



5
Zejeu

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE COMPUESTOS
TIPO HEPARAN SULFATO EN LAS LINEAS
CELULARES TUMORALES SK - MEL 28 Y K - 562.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ALCANTARA GOMEZ LUZ ELENA



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.

Agradezco a la Dra Angelina Quintero por su paciencia, dedicación y apoyo para la realización de éste trabajo.

Le doy las gracias a la Dra Guadalupe Maldonado y al Dr. Edgar del departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina por haberme permitido trabajar en su laboratorio para la realización del experimento de angiogénesis.

Gracias también a Miriam, técnico del Dr. Carrancá de Biomédicas, por su ayuda y consejos para el cultivo de las líneas celulares.

Agradezco a todos mis amigos por dejarme llevar una pequeña parte de sus vidas, y recibir una parte de la mía.

Agradezco especialmente a Emma y a su familia por brindarme su invaluable amistad.

Les doy gracias infinitas a Sandra y su familia por su apoyo y paciencia en la realización escrita de éste trabajo.

Dedicatorias:

A Dios, por estar siempre conmigo.

A mis padres, porque son lo más
importante en mi vida.

A mis hermanos: Mauricio, Assael, Gustavo,
Julian y Hugo por su solidaridad hacia mí.
Los quiero mucho.

A mi cuñada Adriana, por apoyarme en
los momentos difíciles.

A mis sobrinos Irma, Omar, Erick y Daniela
porque disfruto mucho su existencia.
Gracias por contagiarme su alegría

ÍNDICE

	PAG
INTRODUCCIÓN	1
OBJETIVO	3
HIPÓTESIS	4
ANTECEDENTES	5
METODOLOGÍA	36
RESULTADOS	59
DISCUSIÓN	87
CONCLUSIONES	93
APÉNDICE I	95
BIBLIOGRAFÍA	97

INTRODUCCIÓN

La tumorigénesis es un proceso que involucra varias etapas, en las cuales las alteraciones genéticas se van acumulando para producir finalmente el fenotipo neoplásico. El proceso tumorigénico puede estar precedido por una hiperproliferación de células, algunas de las cuales pueden dar origen a una expansión clonal formando una pequeña neoplasia benigna (adenoma). La progresión del adenoma a carcinoma esta marcada por un incremento gradual en el tamaño del tumor, la adquisición de una citología atípica, la pérdida de la característica de inhibición por contacto, el crecimiento desmedido aún por encima de las células normales vecinas y la invasión de la membrana basal (38).

Muchas de las terapias con agentes químicos estan enfocadas a inhibir directamente la proliferación de las células neoplásicas, sin embargo, debido a la heterogeneidad tumoral las células que componen un tumor difieren entre otras características en su capacidad para formar metástasis y en su respuesta frente a fármacos anticancerígenos, lo que dificulta encontrar un fármaco que sea efectivo contra todas las células tumorales.

Por otra parte muchos tumores no responden a agentes quimioterapéuticos de novo o se hacen resistentes al tratamiento. Esta resistencia es lo que obliga a la búsqueda de alternativas para evitar el crecimiento neoplásico, una de éstas es la inhibición de la angiogénesis. La angiogénesis es el mecanismo por medio del cual se forman nuevos vasos sanguíneos dirigidos hacia el tumor. La no formación de éstos vasos trae como consecuencia:

- 1.- Que el tumor no puede recibir los nutrientes necesarios para su crecimiento
- 2.- Se elimina una ruta muy importante para la diseminación de células tumorales
- 3.- Se elimina la formación de metástasis.

Debido a que en condiciones normales la angiogénesis no se lleva a cabo en los adultos (excepto en la ovulación, en la formación de la placenta, en la embriogénesis, en la

menstruación y en el proceso de curación de una herida), se vislumbra como un tema de estudio en la búsqueda de nuevos fármacos que puedan inhibirla.

La terapia antiangiogénica inhibe la formación de metástasis y evita que la masa tumoral crezca por encima de 1cm^3 . Al limitar el crecimiento, el tumor se extrae quirúrgicamente y al "eliminar" las metástasis tenemos un rango de seguridad de que el cáncer no se volverá a presentar. Esto es lo que hace de ésta terapia una opción muy viable en el tratamiento del cáncer.

El presente trabajo está encaminado a la búsqueda de nuevos agentes quimioterapéuticos que puedan inhibir la angiogénesis y por consecuencia la formación de metástasis. Se ha visto que fármacos con estructura parecida a la heparina y que son altamente sulfatados pueden inhibir la angiogénesis (18). Los fármacos probados son del tipo heparán sulfato (cumplen con las características antes mencionadas) por lo que pensó que tendrían un efecto antiangiogénico.

OBJETIVO

- Estudiar el posible efecto antiproliferativo de los fármacos heparán sulfato H₁, H₂, H₃ y H₄ sobre las líneas celulares tumorales humanas SK-Mel 28 y K-562.
- Estudiar el posible efecto antiproliferativo de los fármacos heparán sulfato H₁, H₂, H₃ y H₄ sobre células endoteliales de capilar de cerebro bovino (A023BBE_p7) cultivadas en presencia de medio acondicionado por células tumorales (SK-Mel 28 y K-562).

HIPÓTESIS

- Los heparán sulfato se unen a factores de crecimiento liberados por las células tumorales bloqueando su unión a la membrana de la célula, lo que inhibe su proliferación.

ANTECEDENTES

CÁNCER.

El estudio científico del cáncer, se remonta a 1775 cuando Sir Percival Pott observó que en hombres que trabajaban como deshollinadores había una alta tasa de mortalidad debido al cáncer de escroto (1).

Desde hace más de 20 años, la biología molecular ha revolucionado la investigación en cáncer. Ahora se sabe que los mecanismos de oncogénesis por carcinógenos no virales y retrovirus tiene las mismas bases moleculares, y que en un principio, cualquier gen que codifica para un factor de crecimiento, un receptor, una molécula de señalización intracelular o una proteína que regula la transcripción puede ser considerada como un proto-oncogen en potencia.

La mayoría de los tejidos son diferenciados, esto es, han desarrollado una apariencia y función especializada. Durante el proceso de diferenciación, las células generalmente pierden su capacidad proliferativa, pero muchos tejidos retienen una fracción de células germinales no diferenciadas las cuales podrían dividirse para reemplazar a las células maduras. Parece ser que la mayoría de los cánceres se originan de tales células precursoras o germinales (2,33)

Un tumor es un complejo ecosistema que comprende células de varios tipos en contacto con la matriz extracelular. Entre estos tipos encontramos:

- 1.-Células neoplásicas en proliferación que se encuentran en diferentes estadios del ciclo celular (S, G₁, G₂ ó M),
- 2.-Las llamadas células G₀ que han detenido el ciclo temporalmente pero que pueden continuarlo más tarde y
- 3.-Células muertas.

Dentro de la población de las células neoplásicas, encontramos algunas células parcialmente transformadas. Otro grupo de células dentro de la población de células tumorales, lo constituyen las células que pueden revertir al fenotipo no maligno. Hay evidencia de que las células de fibrosarcoma, las células de la leucemia mieloide y los fibroblastos transformados in vitro por el virus del papiloma o por algunos carcinógenos, pueden revertir in vitro al fenotipo no maligno. Esto no significa que estas células sean normales pueden por ejemplo, tener aneuploidia y pueden re-revertir a células malignas (2).

Las células híbridas constituyen la última subpoblación. Se ha mostrado que la hibridación puede ocurrir in vivo entre células de tumores transplantados y células del hospedero (2). Hay gran evidencia de que las células neoplásicas de tumores experimentales humanos y animales de desarrollo espontáneo son como regla general marcadamente heterogéneos con respecto a varias características como son la morfología en secciones de tejido, las características del crecimiento y la morfología en cultivo de tejidos, su cariotipo, la tumorigenicidad, la capacidad metastásica, la sensibilidad a fármacos citotóxicos, la radiación e hipertermia, la cantidad y distribución de receptores de superficie celular para hormonas, para factores de crecimiento y lectinas. Otras características de heterogeneidad son: la sensibilidad a ataques del hospedero mediado por anticuerpos específicos y complemento, a ataques por células T sensibilizadas, por macrófagos o células NK y quizás a la expresión de oncogenes (2, 42).

METÁSTASIS

Cuando la neoplasia primaria alcanza un tamaño de 1cm^3 , para continuar su crecimiento necesita de nutrientes y oxígeno. Para cubrir estas necesidades, las células tumorales inducen la formación de nuevos vasos sanguíneos, los cuales serán los que suministren los nutrientes y el oxígeno necesario para que la neoplasia primaria continúe su crecimiento,

además, estos vasos serán la vía a través de la cual las células con capacidad metastásica llegarán al lecho vascular de un órgano lejano. Al crecimiento de las células tumorales en órganos distantes de la neoplasia primaria se le llama **metastasis**.

LAS METÁSTASIS Y SU IMPORTANCIA TERAPÉUTICA

A pesar de los avances en la cirugía y el desarrollo de terapias coadyuvantes agresivas para el tratamiento de neoplasias primarias, la mayoría de las muertes en los pacientes con cáncer son causadas por el desarrollo de metástasis(42).

Las metástasis son clínicamente detectadas en aproximadamente el 30% de los pacientes a los que se les diagnostica un tumor sólido. Del 20% al 30% de los pacientes tienen micrometástasis ocultas o silenciosas (que no se han manifestado clínicamente) en el momento que se está realizando el tratamiento de la neoplasia primaria (45).

El desarrollo de metástasis no es aleatorio, se lleva a cabo en una secuencia de pasos que dan como resultado la formación de las metástasis. Ésto favorece la sobrevivencia y el crecimiento de algunas subpoblaciones de células que coexisten con la neoplasia original, por lo tanto las células que son capaces de originar una metástasis son más resistentes a la acción de los fármacos que las células que se encuentran en la neoplasia original. Esto hace que la quimioterapia no sea efectiva completamente, ya que puede matar a las células que no son potencialmente formadoras de metástasis pero es más difícil que elimine a las que sí lo son. Por ésta razón los investigadores se dieron a la tarea de buscar fármacos que pudieran inhibir un proceso que fuera requerido por todas las células (metastásicas y no metastásicas) para sobrevivir, proliferar y diseminarse, este proceso es la angiogénesis(44).

LA METÁSTASIS Y LA MATRIZ EXTRACELULAR

En contraste con los tumores malignos, los tumores benignos tienen una frontera limitante circunscrita y raramente matan al hospedero a menos que un órgano vital este mecánicamente obstruido (32). Esta frontera es la matriz extracelular, que evita que las células neoplásicas se diseminen y formen metástasis. El organismo de los mamíferos esta compuesto de varios compartimientos tisulares separados uno de otro por dos tipos de matriz extracelular: la membrana basal y el estroma intersticial (45,54). La matriz extracelular actúa como un filtro selectivo de macromoléculas y esta involucrada en la mitosis y la diferenciación (41,32). Es una estructura continua insoluble pero flexible (41), de tal densidad que generalmente excluye a moléculas de un peso molecular alto y por tanto no contiene caminos preexistentes para la migración celular (32,41). Por esto se ha postulado que la penetración se alcanza por una combinación de digestión enzimática de los componentes de la matriz extracelular y una movilidad aumentada de las células tumorales (43). Además la matriz extracelular tiene otras funciones como son: unir hormonas y factores de crecimiento de forma selectiva, dando como resultado una serie de señales que se presentan a la célula (33). Por ejemplo, se ha postulado que la matriz extracelular ejerce influencia mecánica y química en la forma y en la bioquímica de la célula (32,33) por medio de receptores de la membrana plasmática (32) y que las interacciones bioquímicas entre la matriz extracelular y las células normales pueden estar alteradas en la neoplasia, e influir de esta forma en la proliferación e invasión del tumor(32).

COMPONENTES DE LA MEMBRANA BASAL

Para la mayoría de los tejidos, las células parenquimales del órgano secretan y ensamblan los componentes de la membrana basal (41). La membrana basal es un tipo diferente de matriz extracelular que separa las células parenquimales de un órgano del estroma intersticial. Es una malla de colágeno tipo IV, glicoproteínas específicas tales como la laminina y la entactina, y los proteoglicanos heparán sulfato (32,41). La cantidad de estos componentes y la presencia o ausencia de fibronectina, es diferente en la membrana basal de diferentes tejidos (32).

La membrana basal generalmente existe como una interface entre diferentes tejidos. Por esto, las células tumorales deben interactuar con ésta en los límites entre dos tejidos, por ejemplo, cuando ocurre la invasión a los tejidos nervioso, muscular, y adiposo, al invadir el cerebro, al entrar al espacio alveolar o bien al invadir las glándulas. La excepción a la regla la constituyen los senos hepáticos del adulto, que no contienen una membrana basal formada. Las células tumorales entran al hígado por la vena porta (por ejemplo, derivadas de un cáncer de intestino), de esta manera, no necesitan cruzar una membrana basal para invadir el parénquima hepático (32).

Los desordenes benignos con desorganización epitelial o proliferación, están usualmente caracterizados por una membrana basal continua que separa el epitelio del estroma. En contraste, los carcinomas invasivos presentan, una membrana basal defectuosa (41,32,45). La membrana basal es también defectuosa alrededor de las células tumorales en los nódulos linfáticos y en los órganos con metástasis. Estos defectos pueden ser las etapas tempranas de la progresión hacia un carcinoma invasivo debido a que en las zonas de la microinvasión, la membrana basal esta marcadamente fragmentada o ausente (41, 32).

La pérdida de la membrana basal puede ser debida a una disminución de la síntesis o del ensamblaje de los componentes secretados. Alternativamente, la pérdida puede

deberse a un incremento en el recambio causado por las proteasas que son sintetizadas por las células tumorales.

Parece ser que las células epiteliales y parenquimales que se encuentran proliferando requieren una membrana basal para anclarse y crecer. En cambio, las células de un tumor invasivo pierden tal requerimiento (41).

En la invasión tumoral, las células neoplásicas interactúan con diversos componentes de la matriz extracelular como son los que se mencionan a continuación:

LAMININA

La laminina es la mayor glicoproteína de la membrana basal. La unión de la laminina a la superficie de las células puede ser a receptores específicos de alta afinidad, o a glicolípidos de la membrana con baja afinidad. Esta proteína regula una amplia variedad de fenómenos biológicos, incluyendo la unión de la célula a la membrana basal (anclaje), el crecimiento, la morfología y la migración celular (41). se encuentra exclusivamente en la membrana basal y es producida por las células normales de dicha membrana (32).

La laminina es una molécula en forma de cruz con tres brazos cortos y uno largo (Fig.1). Todos los brazos tienen una región terminal globular constituida por carbohidratos, y cuya función no se conoce. La intersección de los brazos cortos de la cruz contiene numerosos enlaces disulfuro y es relativamente resistente a la acción de las proteasas. Esta región contiene el sitio de unión para el receptor de laminina. La molécula nativa de laminina por medio de las regiones globulares promueve la unión a los sulfatos de la membrana basal y al colágeno. La región globular del brazo largo de la laminina contiene un sitio de unión a la heparina. (Fig. 1)

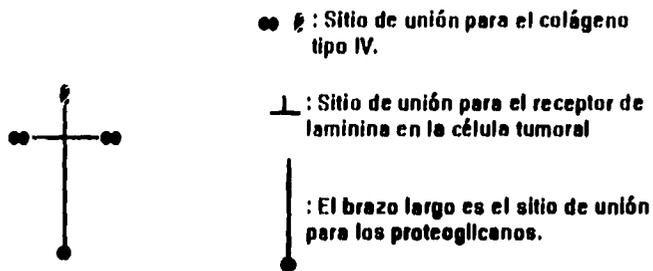


Figura No. 1. Estructura de la laminina. (32)

Los receptores para la laminina pueden estar alterados en número o grado de ocupación en los carcinomas humanos. Por ejemplo, se ha visto que los carcinomas de colon y de mama contienen un gran número de receptores de laminina expuestos pero no ocupados comparados con las lesiones benignas, así las células pueden interactuar con la laminina presente en la membrana basal, adherirse a ella y comenzar el proceso de invasión. La alteración en los receptores para la laminina puede ser un resultado indirecto de la defectuosa organización de la membrana basal en los carcinomas. En modelos animales Terranova y cols, 1981(41), seleccionaron células tumorales por su habilidad de unión por medio de la laminina, las células que se unían con mayor afinidad a la laminina produjeron 10 veces más metástasis después de una inyección intravenosa (i.v.) comparadas con las que se unían con una baja afinidad.

El receptor de laminina juega un papel en la metástasis hematogena al menos por dos mecanismos (41,15):

- 1.- Si el receptor no está ocupado, puede ser usado por la célula para unirse directamente a la laminina del hospedero.
- 2.- Si el receptor está ocupado con laminina, la célula puede utilizar la superficie de la laminina como un puente de unión a través de las regiones globulares terminales.

Un fragmento de laminina que se une al receptor, pero que ha perdido las regiones globulares terminales inhibe ambos mecanismos (41).

COLÁGENO

El colágeno tipo IV es el esqueleto estructural de la membrana. Es un importante sustrato porque constituye el andamiaje sobre el cual los otros componentes de la matriz son ensamblados (41). Las células epiteliales se unen por medio de las proteínas de anclaje como la laminina y la fibronectina a las moléculas de colágeno, estas proteínas de anclaje forman un puente entre la superficie celular y el colágeno de la matriz. De esta forma, la influencia del colágeno sobre la célula es indirecta a través de los componentes de la matriz que están en contacto directo con la célula (33)

Los colágenos tipos IV y V están asociados a la membrana basal y no son susceptibles al ataque de las colagenasas intersticiales (43,45). Las colagenasas tipo IV existen en dos formas, 72-kDa y 92-kDa, y son activas a pH neutro. Las enzimas son liberadas como zimógenos y pueden ser activadas *in vitro* por tripsina, plasminógeno o por exposición a compuestos organomercuriales. Sin embargo, el mecanismo de activación *in vivo* aún no está claro (43).

Se ha visto que células NIH 3T3 transfectadas que mostraron propensión a la metástasis, secretaron altos niveles de colagenasa tipo IV comparado con los niveles presentados por células NIH 3T3 no transfectadas o espontáneamente transformadas (tumorigénicas pero no metastásicas). Lo que significó que la supresión de la metástasis trajo como resultado la supresión de la colagenasa tipo IV (41).

FIBRONECTINA

La fibronectina es una glicoproteína (5% de CHO en peso), se puede encontrar en la superficie de la célula, como componente de la matriz extracelular y de forma soluble en el plasma. Tiene tres diferentes dominios, uno de unión al colágeno, otro de unión a la heparina, y otro de unión a su receptor en la superficie de la célula (43). In vivo, la fibronectina puede servir para organizar varios componentes de la matriz y para transmitir información a la célula (32).

Dado que la fibronectina se encuentra en la membrana basal de los capilares, se ha postulado que esta involucrada en la interacción de células tumorales que se encuentran en el torrente sanguíneo con la membrana basal de los capilares (32).

PROTEOGLICANOS

Los proteoglicanos son moléculas compuestas de un núcleo proteico y una o más largas cadenas de polisacáridos no ramificadas conocidas como glicosaminoglicanos las cuales están unidas covalentemente al núcleo proteico por un residuo de serina y constituyen al menos el 90% del peso del proteoglicano. Para un proteoglicano en particular, (por ejemplo, heparán sulfato) el núcleo proteico puede variar de tejido a tejido.

Los proteoglicanos pueden ser un factor de especificidad tisular, ya que se ha visto que el heparán sulfato en la piel puede ser distinto tanto química como funcionalmente del heparán sulfato en los pulmones.

Bernfield y cols, 1984 (33), mostraron que los proteoglicanos tienen influencia en la división celular. Koda y Bernfield (1984, 33) reportaron evidencia sugiriendo que algunos proteoglicanos son moléculas transmembranales que conectan componentes del citoesqueleto con las proteínas de anclaje (33).

Los proteoglicanos heparán sulfato son muy abundantes in vivo. Entre estas moléculas encontramos:

- **Perlecan** que se encuentra en la membrana basal.
- Miembros de la **familia sindecan, betaglicano**, y algunas isoformas de **CD44**
- **Glipican y Cerebroglican** .

Integrando la función estructural de los componentes de la membrana basal podemos decir que las glicoproteínas de unión como la laminina y la fibronectina forman un puente entre la superficie de las células epiteliales o en el caso de una neoplasia forman un puente entre la superficie de la células tumorales y otros componentes de la matriz como es el colágeno (32,33). Asociadas a las proteínas de anclaje se encuentran una o mas proteínas, glicoproteínas o proteoglicanos(Figura 2) (33).

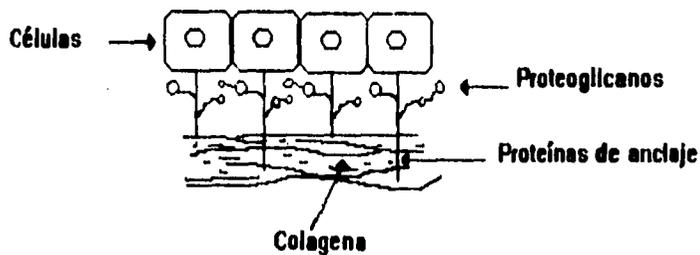


Figura No.2. Esquematización de la función estructural de los componentes de la membrana (33).

INTERACCIÓN DE LAS CÉLULAS TUMORALES CON LA MATRIZ EXTRACELULAR

Cuando los científicos se dieron cuenta de que si se llegaban a conocer molecularmente las interacciones entre las células tumorales y la matriz extracelular estas podrían ser un blanco para agentes quimioterapéuticos, se dieron a la tarea de investigarlo. De éste estudio surgieron una serie de hipótesis, entre estas encontramos la de Liotta y cols. (45) la cual, describe en tres pasos la secuencia de eventos durante la invasión de las células tumorales a la matriz extracelular (Fig. 3):

El primer paso es la adhesión de las células tumorales a la matriz. El principal mecanismo por el cual las células se unen a la matriz extracelular es a través de factores glicoproteicos de unión como la laminina y la fibronectina. Estos factores pueden ser sintetizados por la célula tumoral o ésta puede utilizar los factores de unión presentes en la membrana basal del tejido del hospedero. Por medio de los receptores de superficie para la laminina que se encuentran en dicha membrana, se lleva a cabo la adhesión de las células tumorales antes de la invasión.

Parece ser que los receptores de la fibronectina, las integrinas, al interactuar con la fibronectina de la célula tumoral alinean a ésta molécula en la superficie celular con componentes del citoesqueleto tales como talina y actina, alterando la morfología celular. Las integrinas pueden estar involucradas en las interacciones de la célula tumoral con las plaquetas, en la unión de células linfoides al endotelio, y en la interacción de células tumorales circulando con la superficie endotelial, la fibrina, el factor de von Willebrand, o la trombospodina, lo que trae como resultado que las células tumorales se protejan formando acumulos y así puedan viajar más libremente en la circulación llegando finalmente al órgano donde formarán metástasis.

El segundo paso es la penetración de las células tumorales a la matriz extracelular. Para esto, se requiere de enzimas que degraden la matriz. Se han descrito muchas clases

de proteinasas: metaloproteinasa y proteinasa de la serina y de la cisteína. Las células tumorales metastásicas, las células endoteliales, y los leucocitos polimorfonucleares producen metaloproteinasa específica para el colágeno tipo IV. De hecho existe una fuerte correlación clínica entre la cantidad de metaloproteinasa colagenasa tipo IV localizada usando una tinción inmunohistoquímica y mediciones *in vitro* y el fenotipo metastásico más agresivo.

De la misma forma, la actividad de las colagenasas intersticiales se ha correlacionado con la agresividad del carcinoma de vejiga humana. Los estudios de inmunohistoquímica sugieren que las células tumorales estimulan directamente a los fibroblastos para secretar colagenasa tipo I en vez de secretarla ellas mismas.

Otra proteinasa, la Catepsina B, es una hidrolasa ácida lisosomal con una actividad de endopeptidasa con un amplio rango de sustratos incluyendo miosina, actina, proteoglicanos, fibronectina, laminina, y porciones no helicoidales de colágeno tipo IV. La Catepsina B se ha encontrado en asociación con fracciones de membrana basal de células tumorales y en el medio condicionado por células tumorales lo que sugiere que está involucrada en la degradación de la matriz extracelular (45).

Los inhibidores de la síntesis de proteínas o los inhibidores naturales de metaloproteinasa bloquean la invasión de la matriz extracelular (por ejemplo, la inhibición de la heparanasa). De aquí se deduce que la invasión de la matriz no es sólo debido a la presión resultante por el crecimiento de las células tumorales, sino que además requiere mecanismos bioquímicos activos(43).

El tercer paso es la locomoción de las células tumorales a través de la matriz extracelular modificada por proteólisis para entrar a el estroma. El movimiento de las células a través de las barreras biológicas tales como el endotelio de la membrana basal puede ocurrir por medio de mecanismos quimiotácticos. Entre los factores quimiotácticos que se han encontrado para las células tumorales hay factores de crecimiento y componentes de la matriz extracelular como son: péptidos de colágeno, ciertos componentes

de tejido conectivo, factores de crecimiento parecidos a la insulina I y II, insulina, laminina, trombospondina, y fibronectina (45). Sin embargo, estos factores contribuyen a la locomoción dirigida, pero no es suficiente para iniciar la movilidad. Liotta y cols, 1991 (45), investigaron la posibilidad de que las células pudieran sintetizar factores de movilidad autócrinos (AMF). Los AMF de forma parácrina pueden reclutar células tumorales recién nacidas y con esto aumentar la respuesta invasiva. La presencia y acción de estas sustancias podría explicar la locomoción autónoma de células tumorales involucradas en la invasión y en el desarrollo de metástasis.

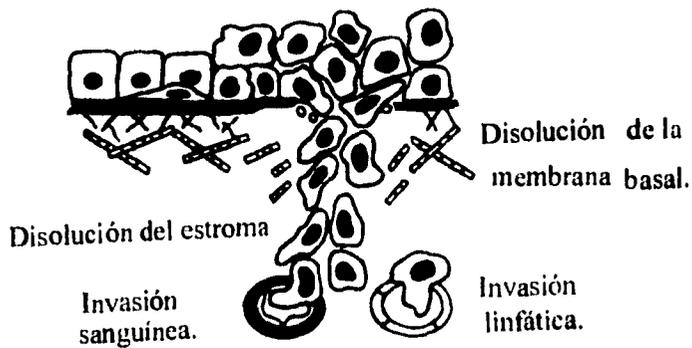


Figura No 3. Interacción de las células tumorales con la matriz extracelular en la transición hacia carcinoma invasivo(32).

LA PATOGÉNESIS DE LAS METÁSTASIS

La investigación de los mecanismos que regulan el patrón del inicio de las metástasis comenzó en 1889, cuando Paget cuestionó si la distribución de éstas se debía a la casualidad. Paget se dio cuenta que esto no era así, ya que ciertas células tumorales ("la semilla") tenían una afinidad específica por el medio de ciertos órganos ("la tierra").

Solo se obtenían metástasis cuando la semilla y la tierra se conjugaban. Fidler I., 1990 (44) encontró que el crecimiento de un tumor es específico de un sitio en particular dentro de un órgano. De tal forma, que los factores críticos que regulan la formación de las metástasis, y el lugar donde se ubican son las propiedades intrínsecas de las células metastásicas y de los factores del huésped involucrados en la homeostasis (el microambiente del tejido del hospedero) (44). Las metástasis órgano específicas son producidas por células tumorales que son receptivas al nuevo ambiente en el que se encuentran (44).

En principio, los eventos requeridos para la formación de una metástasis son los mismos en todos los tumores. Los pasos más generales en el proceso de metástasis son los siguientes:

Después de la transformación celular, el crecimiento de una célula neoplásica debe ser progresivo. Si la masa tumoral mide más de 2mm de diámetro se observa una extensa vascularización, en la cual, la síntesis y secreción de factores angiogénicos juega un papel clave (angiogénesis) (41). De esta forma, las células tumorales tienen acceso a los vasos linfáticos y sanguíneos para su diseminación. Para llevar a cabo la diseminación linfática, las células tumorales o acúmulos de ellas son transportados a los nódulos linfáticos regionales (embolia linfática) (2).

Se ha visto que los capilares linfáticos no tienen una membrana basal formada. Ésta sólo existe en los grandes canales linfáticos y en los senos de los nódulos linfáticos, de tal forma, que las células tumorales que se encuentran en el espacio intersticial no necesitan cruzar una membrana basal para entrar en la circulación linfática (41). Además, la barrera de los nódulos linfáticos es menos eficiente de lo que se creía originalmente, y muchas de las células inyectadas pasan a través del nódulo al conducto linfático eferente, y de aquí, por medio del conducto torácico al torrente sanguíneo (Fig 4) (2).

En la diseminación sanguínea, las células tumorales deben desprenderse del tumor primario o de otras metástasis y penetrar la pared del vaso sanguíneo (43,2) por medio de la secreción de enzimas que actúan sobre la membrana. Una vez que ha penetrado, la célula tumoral o acúmulos de ellas se agregan con leucocitos del hospedero, con fibrina o con plaquetas para hemolizar en las venulas precapilares por impactación mecánica y adherirse a la superficie luminal endotelial. Las células tumorales adheridas inducen rápidamente la retracción de las células endoteliales y se unen ávidamente a la membrana basal expuesta. Una vez que las células tumorales se han unido, las células endoteliales adyacentes se extienden sobre ellas y las separan del torrente sanguíneo. En este punto, nuevamente las células tumorales secretan enzimas o inducen la secreción de éstas por las células del hospedero originando una destrucción local de la matriz. Inmediatamente después se observan los pseudópodos de las células tumorales atravesando esta nueva puerta en la membrana celular. A este paso le sigue la extravasación completa de las células tumorales (45).

En el órgano donde la metástasis ha iniciado, las células tumorales que se han extravasado deben migrar a través del estroma intersticial perivascular antes de que crezca la colonia tumoral en el parenquima del órgano (32). La proliferación dentro del parenquima completa el proceso metastásico.

Cuando el tumor primario está situado en una región donde el drenado sanguíneo es por la vena porta, el sitio que primero encuentran las células tumorales es el lecho vascular del hígado; cuando el tumor está situado en otra parte, el lecho sanguíneo que encuentran primero es el pulmonar. Sin embargo, las células tumorales se pueden deformar lo suficiente para pasar a través de los capilares o pueden pasar por alto el lecho capilar y entrar al lado venoso de la circulación por medio de una desviación arteriovenosa en el hígado, pulmones y otras regiones, y entonces, entrar a la circulación arterial por medio del corazón para tener acceso a tejido vascularizado en cualquier parte del cuerpo (Fig 4).

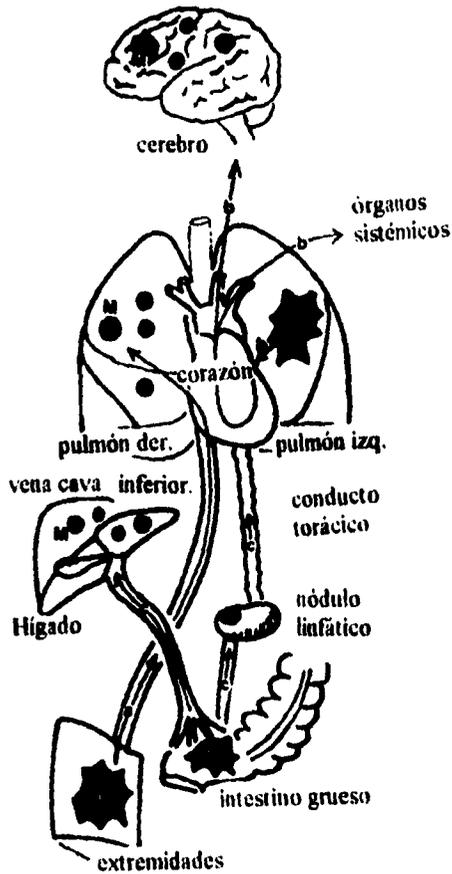


Figura No 4. Sitios de preferencia para las metástasis (M). Los sarcomas procedentes de las extremidades se diseminan a través de la vena cava inferior hacia los pulmones (a). Las células tumorales (T) procedentes de los pulmones entran a la vena cava izquierda y de aquí llegan a la circulación sistémica (b). Las células tumorales que proceden del intestino grueso son transportadas directamente de la circulación venosa hacia el hígado e indirectamente de las comunicaciones linfático-venosas hacia los pulmones (c). (45)

Una proliferación limitada de células malignas origina pequeñas colonias de células tumorales llamadas "micrometástasis", las cuales en un principio rodean los vasos sanguíneos. sin embargo, un crecimiento mayor de estas lesiones para formar metástasis de importancia clínica requiere el crecimiento interno de vasos sanguíneos para proveer una nutrición adecuada y así mantener la proliferación celular.

Una vez que el tumor ha inducido la formación de nuevos vasos sanguíneos hacia él, las células pueden invadir nuevamente el estroma, penetrar los vasos sanguíneos, y entrar a la circulación para producir metástasis secundarias, las llamadas "metástasis de metástasis" (Fig 5).

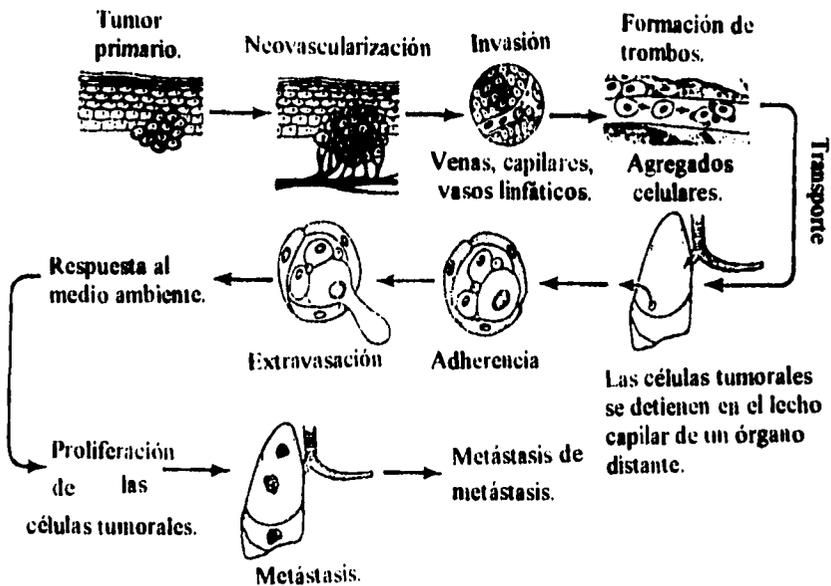


Figura No. 5. Eventos clínicos de la metástasis (13).

La metástasis es un proceso muy selectivo y sólo unas pocas células en un tumor primario pueden dar origen a una metástasis debido a que la mayoría de células que entran

al torrente sanguíneo son rápidamente eliminadas. Esto se demostró en un experimento en el cual usando células B16 de melanoma, se observó que 24 horas después de su entrada en la circulación, menos del 1% de las células estaban viables, y menos del 0.1% de las que se encontraban en circulación sobrevivían para formar una metástasis (44-42). lo que llevó a pensar que además de que la turbulencia en el torrente sanguíneo podía ser un factor que limitara la sobrevivencia de las células tumorales, algún factor intrínseco a la célula tumoral podría contribuir a que sólo unas pocas sobrevivieran. Esto echó abajo la creencia de que la metástasis representa la última expresión de anarquía celular, ahora se sabe que la metástasis es un proceso muy selectivo y está regulado por diferentes mecanismos(44).

PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS TUMORALES Y DE LOS FACTORES DEL HUÉSPED QUE REGULAN LAS METÁSTASIS(44)

PROPIEDADES DE LAS CÉLULAS TUMORALES.

A. Facilitación de la metástasis

- 1.- Producción de factores de crecimiento y sus receptores.
- 2.- Producción de factores angiogénicos.
- 3.- Movilidad, invasividad.
- 4.- Agregación, deformabilidad.
- 5.-Receptores de superficie celular específicos y moléculas de adhesión.

B. Inhibición de la metástasis

- 1.-Antigenicidad

FACTORES DEL HUÉSPED.

A. Facilitación de la metástasis

- 1.- Neovascularización
- 2.- Factores de crecimiento paracrinos y autocrinos.
- 3.- Plaquetas y sus productos.
- 4.- Células inmunes y sus productos.

B. Inhibición de la metástasis

- 1.- Barreras tisulares
- 2.- Turbulencia sanguínea, células endoteliales.
- 3.- Inhibidores tisulares de enzimas degradadoras.
- 4.- Factores antiproliferativos tisulares.
- 5.- Células inmunes y sus productos.

ANGIOGÉNESIS.

El término "angiogénesis" fue acuñado en 1935 para describir la formación de nuevos vasos sanguíneos en la placenta. Los nuevos capilares sanguíneos se forman a partir de los vasos sanguíneos preexistentes. La angiogénesis generalmente no es activa en los adultos excepto durante la sanación de alguna herida, la ovulación, en la menstruación y en la formación de la placenta (11).

En estudios iniciados en 1963, se encontró que los tumores implantados en órganos aislados y no perfundidos no crecían más allá de unos pocos milímetros de diámetro. Cuando se reimplantó el órgano en el ratón donador, estos tumores crecieron rápidamente más allá de 1cm^3 y mataron a su hospedero. Éste descubrimiento sugiere que en el ratón,

el tumor llega a vascularizarse, pero en el órgano aislado esto no se lleva a cabo, por lo que no hay suministro de oxígeno, de nutrientes y hay una acumulación de desechos tóxicos en el medio ambiente tumoral(30,46).

Con base en lo anterior, se postuló la siguiente hipótesis: "Una vez que se ha establecido el tumor, cada incremento en la población de células tumorales debe ser precedida por un incremento en el número de capilares que convergen en el tumor".

La vascularización tumoral por medio de los vasos sanguíneos del hospedero provee el camino para la diseminación de las células tumorales que se encuentran alrededor de los capilares sanguíneos en una configuración cilíndrica con un radio de 150 a 200 μ , equivalente a la distancia de difusión del oxígeno, conforme aumenta la distancia de las células tumorales a los capilares la síntesis de DNA disminuye (46).

Actualmente, se ha comenzado a reconocer que la patología dominante en muchos casos de neoplasias es la persistencia de la angiogénesis(30). Al estudiar su mecanismo de acción, se ha visto que están involucrados diferentes moléculas o factores angiogénicos que son sintetizados y/o utilizados por las células tumorales para inducir el crecimiento de los capilares sanguíneos.

FACTORES ANGIOGÉNICOS

El aislamiento del primer factor angiogénico fue cerca de 1970 (30). Se conocen al menos 20 moléculas que producen neovascularización. Entre estos, los primeros fueron el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) aislado de cerebro y el factor de crecimiento de células endoteliales (ECGF) aislado del hipotálamo, retina, ojo, y cartilago. Entre los factores de crecimiento, los más sobresalientes son: bFGF, VEGF, TNF α y TGF β .

FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGF)

Un progreso en la purificación de mitógenos para células endoteliales se dió en 1983 como resultado de la observación de que un factor de crecimiento derivado de un condriosarcoma de rata, tenía una marcada afinidad por la heparina. Tiempo después, se encontró que muchos factores de crecimiento de células endoteliales tenían una fuerte afinidad por la heparina y su purificación se facilitó con el uso de la cromatografía de afinidad a la heparina. Experimentos realizados en membrana corioalantoidea de embrión de pollo y en córnea de conejo han mostrado que los factores de crecimiento de unión a la heparina inducen la angiogénesis en cantidades de nanogramos.

Por 1985 se determinó la estructura primaria de dos factores de crecimiento que se unen a la heparina, FGF básico, un polipéptido de 146 a.a, y el FGF ácido, un polipéptido de 140 a.a (25). Estos, estimulan a las células endoteliales a producir proteasas, a proliferar y a migrar *in vitro*. También inducen la angiogénesis *in vivo* (Tabla 1). Se piensa que los efectos angiogénicos de los FGF's son iniciados por su interacción con receptores específicos en la membrana de las células endoteliales (46)

Los receptores para FGF's (FGFRs) tienen actividad de tirosincinasa, y se activan por dimerización del receptor. Esta dimerización origina la autofosforilación del receptor, facilitando el reclutamiento de proteínas de señalización interna.

Los FGF's se unen a proteoglicanos con menor afinidad de la que se unen a sus receptores transmembranales. Sin embargo, en experimentos *in vitro*, parece ser que la afinidad de estos ligandos por sus receptores (FGFRs) aumenta en presencia de proteoglicanos. *In vivo* no se ha presentado esta correlación.

Una molécula de proteoglicano puede presentar varias moléculas de FGF's a sus receptores, facilitando su dimerización y activación, originando con esto señales transmembranales que afectan el comportamiento de las células.

Al estudiar un poco más la relación de los proteoglicanos con la función de los FGF's. Yayon, 1994 (25), encontró que la mayoría de proteoglicanos probados (entre ellos síndecan y glipican) no eran capaces de potenciar la unión de los FGF's con su receptor de alta afinidad. Además, todos estos proteoglicanos inhiben la interacción in vitro de los FGF's con su receptor transmembranal. Contrario a estos descubrimientos, el perlecan mostró ser activador del bFGF, promoviendo su unión con su receptor transmembranal in vitro y la angiogénesis in vivo. Con base en estos resultados podemos decir que existen proteoglicanos que inhiben la interacción del FGF con su receptor y existen también proteoglicanos que estimulan ésta unión. Lo importante es identificarlos para poder usar a aquellos que inhiban la unión de los FGF's a su receptor como agentes angiopresivos.

Se ha postulado que los FGF's se pueden liberar de tres maneras diferentes:

- 1.- El FGF puede ser un factor angiogénico asociado a la célula que es liberado fisiológicamente solo bajo circunstancias especiales, por ejemplo, durante la ovulación.
- 2.- Se podría liberar el FGF después de algún daño en la célula y por lo tanto, tener un papel en la reparación tisular.
- 3.- La hidrólisis de heparán sulfato de la matriz extracelular podría liberar FGF básico induciendo la mitosis de las células endoteliales .

ANGIOGENINA

Otro factor angiogénico, la angiogenina es el primer polipéptido aislado de un medio condicionado de una línea celular de carcinoma de colon humano, es un potente estimulador de la angiogénesis a concentraciones de 0.5 a 290 ng en el embrión de pollo, y de 50 ng en la cornea de conejo. Tiene un 35% de secuencia homóloga a la familia de ribonucleasas pancreáticas pero aún no se sabe como la actividad enzimática de la angiogenina esta involucrada en el mecanismo de la angiogénesis (Tabla 1) (30, 46).

FACTORES DE CRECIMIENTO TRANSFORMANTE

Los factores de crecimiento transformante (TGF) son polipéptidos que cuando fueron aislados de células de ratón transformadas por un virus, se encontró que alteraban el fenotipo de algunas células normales a células transformadas. En 1986 se descubrió que estos factores también eran angiogénicos in vivo. El TGF- α se une al receptor de EGF, y tanto él como el EGF estimulan la proliferación de células endoteliales microvasculares (Tabla 1) (46,30).

TGF- β se encontró en tumores y células normales incluyendo riñón, placenta y plaquetas. Cuando el factor de crecimiento transformante β (TGF- β) se inyectó en la nuca de un ratón recién nacido, el TGF- β estimuló un incremento en el número de fibroblastos, en la producción de colágeno, en la formación de nuevos capilares sanguíneos y en el número de macrófagos que se encontraron en el sitio del inóculo. Sin embargo, el TGF- β inhibe la proliferación de células endoteliales vasculares in vitro. Estos efectos contrapuestos no han podido ser explicados pero se piensa que el TGF- β actúa como un regulador bifuncional del crecimiento celular in vitro (Tabla 1) (30)

Existen otros factores angiogénicos de bajo peso molecular que no han sido bien caracterizados como factores angiogénicos pero que son mitógenos para las células endoteliales. Entre éstos se encuentran: factores quimiotácticos y ciertas prostaglandinas, tales como PGE1 y PGE2.

Los factores angiogénicos que pueden estimular la locomoción o mitosis de células endoteliales vasculares in vitro tienen a estas células como blanco inmediato in vivo. El FGF ácido, el FGF básico y el TGF- α son ejemplos de tales factores angiogénicos directos. Por otro lado aquellos factores angiogénicos que no tienen efecto en las células endoteliales in vitro, se puede decir que tienen un efecto indirecto sobre estas células. Es posible que ciertos factores angiogénicos indirectos trabajen movilizándolo macrófagos o

activándolos para secretar factores de crecimiento o factores quimiotácticos (tal vez ambos) para las células endoteliales vasculares.

Tabla No.1. ACTIVIDADES BIOLÓGICAS DE LOS FACTORES ANGIOGÉNICOS SOBRE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES

FACTOR	ANGIOGENESIS	PROLIFERACIÓN	MOVILIDAD
FGF ácido	SI	SI	SI
FGF básico	SI	SI	SI
Angiogenina	SI	NO	No determinado
TGF-α	SI	SI	No determinado
TGF-β	SI	Inhibición	No determinado
Prostaglandinas	SI	NO	No determinado

FACTORES QUE MODULAN LA ANGIOGÉNESIS

HEPARINA: Se han hecho los siguientes descubrimientos.

1.- Las células cebadas y la heparina derivada de las células cebadas estimulan la locomoción de las células endoteliales de capilares in vitro (2,19,14,42).

2.- La heparina aumenta la angiogénesis inducida por el tumor en el embrión de pollo.

3.- La protamina, una proteína que se une con gran avidez a la heparina, inhibe la capacidad de las células cebadas y la heparina a estimular la locomoción de las células endoteliales, e inhibe la angiogénesis asociada con la embriogénesis, la inflamación, y ciertas reacciones inmunes (26).

4.- La heparina potencia el efecto proliferativo del FGF ácido en células endoteliales in vitro (19,3).

5.- La heparina inhibe la angiogénesis en presencia de cortisona o hidrocortisona (12,54,16,11).

6.- Los fragmentos de heparina que han perdido su actividad anticoagulante, tal como los hexasacáridos producidos por ruptura enzimática de la heparina, o un pentasacárido sintético, también inhiben la angiogénesis cuando se administran con esteroides.

7.- La cromatografía de afinidad a la heparina es un método de purificación muy efectivo para los FGF's angiogénicos.

8.- La heparina incrementa la unión del ECGF a los receptores endoteliales y

9.- La heparina protege a el FGF de la inactivación.

La heparina se une avidamente a la superficie de las células endoteliales, además, éstas son capaces de producir moléculas parecidas a la heparina o incluso heparina unidas a la superficie de la célula como se ilustra en la fig 6. Sabiendo que existen factores de crecimiento de unión a heparina, se deduce que la unión de estos a la heparina sobre la superficie de la célula endotelial, desencadenará una respuesta angiogénica.

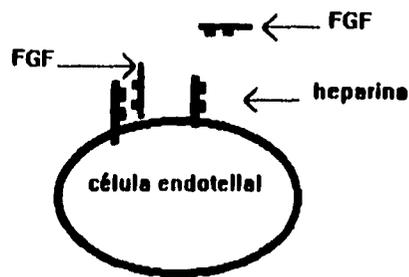


Figura No. 6. Interacción de la heparina sobre las células endoteliales con los FGF's

CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS ENDOTELIALES ASOCIADAS A UN TUMOR.

Las células endoteliales expresan varios niveles de heterogeneidad. El endotelio de los grandes vasos sanguíneos ha mostrado ser funcional y fenotípicamente diferente del de las células endoteliales microvasculares. Las diferencias en la expresión de moléculas de adhesión y crecimiento o factores de movilidad por parte de las células endoteliales en los diferentes lechos vasculares está implicado en el efecto llamado "semilla y tierra" (31,66).

Las células endoteliales de los vasos sanguíneos contribuyen a un gran número de funciones metabólicas entre las que están:

- 1.- Coagulación y trombosis
- 2.- Control del tono vascular y de la presentación de antígenos.
- 3.- Síntesis de componentes de la membrana basal
- 4.- Síntesis de factores de crecimiento.

Las células endoteliales pueden presentar ciertos marcadores de diferenciación como es el caso de la molécula de adhesión de células endoteliales 1 (Lu-ECAM-1), la cual interviene en la diseminación de ciertas células tumorales que tienen predilección por formar metástasis en el pulmón. Otro ejemplo de este tipo de moléculas lo constituyen la molécula de adhesión de células endoteliales de la mucosa 1 (MadCAM-1) y la molécula de adhesión dependiente de glicosilación (GlyCAM-1). Con base en esto podemos decir que la población de células endoteliales es heterogénea y sus características estarán determinadas por su microambiente (29).

La activación de las células endoteliales está asociada con un gran número de cambios fenotípicos que sirven para que las células se adapten a los requerimientos específicos del órgano. Por ejemplo, para el proceso de inflamación, las células son inducidas por medio de citosinas a expresar en su superficie moléculas de adhesión tales como: E-selectina (CD62E),

P-selectina (CD62P), VCAM-1 (CD106) e ICAM-1 (CD54), estas moléculas dirigen a las células que están en la circulación hacia el sitio de inflamación.

La angiogénesis es otro modo de activación de las células endoteliales que induce cambios fenotípicos. Este proceso es causado por mecanismos autócrinos y parácrinos que son capaces de hacer que las células endoteliales salgan de los vasos sanguíneos preexistentes para entrar a una cascada morfológica que dará como resultado la formación de nuevos vasos sanguíneos con células endoteliales maduras. No existe una diferencia morfológica esencial entre los nuevos capilares que responden a la malignidad y el crecimiento de los capilares que ocurre durante la neovascularización fisiológica. Solo existe una diferencia demostrable, es la gran intensidad y persistencia de la angiogénesis inducida por tumores comparado con otros tipos de neovascularización. Los tumores inducen la angiogénesis casi continuamente hasta que la neoplasia es eliminada o el hospedero muere. La neovascularización del tumor permite ampliar el rango de anomalías estructurales y funcionales de los vasos sanguíneos, incluyendo tortuosidades, dilataciones, bifurcaciones y trifurcaciones arterio/venosas. Estas anomalías en la función y arquitectura de los vasos sanguíneos trae como resultado disturbios en el flujo sanguíneo, con frecuentes estasis y cambios en la dirección de el flujo, ocasionando un daño en el intercambio de metabolitos (31). Además, los vasos sanguíneos asociados a un tumor tienen una membrana basal pobremente desarrollada y ha perdido la inervación colateral. Ninguno de los mecanismos del hospedero para el control de la angiogénesis parece ser que limita la angiogénesis tumoral.

QUIMIOTERAPIA

La búsqueda de nuevos fármacos anticancerígenos frecuentemente comienza con la síntesis de análogos de agentes efectivos que ya existen con el objeto de eliminar los efectos no deseados o localizar la actividad citotóxica del fármaco de forma mas precisa. La primera prueba del potencial antitumoral de un fármaco se lleva a cabo en líneas celulares tumorales(28).

El hecho de que una célula tumoral se haga resistente a un fármaco, es decir, que tenga la capacidad de sobrevivir a un tratamiento con este fármaco, ha hecho que los investigadores busquen nuevas alternativas de terapia. además, debido a la importancia clínica de las metástasis, también se han dado a la tarea de desarrollar métodos para predecir la agresividad de la metástasis (41,42). Uno de estos métodos es identificar el grado de vascularización del tumores decir, el grado de angiogénesis que presenta. El desarrollo de una estrategia antiangiogénica exitosa se puede dividir en tres líneas de experimentación:

- 1.-Compuestos naturales o sintéticos que son examinados en su actividad antiangiogénica en sistemas biológicos como en Membrana Corioalantoidea de embrión de pollo o en córnea de conejo.
- 2.-El desarrollo de inhibidores específicos de factores angiogénicos.
- 3.-El desarrollo de inhibidores de la respuesta de células endoteliales vasculares (mitogénesis, migración, generación de proteasas).

TERAPIA ANGIOSUPRESIVA.

Entre los agentes que pueden inhibir la angiogénesis tenemos los que se presentan en la tabla número 2:

Tabla No. 2. AGENTES ANTIANGIOGÉNICOS Y ANGIOSUPRESIVOS(31)

Inhibidores naturales de la angiogénesis	Factor 4 plaquetario (PF4) Trombospondina Interferón α y β
Angiostatina	
Antagonistas de factores de crecimiento angiogénicos	Suramina Pentosan polisulfato (PPS)
Esteroides angiostáticos y sus co-inhibidores	Cortisona Medroxiprogesterona Heparina (fragmentos) Tetradecasulfato de β - ciclodextrina
Fármacos anti-inflamatorios	Indometacina Ibuprofen
Compuestos antiangiogénicos naturales y sus derivados	Análogos de la vit. D ₃ Herbimicina A Análogos de somatostatina
Fármacos anticáncer	Bleomicina Metotrexate Mitoxantrona
Otros	Quelantes de cobre Minociclina

- **Antagonistas de factores de crecimiento y anticuerpos contra factores de crecimiento.**

- 1.- Se han identificado compuestos que bloquean específicamente la unión del bFGF a su receptor de alta afinidad y son potentes inhibidores de la angiogénesis en el ensayo de CAM.
- 2.- El VEGF es un mitógeno para las células endoteliales. Es expresado en varios tumores in situ y es liberado por un gran número de células tumorales. Debido a esto, el tratamiento con anticuerpos monoclonales específicos para VEGF reduce la densidad vascular e inhibe el crecimiento de varios tumores .

- **Heparina.**

Una región específica de la heparina, (ISMS) se une fuertemente al bFGF e inhibe su actividad. Dos análogos de ISMS, GM1306 y GM1474 inhiben la proliferación de las células endoteliales adrenocorticales dependientes de bFGF in vitro.

La administración conjunta de heparina y algunos corticoesteroides ha inhibido la angiogénesis en los ensayos de CAM (54). El mecanismo por medio del cual se lleva a cabo la actividad antiangiogénica de los corticoesteroides en presencia de heparina no se conoce con claridad. Parece ser que estos corticoesteroides inducen la disolución de la membrana basal (53).

Por otro lado, al hacerse estudios de la angiogénesis con fragmentos de heparina administrados junto con los esteroides angiostáticos (los que inhiben la angiogénesis), se encontró que un fragmento hexasacárido con un peso molecular de 1600 fue el inhibidor más potente. Durante éste mismo estudio se encontró que algunos fragmentos de la heparina podían ser responsables de inducir la angiogénesis, y que otros podían inhibirla en presencia de corticoesteroides.

- **Pentosán polisulfato**

La molécula tipo heparina pentosán polisulfato (PPS) evita que los factores de crecimiento de unión a la heparina tengan acceso a sus sitios de unión en los glicosaminoglicanos de la célula y de ésta forma inhibe su función biológica.

- **Inhibidores de enzimas**

1.- Inhibiendo la producción de urocinasa activadora de plasminógeno por medio de interferón- γ , penicilamina y suramina.

2.- Un inhibidor de ribonucleasa pancreática mostró ser capaz de inhibir la angiogénesis inducida por angiogenina, y por bFGF.

3.- La proteína cinasa P (PKC) es una enzima con un importante papel en las señales de transducción y en la inducción de la angiogénesis, la calfostina C es un inhibidor selectivo de PKC y se ha visto que inhibe la respuesta angiogénica inducida por bFGF. TNF- α o interleucina 1 α (34)

- **Fragmento de prolactina**

A concentraciones nanomolares, el fragmento N-terminal de prolactina humana de 16KDa inhibe la proliferación de células endoteliales capilares inducida por VEGF o bFGF (26,34)

METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.

GENERALIDADES SOBRE LAS LÍNEAS CELULARES UTILIZADAS.

SK-MEL-28 (MELANOMA HUMANO MALIGNO)

T. Takahashi y asociados aislaron esta línea como está indicado en el ATCC (61) Proviene de un paciente de 51 años de edad, sexo masculino; tipo de sangre A(+). Fenotipo del HLA del donador: A 11,26:B40,DRw4. Crecimiento en forma de monocapa. Forma un melanoma maligno en ratones desnudos. Fenotipo del HLA de la línea celular: A11,26:B40:DRw4.

Medio de cultivo: Medio esencial mínimo de Eagle con aminoácidos no esenciales y piruvato de sodio 90% y suero fetal bovino, 10%. Viabilidad: 84%.

Medio de congelamiento: 95% de medio de cultivo y 5% de Dimetilsulfóxido (DMSO); libre de antibiótico.

Coenzimas: Fosfoglucomutasa 3 (PGM3,1); fosfoglucomutasa 1 (PGM1,1); Esterasa D (ES D,1); Adenilato ciclasa (AK1,1-2); Glioxilasa (GLO-1,2); Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, B (G6PD, B).

Las pruebas para micoplasma, bacterias y hongos fueron negativas. Confirmado como línea celular humana por análisis isoenzimáticos.

K-562 (LEUCEMIA MIELOGÉNICA CRÓNICA)

La línea celular k-562 fue establecida por Lozzio y Lozzio (61) a partir de una efusión pleural de una mujer de 53 años de edad con leucemia mielogénica crónica en crisis blastoide terminal. Estudios realizados por Anderson y cols. sobre las propiedades de

la superficie de la membrana, permitieron concluir que K-562 era una línea de eritroleucemia humana. Estudios más recientes indican que los blastos de K-562 son multipotenciales, células hematopoyéticas malignas que espontáneamente se diferencian en sus progenitores reconocibles de la serie eritrocítica, granulocítica y monocítica.

Medio de cultivo: Medio RPMI 1640 90% y suero fetal bovino 10%; libre de antibiótico. Las células no se pegan a la botella de cultivo. Crecen en el sobrenadante. Su morfología es parecida a un linfoblasto. **Viabilidad:** aproximadamente el 85%.

Medio de congelamiento: 95% medio de cultivo; 5% DMSO; libre de antibiótico.

Isoenzimas: Adenilato ciclasa (AK1,1); esterasa D (ES D,1); glioxilasa (GLO-1,2); glucosa 6-fosfato deshidrogenasa, B (G6PD, B); fosfoglucomutasa 1 (PGM1,0); fosfoglucomutasa 3 (PGM3,1); enzima mállica (Me2,0) (61).

Las pruebas para micoplasma, bacterias, y hongos fueron negativas. Se confirmó como línea celular humana por isoenzimología. Desarrolla tumores de 30-35 días en ratones desnudos inoculados con 10^7 células vía subcutánea. No se detectó transcriptasa reversa.

REACTIVOS Y SU PREPARACIÓN.

FÁRMACOS:

	Clave	Nomenclatura en éste trabajo.
HEP (1)	HV	H ₁
PRODUCTO D (2)	HA	H ₂
HEPARINA SÓDICA BMP* (3)	HR	H ₃
HEPARINA SÓDICA BMP** (4)	HQ	H ₄

* No. de Lote DO188:B Potencia 134 UI

** No de Lote Do 189:B Potencia 143 UI

Los fármacos fueron obtenidos comercialmente y se prepararon de la siguiente manera: Disolver 20mg de fármaco en 10 ml de agua desionizada estéril. Esterilizar por filtración con membrana de 0.45 μ . Se obtuvo una concentración final de 2mg/ml = 2 μ g/ml. Guardar en el refrigerador.

La composición de los fármacos se resume en la tabla No. 1.

Tabla No. 1 COMPOSICIÓN EN PORCENTAJE DE LOS FÁRMACOS H₂,H₃,H₄.

SACARIDOS	P.M.	EN H ₂	EN H ₃	EN H ₄
Disacáridos	564	1.0	1.2	0.6
Tetrasacáridos	1128-1300	6.5	7.6	6.8
Hexasacáridos	1846	10.5	11.0	10.0
Octasacáridos	2256-2600	14.5	13.3	15.0
Decasacáridos	2820-3026	24.5	23.0	25.0
Dodecasacáridos	3384-3600	22.5	22.0	23.0
Tetradecasacárido	4146	10.5	11.4	10.0
Hexadecasacárido	4242	7.4	7.8	7.5
Octadecasacárido	4884	1.6	2.0	1.2
Eicosacárido	5526	0.8	0.6	0.9

H₁: es un producto de origen chino y de composición desconocida.

VINCRISTINA:

La Vincristina es el componente de muchas combinaciones de regimenes terapéutico y es utilizado entre muchos otros compuestos para tratar el cáncer. La Vincristina se usa como terapia paliativa para leucemias, linfomas, sarcomas en adultos, carcinomas de pulmón y mama. La Vincristina inhibe la polimerización de la tubulina en las terminales de ensamble microtubular (10), destruyendo el huso mitótico, deteniendo con esto la mitosis(28). Se ha reportado que la concentración inhibitoria efectiva sobre la línea K-562 es de 10ng/ml de células (60).

Por todas estas características, se decidió tomar a la Vincristina como fármaco control positivo para la línea celular K-562.

La presentación de la vincristina utilizada fue la solución inyectable de 1mg (ampolleta de 10ml). De la disolución formada, se tomó 0.5ml y se llevó a un volumen final de 5ml para obtener una concentración final de 10ng de vincristina/ μ l.

HIDROCORTISONA:

Obsequiada por el laboratorio de desarrollo analítico, Facultad de Química, U.N.A.M

SOLUCIONES:

TRIPSINA:

Tripsina	0.5g (1:250)
NaCl	8.0g
KCl	0.4g
Dextrosa (GIBCO)	1.0g
NaHCO ₃ (BAKER)	0.20g
Agua desionizada estéril c.b.p.	1L

Pesar las cantidades indicadas y disolverlas en un volumen pequeño con agua desionizada, una vez disueltas, llevar a un volumen final de un litro con agua desionizada. Esterilizar por filtración con membrana millipore de 0.45 μ . Hacer alícuotas de 20ml y guardar en el congelador.

MTT: bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio)

Sal de bromuro de tetrazolio (MTT) SIGMA	100mg
Solución salina isotónica c.b.p	20ml

Se hace un pequeño volumen dependiendo de los requerimientos. Para hacer 20ml, se pesan 100mg de MTT (evitar el contacto con la piel porque es tóxico), se disuelven y se llevan a un volumen de 20ml con solución isotónica estéril (SSI) para obtener una concentración de 5mg/ml. Esterilizar por filtración y almacenar cubierto con papel aluminio para protegerlo de la luz. Guardar en el refrigerador, es estable por un mes aproximadamente.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS)

NaCl	8.0g
KH ₂ PO ₄	0.24g
Na ₂ HPO ₄	1.44g
KCl	0.2g
Agua desionizada estéril c.b.p	1L

Ajustar el pH a 7.4. Adicionar agua desionizada a completar un volumen final de un litro. La solución se distribuye en alícuotas y se esteriliza por autoclave durante 20min a 15lb/in². Guardar a temperatura ambiente o en el refrigerador.

SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA

NaCl	8.5g
Agua desionizada estéril c.b.p	1L

Disolver la sal en el agua desionizada estéril. Distribuir la solución en alícuotas de 500ml y esterilizar por autoclave durante 20 min a 15 lb/in². Almacenar en refrigeración.

ETANOL AL 70% (para la limpieza de campana e incubadora)

Alcohol absoluto SIGMA	70ml
Agua destilada	30ml

A esta solución se le agrega un chorro de benzal como desinfectante.

DIMETIL SULFÓXIDO

Dimetilsulfóxido (DMSO)

SIGMA

FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS BÁSICO (bFGF):

Este factor es Recombinante humano No. de catalogo: 13256-029(GIBCO).

Se disuelven los 10µg de el factor en 100µl de solución amortiguadora de fosfatos (PBS) suplementada con 0.1% de albúmina sérica bovina para tener una concentración de 100ng/µl. Se preparan alícuotas de 5µl (500ng) y se almacenan a -70°C. Se toma una de estas alícuotas y se diluyen en 2.5ml de PBS suplementado con 0.1% de albúmina para obtener una concentración de 200ng/ml. Para evitar congelar y descongelar (ya que puede dañar al producto) se hacen alícuotas de 250µl en tubos eppendorff estériles y se almacenan a -20°C.

MEDIOS DE CULTIVO

RPMI 1640

• Medio RPMI 1640 adicionado con glutamina (GIBCO).

• Suplementos	g/l
Dextrosa (GIBCO)	2.50
NaHCO ₃ (BAKER)	2.00
Suero fetal bovino (SIGMA)	10%
Antibiótico antimicótico(GIBCO)	10ml
Piruvato de sodio (100mM) (GIBCO)	10ml
Aminoácidos no esenciales (10mM) (SIGMA)	10ml

Preparación: A un volumen de 700ml de agua desionizada a temperatura ambiente (15-30°C), agregar el contenido de un sobre de medio RPMI 1640 (10.4g/paquete). Agregar los suplementos excepto el suero fetal bovino. Agitar hasta disolución completa. Ajustar el pH del medio de 0.3 a 0.4 unidades debajo del pH final de trabajo deseado de 7.4.

Completar el volumen a 900ml con agua desionizada. Esterilizar inmediatamente por filtración con membrana millipore de 0.45µ. Suplementar el medio con 10% de suero fetal bovino activo (esterilizado por filtración con membrana millipore de 0.45µ) a medida que se va utilizando. El medio se conserva en refrigeración. Como control de una posible contaminación microbiana es recomendable incubar una alícuota del medio a 37°C durante dos días. El medio se conserva en refrigeración. Si al término de éste tiempo, el medio está turbio o el indicador viró a amarillo, se debe refiltrar. Si al hacer la prueba de esterilidad para éste medio se presenta contaminación, se desecha.

D-MEM. (Dulbecco's Modified Eagle Medium)

• Medio D-MEM (GIBCO)

Suplementos	g/l
Glutamina (200mM) (SIGMA)	2 ml
Hepes (SIGMA)	2.2
Insulina (LILLY)	10 ml
MEM- solución de a.a esenciales (GIBCO)	10 ml
Suero fetal bovino (SIGMA)	10% (v/v)
Antibiótico antimicótico (100X)(SIGMA)	10 ml
NaHCO ₃ (BAKER)	3.7

Preparación: A un volumen de 700ml de agua desionizada, a temperatura ambiente (15-30°C), adicionar el contenido de un sobre de medio D-MEM. Adicionar todos los

suplementos excepto el suero fetal bovino. Agitar hasta disolución completa. Ajustar el pH del medio de 0.2 a 0.3 unidades debajo del pH final de trabajo deseado (pH 7.4).

Completar con agua desionizada hasta un volumen de 900ml. Esterilizar inmediatamente por filtración con membrana. Suplementar el medio con suero fetal bovino activo (previamente esterilizado por filtración con membrana) a medida que se vaya utilizando.

Como control de una posible contaminación microbiana , es recomendable incubar una alícuota de medio a 37°C durante tres días. El medio se conserva en refrigeración.

MEDIO PARA CONGELAMIENTO

Suero Fetal Bovino inactivado(sigma)	92%
Dimetil Sulfoxido (DMSO)	8%

Se prepara la solución de 92% de suero y 8% de DMSO . Se coloca una alícuota de células de 2 a 3 millones de células a congelar en el criotubo, y se le agrega medio de congelamiento, aproximadamente 1ml de medio. Se congela a -70°C por dos horas y después se pasa a nitrógeno líquido.

TÉCNICAS

CONDICIONES NECESARIAS PARA CULTIVAR CÉLULAS.

En primer lugar, se debe de contar con un cuarto de cultivo aislado, para evitar corrientes de aire. Se requiere de una campana de flujo laminar estéril, una incubadora que tenga inyección de CO₂ y un microscopio invertido. De preferencia que todo lo que se va a

manejar para el cultivo de células como son medios, pipetas, vasos, etc., se encuentre muy cerca del cuarto de cultivo.

El cuarto siempre debe de estar limpio. Cuando se va a trabajar, la campana se debe prender 15min antes y limpiarse con una solución de etanol al 70% y benzal; la limpieza se realiza antes y después de trabajar. De preferencia, hay que tener un mechero, para flamear la boquilla de las botellas de cultivo, de medio de cultivo, de pipetas, y de cualquier material con el que se vaya a trabajar.

La incubadora siempre debe de tener la cantidad suficiente de agua para mantener el porcentaje de humedad que se requiere para el cultivo. Como las células son sensibles a las variaciones de CO_2 , es necesario revisar periódicamente que el nivel de CO_2 sea el correcto. Hay que cuidar que las charolas de la incubadora estén siempre limpias para evitar cualquier tipo de contaminación. Se realiza una limpieza general de la incubadora frecuentemente (semanalmente). Todos los materiales que entren a la incubadora como botellas de cultivo, medios de cultivo, deberán ser limpiados exteriormente con la solución de etanol y benzal a fin de evitar contaminaciones.

La persona que va a trabajar con las líneas celulares debe antes lavarse las manos con agua y jabón y después frotarlas con la solución de etanol y benzal, para prevenir contaminación.

Cuando por alguna razón, ocurrió una contaminación por bacterias, esta es fácilmente reconocible, porque el medio se vuelve turbio y opaco en 48hrs. En ese momento, se debe desechar esa botella de cultivo, y dar una limpieza general con Sulfato de Cobre, para eliminar cualquier tipo de contaminación que pudiera haber en la incubadora. Los siguientes días se revisan las demás cajas para detectar cualquier posible contaminación. Todo el trabajo debe de realizarse dentro de la campana.

MÉTODO DE DESCONGELAMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES.

El descongelamiento de las líneas celulares debe de hacerse en el menor tiempo posible (1min). Antes de descongelar el criotubo, se debe colocar en la incubadora una botella de cultivo con el medio de cultivo respectivo para cada línea celular con el objeto de que se adapte a las condiciones de humedad y de CO₂ que se requiere. Después de unos 10min aproximadamente, se procede a descongelar el criotubo. Se saca del nitrógeno líquido y se frota con las palmas de las manos hasta que la pastilla de hielo se desprenda, una vez que esto ha sucedido, se vacía la pastilla en la botella con el medio de cultivo. Se homogeniza y se observa la morfología de las células al microscopio para saber en que condiciones se encuentran al momento de descongelar, posteriormente, se meten a la incubadora. Después de aproximadamente 2 horas hay que cambiarles el medio de cultivo porque el DMSO con que se congelaron es tóxico para las células. Se hace una segunda observación de las células al microscopio y se meten nuevamente a la incubadora.

MÉTODO DE CULTIVO DE LAS LÍNEAS CELULARES.

Cuando se cultivan líneas celulares, deben tenerse cuidados en pequeños detalles. Hay que tomar en cuenta que unas líneas son mas sensibles a cambios que otras, y sobre todo, después de descongeladas.

Primero hay que cubrir las condiciones mínimas para el cultivo celular. Después del descongelamiento, las células se deben de observar diariamente. Cuando los medios contienen rojo de fenol como indicador, como en nuestro caso, éste indicador vira a amarillo cuando el medio está muy ácido, indicando que ya no hay suficientes nutrientes necesarios para las células, por lo tanto hay que cambiarlo. Sin embargo, si cuando se hacen las observaciones diarias se nota que el medio está muy sucio de restos celulares o desechos celulares, aunque el medio no ha virado a amarillo, se debe de cambiar ya que

estos desechos son tóxicos para las células vivas o incluso se debe de cambiar la botella de cultivo, porque muchas veces estos restos se adhieren a la botella y con el simple cambio de medio no es suficiente.

Antes de llevar a cabo el cambio de medio, los medios, el PBS y la tripsina se deben de colocar en un baño a 37°C por aproximadamente 15 min. El cambio de medio debe llevarse a cabo rápidamente porque las células se estresan.

En el caso de la línea celular SK-MEL 28 éstas células se adhieren al plástico, de tal forma que lo único que se tiene que hacer es eliminar el medio anterior. Después se agregan a la botella 2 a 3ml de PBS y se agita suavemente para tratar de eliminar todos los desechos. Se retira el PBS y se agrega el medio de cultivo respectivo (en este caso D-MEM). Se agregan 5ml de medio porque las botellas de cultivo utilizadas son de 50ml y esta cantidad de medio no se derrama. Al agregar tanto el medio como el PBS, se debe tener cuidado de que la pipeta no toque la boquilla de la botella de cultivo. Para evitar contaminaciones se flamea la boquilla de la botella. Se cierran las botellas y se meten a la incubadora en posición horizontal, una vez adentro, se abre un poco el tapón para permitir el flujo de CO₂ botella.

En el caso de la línea K-562, dado que las células se encuentran tanto en suspensión como adheridas al plástico, es necesario tomar el medio y colocarlo en un tubo tubo para centrifugarlo a una velocidad de 2000 r.p.m durante 5 min. Mientras se esta centrifugando, a la botella de cultivo se le agregan de 2 a 3 ml de PBS. se agita para eliminar los restos celulares y posteriormente se extrae el PBS. Se agregan aproximadamente 3ml de medio nuevo: en este caso RPMI 1640. Una vez centrifugados los tubos, se observa una pastilla de células en el fondo, cuidadosamente se elimina el medio sin destruir la pastilla y se le agrega un pequeño volumen de medio nuevo, se resuspende la pastilla y se incorpora a la botella de cultivo. Se completa con medio de cultivo nuevo, para llegar a un volumen final de 5 ml.

En caso de que la botella de cultivo después de lavarla con PBS mantenga los restos celulares, es necesario entonces, cambiar de botella, para lo cual se desprenden las células de la botella agregando 2ml de tripsina, e incubando durante cinco minutos o hasta que se desprendan completamente las células. Se toma la suspensión celular tratada con tripsina y se centrifugan a 2000 r.p.m por cinco minutos. Una vez centrifugadas las células, se elimina el sobrenadante con cuidado y se le agrega medio nuevo, se resuspende la pastilla y se agrega a una botella nueva. Se observan al microscopio y se incuban horizontalmente abriendo levemente el tapón de la botella.

En el caso del cultivo de las células endoteliales, que por tratarse de células no transformadas, son mucho mas susceptibles a cualquier variación en las condiciones de cultivo que las células tumorales, además de que requieren de factores de crecimiento exógenos. Estas células, se adhieren al plástico, por lo que el cambio de medio de cultivo se facilita realizandose de la misma forma como se hizo para la línea celular SK-Mel 28, pero además se les debe agregar 50µl de bFGF (concentración 0.2ng/µl) por cada 10ml de medio de cultivo para estimular la reproducción celular. El cambio de medio y por lo tanto de factor, se debe de realizar cada dos días independientemente de si hay restos celulares o no. Es importante revisar estas células constantemente para detectar cualquier cambio en la morfología y encontrar lo mas su pronto posible la causa. La muerte de las células se detecta fácilmente porque comienzan a despegarse de la botella de cultivo y un paso previo a esto es que se observan células muy vacuoladas.

Las células se incuban a 37°C en presencia de 5% de CO₂ y 100% de humedad. Es necesario recordar que al incubarse el cultivo, se debe de abrir el tapón de la botella.

MÉTODO DE CONGELAMIENTO DE LAS LÍNEAS CELULARES.

Cuando las células están a punto de llegar a confluencia y si no se van a utilizar, se recomienda congelarlas, ya que en éstas condiciones se mantienen viables por mucho tiempo. No se recomienda que se congelen cuando están en confluencia porque la muerte celular ya comenzó y la viabilidad disminuye. El método de congelamiento se realiza de la siguiente forma: Las células que están a punto de llegar a confluencia (que tengan de 2 a 3 millones de células) se despegan de la botella agregando 2ml de tripsina e incubándolas por cinco minutos o hasta que se desprendan completamente. La suspensión de células tratadas con tripsina se centrifuga a 2000 r.p.m durante 5min. Se elimina el sobrenadante y la pastilla se resuspende en un pequeño volumen de medio de congelamiento. Esta suspensión se coloca en un criotubo. Se completa con medio de congelamiento hasta tener un volumen final aproximado de 1ml. Se recomienda no poner demasiado medio porque al congelarse puede romperse el tubo. Se congela a -70°C por dos horas y posteriormente se meten en nitrógeno líquido.

MEDIO ACONDICIONADO POR LAS LÍNEAS CELULARES TUMORIGÉNICAS

El medio acondicionado por las células tumorales que casi llegan a confluencia se recolecta en viales estériles y se filtra dos veces con membrana millipore de 0.45 μ para asegurarse de eliminar los restos celulares y que el medio sólo contenga los factores angiogénicos secretados por las células tumorales. Este medio que consta del medio acondicionado con factores de crecimiento secretados por las células tumorigénicas de 2 y 3 días de incubación. El medio acondicionado por células tumorales debe utilizarse lo más pronto posible, ya que corren el riesgo de que los factores angiogénicos se descompongan.

TÉCNICA DE REDUCCIÓN DEL MTT.

FUNDAMENTO:

El reactivo bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolio (MTT) es reducido por las deshidrogenasas mitocondriales de las células vivas formando un precipitado morado, el formazán (59). El número de células viables es directamente proporcional a la producción de formazán, el cual, después de su solubilización en DMSO puede ser medido espectrofotométricamente. Las medidas de sensibilidad in vitro a un fármaco por el método de la reducción de la sal de tetrazolio ha mostrado tener correlación con las determinaciones experimentales hechas por otros métodos como son: determinación de proteína celular, por exclusión con colorante vital y métodos clonogénicos en una variedad de cultivos y condiciones experimentales (55).

CURVA DE CRECIMIENTO

- 1.- Se selecciona un cultivo que se encuentre en confluencia, es decir, que se observe una monocapa uniforme en toda la botella, esto para asegurar que la cantidad de células que tenemos en la botella sea suficiente para realizar la curva.
- 2.- Se retira el medio de cultivo
- 3.- Para desprender las células que se encuentran en confluencia, se agregan aproximadamente 2ml de tripsina. Se introducen a la incubadora a 37°C en presencia de 5% de CO₂, 95% aire y 100% de humedad. se incuba aproximadamente 5 min, o hasta el desprendimiento total de las células.
- 4.- Se hacen las diluciones correspondientes con medio de cultivo, hasta tener una concentración de 1×10^4 células/100µl (realizar el conteo celular en una cámara de Neubauer).
- 5.- Se depositan 100µl de la suspensión celular en los pozos correspondientes a cada uno de los seis días de la curva. Cada día se hace por triplicado.

- 6.- Adicionar 900µl de medio de cultivo fresco; cerrar la caja y meterla a la incubadora a 37°C. en presencia de 5% CO₂, 95% de aire y 100% de humedad,
- 7.- Después de un día de incubación, se resuspende cuidadosamente el contenido de cada pozo y se coloca en su correspondiente tubo eppendorff estéril. Si se trata de células que se adhieren al plástico, adicionar a cada pozo 500µl de tripsina, incubar a 37°C 5 min y resuspender nuevamente con cuidado vertiendo el contenido en el tubo eppendorf correspondiente.
- 8.- Centrifugar los tubos a 3000 r.p.m. durante 4 min.
- 9.- Se descarta cuidadosamente el sobrenadante
- 10.- Se resuspenden las células con 200µl de medio nuevo y se adicionan 20µl de una solución de MTT estéril (5mg de MTT/ml SSI). Tapar, agitar, hacer un agujero en la tapa del tubo con un alfiler para permitir la entrada de aire con CO₂
- 11.- Incubar por cuatro horas a 37°C en presencia de 5% de CO₂, 95% de aire y 100% de humedad,
- 12.- Centrifugar a 5000 r.p.m durante 5 min. Descartar cuidadosamente el sobrenadante,
- 13.- Disolver la pastilla con 500µl de DMSO,
- 14.- Medir la absorbancia a 540nm,
- 15.- Se repite todo el procedimiento para los días 2,3,4,5 y 6.

CURVA PATRÓN

- 1.- Se escoge un cultivo que se encuentre en confluencia.
- 2.- Se elimina el medio de cultivo de la botella
- 3.- Para desprender las células se agregan aproximadamente 2ml de tripsina, se incuba aproximadamente 5 min ó hasta el desprendimiento total de las células a 37°C en presencia de 5% de CO₂, 95%de aire y 100% de humedad

- 4.- Las células se resuspenden y se hace el conteo celular en una cámara de Newbauer. de ser necesario, se hacen diluciones con el medio de cultivo para tener aproximadamente a)100células; b)5000células; c)10000células; d)50000células; e)100000células; en un volumen no mayor de 150 μ l y no menor de 5 μ l.
- 5.- Colocar cada alicuota en su correspondiente tubo eppendorff estéril y completar con medio de cultivo para tener un volumen final de 200 μ l en todos los tubos,
- 6.-Adicionar 20 μ l de solución de MTT estéril (50mg de MTT/ml de SSI).
- 7.-Tapar los tubos, agitar y hacer en las tapas un agujero con un alfiler, para permitir la entrada de aire con CO₂
- 8.- Incubar los tubos cuatro horas a 37°C en presencia de 5% CO₂, 95% aire y 100% de humedad,
- 9.- Pasado este tiempo, centrifugar los tubos a 5000 r.p.m durante 5min
- 10.- Descartar cuidadosamente el sobrenadante.
- 11.- Disolver la pastilla en 500 μ l de DMSO .
- 12.- Medir la Absorbancia a 540nm,

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTITUMORAL DIRECTA DE LOS FÁRMACOS EN LINEAS CELULARES TUMORALES

1.- Se toman 100 μ l de la suspensión celular (aproximadamente 1×10^4 células/100 μ l) y se colocan en cada uno de los pozos correspondientes al control negativo, H₁, H₂, H₃, H₄ y al control positivo en una placa de cultivo de 24 pozos. Se adiciona medio de cultivo hasta completar en cada pozo un volumen total de 1ml. Se incuban hasta que las células alcancen la fase exponencial (determinada en la curva de crecimiento) a 37°C en presencia de 5% de CO₂, 95% de aire y 100% de humedad, una vez alcanzada ésta fase, se adicionan a los pozos 25 y 50 μ l de los fármacos a la concentración de 2 μ g/ μ l, para obtener concentraciones

de 50 y 100µg/ml respectivamente, dejando sin fármaco los pozos que serán los controles. El experimento se realiza por triplicado.

2.- Se incuban nuevamente las células bajo las mismas condiciones y se determina la viabilidad de cada pozo a las 24 y 48 horas, empleando la técnica de reducción de la sal de tetrazolio (MTT), para lo cual se resuspende el contenido de cada pozo en forma cuidadosa y se coloca en tubos eppendorff estériles. Si se trata de células que se adhieren, se adicionan 500µl de tripsina a los pozos, se incuban 5min a 37°C, se vuelven a resuspender las células con cuidado, y se coloca el contenido de los pozos en los tubos eppendorff correspondientes,

3.- Se centrifugan los tubos a 3000 r.p.m. durante 4 min.

4.- Se descarta con cuidado el sobrenadante

5.- Se resuspenden las células con 200µl de medio de cultivo nuevo y se adicionan 20 µl de una solución de MTT estéril (5mg MTT/ml SSI)

6.- Tapar los tubos y agitarlos. Hacerles un agujero en la tapa con un alfiler para permitir la entrada de aire con CO₂

7.- Incubar por cuatro horas a 37°C en presencia de 5% de CO₂, 95% de aire y 100% de humedad.

8.- Centrifugar a 5000 r.p.m. durante 5 min. Descartar cuidadosamente el sobrenadante,

9.- Disolver la pastilla en 500µl de DMSO,

10.- Medir la absorbancia a 540nm,

11.- Obtener la absorbancia promedio de cada sistema y obtener la desviación estándar.

12.- Determinar el porcentaje de inhibición

$$\% \text{ proliferación} = \frac{\text{Absorbancia promedio de cada fármaco} \times 100}{\text{Absorbancia promedio del control}}$$

$$\% \text{ inhibición} = 100 - \% \text{ proliferación}$$

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA DE LOS FÁRMACOS EN CELULAS ENDOTELIALES

El experimento se llevó a cabo a cabo como se indica en la tabla No 3:

Tabla No. 3. ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS TIPO HEPARÁN SULFATO SOBRE CÉLULAS ENDOTELIALES EN PRESENCIA DE MCT Ó bFGF

Células E	H ₁	H ₂	H ₃	H ₄	MCT	bFGF	Vol. final
100µl							1 ml
100µl					200µl		1 ml
100µl						10µl	1 ml
100µl	50µl						1 ml
100µl		50µl					1 ml
100µl			50µl				1 ml
100µl				50µl			1 ml
100µl	50µl				200µl		1 ml
100µl		50µl			200µl		1 ml
100µl			50µl		200µl		1 ml
100µl				50µl	200µl		1 ml
100µl	50µl					10µl	1 ml
100µl		50µl				10µl	1 ml
100µl			50µl			10µl	1 ml
100µl				50µl		10µl	1 ml

Células E= Alicuotas de células endoteliales a una concentración de 0.925×10^4 células/100µl. **MCT** = medio acondicionado por las células tumorales. **bFGF**=factor de crecimiento de fibroblastos básico, concentración 0.2 ng/µl. **H₁, H₂, H₃, H₄**= Los fármacos se utilizaron la concentración de 2µg/µl

E: Corresponde al control para las células endoteliales. Se coloca una alicuota de aproximadamente 1×10^4 células por 100µl y se completa a 1ml con medio de cultivo D-MEM nuevo.

E+T: Corresponde al control para ver si realmente el medio acondicionado tiene efecto sobre la proliferación de las células endoteliales.

E+H₁ Con estos ensayos observamos la acción directa que tienen
E+H₂ los diferentes heparán sulfato sobre las células
E+H₃ endoteliales.
E+H₄

E+T+H₁ Con estos ensayos observamos si hay un efecto antiangiogénico
E+T+H₂ de los heparán sulfato con respecto a la acción de los factores
E+T+H₃ de crecimiento contenidos en el medio acondicionado.
E+T+H₄

E+bFGF: Corresponde al control para ver la acción directa de el bFGF sobre las células endoteliales.

E+bFGF+H₁
E+bFGF+H₂ Experimentos control para conocer el efecto que
E+bFGF+H₃ existe del bFGF en presencia de los diferentes heparán sulfato.
E+bFGF+H₄

2.-Estos ensayos se van distribuyendo por triplicado en cajas de cultivo de 24 pozos.

3.- Una vez que se preparó todo el experimento, se colocan las cajas de cultivo en la incubadora a 37°C en presencia de 5% de CO₂ y 100% de humedad.

4.- Las lecturas se realizan 3 días después para observar en efecto en las células antes de que se acumulen desechos tóxicos. Para hacer la evaluación de la viabilidad de las células endoteliales, se utiliza la técnica de reducción del MTT, para lo cual se resuspende el contenido de cada pozo en forma cuidadosa y se coloca en tubos eppendorff estériles, se adicionan 500µl de tripsina a los pozos, se incuban 5min a 37°C y se vuelven a

resuspender con cuidado para despegarlas del plástico. Se coloca el contenido de los pozos en los tubos eppendorff correspondientes,

5.- Se centrifugan los tubos a 3000 r.p.m. durante 4 min.

6.- Se descarta con cuidado el sobrenadante

7.- Se resuspenden las células con 200µl de medio de cultivo nuevo y se adicionan 20 µl de una solución de MTT estéril (5mg MTT/ml SSI)

8.- Tapar los tubos y agitarlos. Hacerles un agujero en la tapa con un alfiler para que el CO₂ pueda permear al medio de cultivo.

9.- Incubar por cuatro horas a 37°C en presencia de 5% de CO₂, 95% de aire y 100% de humedad,

10.- Centrifugar a 5000 r.p.m. durante 5 min. Descartar cuidadosamente el sobrenadante,

11.- Disolver la pastilla en 500µl de DMSO,

12.- Medir la absorbancia a 540nm,

13.- Obtener la absorbancia promedio de cada sistema y obtener la desviación estándar.

14.- Determinar el porcentaje de inhibición.

DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIANGIOGÉNICA DE LOS FÁRMACOS EN EMBRIONES DE POLLO

Debido a que teníamos información de que la heparina o fragmentos de la heparina que no tenían actividad anticoagulante mostraban un efecto antiangiogénico muy importante cuando eran administrados junto con esteroides como la cortisona o la hidrocortisona (54), se decidió que si los fármacos probados no tenían un efecto antiangiogénico por sí solos, quizás sí lo tendrían cuando se administraran con hidrocortisona. Se realizó un experimento preliminar con el objeto de conocer la posible acción antiangiogénica de los heparán sulfato H₂ y H₄ cuando son administrados en combinación con hidrocortisona (HC). Los esteroides que han mostrado tener un mayor

efecto antiangiogénico cuando son administrados con heparina son 17α -hidroxiprogesterona, hidrocortisona y 11α epihidrocortisol (54,12,16,18).

El experimento se realizó usando dos de los fármacos que habían sido probados en los experimentos anteriores: el heparán H₄ que mostró tener un efecto antiproliferativo leve sobre las células endoteliales A023 BBep7 y el heparán H₂ que prácticamente no tuvo efecto antiangiogénico sobre las células endoteliales (Fig 18).

Las concentraciones utilizadas en este experimento, corresponden a las óptimas reportadas por Crum, Szabo y Folkman (1985;54) de $50\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ para el fármaco utilizado (en su caso heparina) y $60\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ para el esteroide utilizado (en su caso cortisona). Las soluciones de los fármacos se prepararon a una concentración de $100\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ y la suspensión de la hidrocortisona se preparó a una concentración de $120\mu\text{g}/10\mu\text{l}$ de tal forma, que en los experimentos en donde se colocan los dos fármacos juntos, se adicionaron $5\mu\text{l}$ de fármaco y $5\mu\text{l}$ de la hidrocortisona para llegar a las concentraciones óptimas de ambos.

La solución de los fármacos se obtuvo pesando 10mg de cada fármaco y disolviéndolo en 1ml de agua desionizada estéril para obtener una concentración de 10mg/ml o $100\mu\text{g}/10\mu\text{l}$. La solución se esterilizó por filtración con membrana millipore de 0.45μ . Se conserva en refrigeración.

Al no poder preparar una solución de hidrocortisona, ya que no es soluble en agua, probamos con diversos disolventes: DMSO con el cual aparentemente si se solubilizó pero en el momento de filtrar la hidrocortisona precipitó. Se probó con tetraetilenglicol con el cual obtuvimos mejores resultados de solubilidad después de 2 horas. Sin embargo, la hidrocortisona no se disolvió completamente y se utilizó como suspensión cuidando de homogeneizar perfectamente cada vez que se utilizara. Para preparar la suspensión, se pesan 12mg de la hidrocortisona y se le agrega 1ml de tetraetilenglicol para obtener una concentración de 12mg/ml ó $120\mu\text{g}/10\mu\text{l}$.

La preparación de los embriones se realizó de la siguiente forma: Con la ayuda de un ovoscopio, se determinó el límite entre la membrana corioalantoidea y el espacio de aire del embrión marcándolo con un plumón. Trabajando dentro de la campana de flujo laminar, se quitó el cascarón que corresponde al espacio de aire con ayuda de unas tijeras pequeñas, posteriormente, se quitó la membrana que protege al embrión para exponer la membrana corioalantoidea. Para realizar el experimento, el volumen de cada uno de las mezclas de heparán sulfato (H₂ y H₄) con la HC, se colocaron en el centro de un pedazo de papel filtro de 1.5cm x 1.5cm estéril y éste se colocó sobre los capilares de la membrana corioalantoidea. La observación se hizo a las 24 horas.

En el caso de los controles cada uno de los ensayos del experimento se realizó por quintuplicado. Para los problemas se colocaron siete embriones. Esto con el objeto de prever la muerte de algún embrión. El experimento se realiza como se muestra en la Tabla 4:

Tabla No.4 ACCIÓN DE LOS FÁRMACOS TIPO HEPARÁN SULFATO H₂ Y H₄ SOBRE EMBRIONES DE POLLO

No de Embriones	Solvente	HC	H ₂	H ₄
cinco				
cinco	5µl			
cinco		5µl		
siete			5µl	
siete				5µl
siete		5µl	5µl	
siete		5µl		5µl

HC= Hidrocortisona, Concentración 120µg/10µl

C. NEG: Se colocó el papel filtro sobre la membrana corioalantoidea sin fármaco para ver el efecto mecánico de éste sobre la membrana. **SOL:** control que corresponde al disolvente

tetraetilenglicol para ver que acción tiene sólo frente a los embriones. **HC**: corresponde a el control de la hidrocortisona sola para ver que efecto tienen sobre las células tumorales. **H₂ y H₄**: fueron controles para ver conocer si los heparán sulfatos sólo tiene algún efecto sobre el embrión de pollo. **HC+H₂**: este ensayo se hace con el objeto de conocer el efecto que tiene la administración conjunta de hidrocortisona con el heparán H₂. **HC+H₄**: este ensayo se realiza para conocer el efecto de la administración conjunta de la hidrocortisona con el heparán H₄.

RESULTADOS

Este estudio está encaminado a la búsqueda de fármacos que actúen sobre líneas celulares tumorales inhibiendo de alguna forma su proliferación.

Como primer paso, fue necesario determinar las fases de crecimiento de las líneas SK-Mel 28 y K-562 (Figuras y Tablas 6 y 7 respectivamente) para conocer a que tiempo las células llegan a la fase de crecimiento exponencial, fase a la cual se agregan cada uno de los fármacos a estudiar.

Para las dos líneas celulares, el inicio de la fase exponencial se presentó al segundo día de incubación encontrándose la fase estacionaria en el sexto día en el caso de la línea K-562 (Fig.6), y en el caso de la línea SK-Mel 28 se presentó en el tercer día de incubación (Fig.7).

El fármaco se coloca al inicio de la fase exponencial con el objeto de asegurarse que la muerte celular sea debida al fármaco y no a la muerte natural de las células.

CURVA DE CRECIMIENTO DE K-562

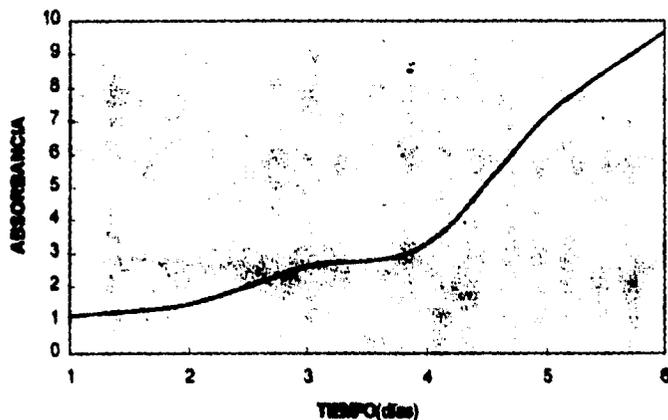


Figura No. 6 Curva de crecimiento de la línea celular tumoral humana K-562. El inóculo utilizado fué de 1.67×10^4 células/ml. Los puntos graficados son el promedio de tres determinaciones.

Tiempo (días)	Absorbancia
1	1.13
2	1.49
3	2.62
4	3.30
5	7.15
6	9.67

Datos de la curva de crecimiento de K-562. La absorbancia reportada es el promedio de tres determinaciones realizadas para cada tiempo.

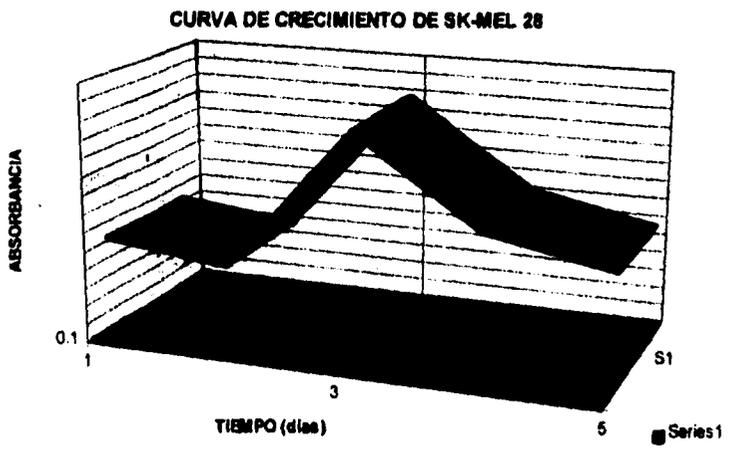


Figura No.7 Curva de crecimiento de la línea celular tumoral humana SK-Mel 28. El inóculo inicial fué de 1.24×10^4 cel/ml. Los puntos graficados son el promedio de tres determinaciones.

Tiempo (días)	Absorbancia
1	0.613
2	0.534
3	1.320
4	0.852
5	0.716

Datos de la curva de crecimiento de SK-Mel 28. Las absorbancia reportada es el promedio de tres determinaciones realizadas para cada tiempo.

se realizó la curva patrón para las líneas celulares K-562 y SK-Mel 28 utilizando la técnica de reducción del MTT con el objeto de corroborar la proporción directa entre el número de células presente en la muestra y la cantidad de formazán producido por las mismas. Por otro lado, las concentraciones de formazán producido fueron diluidas cuando fue necesario, de tal manera de obtener rangos de concentración que pudieran interpolarse en ésta curva.

Las figuras 8 y 9 muestran las curvas patrón para las líneas celulares tumorales K-562 y SK-Mel 28 respectivamente.

En el experimento para conocer la acción directa de los fármacos sobre la línea celular K-562 se hicieron diluciones de las muestras, de tal forma que las absorbancias obtenidas fueron interpoladas en la curva patrón para obtener el número de células correspondiente a la muestra.

Cada determinación se realizó por triplicado. Se obtuvo el promedio de éstas y el número de células resultante se compara con el control negativo para obtener el porcentaje de inhibición en cada caso. En las tablas 7, 8, 9 y 10 se muestran los resultados en número de células.

CURVA PATRÓN DE LA LÍNEA K-562

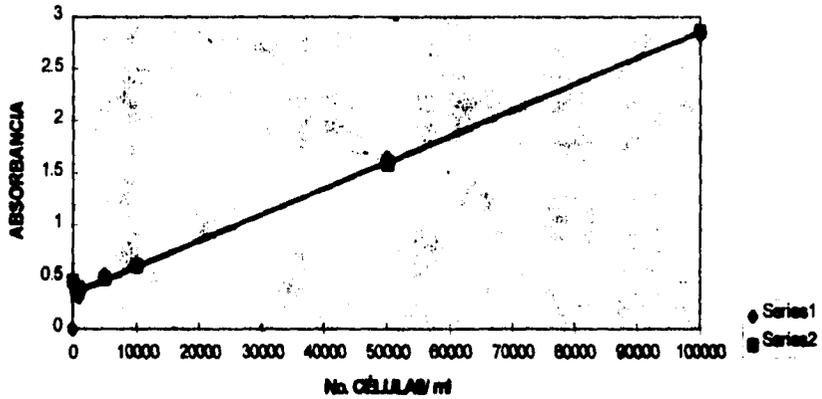


Figura No. 8 Curva patrón de K-562. El inóculo inicial fue de 2.34×10^4 células/ml

Concentración (cel./	Absorbancia
0	0
1000	0.313
5000	0.519
10000	0.622
50000	1.646
100000	2.831

Valores de regresión lineal

r	0.9885
b	0.4629
m	2.6×10^{-5}

CURVA PATRÓN DE LA LÍNEA SK-MEL 28

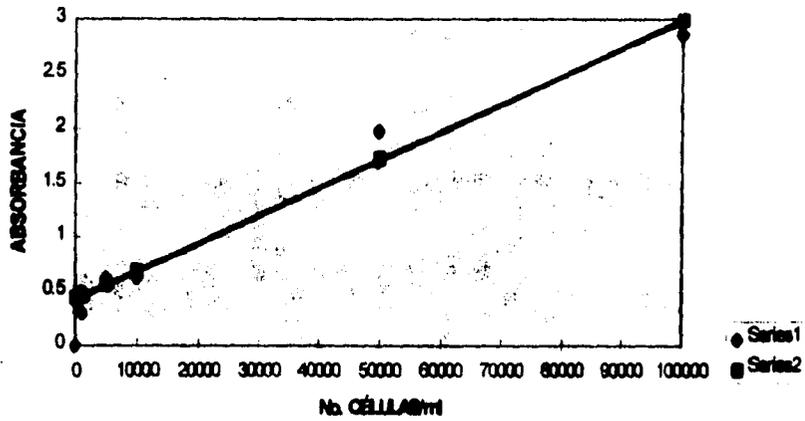


Figura No.9 Curva patrón de SK-Mel 28. El inóculo inicial fue de 6.975×10^4 cél/ml.

Concentración (cel./ml)	Absorbancia
0	0
1000	0.302
5000	0.614
10000	0.634
50000	1.976
100000	2.861

Valores de regresión lineal

r	0.9872
b	0.4445
m	2.5×10^{-4}

La primera evaluación que se hizo de los fármacos fue determinar su actividad antitumoral directa sobre las líneas celulares, para lo cual se utilizaron placas de cultivo de 24 pozos, en las cuales se colocó el inóculo inicial de células tumorales. Después de dos días de incubación, se agregó cada uno de los fármacos. La concentración de los fármacos en el pozo fue de 50µg/ml en el primer experimento, y de 100µg/ml en el segundo experimento. Para ambos experimentos se realizaron determinaciones de la viabilidad celular por medio de la técnica de reducción de MTT a las 24 y 48 horas de colocados los fármacos. Las lecturas se realizaron a 540nm, se obtiene la absorbancia promedio de éstas y la desviación estándar de los datos (d.e).

Para los experimentos a ambas concentraciones (50 y 100µg/ml) se utilizó un control negativo en el cual se colocaron células en ausencia de fármaco. Las absorbancias promedio de los problemas se compararon con la absorbancia promedio de éste control para obtener el porcentaje de inhibición de la proliferación para cada uno de los fármacos. Se utiliza como control positivo la vincristina, un fármaco que es capaz de inhibir la proliferación de las células tumorales.

Para la línea celular K-562, la Vincristina está reportada como inhibidor efectivo de la proliferación a una concentración de 10ng/ml de células. En un primer experimento se colocaron 30, 60 y 100ng/ml de la vincristina, y aunque comparado con el control negativo, sí hubo inhibición, ésta no aumentó conforme se aumentaba la concentración del fármaco, sino que por el contrario (datos no mostrados), la inhibición de la proliferación disminuía conforme aumentaba la concentración de la vincristina, por esta razón, se decidió usar concentraciones más altas, utilizando 300ng/ml, 600ng/ml y 1µg/ml concentraciones a las cuales se obtuvieron mejores resultados. En el caso del experimento de 24 horas, tanto 50 como 100µg/ml de la vincristina no tuvieron un efecto inhibitor del crecimiento celular (Tablas 7 y 8), sin embargo, el porcentaje de inhibición se hace mayor conforme aumenta la concentración.

TABLA No.7 EFECTO DIRECTO DE LOS FÁRMACOS A UNA DOSIS DE 50µg/ml SOBRE LA LÍNEA CELULAR K-562, A 24 HORAS.

Concentración del fármaco (50 µg/ml)	No. de Células promedio +/- d.e¹	% de inhibición
Control negativo	55500 +/- 39,598	
H₁	101,000 +/- 500	- 82.00
H₂	132,000 +/- 24,000	- 137.83
H₃	113,333 +/- 12,220	- 104.20
H₄	136,333 +/- 10,969	-145.64
Control positivo: Vincristina		
300ng/ml	124,000 +/- 8,000	- 123.42
600ng/ml	124,000 +/- 8,000	- 123.42
1µg/ml	80,000 +/- 6,928	- 44.14

d.e = desviación estándar.

¹Cada ensayo se realizó por triplicado. Los datos reportados representan el promedio de las tres determinaciones.

TABLA No. 8 EFECTO DIRECTO DE LOS FÁRMACOS A UNA DOSIS DE 100µg/ml SOBRE LA LÍNEA CELULAR K-562, A 24 HORAS.

Concentración del fármaco (100 µg/ml)	No.Células promedio +/- d.e. ¹	% de Inhibición
Control negativo	96,333 +/- 38,718	
H₁	246,666 +/- 15,275	-156.06
H₂	234,000 +/- 14,000	-142.90
H₃	156,000 +/- 7,505	-61.94
H₄	210,000 +/- 24,331	-118.00
Control positivo: Vincristina		
300 ng/ml	124,000 +/-1000	-28.72
600 ng/ml	116,000 +/- 5,291	-20.41
1 µg/ml	61000 +/- 13,279	36.68

d.e= desviación estándar.

¹Cada ensayo se realizó por triplicado. Los datos reportados representan el promedio de las tres determinaciones.

A las 48 horas ya se ve el efecto de la vincristina sobre las células tumorales. (Tablas 9 y 10).

Los resultados se obtuvieron como lecturas de viabilidad celular para cada concentración de fármaco. Comparando las lecturas promedio de los fármacos con la lectura promedio del control, se obtuvo el % de inhibición de la proliferación para cada uno de éstos.

TABLA No.9 EFECTO DIRECTO DE LOS FÁRMACOS A UNA DOSIS DE 50µg/ml SOBRE LA LÍNEA CELULAR K-562, A 48 HORAS

Concentración del fármaco (50 µg/ml)	No. de Células promedio +/- d.e. ¹	% de Inhibición
Control negativo	97,000 +/- 9,866	
H₁	107,000 +/- 11,790	-10.31
H₂	120,000 +/- 16,258	-23.71
H₃	115,000 +/- 9,238	-18.56
H₄	100,000 +/- 40,000	-3.09
Control positivo: Vincristina		
300 ng/ml	46,000 +/- 5,679	52.58
600 ng/ml	51,500 +/- 3175	46.91
1 µg/ml	42,000 +/- 7974	56.70

d.e = desviación estándar.

¹Cada ensayo se realizó por triplicado. Los datos reportados representan el promedio de las tres determinaciones.

TABLA No. 10 EFECTO DIRECTO DE LOS FÁRMACOS A UNA DOSIS DE 100µg/ml SOBRE LA LÍNEA CELULAR K-562, A 48 HORAS.

Concentración del fármaco (100 µg/ml)	No. de Células promedio +/- d.e.¹	% de Inhibición
Control negativo	196,666 +/- 25,290	
H₁	266,666 +/- 15,275	-35.59
H₂	273,333 +/- 8,036	-38.95
H₃	267,500 +/- 4,330	-36.02
H₄	251,666 +/- 10,103	-27.97
Control positivo: Vincristina		
300 ng/ml	67,000 +/- 5,568	65.93
600 ng/ml	62,500 +/- 10,583	68.22
1 µg/ml	55,500 +/- 6,245	71.77

d.e= desviación estándar.

¹Cada ensayo se realizó por triplicado. Los datos reportados representan el promedio de las tres determinaciones.

Para la línea celular K-562, a 24 horas y una concentración de 50µ/ml no se observa una inhibición de la proliferación de las células tumorales con ninguno de los fármacos. Por el contrario, indujo la proliferación celular al menos en un 82% en el caso del fármaco H₁ y la máxima proliferación fue de 145.63% para H₄. Estos resultados se muestran en la Fig 10 observándose claramente, que el porcentaje de inducción de la proliferación con tres de los fármacos (H₂, H₃ y H₄) fue mayor del 100%. Un resultado similar se presenta con los fármacos a una concentración de 100µg/ml, en donde encontramos la mayor proliferación con H₁ con un valor de 156 % de inducción de proliferación celular. Los resultados se pueden observar en la figura 11 en donde los fármacos H₁, H₂ y H₄ inducen la proliferación por encima del 100%, los datos de H₂ y H₄ (Fig 10) coinciden con los datos anteriores.

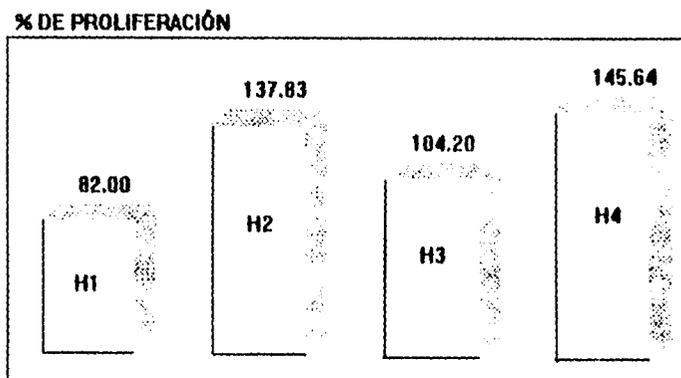


Figura No. 10 Determinación del efecto directo de los fármacos heparán sulfato a una dosis de 50µg/ml sobre la línea celular K-562. El inóculo inicial fué 1.587×10^4 cel/ml. El resultado se expresa como el promedio de tres determinaciones individuales. La lectura se realizó a las 24 horas de agregados los fármacos.

% DE PROLIFERACIÓN

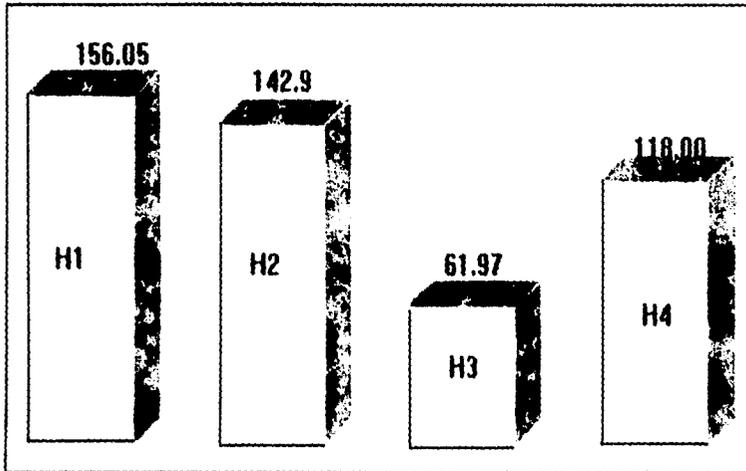


Figura No. 11 Determinación del efecto directo de los fármacos heparán sulfato a una dosis de $100\mu\text{g/ml}$ sobre la línea celular K-562. El inóculo inicial fué $1.587 \times 10^4 \text{cel/ml}$. El resultado se expresa como el promedio de tres determinaciones individuales. La lectura se realizó a las 24 horas de agregados los fármacos.

A las 48 horas, tampoco se detectó inhibición de la proliferación celular en presencia de los fármacos, aunque la menor inducción de la proliferación fué a la concentración de $50\mu\text{g/ml}$. El fármaco H₂ presenta la mayor inducción de la proliferación celular de 23.71% y la menor inducción se presenta con H₄ con 3.09%. En la Figura 12 se presenta la inducción de la proliferación de los fármacos a 48 horas y $50\mu\text{g/ml}$, las mayores inducciones corresponden a H₂ y H₃.

% DE PROLIFERACIÓN

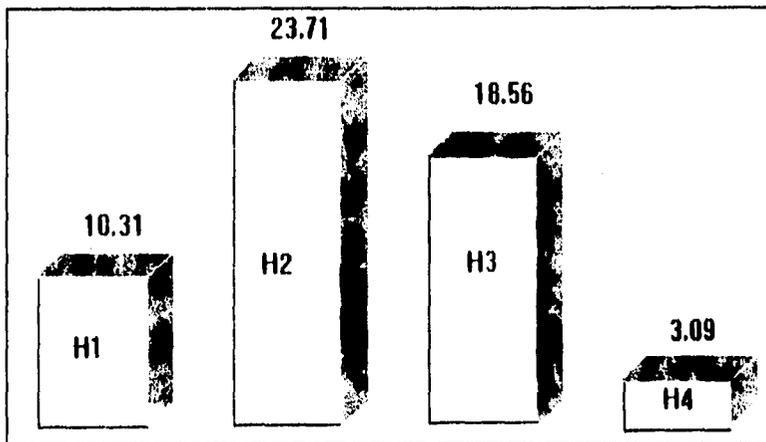


Figura No. 12 Determinación del efecto directo de los fármacos heparán sulfato a una dosis de 50µg/ml sobre la línea celular K-562. El inóculo inicial fué 1.587×10^4 cel/ml. El resultado se expresa como el promedio de tres determinaciones individuales. La lectura se realizó a las 48 horas de agregados los fármacos.

A la concentración de 100µg/ml, el fármaco que presenta una menor inducción de la proliferación es H4 con 27.97% y el que presenta una mayor inducción es H2 con 38.98%. Estos resultados se presentan en la figura No 13.

Para los experimentos a las 48 horas con ambas dosis de fármacos, la vincristina mostró una inhibición máxima a la concentración de 1µg/ml y a las 48 horas (Tablas 9 y 10).

% DE PROLIFERACIÓN

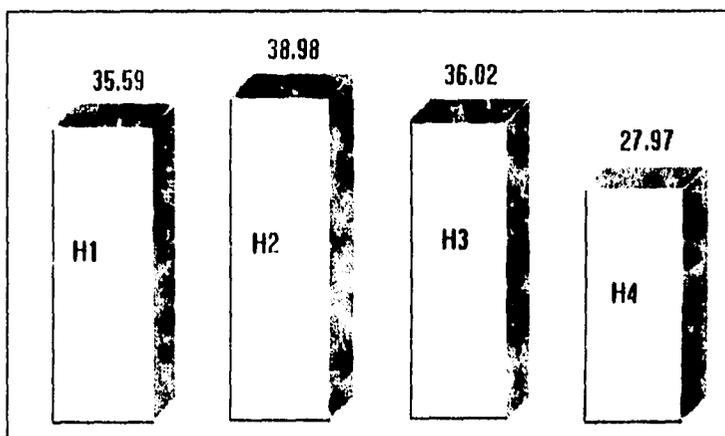


Figura No. 13 Determinación del efecto directo de los fármacos heparán sulfato a una dosis de 100µg/ml sobre la línea celular K-562. El inóculo inicial fué 1.587 x 10⁴cel/ml. El resultado se expresa como el promedio de tres determinaciones individuales. La lectura se realizó a las 48 horas de agregados los fármacos.

Para los experimentos realizados con la línea SK-MEL 28, no se requirió hacer diluciones, por lo que no fue necesario utilizar la curva patrón. Los resultados se reportan como absorbancia promedio +/- la desviación estándar(d.e). (Tablas 11, 12, 13 y 14).

Los melanomas son un tipo de cáncer que es difícil de tratar con quimioterapia, razón por la cual no existe un fármaco reportado como óptimo para su tratamiento. Por tal razón, se probó el efecto de la vincristina a concentraciones mayores que las utilizadas con la línea K-562 pero no se observó ninguna inhibición. Los resultados se expresan en las tablas 11, 12, 13 y 14. El control negativo, las mediciones por medio de la técnica de MTT y la forma de obtener el porcentaje de inhibición de la proliferación celular se realizaron de la misma forma que con la línea K-562.

TABLA No. 11 EFECTO DIRECTO DE LOS FÁRMACOS A UNA DOSIS DE 50 µg/ml SOBRE LA LÍNEA CELULAR SK-MEL 28, A 24 HORAS.

Concentración del fármaco (50 µg/ml)	Absorbancia promedio +/- d.e.¹	% de Inhibición
Control negativo	0.961 +/- 0.051	
H₁	0.913 +/- 0.109	4.95
H₂	0.970 +/- 0.056	0.67
H₃	0.820 +/- 0.167	14.74
H₄	1.020 +/- 0.037	-6.11
Control positivo : Vincristina		
1 µg/ml	1.162 +/- 0.065	-20.91
2 µg/ml	1.060 +/- 0.044	-10.51

d.e= desviación estándar.

¹ Cada ensayo se realizó por triplicado. Los datos reportados representan el promedio de las tres determinaciones.

TABLA No.12 EFECTO DIRECTO DE LOS FÁRMACOS A UNA DOSIS DE 100µg/ml SOBRE LA LÍNEA CELULAR SK-MEL 28, A 24 HORAS.

Concentración del fármaco (100 µg/ml)	Absorbancia promedio +/- d. e¹	% de Inhibición
Control negativo	0.921 +/- 0.075	
H₁	0.950 +/- 0.037	-2.88
H₂	0.940 +/- 0.050	-1.94
H₃	1.350 +/- 0.182	-46.59
H₄	1.005 +/- 0.077	-9.15
Control positivo: Vincristina		
1 µg/ml	1.125 +/- 0.216	-22.14
2 µg/ml	0.965 +/- 0.078	-4.76

d.e = desviación estándar.

¹Cada ensayo se realizó por triplicado. Los datos reportados representan el promedio de las tres determinaciones.

TABLA No.13 EFECTO DIRECTO DE LOS FÁRMACOS A UNA DOSIS DE 50µg/ml SOBRE LA LÍNEA CELULAR SK-MEL 28, A 48 HORAS.

Concentración del fármaco (50 µg/ml)	Absorbancia promedio +/- d.e.¹	% de Inhibición
Control negativo	0.458 +/- 0.035	
H₁	0.486 +/- 0.026	-6.02
H₂	0.503 +/- 0.034	-9.80
H₃	0.540 +/- 0.052	-17.85
H₄	0.554 +/- 0.046	-20.89
Control positivo: Vincristina		
1 µg/ml	0.568 +/- 0.027	-23.88
2 µg/ml	0.0519 +/- 0.031	-13.22

d.e = desviación estándar

¹Cada ensayo se realizó por triplicado. Los datos reportados representan el promedio de las tres determinaciones.

TABLA No. 14 EFECTO DIRECTO DE LOS FÁRMACOS A UNA DOSIS DE 100µg/ml SOBRE LA LÍNEA CELULAR SK-MEL 28, A 48 HORAS.

Concentración del fármaco (100 µg/ml)	Absorbancia promedio +/- d.e. ¹	% de Inhibición
Control negativo	0.478 +/- 0.011	
H ₁	0.551 +/- 0.038	-15.28
H ₂	0.559 +/- 0.031	-17.06
H ₃	0.526 +/- 0.019	-10.20
H ₄	0.555 +/- 0.013	-16.11
Control positivo: Vincristina		
1 µg/ml	0.518 +/- 0.002	-8.5
2 µg/ml	0.543 +/- 0.017	-13.73

d.e = desviación estándar

¹Cada ensayo se realizó por triplicado. Los datos reportados representan el promedio de las tres determinaciones.

En la línea celular SK-Mel 28 encontramos que a 50µg/ml y 24 horas sí hubo inhibición de la proliferación, encontrando un valor máximo de 14.74% con el heparán H₃ y la menor inhibición fue de 0.67% con el heparán H₂. El heparán H₄ mostró una inducción de la proliferación celular de 6.11%. Estos resultados se encuentran esquematizados en la Figura 14.

% DE PROLIFERACIÓN

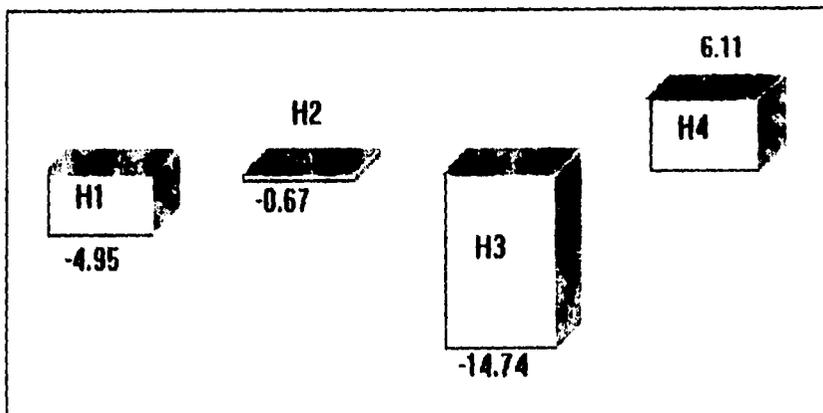


Figura No. 14 Determinación del efecto directo de los fármacos heparán sulfato a una dosis de 50µg/ml sobre la línea celular SK-MEL 28. El inóculo inicial fue 1.23×10^4 cel/ml. El resultado se expresa como el promedio de tres determinaciones individuales. La lectura se realizó a las 24 horas de agregados los fármacos.

Cuando el experimento se realizó a 48 horas y 50µg/ml, observamos que el efecto y volvemos a tener una inducción de la proliferación que es el resultado que se ha ido observando a través de los experimentos. En éste caso, tenemos una mayor inducción de la proliferación celular en H₄ con 20.89% y la menor inducción la tenemos en H₁ con 6.02%. En la Figura 15 se presentan estos resultados.

% DE PROLIFERACIÓN

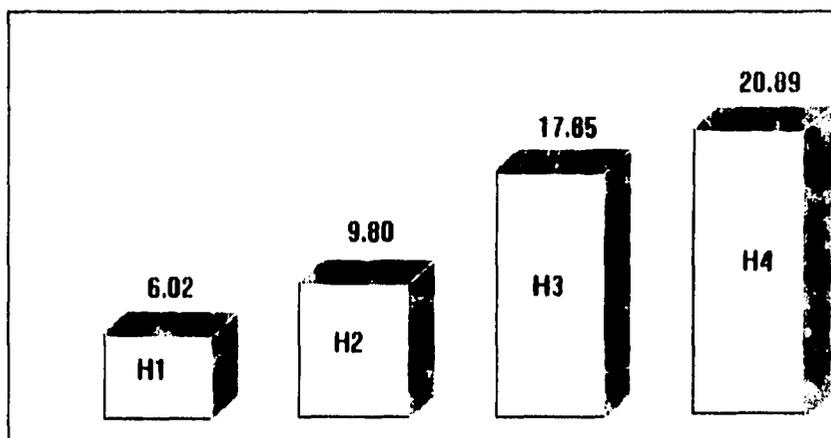


Figura No. 15 Determinación del efecto directo de los fármacos heparán sulfato a una dosis de 50µg/ml sobre la línea celular SK-MEL 28. El inóculo inicial fué 1.23×10^4 cel/ml. El resultado se expresa como el promedio de tres determinaciones individuales. La lectura se realizó a las 48 horas de agregados los fármacos.

En el caso de la concentración de 100µg/ml a las 24 horas, encontramos que el mayor porcentaje de inducción de la proliferación celular se presenta con el heparán H₃ (Fig 16). Contrario al efecto anterior, éste mismo fármaco (H₃) a una dosis de 50µg/ml a 24 horas presenta un efecto inhibitorio de 14.74%(Fig.14) .

ESTA VECE NO HAY
SALUD DE LA PUBLISTICA

% DE PROLIFERACIÓN

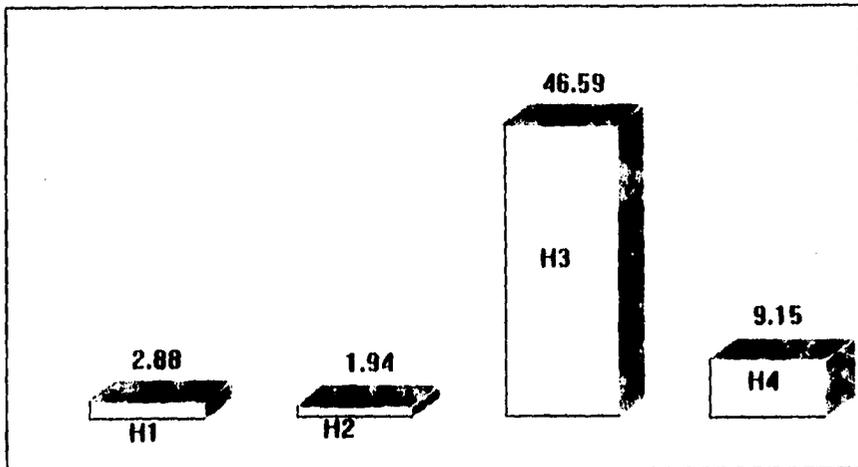


Figura No. 16 Determinación del efecto directo de los fármacos heparán sulfato a una dosis de $100\mu\text{g/ml}$ sobre la línea celular SK-MEL 28. El inóculo inicial fue $1.23 \times 10^4 \text{ cel/ml}$. El resultado se expresa como el promedio de tres determinaciones individuales. La lectura se realizó a las 24 horas de agregados los fármacos.

Por último, en el experimento donde se trataron las células con $100\mu\text{g/m}$ de cada fármaco, a las 48 horas encontramos que el efecto proliferativo se mantiene. En este caso, el porcentaje de proliferación con los cuatro fármacos es muy parecidos (Figura 17).

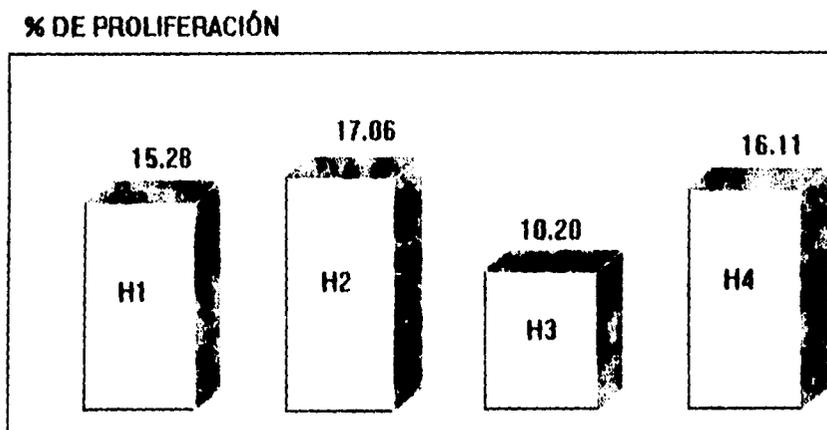


Figura No. 17 Determinación del efecto directo de los fármacos heparán sulfato a una dosis de 100µg/ml sobre la línea celular SK-MEL 28. El inóculo inicial fué de 1.23×10^4 cel/ml. El resultado se expresa como el promedio de tres determinaciones individuales. La lectura se realizó a las 48 horas de agregados los fármacos.

Después de esta serie de experimentos y habiendo demostrado que los fármacos no tienen acción directa sobre las células tumorales, evaluamos la posibilidad de que éstos fármacos pudieran actuar inhibiendo la angiogénesis, para esto, se realizó un experimento en el cual se incubaron células endoteliales de capilar de cerebro bovino (A 023BBEp7) que son formadoras de capilares sanguíneos in vivo, en presencia de los heparán sulfatos y medio acondicionado por las células k-562.

De trabajos revisados con anterioridad, se sabe que las células endoteliales secretan factores de crecimiento, entre los cuales está el bFGF, que estimula el crecimiento de las células endoteliales para formar vasos sanguíneos y de ésta forma vascularizar el tumor. De tal forma, que si nosotros incubamos medio acondicionado por células tumorales (

sabiendo que aquí se encuentran los factores de crecimiento), en contacto con las células endoteliales, deberemos encontrar una respuesta inductora de la proliferación, y si nosotros suponemos que nuestros fármacos tipo heparán sulfato pueden actuar como el PPS (20), entonces, el fármaco inhibirá el efecto del factor, evitando que se una a su receptor en la célula endotelial lo que inhibirá la proliferación de células tumorales al inhibir la formación de capilares.

Este experimento se llevó a cabo utilizando varios controles:

En primer lugar, un control compuesto exclusivamente por células endoteliales.

Otro control de células endoteliales y el medio acondicionado por las células tumorales, para saber si este realmente induce la proliferación de las células endoteliales

Un control de células endoteliales con bFGF, que nos va a servir para saber si el efecto de los fármacos es directamente sobre el bFGF.

Se realizó un experimento en el cual se incubaron las células endoteliales con cada uno de los fármacos por separado, para conocer la acción directa de los heparán sobre las células endoteliales. Los resultados fueron comparados con el control de células endoteliales y con base en este se obtiene el porcentaje de inhibición.

Los experimentos realizados para conocer el efecto antiangiogénico consistieron en colocar células endoteliales con medio acondicionado por células tumorales y cada uno de los fármacos por separado. Los resultados fueron comparados con el control de células endoteliales y medio acondicionado por células tumorales y con base en éste se obtiene el porcentaje de inhibición.

Por otro lado, el experimento también consistió en colocar células endoteliales con bFGF y cada uno de los fármacos para ver que acción tienen los fármacos sobre la inducción de la proliferación. Los resultados son comparados con el control de células endoteliales y bFGF y con base en éste se obtiene el porcentaje de inhibición.

Los resultados de éstos experimentos se presentan en la tabla No 15

TABLA No. 15 EFECTO ANTIANGIOGÉNICO DE LOS FÁRMACOS A UNA DOSIS DE 100µg/ml SOBRE LAS CELULAS ENDOTELIALES A 023, A 72 HORAS.

	Absorbancia promedio +/- D.F.	% de Inhibición
E	0.448 +/- 0.040	
E + T	0.619 +/- 0.070	
E + H₁	0.464 +/- 0.022	-3.70
E + H₂	0.473 +/- 0.030	-5.65
E + H₃	0.485 +/- 0.030	-8.40
E + H₄	0.458 +/- 0.036	1.58
E + T + H₁	0.548 +/- 0.070	11.33
E + T + H₂	0.675 +/- 0.031	-9.19
E + T + H₃	0.653 +/- 0.071	-5.49
E + T + H₄	0.550 +/- 0.040	11.70
E + bFGF	0.582 +/- 0.022	
E + bFGF + H₁	0.568 +/- 0.003	2.37
E + bFGF + H₂	0.564 +/- 0.034	3.19
E + bFGF + H₃	0.590 +/- 0.064	-1.41
E + bFGF + H₄	0.544 +/- 0.018	6.53

En estos experimentos encontramos que los fármacos H₁ y H₄ inhiben el crecimiento de las células endoteliales en 11% cuando se encontraban en presencia del medio acondicionado por células tumorales. Esto se corrobora en el experimento con bFGF y los fármacos, aunque no en la misma proporción, ya que en este caso, para H₁ hay un 2.37% de inhibición, y para H₄ hay un 6.53% sin embargo, estos valores no son significativos como para poder decir que éstos fármacos tienen actividad antiangiogénica, y mucho menos desde un punto de vista clínico, donde los fármacos con estos valores no representan una opción terapéutica. En la Figura 18 se encuentran resumidos estos resultados.

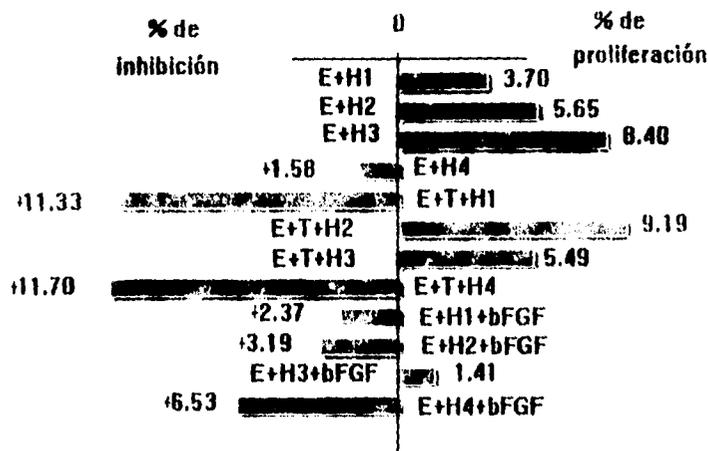


Figura No. 18 Determinación del efecto antiangiogénico de los fármacos heparán sulfato a una dosis de 100µg/ml sobre las células endoteliales A023BBE7. El inóculo inicial fue 0.925x10⁵cel/ml. El resultado se expresa como el promedio de tres determinaciones individuales. La lectura se realizó a las 72 horas de agregados los fármacos.

El experimento con los embriones de pollo se realizó debido a que en la literatura se reporta que la heparina administrada junto con algunos corticoesteroides es capaz de inhibir la angiogénesis en el ensayo de membrana corioalantoidea de embrión de pollo (12,16,17,18).

Los resultados obtenidos en este experimento se hicieron con base en la observación visual a 24 horas realizada por tres personas diferentes del laboratorio. Las tres personas coincidieron en que el fármaco tipo heparán sulfato H₄ a una concentración de 50µg/10µl mostró tener un efecto antiangiogénico cuando se administró junto con hidrocortisona a una concentración de 60µg/10µl. Estos resultados se muestran en la tabla No 16.

TABLA No. 16 EFECTO ANTIANGIOGÉNICO DE LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DE LOS FÁRMACOS H₂ Y H₄ E HIDROCORTISONA SOBRE LOS CAPILARES DE LA MEMBRANA CORIOALANTOIDEA DE EMBRIÓN DE POLLO

	Embrión No. 1	Embrión No. 2	Embrión No. 3	Embrión No. 4	Embrión No. 5	Embrión No. 6	Embrión No. 7
Control negativo	NO	NO	NO	NO	NO		
solvente	NO	NO	NO	NO	NO		
HC	NO	NO	NO	NO	NO		
H ₄	NO						
H ₄ + HC	SI	NO	NO	SI	SI	SI	SI
H ₂	NO						
H ₂ + HC	NO	SI	NO	NO	NO	SI	NO

Estos resultados son expresados como el porcentaje de embriones que presentaron zona de inhibición con respecto al número total de embriones . Se presentan en la Tabla No 17 y en la Fig 19.

TABLA No. 17 PORCENTAJE DE INHIBICIÓN DE LA ANGIOGÉNESIS POR LA ADMINISTRACIÓN CONJUNTA DE LOS FÁRMACOS H₂ Y H₄ CON HIDROCORTISONA

FÁRMACO	% DE INHIBICIÓN
H ₄	0 (0/7)
H ₂	0 (0/7)
H ₄ +HC	71.42 (5/7)
H ₂ +HC	28.57 (2/7)

La concentración de los fármacos es de 50µg/10µl. La concentración de la hidrocortisona fue de 60µg/10µl . La observación se realizó a las 24 horas de agregados los fármacos.

% de inhibición de la angiogénesis

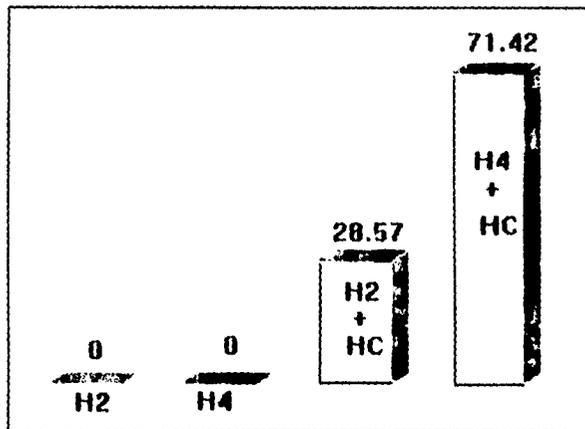


Figura No 19. Efecto de H₂ y H₄ administrados junto con hidrocortisona en membrana corioalantoidea de embrión de pollo. La concentración de los fármacos es de 50µg/10µl. La concentración de la hidrocortisona fue de 60µg/10µl. La observación se realizó a las 24 horas de administrados los fármacos.

DISCUSION

El cultivo de líneas celulares es un arte, ya que cada una de las líneas celulares requiere de cuidados específicos de acuerdo a sus características de crecimiento. Algunas son más sensibles a variaciones en las condiciones de cultivo que otras, incluso hay que familiarizarse perfectamente con la morfología de cada línea para detectar cuando las células están sufriendo daño por falta de algún nutriente o por alguna variación en las condiciones de cultivo. Sin embargo, una vez que las células se han adaptado a las condiciones de cultivo, se vuelven menos sensibles a las variaciones, aún así es necesario trabajarlas con cuidado. La línea celular tumoral K-562 en un principio fue difícil de lograr su crecimiento, sin embargo, una vez que crecieron, se mantuvieron en buenas condiciones a lo largo de todo el trabajo. Son células que se pueden adherir al plástico, pero también se encuentran en el sobrenadante. Cuando se observan al microscopio parecen racimos de células redondas de un aspecto agradable. La línea celular SK-Mel 28 fue más difícil de cultivar, porque cuando se descongelaron se veían bastante bien, pero conforme fue pasando el tiempo, la morfología se iba modificando, las células se tornaban vacuoladas y con puntos negros, esto parece ser debido a la presencia de melanina producida por las células. Posteriormente logramos cultivarlas en condiciones adecuadas. Son células que se adhieren al plástico y su manejo es fácil. Después de resolver éstos inconvenientes, el cultivo de células se facilitó.

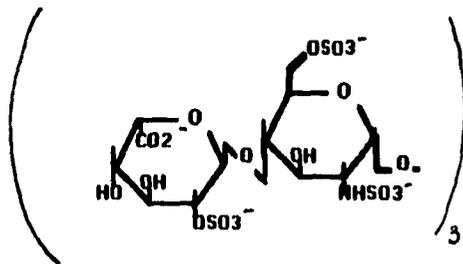
La técnica de reducción del MTT utilizada mostró ser fácil y reproducible. Lo que indica que la técnica es confiable, y cuando por alguna razón las muestras no pueden ser leídas inmediatamente pueden guardarse unas horas en frío sin que el resultado se altere.

En los resultados que obtuvimos, al contrario de lo que esperábamos, los fármacos H₁, H₂, H₃ y H₄ no presentan un efecto inhibitorio en la proliferación celular en las líneas celulares tumorales probadas, y en particular, en la línea K-562, en la cual se observó un marcado efecto de inducción de la proliferación, el cual fue reproducible en todos los experimentos.

En el único caso donde se encontró inhibición directa de la proliferación de células tumorales, fue con la línea celular tumoral SK-MEL a las 24 horas de incubación y a una dosis de 50 µg/ml (Fig. 14), en donde se observa que los fármacos H₁, H₂ y H₃ inhiben la proliferación celular, siendo H₃ el que ejerce el mayor efecto inhibitorio (aproximadamente 15%). Sin embargo, éste efecto se revierte cuando la dosis del fármaco es de 100 µg/ml a las 24 horas de incubación. A las 48 horas de incubación en presencia de ambas dosis, el efecto es de inducción de la proliferación con los cuatro fármacos.

A excepción del efecto inhibitorio presentado por el fármaco H₃ a 24 horas y dosis de 50 µg/ml, el efecto de éstos fármacos sobre la línea celular sk-mel 28 es de inducción de la proliferación celular. El mayor efecto se presenta a las 48 horas de incubación

Tyrrell, D; Ishihara, M y cols., 1993 (62), fraccionando una mezcla de hexasacáridos derivados de heparina por su afinidad a bFGF, y probando éstos fragmentos para conocer su afinidad por bFGF *in vitro*, se dieron cuenta que el hexasacárido con la siguiente estructura:



es un inhibidor de la proliferación de células ACE (Adrenocorticales) inducida por la unión de bFGF. El hexasacárido inhibe también la unión de ¹²⁵IbFGF a la monocapa de células ACE, e inhibe la unión de células transfectadas RO-12UC que expresan Sindecan (un heparán sulfato) con células cubiertas por bFGF. Se ha descrito una actividad similar a oligosacáridos de heparina, inhibiendo la proliferación de células endoteliales de capilar en ausencia de aFGF exógeno.

Estos investigadores también encontraron que una mezcla de decaacáridos estimulaban in vitro la unión de ^{125}I bFGF a su receptor (FGFR) inmovilizado. Esta mezcla de decaacáridos podría contener dominios estructurales que se requieren para la interacción del bFGF con su receptor transmembranal en la superficie de la célula y que no se encuentran en la estructura del hexaacárido (62).

Nuestros fármacos son una mezcla de hexaacáridos y decaacáridos entre otros fragmentos (pag 42) por lo que pensamos que su comportamiento sea debido a una combinación de efectos entre fragmentos inhibidores y fragmentos inductores de la angiogénesis. Probablemente, para poder establecer un efecto inhibitorio deberíamos seleccionar fragmentos más pequeños de la mezcla y probar su actividad en líneas celulares tumorales.

Con base en los resultados obtenidos en los experimentos, observamos que la acción de los fármacos sobre las líneas celulares es de inducción de la proliferación, ésta podría ser explicada de acuerdo a lo propuesto por Folkman y cols, 1994 (3), ellos encuentran que la heparina tiene la capacidad de unir varias moléculas de aFGF al mismo tiempo, lo que origina la oligomerización y activación del receptor (Fig 20).

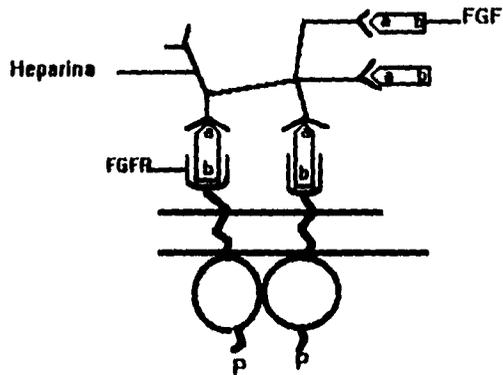


Figura No.20 La heparina se une a varios FGF's originando su oligomerización. La unión independiente de varias moléculas de FGF's a sus receptores (FGFR) trae como resultado la oligomerización y activación del receptor transmembranal. (a) es el sitio de unión para el proteoglicano y (b) es el sitio de unión para el receptor.

Este es un posible mecanismo. Sin embargo, pensamos que para obtener un fármaco con acción terapéutica, se debe de obtener una molécula que este constituida primordialmente por hexasacáridos y entonces probarla en líneas celulares tumorales.

Folkman y cols., (3) hablan también de un antagonista de la heparina, el octasulfato de sacarosa, el cual, únicamente se une a una molécula de aFGF y por lo tanto, no puede inducir su oligomerización y consecuentemente no es capaz de activar el FGFR.

Es probable que pequeños fragmentos de los heparán sulfatos que sean inhibidores de la angiogénesis podrían actuar por un mecanismo similar (Fig 21).

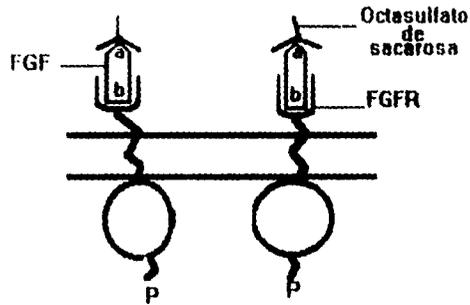


Figura No 21. El octasulfato de sacarosa se une únicamente a una molécula de FGF por lo tanto, no es capaz de oligomerizarlo. El complejo Octasulfato de sacarosa-FGF no es capaz de activar a los receptores transmembranales (FGFR's)

En el experimento que realizamos con embriones de pollo decidimos tomar H₄ y H₂ porque son dos fármacos que tenían efectos contrarios sobre las células endoteliales de la línea A023BBp7 y queríamos saber si administrados conjuntamente con hidrocortisona su actividad seguía siendo opuesta.

Con base en los resultados obtenidos podemos decir que el efecto entre los fármacos tipo heparán sulfato H₂ y H₄ sigue siendo contrario, es decir, que el heparán H₄ cuando se administró junto con hidrocortisona si mostró tener efecto antiangiogénico a las 24 horas de incubación en la membrana corioalantoidea de embrión de pollo, mientras que el fármaco tipo heparán H₂ no indujo zonas de inhibición de la angiogénesis en presencia de hidrocortisona. En este experimento, el fármaco H₄ administrado con hidrocortisona mostró un efecto antiangiogénico mucho mayor que cuando se administró sólo directamente sobre las células endoteliales, en donde la inhibición fue del 11% mientras que en el ensayo en membrana corioalantoidea de embrión de pollo, la inhibición fue aproximadamente del 71%. Estos resultados confirman lo publicado Folkman, 1986 (40), en los cuales la administración

conjunta de heparina e hidrocortisona inhibe la angiogénesis en ensayos CAM. En éste mismo trabajo, se fragmenta la heparina y se prueban éstos fragmentos administrados con un esteroide angiostático, encontrando que el fragmento hexasacárido con un peso molecular de aproximadamente 1600 fue el inhibidor más potente de la angiogénesis.

En otro experimento realizado por Folkman,1986 (40), se sugiere que la heparina contiene fragmentos separados de los cuales al menos uno es responsable de promover la angiogénesis, y otros son responsables de inhibirla en presencia de esteroides angiostáticos (40).

Esto nos hizo pensar que si el fármaco H₄ administrado con hidrocortisona mostró inhibición de la angiogénesis en un 71%, quizás fragmentos más pequeños de éste fármaco administrado con un esteroide angiostático tendrán un efecto antiangiogénico mayor.

CONCLUSIONES

Con base en los estudios realizados hasta el momento y por los resultados encontrados podemos decir que los fármacos tipo heparán sulfato probados no tienen un efecto inhibitorio directo sobre la proliferación de las líneas celulares tumorales SK-MEL 28 y K-562. El efecto encontrado fue contrario a lo esperado, es decir, los fármacos probados muestran un patrón de inducción de la proliferación de células tumorales de las líneas antes mencionadas. Éste patrón puede ser debido a que los fármacos estudiados son una mezcla de diversos fragmentos que tienen actividades contrapuestas, esto es que algunos inhiben la angiogénesis y otros la inducen. Pensamos que los fármacos requieren de modificaciones estructurales, después de las cuales podrán ser probados nuevamente sobre líneas celulares tumorales para evaluar su acción.

Por otro lado, tampoco se encontró un efecto antiangiogénico en ninguno de los fármacos sobre la línea celular endotelial A 023BBEp7 debido a que no existe una diferencia significativa entre los controles y los experimentos con el fármaco. Los únicos fármacos que mostraron un leve efecto inhibitorio fueron H₁ y H₄ con 11% de inhibición de la proliferación celular. Sin embargo, éste resultado es muy bajo si lo vemos desde el punto de vista clínico. Basandonos en la información reportada en la literatura (54,12,16,11) de que la heparina o fragmentos de ella administrados con esteroides angiostáticos en ensayo CAM inhibían la angiogénesis, realizamos el experimento en membrana corioalantoidea de embrión de pollo, en el cual se administraron juntos hidrocortisona y dos de los fármacos (H₂ y H₄). En este experimento el fármaco H₄ sí mostró inhibición del crecimiento de capilares sanguíneos en la membrana corioalantoidea del embrión con un 71% de inhibición de la proliferación; en el caso de H₂ los resultados no fueron concluyentes habiendo encontrado 28% de inhibición. Pensamos que al probar fragmentos pequeños de los fármacos administrados con esteroides angiostáticos en ensayo CAM encontraremos una mejor respuesta antiangiogénica.

Desarrollando una terapia antiangiogénica eficaz existirán mayores posibilidades de curación del cáncer, ya que se está alterando el microambiente del tumor sin dañar las células normales. Experimentos realizados por Folkman, 1986 (40), mostraron que la administración conjunta de heparina y un esteroide angiostático tenía efecto antiangiogénico en capilares en crecimiento pero los capilares maduros y que no se encontraban creciendo no eran afectados, debido a que en el adulto el proceso de angiogénesis no se lleva a cabo en condiciones normales.

Por lo anterior, sería relevante continuar con ésta línea de investigación ya que la angiogénesis ha mostrado ser parte crucial en el desarrollo y diseminación del cáncer.

APÉNDICE I. ABREVIATURAS

S: fase del ciclo celular donde se lleva a cabo la replicación del DNA

G₀: fase del ciclo celular donde las células se encuentran en un estado no proliferativo.

G₁: intervalo del ciclo celular entre el final de la mitosis y el inicio de la replicación de DNA. En ésta fase se sintetizan las proteínas necesarias para la replicación del DNA

G₂: intervalo del ciclo celular entre el final de la fase S y el comienzo de la próxima mitosis.

M: fase del ciclo celular donde las células se encuentran en mitosis.

Células NK: células del sistema inmune, las cuales tienen el primer contacto con el antígeno con el fin de eliminarlo.

AMF: factor de movilidad autócrino

CEA: Antígeno carcinoembrionario

DNA: Material celular que contiene la información genética

FGF: factor de crecimiento de fibroblastos

ECGF: factor de crecimiento de células endoteliales

VEGF: factor de crecimiento endotelial vascular

TNF α : factor de necrosis tumoral α

TNF β : factor de necrosis tumoral β

FGF's: factores de crecimiento de fibroblastos

FGFR's: receptores para los factores de crecimiento de fibroblastos

PGE₁: prostaglandina E₁

PGE₂: prostaglandina E₂

MadCAM- 1: molécula de adhesión presente en células endoteliales de la mucosa

Lu-ECAM-1: molécula de adhesión presente en células endoteliales del pulmón

GlyCAM-1: molécula de adhesión dependiente de glicosilación.

CD 62E:E-selectina. Molécula de adhesión

CD 62P:P-selectina. Molécula de adhesión

CD 106: VCAM-1 Molécula de adhesión

CD 44: ICAM-1 Molécula de adhesión

CAM: membrana corioalantoidea de embrión de pollo

AK1: Adenilato ciclasa

ATCC: American Type Culture Collection

GLO-1: Glioxilasa-1

PGM 1,2,3: Fosfoglucomutasa locus 1,2 y 3

ES D: Esterasa D

G6PD: Glucosa 6-fosfato deshidrogenasa

PKC: proteína cinasa C

Me-2: enzima málica

μ : micras

μ g: micrograno

μ l: microlitro

mg: miligramo

ng: nanogramo

m: pendiente (regresión lineal)

b: ordenada al origen (regresión lineal)

r: coeficiente de correlación (regresión lineal)

INF: interferon

HEPES: Ácido N-2-hidroxiethylpiperazin-N'-2-etansulfónico.

r.p.m: revoluciones por minuto

U: Unidades

% v/v: porcentaje en volumen

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Comprehensive Textbook of Oncology; Vol.I. Chapter 1; Austin.L.; "Overview of Normal and Cancer Cell Biology"; Williams&Wilkins; Second Edition: 1-5 (1991).
- 2.- Woodruff,M; "Cellular Variation and Adaptation in Cancer. Biological Basis and Therapeutic consequences" Capitulo 1; Oxfor University Press; (1990).
- 3.- Spivak-Kroizman; Lemmon,M.A; Dikic,I; " Heparin-Induced Oligomerization of FGF Molecules Is Responsible for FGF Receptor Dimerization, Activation, and Cell Proliferation"; Cell; 79,1015-1024(1994).
- 4.-Dziarski,R; "Enhancement of Mixed Leukocyte Reaction and Cytotoxic Antitumor Responses By Heparin"; The Journal of Immunology; 143;356-365 (1989).
- 5.-Luikart,S; Maniglia,C; Furcht,J; " A Heparan Sulfate-containing Fraction of Bone Marrow Stroma Induces Maturation of HL-60 cells in vitro ";Cancer Research; 50,3781-3785 (1990).
- 6.-Gorelik,E; Bere.W; Herberman,R; "Role of NK Cells in the Antimetastatic effect of Anticoagulant Drugs"; International Journal of Cancer;33,87-94 (1984).
- 7.-Ishihara,M; Tyrrell,D; Stauber,G; "Preparation of Affinity-fractionated, Heparin-derived Oligosaccharides and their Affects on Selected Biological Activities Mediated by Basic Fibroblast Growth Factor"; The Journal of Biological Chemistry; 268,4675-4683 (1993).
- 8.-Coombe,D; Parish,C; Ramshaw,I; Snowden,J; "Analysis of the Inhibiiton of Tumor Metastasis by Sulphated Polysaccharides "; International Journal of Cancer;39,82-88 (1987).
- 9.- Parker,B; Swain,S; Zugmaier,R; "Detectable Inhibition of Heparin-Binding Growth Factor Activity inSera From Patients Treated With Pentosan Polysulfate"; Journal of the National Cancer Institute.Vol 85.No13 (1993).

- 10.- Jordan,M; Himes,R; Wilson,L: "Comparison of the Effects of Vinblastine, Vincristine, Vindesine, and Vinepidine on Microtubule Dynamics and Cell Proliferation in Vitro"; *Cancer Research*; 45,2741-2747 (1985).
- 11.- Folkman,J; Weisz,P; Joullie,M; et.al; " Control of Angiogenesis with Synthetic Heparin Substitutes"; *Science*, 243,1490-1493 (1989).
- 12.- Folkman,J; Langer,R; Linhardt,R; "Angiogenesis Inhibition and Tumor Regression Caused by Heparin or a Heparin Fragment in the presence of Cortisone"; *Science*,221,719,725 (1983).
- 13.- Fidler,I; Ellis,L; "The Implications of Angiogenesis for the Biology and Therapy of Cancer Metastasis"; *Cell*,79,185-188 (1994).
- 14.- Starkey,J; Crowle,P; Taubenberger,S; "Mast-Cell-Deficient W/W Mice Inhibit A Decreases Rate of Tumor Angiogenesis"; *International Journal of Cancer*; 42,48-52 (1988).
- 15.- Aviezer,D; Hecht,D;Safran,M; " Perlecan, Basal Lamina Proteoglican, Promotes Basic Fibroblast Growth Factor-Receptor Binding, Mitogenesis, and Angiogenesis"; *Cell*; 79,1005-1013 (1994).
- 16.- Thorpe,P;Derbyshire,E; Andrade,S; "Heparin-Steroid Conjugates: New Angiogenesis Inhibitors with Antitumor Activity in Mice"; *Cancer Research*53,3000-3007 (1993).
- 17.- Ziche,M; Ruggiero,M; Pasquali,F; "Effects of Cortisone with and without Heparin on Angiogenesis Induced by Prostaglandin E1 and by S180 Cells, and on growth of Murine Transplantable Tumours"; *International Journal of Cancer*;35,549-552 (1985).
- 18.- Penhaligon,M; Camplejohn,R; "combination Heparin Plus Cortisone Treatment of Two Transplanted Tumors in C3H/He Mice"; *Journal of Natural Cancer Institute*;74,869-872 (1985).
- 19.- Azizhkan,R; Clifford,J; Zetter,B; Folkman,J; " Mast Cell Heparin Stimulates Migration of Capillary Endothelial Cells in Vitro"; *J.Exp.Med*;152,931-944 (1980).

- 20.- Zugmaier,G; Lippman,M; 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.Nat,Cancer Inst.*;84(22), 1716-1724 (1992).
- 21.- Danishefsky,I; "Studies on the mechanism of Heparin action by modification of its structure": *Federation Proceedings*;36(1): 33-39 (1977).
- 22.- Liotta,L; Steeg,P; Stetler-Stevenson,W; " Cancer Metastasis and Angiogenesis: An Imbalance of Positive and Negative Regulation"; *Cell*,64,327-336 (1991).
- 23.- Linhardt,R; "Heparin: An Important Drug Enters Its Seventh Decade"; *Chem.Ind*; 50(2),45-47 (1991).
- 24.- Cho,K; Vogelstein,B; "Genetic Alterations in the Adenoma Carcinoma Sequence"; *Cancer Supplement*,70(6),1727-1730 (1991).
- 25.- Mason,I; "The Ins and Outs of Fibroblast Growth Factors"; *Cell*, 78,547-552 (1994).
- 26.- Ferrara,N; Clapp,C; Weiner,R; "The 16K Fragment of Prolactin Specifically Inhibits Basal or Fibroblast Growth Factor Stimulates Growth of Capillary Endothelial Cells"; *Endocrinology*, 129(2), 896 -900 (1991).
- 27.- Tapparelli,C; Metternich,R; Ehrhardt,C and Cook,N; "Synthetic low-molecular weight thrombin inhibitors:molecular design and pharmacological profile"; *TiPS*;14,366-376 (1993).
- 28.- *Comprehensive Textbook of Oncology*; Vol.I. Chapter 55;Riggs,C. and Bennett,J; "Principles of Cancer Chemotherapy" Williams & Wilkins; Second Edition; (1991).
- 29.- Augustin,H; Kozian,D and Johnson,R; "Differentiation of endothelial cells: Analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes"; *BioEssays*, 16(12), 901-906 (1994).
- 30.- Folkman,Jand Klagsbrun,M; "Angiogenic Factors";*Science*, 23, 442-447 (1987).
- 31.- Rak,J; St Croix,B and Kerbel,R; "Consequences od angiogenesis for tumor progression, metastasis and cancer therapy";*Anticancer drugs*. 6.3-18 (1995).

- 32.- Liotta,L; Rao,C.N and Barsky,S: "Tumor Invasion and Extracellular Matrix: Laboratory Investigation"; 49(6),636-649 (1983).
- 33.- Jennie P; "Mammalian Cell Culture". The use of serum-free Hormone-Supplemented Media: Mather; Plenum Press, New York,239-271 (1984).
- 34.- Tai-Ping D.Fan;"Angiosuppressive therapy for cancer";Elsevier Science (1993).
- 35.- Bischoff,J; "Approaches to studying cell adhesion molecules in angiogenesis"; Trends in cell biology, 2 (1995).
- 36.- Weidner,N; Semple,J; Welch,W; Folkman,J; "Tumor Angiogenesis and Metastasis - correlation in invasive breast carcinoma"; The new England Journal of Medicine; 324, 1991.
- 37.- Jin,K; Li,B; Winer,J; "Inhibition of Vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo"; Nature; 362,841-844 (1993).
- 38.- Weidner,N; Carroll,P; Flax,J; " Tumor Angiogenesis Correlates with Metastasis in invasive Prostate Carcinoma"; American Journal of Pathology,143(2),401-409 (1993).
- 39.- Nickoloff,B; Mitra,R; Varani,J;et.al: "Aberrant Production of Interleukin-8 and Thrombospondin-1 Psoriatic Keratinocytes Mediates Angiogenesis" American Journal of Pathology",144(4),820-828 (1994).
- 40.- Folkman,J;" How Is Blood Vessel Growth Regulated in Normal and Neoplastic Tissue?"; Cancer Research,46,467-473 (1986).
- 41.- Liotta,L; " Tumor Invasion and Metastases-Role of Extracellular Matrix"; Cancer Research, 46. 1-7 (1986).
- 42.- Fidler,I;"The Pathogenesis of cancer metastasis"; Macmillan Journals Ltd (1980).
- 43.- Neopto,J and Cooke,T; Cancer. A Molecular Approach. Capitulo 4; Piekford,I; "Molecular Basis of Metastasis"; Ed. Nicholas Lemaine. Scientific Publications (1994).
- 44.- Fidler,I; "Critical Factors in the Biology of Human Cancer Metastasis: Twenty-eighth."; Cancer Research; 50,6130-6138 (1990).

- 45.- Comprehensive Textbook of Oncology; Vol.1.Chapter 19 Kohn,E and Liotta,L; "Local Invasion and Metastasis"; Williams & Wilkins; Second Edition; 131-137 (1991)
- 46.- Comprehensive Textbook of Oncology; Vol.1. Chapter 20; Joseph-Silverstein,J and Silverstein ,R: "Tumor Angiogenesis"; Williams & Wilkins; Second Edition; 138-142 (1991)..
- 47.- Klagsburn,M; " Mediators of Angiogenesis:the biological significance of basic fibroblast growth factor (bFGF)-heparin and heparan sulfate interactions"; Semin. Cancer Biol.,3(2),7-81 (1992).
- 48.- Zugmaier,W; Califano,G;Paik,F; Lippman,S; "Tumor growth dependent on Kaposi's sarcoma-derived fibroblast growth factor inhibited by pentosan polysulfate" Journal of Natural Cancer Institute; 83(10),716-720 (1991).
- 49.- Sylvester D.M; Liu S.Y; Meadows,G; "Augmentation of Antimetastatic activity of interferon and tumor necrosis factor by heparin"; Immunopharmacol Immunotoxicol; 12(2);161-180 (1990).
- 50.- Cooke,T; Neopto,J; Cancer. A Molecular Approach.; Capitulo 18; Hickson,I and Carmichael,J; "Molecular Mechanism of Cytotoxic Drug Resistance";Ed. Nicholas Lemaine. Scientific Publications; (1994).
- 51.- Comprehensive Textbook of Oncology; Vol.1.; Chapter 21;Gerlach,J; "Development of Drug and Radiation Resistance"; Williams & Wilkins;Second Edition. 143-150.
- 52.- Fauve,R; "Metastasis"; Res. Immunol.;145,229-312 (1994).
- 53.- Teicher.B; Alvarez.E; Dong Huang,Z; "Angiogenic Agents Potentiate Cytotoxic Cancer Therapies against Primary and Metastatic Disease"; Cancer Research, 52, 6702-6704 (1992).
- 54.- Crum,R; Szabo,S; Folkman,J; "A New Class of Steroids Inhibits Angiogenesis in the Presence of Heparin or a Heparin Fragment"; Science,230,1375-1378 (1985).

- 55.- Alley, M; Scudiero,D; Monks, A; et. al. " Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay ": Cancer Research; 47, 589-601 (1987).
- 56.- Slater.T; Sawyer,B; Strailli,U; "Studies on Succinate-Tetrazolium Reductasa Systems III. Points of coupling of four different Tetrazolium Salts"; Bioch.Biophys.Acta,77,383-393 (1963).
- 57.- Vistica,D; Skehan,P; Scudiero,D; et. al " Tetrazolium-based Assays for Cellular Viability: A Critical Examination of Selected Parameters Affecting Formazan Production"; Cancer Research, 51, 2515-2520 (1991).
- 58.- Carmichael,J; DeGraff,W; Gazdar,A; Minna,J; Mitchell,J; " Evaluation of Tetrazolium-based Semiautomated Colorimetric Assay: Assessment of Chemosensitivity Testing"; Cancer Research; 47, 936-942 (1987).
- 59.- Green,I.; Reade,J; Ware,C; " Rapid Colorimetric Assay for Cell Viability: Application to the Quantitation of Cytotoxic and Growth Inhibitory Lymphokines"; J. of Immunology Methods; 70,257-268 (1984).
- 60.- Flores,Y; " Modelo *in vitro* para el estudio de la resistencia a fármacos antitumorales vineristina y arabinósido de citosina, empleando la línea tumoral K-562"; Tesis Profesional, Facultad de Química, U.N.A.M. (1995). En prensa.
- 61.- "American Type Culture Collectiol Catalogue of Cell Lines and Hybridomas"; Edit: Hay,R; Caputo,J. Chen,T.R, Macy,M; McClintock,P and Reid,Y; 7th ed.; E:U:A (1992).
- 62.-Tyrrell,D; Ishihara.M; Rao,N., et al ; "Structure and biological activities of a Heparin-derivades hexasaccharide with high Affinity for basic fibroblas growth factor; The Journal of Biological Chemistry"; 268.No 7. 4684-4689 (1993).