regression Caused by Heparin or a Heparin Fragment in the Presence of Cortisone. Science, 221: 719-725, (1983).
- 5.-Fan Tai-Ping D., Meeting Reports: Angiosuppressive Therapy for Cancer. TIPS 15: 33-36, (1994).
- 7.-Moossa A. R., Schimpff S. C. y Robson M. D., Comprehensive Textbook of Oncology. Ed. Williams & Wilkins, 2ª ed. EUA. pp 3-103,123-150, 527-568, 904-941,1020-1028, 1546-1557, (1991).
- 8.-Fidler I. J. y Ellis L.M. The Implications of Angiogenesis for the Biology and Therapy of Cancer Metastasis. Cell 79: 185-188, (1994).
- 9.-Weidner N., Semple J.P., Welch W. R. y Folkman J., Tumor Angiogenesis and Metastasis- Correlation in Invasive Breast Carcinoma. The New England Journal of Medicine 324: 1-8, (1991).
- 10.-Fidler I. J., Critical Factors in the Biology of Human Cancer Metastasis: Twenty-eighth G. H. A. Clowes Memorial Award Lecture. Cancer Res. 50: 6130-6138, (1990).
- 11.- American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas. Editores: Hay R., Caputo J., Chen T.R., Macy M., McClintock P., Reid Y. Séptima edición, Maryland EUA, pp. 4, 118, 119, 122, 123, 247, (1992).

- 12.- Teicher B.A., Alvarez- Sotomayor E. y Dong Huang Z., Antiangiogenic Agents Potentiate Cytotoxic Cancer Therapies against Primary and Metastatic Disease. *Cancer Res.* 52: 6702-6704, (1992).
- 13.- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T., *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.* Ed. Cold Spring Harbor, Laboratory Press. Segunda edición. Tomo 3, B.12, (1989).
- 14.- Green L. M., Reade J.L. y Ware C.F. Rapid Colormetric Assay for Cell Viability: Application to the Quantitation of Cytotoxic and Growth Inhibitory Lymphokines. *J Immunol. Methods*, 70: 257-268, (1984).
- 15.- Flores Y., Modelo *in vitro* para el estudio de la resistencia a fármacos antitumorales, vincristina y arabinósido de citosina, empleando la línea tumoral K-562., Tesis profesional Facultad de Química, UNAM, (1995). En prensa.
- 16.- Schreiber A. B., Winkler M. E. y Derynck R., Transforming Growth Factor- α : A More Potent Angiogenic Mediator Than Epidermal Growth Factor. *Science* 232: 1250-1253, (1986).
- 17.- Zugmaier G., Lippman M. E. y Wellstein A., Inhibition by Pentosan Polysulfate (PPS) of Heparin-Binding Growth Factors Released From Tumor Cells and Blockage by PPS of Tumor Growth in Animals. *J Natl Cancer Inst* 84: 1716-1724, (1992).
- 18.- Hori A., Sasada R., Matsutani E., Naito K., Sakura Y., Fujita T. y Kozai Y., Suppression of Solid Tumor Growth by Immunoneutralizing Monoclonal Antibody Against Human Basic Fibroblast Growth Factor. *Cancer Res.* 51: 6180- 6184 ,(1991).
- 19.- Kim K. J., Li B., Winer J., Armanini M., Gillett N., Phillips H. S. y Ferrara N., Inhibition of Vascular Endotelial Growth Factor-induced Angiogenesis Suppresses Tumor Growth *in vivo*. *Nature* 362: 841-844, (1993).

- 20.- Tyrrell D. J., Ishihara M., Rao N., Horne A., Kiefer M. C., Stauber G. B., Lam L. H. y Stack R. J., Structure and Biological Activities of a Heparin-derived Hexasaccharide with High Affinity for Basic Fibroblast Growth Factor. *J Biol Chem* 268: 4684-4689, (1993).
- 21.- Crum R., Szabo S. y Folkman J., A New Class of Steroids Inhibits Angiogenesis in the Presence of Heparin or a Heparin Fragment. *Science* 230: 1375-1378, (1985).
- 22.- Folkman J., Weisz P. B., Joullié M. M., Li W. W. y Ewing W. R., Control of Angiogenesis with Synthetic Heparin Substitutes. *Science* 243: 1490-1493, (1989).
- 23.- O'Reilly M. S., Holmgren L., Shing Y., Chen C., Rosenthal R. A., Moses M., Lane W., Cao Y., Sage E. H. y Folkman J., Angiostatin: A Novel Angiogenesis Inhibitor That Mediates the Suppression of Metastases by a Lewis Lung Carcinoma. *Cell* 79: 315-328, (1994).
- 24.- Stewart A. G., Tomlinson P. R. y Wilson J., Airway Wall Remodeling in Asthma: A Novel Target for the Development of Anti-asthma Drugs. *TiPS* 14: 275-279, (1993).
- 25.- Alley M. C., Scudiero D. A., Monks A., Hursey M. L., Czerwinski M. J., Fine D. L., Abbott B. J., Mayo J. G., Shoemaker R. H. y Boyd M. R., Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. *Cancer Res.* 48: 589-601, (1988).
- 26.- Carmichael J., De Graff W. G., Gazdar A. F., Minna J. D. y Mitchell J. B., Evaluation of a Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing. *Cancer Res.* 47: 936-942, (1987).
- 27.- Sargent J. M. y Taylor C. G., Appraisal of the MTT Assay as a Rapid Test of Chemosensitivity in Acute Myeloid Leukaemia. *Br J Cancer* 60: 206-210, (1989).

- 28.- Carmichael J., Mitchell J. B., De Graff W. G., Gamson J., Gazdar A. F., Johnson B. E., Glatstein E. y Minna J. D., Chemosensitivity Testing of Human Lung Cancer Cell Lines Using the MTT Assay. *Br J Cancer* 57: 540-547, (1985).
- 29.- Slater T. F., Sawyer B. y Sträuli U., Studies in Succinate-tetrazolium Reductase Systems III. Points of Coupling of Four Different Tetrazolium Salts. *Biochim. Biophys. Acta* 77: 383-393, (1963).
- 30.- Vistica D. T., Skehan P., Scudiera D., Monks A., Pittman A. y Boyd M., Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production. *Cancer Res* 51: 2515-2520, (1991).
- 31.- Folkman J. y Klagsbrun M., Angiogenic Factors. *Science* 235: 442-447, (1987).
- 32.- Spivak-Kroizman T., Lemmon M. A., Dikic I., Ladbury J. E., Pinchasi D., Huang J., Jaye M., Crumley G., Schlessinger J. y Lax I., Heparin-Induced Oligomerization of FGF Molecules Is Responsible for FGF Receptor Dimerization, Activation, and Cell Proliferation. *Cell* 79: 1015-1024, (1994).
- 33.- Mihich E., Drug Resistance: Mechanisms and Reversal. Ed. John Libbey CIC, Pezcoller Foundation Symposia, Trento Italia, pp 89-100 (1989).
- 34.- Patente en trámite.
- 35.- Baba, M., Pauwels R., Balzarini J., Arnout J., Desmyter J. y De Clercq E., Mechanism of inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on replication of human immunodeficiency virus *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 85: 6132-6136, (1988).
- 36.- Mitsuya H., Looney D. J., Kuno S., Ueno R., Wong-Staal F. y Broder S., Dextran Sulfate Suppression of Viruses in the HIV Family: Inhibition of Virion Binding to CD4⁺ Cells. *Science* 240: 646-649, (1988).

- 37.- Coyne E., Heparin manufacturing processes. *Federation Proceedings* 36: 32, (1977).
- 38.- Linker A., Structure of Heparan Sulphate Oligosaccharides and their Degradation by Exo-enzymes. *Biochem. J.* 183: 711-720, (1979).
- 39.- Bischoff J., Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis. *Trends in Cell Biology* 5: 69-74, (1995).
- 40.- The Pharmaceutical CODEX. Ed. The Pharmaceutical Press, 11ª edición, Londres. pp 239-241, 362-368, (1979).
- 41.- Cooper M. R., Danesi R., LaRocca R., Horne M. y Myers C. E., Suramin induces the production of anti-proliferative heparan sulfate in patients with malignancies. *Proceedings of the American Association for Cancer Research* 31: 200, (1990).
- 42.- Nakajima M., DeChavigny A., Johnson C. E., Hamada J. y Stein C. A., Suramin: A Potent Inhibitor of Melanoma Heparanase and Invasion. *J Biol Chem* 266: 9661-9666, (1991).
- 43.- Stein C. A., Suramin: A Novel Antineoplastic Agent with Multiple Potential Mechanisms of Action. *Cancer Res* 53: 2239- 2248, (1993).
- 44.- Fransson L. y Lewis W., Relationship Between Anticoagulant Activity of Heparin and Susceptibility to Periodate Oxidation. *FEBS Letters* 97: 119-123,(1979).
- 45.- Danishefsky I., Studies on the Mechanism of Heparin Action by Modification of its Structure. *Federation Proceedings* 36: 33-34, (1977).
- 46.- Horner A. A., The Concept of Macromolecular Heparin and Its Physiological Significance. *Federation Proceedings* 36: 35-39, (1977).
- 47.- Rak J.W., St Croix B.D. y Kerbel R. S., Consequences of Angiogenesis for Tumor Progression, Metastasis and Cancer Therapy. *Anti-Cancer Drugs* 6: 3-18, (1995).

- 48.- Liotta L. A., Steeg P. S. y Stetler- Stevenson W. G., Cancer Metastasis and Angiogenesis: An Imbalance of Positive and Negative Regulation. *Cell* 64: 327-336, (1991).
- 49.- Fauve R. M., Israel L., Aznavoorian S.A. y Liotta L. A., Metastases. *Res Immunol* 145: 229-241, (1994).
- 50.- Augustin H. G., Kozian D. H. y Johnson R. C., Differentiation of Endotelial Cells: Analysis of the Constitutive and Activated Endothelial Cell Phenotypes. *BioEssays* 16: 901-906, (1994).
- 51.- Ziche M., Ruggiero M., Pasquali F. y Chiarugi V. P., Effects of Cortisone with and without Heparin on Angiogenesis Induced by Prostaglandin E1 and by S180 Cells, and on Growth of Murine Transplantable Tumours. *Int J Cancer* 35: 549-552, (1985).
- 52.- Thorpe P. E., Derbyshire E. J., Andrade S., Press N., Knowles P. P., King S., Watson G. J., Yang Y. y Rao-Betté M., Heparin- Steroid Conjugates: New Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice. *Cancer Res* 53: 3000-3007, (1993).
- 53.- Au Y. P. T., Montgomery K. F. y Clowes A. W., Heparin Inhibits Collagenase Gene Expression Mediated by Phorbol Ester-Responsive Element in Primate Arterial Smooth Muscle Cells. *Circulation Research* 70: 1062-1069, (1992).
- 54.- Woodruff M., Cellular Variation and Adaptation in Cancer. *Biological Basis and Therapeutic Consequences*. Ed. Oxford University Press, EUA, pp 1-11, 54-69, 71-76, (1990).