



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

34

20

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

INDUCCION ENZIMÁTICA DE GSHT EN LA LINEA
K-562 EN PRESENCIA DE LOS FARMACOS
ANTITUMORALES ARA-C Y VINCRISTINA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A :

YOLANDA FLORES PICAZO



MEXICO, D. F.

1996

FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Jurado asignado

Presidente: Prof. Angelina Quintero Ruiz
Vocal: Prof. Beatriz Albina Medina Jiménez
Secretario: Prof. Raúl Genaro Aguilar Caballero
Primer suplente: Prof. Homero Hernández Montes
Segundo suplente: Prof. Rebeca García Macedo

Sitio donde se desarrolló el tema:
Departamento de Biología
Facultad de Química, UNAM

Asesor del tema :



Dra. Angelina Quintero

Sustentante:



Yolanda Flores Picazo

"A Dios por haberme dado la oportunidad de vivir"

DEDICATORIAS

Con profundo amor a la Sra. Goyita Picazo Ramírez, quien siempre me educó en un ambiente de ternura y cariño. Porque gracias a ella he llegado a cumplir una de las metas más anheladas.

Porque que sé que estás conmigo, gracias mamá.

A mi padre, Sr. Jesús Flores Martínez y a mis hermanos, José Luis, Eloy y Jesús, por el apoyo incondicional que a lo largo de de mi formación me brindaron.

A mi querida hermana Mercedes, porque hoy más que nunca, he tenido su valioso apoyo, como hermana y como la mejor de mis amigas.

A Miguel, porque el tener a la persona amada ha sido uno de los más grandes alicientes para llegar a la meta.

A mis tíos, Sr. Antonio Picazo Ramírez y Sra. Angela Aguilar por que desde siempre me han brindado su cariño y su apoyo.

A mis queridos sobrinos: Diana, Miriam, Carlitos, Carlitos Eloy, Karlita, Ale y Laurita, porque su cariño es suficiente para seguir adelante.

A mis cuñados Cata, Bertha y Carlos por su amistad y su cariño.

AGRADECIMIENTOS

Con profundo agradecimiento a la Dra. Angelina Quintero Ruiz, ya que gracias a su orientación, apoyo, esfuerzo y dedicación he logrado subir un pequeño peldaño a través de la realización de esta tesis.

Al Dr. José Sullivan por facilitarnos la línea tumoral de la que fue objeto este estudio.

Al Dr. Saúl Villa Treviño por su valiosa ayuda para llevar a cabo este trabajo.

A la Bióloga Samia Fatel; por la asistencia técnica que me brindó y por la oportunidad de conocer a tan bella persona.

A la Sra. Evelia, por su valiosa asistencia y su agradable amistad.

Al Sr. Eric Monterrubio, Sr. Alejandro Cabrera y Srita. Mirna Manzola, por su asistencia en el área de cómputo para la realización de este trabajo.

A todas aquellas personas que de alguna manera hayan contribuido para la realización de este trabajo, gracias.

INDICE

	PAGINA
ABREVIATURAS	7
LISTA DE TABLAS	9
LISTA DE GRAFICAS	10
INTRODUCCION	11
RESUMEN	12
JUSTIFICACION	13
HIPOTESIS	14
OBJETIVOS	15
1. ANTECEDENTES TEORICOS	16
1.1 Definición de la célula normal y tumoral	16
1.2 Tipos de cultivos celulares	17
1.2.1 Crecimiento de las células tumorales in vitro	17
1.2.2 Establecimiento de una línea celular resistente	17
1.2.3 Generalidades de la línea tumoral K-562	17
1.3 Fármacos Antineoplásicos	18
1.3.1 Fases de selección de fármacos con actividad antineoplásica	18
1.3.2 Clasificación de los fármacos antineoplásicos de acuerdo a su mecanismo de acción.	22
1.3.3 Clasificación estructural de los fármacos antitumorales	22
1.3.4 Mecanismo de acción del Arabinósido de citosina ARA-C	23
1.3.5 Mecanismo de acción de Vincristina	25

2. MULTIRESISTENCIA A FARMACOS	
2.1 Glucoproteína GP-170	26
2.1.1 Mecanismo de acción de la GP-170	27
2.2 Reversión de la resistencia	28
2.3 Expresión de la GP-170 en tejidos	28
2.4 Cambios bioquímicos asociados al fenotipo de multirresistencia a fármacos	28
2.5 Genética del fenotipo MDR	29
3.0 Glutación Sufhidrilo transferasa	30
3.1 Generalidades de la GSHT	30
3.1.1 Isoenzimas de la GSHT	30
3.1.2 Expresión de la GSHT π en tejidos no tumorales	30
3.1.3 Características bioquímicas de la GSHT	33
3.1.4 Distribución de la GSHT en diferentes tejidos	33
3.1.5 Distribución de la GSHT en diferentes especies	34
3.1.6 Técnicas para la medición de la actividad de la GSHT	34
4. MATERIALES Y REACTIVOS	
4.1 Composición del medio de cultivo	35
4.2 Exposición de células a fármacos antineoplásicos y marcaje radioactivo	35
4.3 Elaboración de geles PAGE-SDS	35
4.4 Tinción con plata	36
4.5 Cuantificación de la actividad enzimática de GSHT	37
4.6 Medición de proteína (Método de Bradford)	37

5. PREPARACION DE REACTIVOS

5.1	Medio de cultivo	37
5.1.2	Composición del medio de cultivo	37
5.1.3	Suplementación del medio de cultivo	39
5.2	Preparación de fármacos antitumorales	39
5.3	Viabilidad celular	39
5.3.1	Exclusión de colorante	39
5.3.2	Reducción de la sal de tetrazolio	39
5.4	Medición de marca radioactiva	39
5.4.1	Solución para centellador	39
5.4.2	Solución para precipitación de proteínas radioactivas	39
5.5.	Análisis de proteínas	40
5.5.1	Geles Laemmli	40
5.5.2	Geles de poliacrilamida en dos dimensiones	40
5.5.3	Marcadores de peso molecular	42
5.5.4	Solución para tinción de geles (Azul Coomasie)	43
5.5.5	Solución para tinción de geles (Plata)	43
5.5.6	Determinación de Proteína	44
5.7	Determinación de la actividad de la GSHT	44
5.7.1	Buffer para la determinación de la actividad de GSHT	44
5.7.2	Sustratos para la conjugación de la GSHT	44
5.7.3	Solución para detener la reacción enzimática	45
6. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES		
6.1.1	Preparación del medio de cultivo para la expansión de las células tumorales	45
6.1.2	Suplementación del medio de cultivo para crecimiento celular	45

6.1.3	Preparación del medio de cultivo para marcaje de proteínas con metionina radioactiva S ³⁵	45
6.1.4	Suplementación del medio de cultivo para marcaje de proteínas con metionina radioactiva S ³⁵	46
6.1.5	Cultivo de las células K-562	46
6.2	Determinación de la viabilidad	46
6.2.1	Exclusión de colorante	46
6.2.2	Reducción de la sal de tetrazolio	47
6.3	Cursos temporales de la citotoxicidad en presencia de los fármacos antineoplásicos	47
6.3.1	Preparación de fármacos	47
6.3.2	Exposición de las línea K-562 a los fármacos antineoplásicos	47
6.3.3	Análisis morfológico	48
6.4	Análisis de proteínas por electroforesis PAGE-SDS	48
6.4.1	Preparación de la muestra para geles en una sola dimensión	48
6.4.2	Marcaje de las proteínas con metionina (S ³⁵) de las células K-562 expuestas a los fármacos ARA-C y Vin	48
6.4.3	Medición de la incorporación de metionina S ³⁵	49
6.4.4	Elaboración de geles de poliacrilamida	49
6.4.4.1	Ajuste del número de células para el corrimiento electroforético	49
6.4.4.2	Elaboración de geles en una dimensión	50
6.4.4.3	Elaboración de geles en dos dimensiones	51
6.4.4.4	Generación del gradiente de pH	52
6.4.4.5	Corrimiento electroforético en una dimensión	52

6.4.4.6	Elaboración de geles bidimensionales	52
6.4.4.7	Corrimiento electroforético para la segunda dimensión	53
6.4.4.8	Conservación de geles de poliacrilamida	54
6.5	Determinación de la actividad de la GSHT	54
6.5.1	Determinación basal de la actividad GSHT	54
6.5.2	Medición de las proteínas para la fuente de enzima	55
6.5.3	Determinación de la actividad de la GSHT	56
7. RESULTADOS		
7.1	Curva de crecimiento	57
7.1 a)	Determinación del tiempo reducción del MTT	58
7.2 b)	Selección del disolvente para la medición del formazan	59
7.3	Curva de crecimiento	60
7.4 y 7.5	Cursos temporales de la viabilidad celular en presencia de vincristina y Ara-c	61
7.6	Inducción de la actividad de la GSHT	63
7.7	Análisis de las proteínas por electroforesis uni y bidimensional marcados con metionina adioactiva S ³⁵ en la línea celular K-562 en presencia de los fármacos antitumorales.	68
8.0	DISCUSION	70
9.0	PERSPECTIVAS	72
10.0	CONCLUSIONES	73
11.0	BIBLIOGRAFIA	74

ABREVIATURAS

ARA-C	Arabinósido de citosina
ARA-CDP	Arabinósido-citidín difosfato
ARA-CTP	Arabinósido- citidín trifosfato
C-219	Monoclonal anti GP-170 humano
CDNB	Cloro dinitro benzeno
CPM	Cuentas por minuto
CTP	Citidín trifosfato
dCTP	Deoxicitidín trifosfato
dCyd	Deoxicitidina cinasa
DMSO	Dimetil sulfóxido
DTT	Ditiotreitol
GP-170	Glucoproteína- 170
GSH	Glutación (reducido)
GSHT	Enzima glutatión sulfhidrilo transferasa
K-562	Línea tumoral (Eritro leucemia linfocítica crónica)
KDa	Kilodaltones
mdr	Gene asociado a la multirresistencia
MDR	Fenotipo asociado a multirresistencia
MRK16	Monoclonal anti GP-170 murino
MTT	Sal de bromuro de tetrazolio
NK	Células asesinas
PI	Punto isoeléctrico
S ³⁵	Azufre radioactivo

SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCA	Acido tricloroacético
TED	Buffer Tris-EDTA
μCi	Micro Curies
Vin	Vincristina

LISTA DE TABLAS

TABLA	LEYENDA	PAGINAS
1.3	Estrategias clínicas para el empleo de nuevos fármacos	20
1.4	Respuesta de diversos tumores humanos a la quimioterapia antineoplásica	21
1.6	Propiedades de la célula tumoral que favorece la toxicidad de los fármacos antitumorales	22
1.6	Reacciones de fosforilación para la incorporación del ARA-C en el DNA	24
3.1	Reacciones de detoxificación de la GSHT vía la ruta del ácido mercaptúrico	32
6.4	Esquema de trabajo para realizar geles en una sola dimensión	50
6.6	Curva patrón de proteínas	54
6.6	Cinética enzimática de la GSHT relación actividad y proteína	55
7.6	Actividad específica de la enzima GSHT medida en la línea K-652	65

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	LEYENDA	PAGINA
1.3	Estructura química de la citosina y su metabolito	24
1.4	Estructura química de vincristina	25
2.2	Estructura de la GP-170	27
7.1	Tiempo de incubación de la sal de MTT por la línea K-562	58
7.2	Selección del disolvente para los cristales de formazan	59
7.3	Curva de crecimiento	60
7.4	Efecto de la vincristina sobre el desarrollo de la línea K-562	61
7.5	Efecto del ARA-C sobre el desarrollo de la línea K-562	62
7.6	Actividad de la GSHT en presencia de los fármacos antineoplásicos	65
7.7	Patrón de expresión de las proteínas de la línea K-562	68

INTRODUCCION

RESUMEN

El cáncer es una enfermedad que conlleva una serie de eventos bioquímicos y fisiológicos que, al ser alterados originan una nueva clona celular con características morfológicas diferentes de la célula inicial. Posteriormente estas células predominarán dentro del tejido donde se desarrollan.

Se ha observado que no todas las neoplasias (en especial las malignas y en fases avanzadas) son fácilmente erradicables, por lo que algunos pacientes presentan resistencia a los fármacos antitumorales durante los primeros meses de tratamiento. Así pues se debe incrementar la dosis del fármaco y con ello se ven aumentados los efectos tóxicos. El problema de la resistencia a fármacos ha llevado a numerosos investigadores a estudiar el mecanismo por el cual se presenta la resistencia a los fármacos antineoplásicos.

Para llevar a cabo nuestro estudio se empleó una línea celular tumoral (K-562), la cual se trató con dos fármacos antitumorales; arabinósido de citosina y vincristina para inducir resistencia. La citotoxicidad de los fármacos sobre la línea K-562 se determinó mediante la técnica de reducción de la sal de tetrazolio(MTT). Se emplearon técnicas electroforéticas en una y dos dimensiones para analizar el patrón de expresión de proteínas de la línea K-562 así como la actividad de la enzima glutatión sulfhidrilo transferasa en presencia de los fármacos antineoplásicos.

Finalmente, este trabajo propone un modelo de estudio *in vitro* que permita estudiar el mecanismo de resistencia a fármacos.

JUSTIFICACION

El cáncer es una de las enfermedades que más afecta a la población mundial. Un individuo con cáncer debe ser sometido a tratamiento con fármacos antineoplásicos. La mayoría de estos fármacos no sólo daña a las células tumorales sino, a las células normales del sujeto. Aunado a esto se observan diversos efectos tóxicos que afectan en gran parte la actividad física del paciente. El tratamiento que al inicio proporciona buenos resultados posteriormente requiere de emplear dosis mayores y por supuesto se ven aumentados los efectos tóxicos. Todo ello ha generado que diversos investigadores se aboquen al estudio de la resistencia a los fármacos. Se han propuesto algunas teorías al respecto y con ello se abre una línea de investigación donde existe un amplio campo a diferentes niveles. Así mismo para emprender este tipo de trabajos es necesario que se inicie con estudios **in vitro**.

HIPOTESIS

1.- Las células tumorales en presencia de los fármacos vincristina y arabinósido de citosina, inducen o inhiben la síntesis de proteínas relacionadas al mecanismo de resistencia.

2.-Se ha observado un aumento en la actividad de la enzima GSHT, en diversos tipos de tumores. Un incremento en la actividad de la GSHT se asocia al fenotipo de resistencia entonces, si la línea celular K-562 presenta resistencia a los fármacos utilizados es probable que se observe un aumento en la actividad de esta enzima.

OBJETIVOS

Objetivo general:

El objetivo de este trabajo es identificar cambios en la actividad de la glutatión sulfhidrilo transferasa (GSHT) y en la síntesis de otras proteínas que pudieran estar relacionadas al mecanismo de resistencia.

Objetivos particulares:

- 1. Establecer el cultivo de células tumorales K-562 en condiciones *in vitro*.**
- 2. Caracterizar la línea K-562 mediante una curva de crecimiento.**
Analizar su comportamiento a través de cursos temporales de la citotoxicidad en presencia de los fármacos antitumorales.
- 3. Determinar la actividad total de la enzima glutatión sulfhidrilo transferasa, en presencia de los fármacos antitumorales como parámetro de la resistencia a fármacos.**
- 4. Analizar el patrón de expresión de proteínas en las células K-562 expuestas a los fármacos mediante electroforesis unidimensional y bidimensional, para detectar si existe inducción o inhibición de proteínas relacionadas al mecanismo de resistencia a fármacos.**

1. ANTECEDENTES

1.1 Definición de la célula normal y tumoral. - La célula normal crece, se divide y lleva a cabo funciones específicas de acuerdo al órgano o tejido del cual forma parte. Dichas funciones en condiciones normales se encuentran perfectamente reguladas. Sin embargo la regulación metabólica de la célula, puede alterarse por efecto de diferentes agentes de tipo físico (radiaciones), químico (alimentos y fármacos) y/o biológico (virus). Estos eventos pueden originar una mutación en el material genético, lo cual podría activar alguno de los protooncogenes asociados a tumorigenicidad.

Las células tumorales se reconocen morfológicamente por su gran núcleo en relación al citoplasma, pocas estructuras especializadas, así como gran capacidad de división. Una célula tumoral además de proliferar rápidamente, puede generar áreas secundarias de crecimiento distantes al tumor, a este proceso se le denomina metástasis **(1)**.

En la célula tumoral se han observado cambios a nivel enzimático, como por ejemplo el aumento de la actividad de la enzima glutatión sulfhidrilo transferasa. Se ha reportado que estos cambios ocurren tanto a nivel de la transcripción como de la traducción **(2)**. Se sabe que esta enzima se expresa tanto en la célula normal como en la tumoral. La actividad de esta enzima aumenta principalmente cuando el organismo se ve afectado por un compuesto tóxico **(3)**. Adicionalmente se ha reportado sobreexpresión de esta enzima en diferentes tipos de tumores, como por ejemplo riñón **(4)** y pulmón, por lo cual se piensa que puede ser utilizada como marcador tumoral. Otra alteración reportada a nivel genético en la célula tumoral es la variabilidad del genotipo, presentándose un número anormal de cromosomas, es decir, pasa de una célula diploide a una célula aneuploide **(5)**.

Entre las diferencias a nivel citológico entre células normales y células tumorales, de piel, pulmón, placenta se han detectado las siguientes características:

a) Contienen más de cuatro núcleos y b) Presentan figuras mitóticas tripolares o multipolares a diferencia de la célula normal. Estos cambios genéticos favorecen el establecimiento de la célula tumoral **(6)**.

1.2.TIPOS DE CULTIVOS :

Existen diversos tipos de cultivos:

1) Cultivo primario.- Es aquel que proviene de un tejido animal, son células bien diferenciadas y cuya permanencia en cultivo es corta.

2) Cultivo secundario.- Se forma a partir de un cultivo primario, y se comporta de la misma forma que el cultivo que le dió origen.

3) Cepa celular.- Se trata de un cultivo celular bien caracterizado tiene básicamente tres fases: lag, exponencial y estacionaria.

4) Línea celular.- Se refiere a una estirpe celular que se divide aceleradamente y que muestra duración de vida indefinida (es decir que son células inmortales), bajo condiciones de cultivo ya establecidas

1.2.1 CRECIMIENTO DE LAS CELULAS TUMORALES IN VITRO.- Empleando un medio de cultivo definido (con una fuente de carbono tal como la glucosa, una fuente de nitrógeno como el glutatión y cofactores) es posible crecer células animales bajo condiciones óptimas para su crecimiento. El cultivo de células **in vitro** requiere también de aminoácidos esenciales tales como arginina, histidina, isoleucina, lisina, metionina y vitaminas (7). Uno de los factores indispensables para el crecimiento celular, es el suero fetal bovino que proporciona oligoelementos y factores de crecimiento (8).

1.2.2 ESTABLECIMIENTO DE UNA LINEA CELULAR RESISTENTE

Una línea celular puede ser sensible o resistente hacia algún fármaco antitumoral. Para transformar una línea tumoral en una célula resistente, se lleva a cabo un cultivo de forma continua, en las condiciones normales de crecimiento y bajo diferentes concentraciones del fármaco seleccionado. A medida que se van obteniendo células resistentes es conveniente cambiar el medio de cultivo para evitar que los detritos (restos celulares) de las células sensibles, permanezcan en el medio de cultivo e inhiban el crecimiento de las células ya resistentes (9). Posteriormente puede realizarse un análisis genético que permita identificar alteraciones cromosomales que demuestren la resistencia a los fármacos antitumorales (10).

1.2.3 GENERALIDADES DE LA LINEA TUMORAL K-562 .- La línea K-562 es una línea derivada de una paciente femenina con leucemia mielocítica crónica, obtenida de una

efusión pleural (11). La línea celular fue obtenida por cultivo del tejido durante 4 años hasta lograr que las células fueran inmortales. Las células que componen la línea celular son blastos indiferenciados, su cariotipo ha sido descrito y se conoce que estas células presentan el cromosoma Filadelfia, el cual se caracteriza por una deleción terminal del brazo largo del cromosoma 22 (11). También se ha reportado que estos blastos no diferenciados son ricos en glicoforina, una glucoproteína que puede ser inducida, para producir hemoglobina fetal y embriónica en presencia de hemina, los cuales a su vez se conocen como marcadores de las series eritroides (12). Otro dato adicional de esta línea es que presenta alta sensibilidad a las células del sistema inmune NK (13), es decir que mediante esta interacción es posible detectar la presencia de las NK debido a que causan letalidad en las K-562.

1.3 FARMACOS ANTINEOPLASICOS.- Paul Ehrlich se considera el padre de la quimioterapia antineoplásica, ya que descubrió los primeros agentes alquilantes con actividad antitumoral. El tratamiento quimioterapéutico antineoplásico, se refiere al uso de fármacos para combatir el crecimiento de las células neoplásicas en un tumor. La investigación de nuevos fármacos con propiedades anticancerosas se puede iniciar con la síntesis de análogos de fármacos efectivos (14). De los miles de compuestos sintetizados sólo algunos logran utilizarse en la clínica, por lo que es deseable la obtención de fármacos cuyos efectos secundarios sean cada vez menores. Entre los fármacos que cumplen con estas características se pueden mencionar: 5-fluorouracilo, 6 mercaptopurina y análogos del platino que han mostrado actividad antitumoral con aceptable toxicidad.

1.3.1 FASES PARA LA SELECCION DE FARMACOS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLASICA

- a) La primera fase para la utilización de un nuevo agente con actividad antitumoral se prueba en líneas tumorales, estas líneas podrán ser en un principio murinas y posteriormente deberán probarse en líneas celulares humanas.
- b) Los fármacos que manifiestan actividad antineoplásica son probadas en ratones a los que previamente se les haya inducido algún tipo de tumor (mama, colon, leucemias, pulmón, sarcomas y melanomas).

c) Posteriormente para poder utilizarlos en humanos, deberán efectuarse pruebas en perros y primates, es decir en animales de mayor tamaño. Por último deberá determinarse, la dosis máxima tolerable con el mínimo de letalidad (10 % de la dosis letal).

Es necesario probar la toxicidad del fármaco mediante ensayos de órgano aislado, como por ejemplo médula ósea, sistema nervioso, etc **(15)**. Para determinar las dosis adecuadas del fármaco se siguen las siguientes etapas clínicas.

FASE I. En esta primera etapa se realiza para determinar dosis que puedan ser toleradas e identificar efectos no deseables. A partir de esta fase se determina el régimen de dosis. La dosis inicial en humanos es usualmente del 10 al 30 % de la dosis usada en ratones.

FASE II. Se refiere a las pruebas para determinar el espectro de actividad antineoplásica de nuevos compuestos; una respuesta completa indica que han desaparecido todas las evidencias físicas que presenta el tumor. Para ello son analizadas mediante radiografías y tomografía, comprobando que han desaparecido. Por otro lado debe haber disminución de síntomas, de ahí que un 50 % en la reducción del tumor, es considerada una respuesta parcial.

FASE III. En esta fase los fármacos que se han estudiado en las fases anteriores, se comparan con el fármaco de elección utilizado en la terapia hasta ese momento. Los fármacos que demuestran una actividad similar en esta fase pueden ser usados en pacientes con cáncer y de esta forma se acepta como un nuevo agente quimioterapéutico antitumoral. (En la tabla N. 1.3 se resumen las fases para la utilización de un nuevo fármaco).

TABLA 1.3 ESTRATEGIAS CLINICAS PARA EL EMPLEO DE NUEVOS FARMACOS	
FASE I	Estudios de toxicidad y escalamiento de dosis en diversos pacientes.
FASE II	Espectro de la actividad antitumoral, de las dosis seleccionadas en la fase I y el estudio de la relación dosis respuesta.
FASE III	Comparación de los nuevos fármacos con respecto a los empleados en la terapia hasta ese momento.

Se ha logrado determinar cuales son los tumores que responden eficazmente al tratamiento con fármacos antitumorales y los que sólo responden parcialmente (Tabla 1.4)

TABLA N. 1.4 RESPUESTA DE LOS DIVERSOS TUMORES HUMANOS A LA QUIMIOTERAPIA ANTINEOPLASICA	
TIPO DE TERAPIA	TIPO DE TUMOR
Curativa	Leucemia aguda no linfocítica
✓	Linfoma de Burkitt
✓	Enfermedad de Hodgkin
✓	Sarcoma testicular
Benéfica	Carcinoma hepatocelular
✓	Carcinoma pancreático
✓	Carcinoma mamario
✓	Carcinoma cérvical
✓	Melanoma maligno
Paliativa	Mieloma múltiple
✓	Osteosarcoma
✓	Neuroblastoma
✓	Carcinoma de ovario
✓	Leucemia linfocítica crónica

Durante el empleo de fármacos antitumorales no es posible hacer una distinción entre la célula tumoral y la normal, ya que ambas células forman parte del mismo tejido. Sin embargo ciertas características (tabla 1.5) biológicas de la célula tumoral permiten que sea más vulnerable a la acción de los agentes antineoplásicos.

TABLA N.1.5 PROPIEDADES DE LA CELULA TUMORAL QUE FAVORECE LA TOXICIDAD DE LOS FARMACOS ANTITUMORALES	
PROPIEDAD	MECANISMO
Alta capacidad proliferativa	Sensibilidad de la célula tumoral a los fármacos antitumorales
Material cromosómico alterado	Daño directo al DNA y por lo tanto mayor susceptibilidad
Mitosis anormales	Aumento de sensibilidad del huso mitótico e interferencia con la síntesis de proteínas.
Alteraciones de membrana	Presencia de receptores a los fármacos, que en condiciones normales no se presentan
Anormalidades enzimáticas	Delección de enzimas necesarias para la conservación de la homeostasis, (p. ej. la enzima asparangina sintetasa).

1.3.2 CLASIFICACION DE LOS FARMACOS ANTINEOPLASICOS DE ACUERDO A SU MECANISMO DE ACCION

Los fármacos antineoplásicos se clasifican (15) en tres grupos:

CLASE I. Este tipo de fármacos actúa cuando las células están dentro de las fases G1-M del ciclo celular.

CLASE II: Son fármacos que actúan en la fase de síntesis 0 del ciclo celular, entre los cuales están: Metrotexate, ARA-C, vincristina, etc.

CLASE III. No ejercen su efecto en una etapa específica del ciclo celular, dentro de este grupo se encuentran: antraciclinas, antibióticos, nitrosoureas, clorambucil, ciclofosfamida, cisplatino y bleomicina.

1.3.3 CLASIFICACION ESTRUCTURAL DE LOS FARMACOS ANTITUMORALES.

Los fármacos antineoplásicos pueden agruparse de acuerdo a su estructura (15) y se clasifican en :

1) Agentes alquilantes.- Estos fármacos tienen un efecto tóxico por interacción de sus grupos electrofílicos con grupos nucleofílicos de las células blanco, es decir básicamente actúan sobre el DNA o el RNA. Se intercalan entre las cadenas de los ácidos nucleicos, dando como resultado un error a nivel transcripcional o traduccional. Estos compuestos pueden agruparse dentro de la clase III. Los agentes alquilantes más utilizados son: Mecloretamina, ciclofosfamida, clorambucil, busulfan, dacarbazina y melfalan.

2) Nitrosoureas. El mecanismo de acción de las nitrosoureas, es a través de la inhibición de la reparación del DNA, alteraciones de la estructura del RNA y carbamoylación de varias proteínas, como ejemplos de este tipo de fármacos se encuentran: la carmustina, lomustina y semustina.

3) Antimetabolitos. Son fármacos conocidos como inhibidores de reacciones enzimáticas del metabolismo, ya sea como intermediarios o análogos inactivos de algunos sustratos. Estos antimetabolitos son activos únicamente durante fases específicas del ciclo celular y se encuentran agrupados dentro de la clase II. Algunos ejemplos de ellos son: El metrotexate que es un análogo del ácido fólico y se une fuertemente al sitio activo de la enzima dihidrofolato reductasa. Por lo que inhibe la reducción del dihidrofolato a tetrahidrofolato, que es un prerrequisito necesario para la formación de metilentetrahidrofolato. Este último es requerido para la síntesis de timidilato y precursores de las purinas. El 5-fluoracilo puede ser convertido en 5-Fluoradeoxiribosido, que es un potente inhibidor de la síntesis de timidina: De ahí que sea fácilmente incorporado en la síntesis del RNA y consecuentemente interfiere con la síntesis de macromoléculas (DNA y proteínas) de manera similar la 6-mercaptopurina inhibe la síntesis de adenina y guanina, ya que es un análogo estructural de la hipoxantina e inhibe la síntesis de purinas. Por último se encuentra el arabinósido de citosina, cuya información se detalla enseguida.

1.3.4 MECANISMO DE ACCIÓN DEL ARABINOSIDO DE CITOSINA (ARA-C)

El arabinosido de citosina es un análogo estructural de la citidina y deoxicitidina. Estos últimos son nucleótidos que forman parte del DNA. Debido a la semejanza estructural que existe entre el análogo y el metabolito, el metabolito se incorpora en el proceso normal de síntesis del DNA (16).

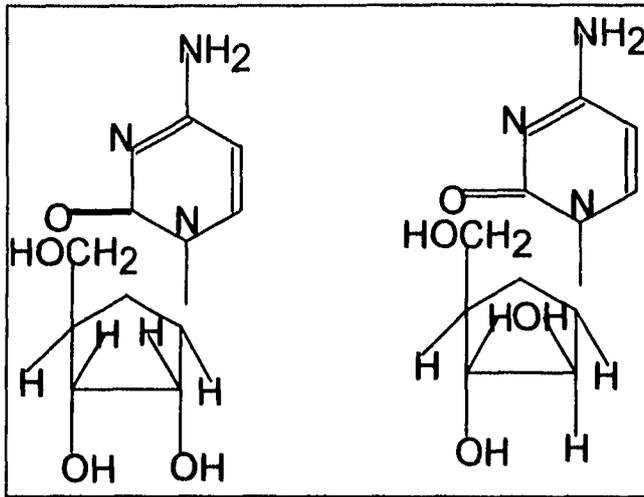


FIG 1.3 Estructura química de la citosina (a) y su análogo ARA-C (b)

El arabinosido de citosina penetra a la célula por difusión facilitada. Parte de su actividad biológica se encuentra asociada a la conversión del ARA-C a el metabolito activo el cual debe ser fosforilado por la enzima "deoxicitidina cinasa" citoplasmática. El compuesto se fosforila a ARA -CTP utilizando ATP como grupo donador de fosfatos (17). La primera etapa en el metabolismo del compuesto, es limitante para la asimilación del fármaco. Esta inicia a través de la enzima deoxicitidina cinasa que se eleva en la mitad de la fase "S" del ciclo celular y fosforila el ARA-CMP a ARA-CDP (18). Finalmente una CDP deoxicitidina cinasa que fosforila el ARA-CDP a ARA-CTP que es el metabolito que se incorpora en la síntesis de DNA.

TABLA 1.6 REACCIONES DE FOSFORILACION DEL ARA-C PARA SU INCORPORACION AL DNA

ARA-C \Rightarrow ARA-CMP \Rightarrow ARA-CDP \Rightarrow ARA-CTP \Rightarrow Incorporación en el DNA

La resistencia que presenta la célula se debe a la baja eficiencia de incorporación de ARA-C dentro de la poza nucleotídica, como resultado de una baja proporción de

fosforilación y no debido a un transporte lento como se pensaba (19). El catabolismo del dCTP lo realiza la enzima deoxitidina desaminasa. Los niveles de la enzima varían entre las células normales y las tumorales ya que subpoblaciones de células de roedores (20) resistentes al ARA-C, se ha encontrado disminuida la actividad de la deoxicitidina cinasa. Por lo anterior se piensa que la baja actividad de la deoxicitidina desaminasa es la causa principal de la resistencia a fármacos en células tumorales de roedores (20). La inhibición del transporte del ARA-C ha sido encontrado como otro mecanismo para presentar resistencia (17). Se ha reportado, como una variante del mecanismo de resistencia a este fármaco, incrementos de los niveles de deaminasa y reducción de la afinidad de ARA-CTP por la DNA polimerasa (21). En resumen el mecanismo de resistencia al arabinósido de citosina encontrado en modelos murinos (22) y humanos, postula que se debe a: 1) Una disminución del transporte de ARA-C, 2) Disminución de la formación y retención ARA-C trifosfato, 3) Disminución de la incorporación del ARA-C dentro del DNA y aumento de la actividad de la enzima deaminasa citidina. Los efectos del ARA-C en células tumorales tanto *in vivo* como *in vitro*

son: citotoxicidad en la fase S y por lo tanto inhibición de la síntesis del DNA.

1.3.5 MECANISMO DE ACCION DE LA VINCRISTINA

Los alcaloides de la vinca son derivados de la planta llamada *Catharanthus roseus*, estructuralmente son compuestos derivados del indol.

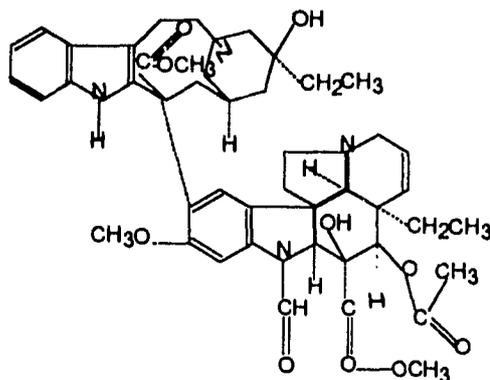


Figura 1.4 Estructura química de la vincristina

Son potentes inhibidores de proliferación celular, la actividad antiproliferativa de los alcaloides de la vinca se ha atribuido en gran parte a la inhibición de la mitosis como resultado de la despolimerización de los microtúbulos del huso mitótico (23). La interacción del fármaco con la tubulina inhibe la polimerización de esta última durante la formación de los microtúbulos *in vivo* e *in vitro* (24). El efecto más notorio es el aumento de microtúbulos astrales en comparación con la célula normal.

También se ha reportado que los derivados de la vinca no causan inhibición de la polimerización de tubulina de otras proteínas fibrosas. Por lo tanto la estructura celular más afectada es el huso mitótico. El uso mitótico es una de las estructuras muy importantes para que se lleve a cabo la división celular. La inhibición de la mitosis es un proceso reversible para muchos agentes antimitóticos, no obstante se presentan diversas aberraciones durante las subsecuentes divisiones celulares. Entre otros derivados de la vinca se encuentran, la vincristina, vinblastina, vinleurosina, vinrosidina, y rovidina (25). El uso de estos fármacos es básicamente en el tratamiento de ciertos cánceres como: leucemias agudas, sarcomas y enfermedad de Hodgkin (26).

2.MECANISMO DE RESISTENCIA A FARMACOS

2.1 GLUCOPROTEINA GP-170

La resistencia de células tumorales a fármacos citotóxicos es considerada una de las causas más comunes por las cuales la quimioterapia antineoplásica no tiene el éxito deseado. Se han buscado mecanismos que expliquen el fenómeno de la resistencia (27). Una de las teorías más aceptadas es aquella que postula que la resistencia se encuentra frecuentemente asociada a la sobreexpresión de la glucoproteína de membrana de 170 kDa de masa molecular. Esta proteína semeja una bomba de flujo que permite que el fármaco antitumoral salga hacia afuera de la célula.

También se sabe que muchos de los fármacos asociados al fenotipo de resistencia, son compuestos anfipáticos de alta masa molecular. Por otra parte se ha encontrado resistencia cruzada aún cuando no existe similitud estructural o funcional entre los diversos fármacos empleados (28). En células resistentes la reducción de la acumulación del fármaco se asocia con el fenotipo de multirresistencia. Los últimos descubrimientos

demuestran que la concentración del fármaco es mayor en células sensibles, es decir en células sensibles, ya que se ha comprobado que en las células resistentes, la acumulación del fármaco es inversamente proporcional al grado de resistencia (29).

2.1.1 MECANISMOS DE ACCION DE LA GP-170.-Se han propuesto algunos mecanismos acerca del funcionamiento de la glucoproteína de membrana GP-170.

Fundamentalmente se piensa que depende de energía, algunas teorías al respecto son:

a) Se ha observado que cuando el fármaco entra en las células es expulsado por una bomba dependiente de energía, cuya actividad se ve aumentada en células resistentes (30).

b) Existe una barrera permeable dependiente de energía que controla la entrada del fármaco dentro de la célula (30) y opera con gran eficacia en células resistentes.

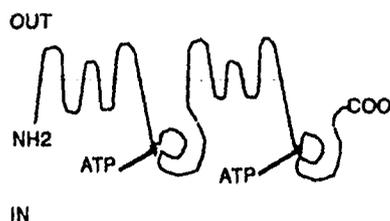


FIG. 2.2 Estructura de la GP-170

Gros y col. para comprobar la dependencia de energía (31) emplearon células crecidas en un medio de cultivo deficiente en glucosa y en presencia de inhibidores de la fosforilación oxidativa. Los resultados demostraron que se presenta un incremento de los niveles del fármaco dentro de las células resistentes. De esta forma la salida del fármaco aumenta en la medida que existe ATP presente en el medio. Con respecto a la estructura de esta proteína se piensa que forma un canal dentro de la membrana citoplasmática que depende de energía para la expulsión del fármaco. Con base al análisis de secuencia se postula que existen dos dominios alfa-helicoidales transmembranales, además de dos sitios extramembranales de unión a ATP y un sitio de glucosilación (31).

2.2 REVERSION DE LA RESISTENCIA.-Existen diversos compuestos que tienen la capacidad de revertir la resistencia a fármacos e incrementan la acumulación del fármaco dentro de la célula. Este tipo de fármacos no presentan efectos tóxicos y se pueden coadministrar con los fármacos antitumorales. También son capaces de inhibir los canales de calcio (32).

Entre estos compuestos se encuentran:

1)La N-acetildaunorubicina (33) es un análogo estructural de la daunorubicina, es un fármaco no tóxico, que permite la acumulación de daunorubicina en tumores ascíticos de Ehrlich .

2) Los bloqueadores de los canales de calcio permiten que la acumulación del fármaco, tal es el caso del verapamilo. El efecto de reversión a través de este mecanismo se ha reportado en células p388 resistentes a vincristina y a vinblastina (34).

3) Los inhibidores de calmodulina facilitan el incremento en la acumulación del fármaco (por ejemplo la trifluoperazina). Un caso específico de este fármaco fue demostrado en la sublínea p388 resistente a vincristina y a adriamicina (34).

2.3 EXPRESION DE LA GP-170 EN TEJIDOS NO TUMORALES. La expresión de la GP-170 se analizó en diversos tejidos tumorales, humanos y murinos. El empleo de anticuerpos monoclonales entre los cuales se destacan el C-219 (35) específico contra la proteína de membrana de 170 kDa, ha permitido evidenciar la expresión normal de esta proteína. Se ha encontrado la expresión de la GP-170 en tejidos murinos mediante el uso del anticuerpo MRK16 (36) y en otros órganos tales como hígado, páncreas, riñón, yeyuno y glándulas adrenales. Estos descubrimientos indican que la GP-170 es expresada en altos niveles en tejidos no neoplásicos, lo cual sugiere que posee un papel fisiológico en procesos secretorios (37).

2.4 CAMBIOS BIOQUIMICOS ASOCIADOS AL FENOTIPO DE MULTIRRESISTENCIA A FARMACOS. Se han asociado cambios a nivel bioquímico con respecto al fenotipo de multirresistencia a fármacos, entre los cuales se han encontrado los siguientes:

1)La presencia de una proteína pequeña (38), ácido citosólico (sorcina) cuyo masa molecular oscila entre 19 y 22 kDa. Esta proteína se ha descrito en numerosas líneas

tumorales resistentes. La relación entre la sobreexpresión de la GP-170 y la sorcina en células resistentes se ha manifestado a través de estudios de biología molecular. El gene de la sorcina fue encontrado yuxtapuesto al gene de la GP-170. Esto se ha demostrado tanto en el genoma de hamster como en el humano. La sobreexpresión del gene que codifica para sorcina parece ser el resultado de una coamplificación con el gene que codifica para la GP-170 (38). Sin embargo no es necesaria la sobreproducción de sorcina para el desarrollo del fenotipo de la multirresistencia a fármacos. Por otra parte de la presencia de sorcina en células resistentes indican que la sorcina puede ser un importante modulador del fenotipo de resistencia.

2.5 GENETICA DEL FENOTIPO MDR.- La GP-170 es codificada por una familia de genes conservados en diferentes especies. Se ha visto que cuando se realizan ensayos de tranfección en células sensibles a un determinado fármaco, con el gene que codifica para la GP-170 las células sensibles pueden transformarse en células resistentes y se observa una clara sobreexpresión de la GP-170 (39).

Por otra parte se piensa que el fenotipo **MDR**, está asociado con la amplificación del gene, sugiriendo que la base de este fenotipo se debe a un incremento en la expresión del producto de un gene normal.

Finalmente la resistencia de las células tumorales a fármacos lipofílicos se ha demostrado como resultado de un incremento en la expresión del gene y de la proteína GP-170 kda. El gene **mdr** (multidrug resistance)(40) puede sufrir mutaciones puntuales por lo que algunos autores hayan postulado que a este tipo de mutaciones sean las causantes de las diferentes respuestas a los fármacos (41). La GP-170, como ya se mencionó, es una proteína conservada y probablemente codificada por una familia de genes que a su vez pueden amplificarse en células **MDR** positivas (41).

El gene **mdr** de 4.5 kilobases se expresa a altos niveles en varias células tumorales humanas resistentes, la presencia de este gene se ha localizado en el cromosoma 7. Varios autores han reportado que la expresión de la proteína GP-170 correlaciona con la amplificación del gene **mdr**.

3. GLUTATION SULFHIDRILLO TRANSFERASA

3.1 GENERALIDADES DE LA GSHT

Los agentes químicos que penetran al organismo, pueden ser transformados por una variedad de reacciones químicas, que permiten su conversión a sustancias menos tóxicas. Una de las reacciones que se efectúan en este tipo de procesos es mediante la acción de la enzima glutatión sulfhidrilo transferasa (GSHT) (42). Su papel principal en los organismos es la detoxificación mediante la transformación de compuestos químicos complejos fácilmente degradables vía la ruta del ácido mercaptúrico, lo cual facilita su eliminación en orina o bilis. La enzima GSHT es una enzima que lleva a cabo la conjugación de un compuesto nucleofílico (GHS) con un compuesto electrofílico de tal forma que el xenobiótico (un fármaco antineoplásico u otro compuesto tóxico) sea eliminado (43).

3.1.1 ISOENZIMAS DE LA GSHT.- Existen tres isoformas dentro de la familia GSHT, que son α , μ , y π .

La enzima glutatión sulfhidrilo α ha sido localizada en el cromosoma 6p12 (44) y se observó que esta isoenzima se sobreexpresa en células que son resistentes a las mostasas nitrogenadas (45). Las mostasas nitrogenadas son capaces de formar aductos con el glutatión (46). La formación de aductos con GSH (glutatión) es una etapa crítica en la conversión del fármaco a un producto de excreción más fácilmente eliminable (mercapturato) (46). La isoenzima μ ha sido localizada en el cromosoma 1p31 (47), se piensa que juega un papel importante en el proceso de desnitrosación (47). Además se ha encontrado en células resistentes a nitrosoureas. Por último la isoenzima π , se ha localizado en el cromosoma 11q13 (48), la GST π fue identificada en placenta humana (49), sin embargo ahora se ha encontrado en otros tejidos tanto normales como cancerosos (50).

3.1.2 EXPRESIÓN DE LA GSHT π EN TEJIDOS NO TUMORALES (51): Con baja expresión: músculo esquelético, colon, cérvix, hepatocitos y páncreas. Expresión media: nervios periféricos, piel, glándulas sebáceas, epitelio de mama, bazo, estómago, riñón (glomérulo, tubulos proximal y distal), tiroides, placenta, ductos biliares de hígado,

ovario, esófago, endometrio, timo, nodulos linfáticos, duodeno, pulmón. **Alta expresión:** Páncreas (exocrino) y epitelio prostático. La presencia de GST π en tumores humanos ha sugerido que esta enzima puede actuar como un marcador tumoral, puesto que se ha encontrado sobreexpresión de la isoenzima π en células resistentes a fármacos. Una de las razones por las que esta enzima se ve incrementada, es debido a una respuesta celular al estrés. En este caso debido a la presencia del fármaco antitumoral, la GST π puede entonces representar a una proteína inducida por estrés de forma análoga a la inducción de las proteínas de choque térmico ("heat shock"). Esto significa que la enzima tiene una función protectora generalizada contra el daño oxidativo. La regulación de los genes de la enzima GST π ocurre a través de la inducción de la proteína en presencia de un agente tóxico. Como ya se mencionó existe una serie de reacciones como parte del mecanismo que permite la detoxificación, el cual es iniciado por la GSHT para finalmente obtener el ácido mercaptúrico producto final del proceso de detoxificación.

TABLA 3.1 REACCIONES DE DESTOXIFICACION DE LA GSHT VIA LA RUTA DEL ACIDO MERCAPTURICO Boyland y col (42.)

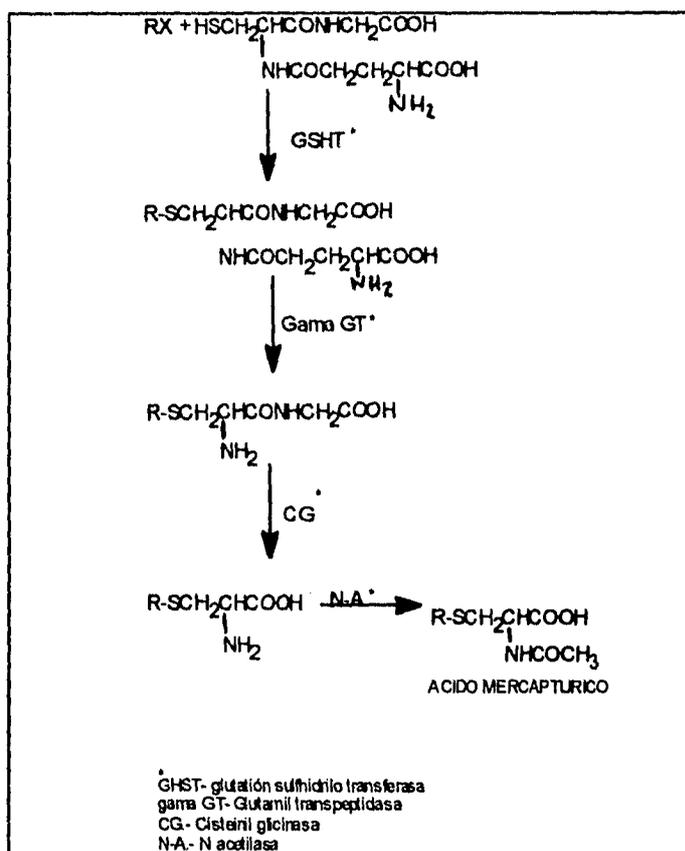


FIG. 3.1 Vía del ácido mercaptúrico

3.1.3 CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS DE LA ENZIMA GLUTATION SULFIDRILOTRANSFERASA

Aproximadamente 10 % de la proteína total soluble de hígado de rata y 2 % en hígado humano es GSHT (43). Esta enzima se encuentra en mayor proporción en el citosol .

Se ha reportado que la GSHT de rata y la humana tienen masas moleculares similares aproximadamente de 46,000 kDa. Esta proteína presenta dos subunidades que pueden ser idénticas o de masa molecular aproximada (52). Tienen un punto isoeléctrico cercano a 7 y difieren en la composición de algunos aminoácidos. Por otro lado se ha tratado de encontrar una nomenclatura común para nombrar las diferentes isoenzimas. Una de ellas se basa en la pureza de la enzima (después de haber sido extraídas de una columna de elución), siendo denominadas como: a b g d e ; otra de las nomenclaturas propuestas es de acuerdo a sus diferentes puntos isoeléctricos. Hoy en día se han nombrado con letras griegas a las isoenzimas de origen humano: α , μ y π , cuyos puntos isoeléctricos son : a $pI=8.7$, $pI= 6.6$, $pI=4.8$ respectivamente.

Con respecto al mecanismo de acción de la enzima se propone que no requiere la formación inicial de un intermediario que involucre ATP. Solamente se necesita de ATP para la formación del glutatión y la acetilación del conjugado de cisteína. La enzima puede activar al (GSH) por conjugación con algún compuesto electrofílico, por lo cual ambos sustratos se unen específicamente a la GSHT, puede presentarse una reacción no enzimática de los sustratos empleados (GSH y CDNB), por lo cual debe considerarse en su determinación. .

3.1.4 DISTRIBUCION DE LA GSHT EN DIVERSOS TEJIDOS.-La distribución de la enzima en los diferentes tejidos está basada en la capacidad del tejido para metabolizar compuestos extraños, particularmente si el tejido es el sitio de entrada o salida de compuestos tóxicos, tal es el caso del pulmón, hígado, piel, tracto gastrointestinal y riñón. La mayor ruta de entrada de muchos compuestos carcinogénicos dentro de el cuerpo es posible a través del tracto gastrointestinal. Por lo anterior es importante que exista un mecanismo de detoxificación que evite que el organismo sea dañado. La actividad de la GSHT se presenta generalmente en mayor cantidad en tejido hepático (50) que en

tejido extrahepático.

3.1.6 DISTRIBUCION DE LA GSHT EN DIFERENTES ESPECIES- Esta enzima no es exclusiva de la especie humana debido a su papel tan importante durante el proceso de detoxificación de agentes extraños. Algunas de las especies donde se ha encontrado esta enzima son las siguientes: rata, perro, cuyo, ratón, conejo, hamster, humano adulto, feto humano (53). En cuanto a la maduración de la enzima en el organismo, se sabe que en hígado de rata se incrementan lentamente los niveles a partir de un período postnatal de nueve semanas.

3.1.6 TECNICAS PARA LA MEDICION DE LA ACTIVIDAD DE LA GSHT

Para medir la actividad GHST, se han probado diversos métodos basados en la cuantificación del sustrato reaccionante o bien del producto formado. Algunos de los métodos utilizados han sido: espectrofotométricos o bien con técnicas radioisotópicas. La técnica espectrofotométrica que ha sido usada en los estudios de Al-Kassab (54), determina nitritos producidos en la reacción de conjugación, por otro lado los estudios espectrofotométricos referidos por Jakoby y col. (56), se basan en cambios de la absorbencia a una longitud de onda específica, cuando el sustrato electrofílico reacciona con el glutatión. Los estudios que han utilizado radioisótopos, han sido descritos por Nemoto (55), en este ensayo el sustrato electrofílico puede ser radiomarcado.. Hoy en día se utiliza el 2,4-cloro dinitro benzeno y algunos derivados como el 2-dicloro dinitro benzeno como segundo sustrato para medir la actividad de la enzima a 340 nm de longitud de onda.

MATERIALES Y METODOS

4.1 COMPOSICION DEL MEDIO DE CULTIVO

Medio RPMI 1640	GIBCO
Suero fetal bovino	HYCLONE
Piruvato de sodio	SIGMA
Aminoácidos no esenciales	SIGMA
Antibiótico-antimicótico	SIGMA
Dextrosa	BAKER
Bicarbonato de sodio	BAKER
Acido clorhídrico	BAKER

4.2 EXPOSICION DE CELULAS A FARMACOS ANTINEOPLASICOS Y MARCAJE RADIATIVO

Vincristina (Oncovin)	ELI-LILLY
Arabinósido de citosina (Citarabina)	ALEXAN
Sal de bromuro de tetrazolio(MTT)	SIGMA
Azul tripano	SIGMA
Dimetil Sulfóxido (DMSO)	SIGMA
PPO (2,5 difeniloxasol)	SIGMA
POPOP((1,4 BIS [5-fenil-2oxazolil] benzeno; SIGMA 2,2'-p-fenilen bis [5-feniloxazol])	SIGMA
Placas de rayos X	KODAK
Fijador de placas de rayos X	KODAK
Revelador de placas de rayos X	KODAK
Metionina S ³⁵	AMERSHAM

4.3 ELABORACION DE GELES PAGE-SDS

Acrilamida	SIGMA
Bisacrilamida	SIGMA

NP-40	SIGMA
Urea	BIORAD
Persulfato de amonio	BAKER
Temed	BAKER
Anfolinas pH=5-7	BIORAD
pH=3-10	
Lauril sulfato de sodio (SDS)	SIGMA
β Mercapto etanol	SIGMA
Tris-clorhídrico	SIGMA
Trisma-Base	SIGMA
RNAsa pancreática	SIGMA
DNAsa pancreática	SIGMA
Hidróxido de sodio	MERCK
Glicerol	MERCK
Agarosa	MERCK
Glicina	MALLINCKROD
Azul de bromofenol	SIGMA
Azul de Coomasie R-250	SIGMA
Alcohol isopropílico	SIGMA
Marcadores de alto y baja masa molecular	BIORAD
4.4 TINCION CON PLATA	
Nitrato de plata	SIGMA
Permanganato de potasio	SIGMA
Etanol	MALLINCKRODT
Carbonato de sodio	BAKER
Formaldehído	SIGMA
Ac. acético glacial	BAKER
Metanol Absoluto	MALLINCKRODT

4.6 CUANTIFICACION DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA DE LA GSHT

Ditioneitol (DTT)	SIGMA
Cloruro de potasio	BAKER
EDTA	MALLINCKRODT
Cloro dinitro benzeno	SIGMA
Glutati3n reducido	SIGMA
Acido tricloroac3tico	SIGMA

4.6 MEDICION DE PROTEINAS (METODO DE BRADFORD)

Alb3mina s3rica bovina	SIGMA
Azul de Coomasie G-250	SIGMA
Acido ortofosf3rico al 85 %	MERCK
Etanol	MALLINCKRODT

5. PREPARACION DE REACTIVOS

5.1 MEDIO DE CULTIVO (1 l)

Medio RPMI 1640 adicionado con glutamina

2.0 g de bicarbonato

2.5 g de dextrosa

5.1.2 Composici3n del medio de cultivo RPMI 1640

SALES INORGANICAS	CANTIDAD
	mg/L
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	100
KCl	400
MgSO ₄	48.84
NaCl	6000
Na ₂ HPO ₄ (anhidro)	800
OTROS COMPONENTES	
D-glucosa	2000
Glutati3n (reducido)	1.0
Rojo de fenol	5.0

AMINOACIDOS

L-Arginina	200
L-Asparagina	50
L-Acido aspártico	20.0
L-Cistina.2HCl	65.15
L-Acido glutámico	20.0
L-Glutamina	300
Glicina	10
L-Histidina	15
L-Hidroxiprolina	20
L-Isoleucina	50
L-Leucina	50
L-Lisina.HCl	40
L-Fenilalanina	15
L-Prolina	15
L-Serina	20
L-Treonina	30
L-Triptofano	30
L-Tirosina.2Na.2H ₂ O	28.83
L-Valina	20

VITAMINAS

Biotina	0.20
D-Ca Pantotenato	0.25
Cloruro de colina	3.0
Acido fólico	1.0
i-Inositol	35
Niacinamida	1.0
Acido para aminobenzóico	1.0
Pirodoxina.HCl	1.0
Riboflavina	0.20

Tiamina.HCl	1.0
Vitamina B ₁₂	0.005

Formulación de GIBCO (430/1800)

6.1.3 SUPLEMENTACION DEL MEDIO DE CULTIVO

Se empleó suero fetal bovino al 10 %, piruvato de sodio al 1% (stock 100 mM), antibiótico antimicótico al 1 % de un stock de 10,000 unidades/ml de penicilina sódica, 10,000 mg/ml de sulfato de esptreptomicina y 25 mg/ml de anfotericina B como fungicida

6.2. PREPARACION DE FARMACOS: Disolver 100 µg de vincristina en 100 ml de agua destilada estéril, para tener una concentración final de 1 ng/µl. El Arabinósido de citosina de una solución stock de 20 mg/ml, se tomaron 5 µl y se llevaron a un volumen final de 100 ml obteniéndose una concentración final de 1 ng/µl.

6.3 VIABILIDAD CELULAR

6.3.1 EXCLUSION DE COLORANTE Azul tripano al 0.04 % en solución salina isotónica (0.85 %).

6.3.2 REDUCCION DE LA SAL DE TETRAZOLIO. Solución de la sal de tetrazolio (MTT) 5 mg/ml (**57**) en solución salina isotónica, DMSO (Dimetil sulfóxido) para la disolución del compuesto colorido (formazán).

6.4 MEDICION DE MARCA RADIOACTIVA

6.4.1 SOLUCION PARA CENTELLEADOR

PPO (2,5 Difeniloxazol) 5 g, POPOP(1,4 BIS [5-fenil-2oxazolil] benzeno; 2,2'-p-fenilen bis [5-feniloxazol]) 0.3 g, disolver en tolueno.

6.4.2 SOLUCION PARA LA PRECIPITACION DE PROTEINAS RADIOACTIVAS

SDS al 10 %

Metionina al 0.01 %

Acido tricloroacético (TCA) al 50 % y al 5%

5.5 ANALISIS DE PROTEINAS

5.5.1 GELES DE POLIACRILAMIDA (LAEMMLI) (58)

BAJO GEL

Buffer Tris 1 M pH= 8.8

SDS 20 %

Acilamida-Bisacilamida (30 %-0.8 %)

Temed 5 %

Persulfato 30 mg /ml

Agua destilada

Buffer Tris pH=6.8

5.5.2 GELES DE POLIACRILAMIDA EN DOS DIMENSIONES (59)

Sol A) Amortiguador de lisis

Urea 9.5 M

NP-40. 2 % (p/v)

Anfolinas 1.6 % pH= 5-7

Anfolinas 0.4 % pH=3-10

BETA-mercaptoetanol 5 %

Agua destilada

Sol. B) Amortiguador de desintegración por ultrasonido

Tris-HCl 0.01 M pH=7.4

MgCl₂ 5 mM

RNasa pancreática 50 mg/ml

Sol.C) DNasa Pancreática

Tris-HCl 0.01 M pH= 7.4

MgCl₂ 1 mM

DNasa Pancreática 1 mg/ml

Agua destilada

Sol. D) Acilamida 30 %

28.38 % Acilamida

1.62 % Bisacilamida

Agua destilada

Sol.E) Solución Nonidet P-40

NP-40- 10 % (p/v) en agua destilada

Sol. F) Anfolinas pH= 5-7, pH= 3-10.

Soluciones al 40 % (p/v)

Sol. G) Persulfato de amonio al 10 % en agua destilada

Sol. I) Soluciones electrodo

Sol. Anodo H_3PO_4 0.01 M

Sol. Cátodo NaOH 0.02 M

Agua destilada

Sol. K)

Urea 9 M

Anfolinas 1 %

0.8 % rango de pH 5-7

0.2 % rango de pH 3-10

Sol. L)

Trisma Base 1.5 M

SDS 0.4 %

pH 8.8

Sol M)

Tris-HCl 0.5 M

SDS 0.4 %

pH 6.8

Sol.N)

Acilamida 30 %

Acilamida 29.2 %

Bis Acilamida 0.8 %

0) BUFFER MUESTRA -SDS

Glicerol 10 % (p/v)

beta mercapto etanol 5 % (v/v)

SDS 2.3 % (p/v)

Tris-HCl 0.0625 M

pH 6.8

P) GEL DE AGAROSA AL 1 %

Disolver 1 g de agarosa en 100 ml de buffer muestra-SDS (0)

Q) BUFFER DE CORRIDA I

Trisma-base 0.025 M

Glicina 0.192 M

SDS 0.1 %

pH 8

R) BUFFER DE CORRIDA II

(Alta concentración de SDS)

Trisma-base 0.025 M

Glicina 0.192 M

SDS 2 %

S) AZUL DE BROMOFENOL

Azul de bromofenol al 1 %

5.5.3 MARCADORES DE MASA MOLECULAR (ALTA MASA MOLECULAR)

Proteína	masa molecular
	kDa
Anhidrasa Carbónica	29,000
Ovoalbúmina de huevo	45,000
Albúmina Bovina	66,000
Fosforilasa B	97,400
β -Galactosidasa	116,000
Miosina	205,000

MARCADORES DE BAJA MASA MOLECULAR

Proteína	masa molecular
	kDa
Lisozima	14,300

β -Galactoglobulina	18,400
Tripsinógeno (Páncreas de Bovino)	24,000
Pepsina (mucosa estomacal de porcino)	34,700
Albúmina de huevo	45,000
Albúmina (plasma de bovino)	66,000

5.5.4 SOLUCION PARA TINCION DE GELES (AZUL DE COOMASIE)

Solución Colorante

Metanol	500 ml
Acido acético glacial	100 ml
Azul de Coomasie	2.75 g
Agua destilada	cbp 1 L

Solución decolorante

etanol	500 ml
ácido acético glacial	150 ml
agua destilada	cbp 2 L.

5.5.5 SOLUCION PARA TINCION DE GELES (PLATA)

I Solución fijadora

Metanol	50 %
ácido acético glacial	5 %
cloruro cúprico	2 %
agua desionizada	

II Solución de etanol-Acido acético

etanol	10 %
ácido acético	5 %
agua desionizada	

III Solución de Permanganato de potasio

Permanganato de potasio	0.001 %
agua desionizada	

IV Solución de etanol

Etanol 10 %

Agua destilada

V Solución de nitrato de plata

Nitrato de plata 0.1 %

Agua desionizada

VI Solución reveladora

Carbonato de sodio 8 %

formaldehído 0.02 %

5.5.6 DETERMINACION DE PROTEINA (Técnica de Bradford) (60)

100 mg de azul de Coomasie G-250

100 ml de H_3PO_4 al 85 % de pureza

50 ml de etanol 100 %

para 1 L de solución.

Preparación de albúmina sérica bovina

1 mg/ml de albúmina sérica bovina en solución salina isotónica.

5.7 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GLUTATION SULFHIDILO TRANSFERASA (GSHT) (56)

5.7.1 BUFFER PARA LA DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GSHT

KCl 154 mM

Ditiotrietol 5 mM

EDTA 4 mM

Tris-HCl 40 mM pH 7.4

5.7.2 SUSTRATOS PARA LA CONJUGACION DE LA GSHT

Cloro dinitro benzeno (CDNB) 10mM

disolver en Etanol Absoluto.

Glutación (reducido GSH) 10mM

disolver en buffer de fosfatos (K_2HPO_4/KH_2PO_4) pH 6.5

5.7.3 SOLUCION PARA DETENER LA REACCION ENZIMATICA

Tricloro acético (TCA) 22 %

disolver en agua destilada

6. PROCEDIMIENTOS EXPERIMENTALES

6.1.1 PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LA EXPANSION DE LAS CELULAS TUMORALES

La línea tumoral K-562 (Eritroleucemia linfocítica crónica)

se cultiva en medio RPMI 1640 con glutamina adicionado con bicarbonato y dextrosa. Antes de suplementar es necesario ajustar el pH entre 7 y 7.4 unidades. Si el medio se almacena en refrigeración por un tiempo prolongado se puede alcalinizar, por lo cual se debe disminuir el pH a 6.8. De esta forma el pH del medio permanece cerca de la neutralidad en el momento de su uso.

La línea celular empleada se encuentra tipificada genotípica y fenotípicamente por la American Type Culture Collection (ATCC).

6.1.2 SUPLEMENTACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL CRECIMIENTO CELULAR

El medio de cultivo RPMI 1640 se suplementa con 10 % de suero fetal bovino, 1% de aminoácidos esenciales, 1% de piruvato de sodio 100 mM, 1 % de antibiótico-antimicótico (10,000 unidades/ml de penicilina sódica G, 10,000 mg/ml de sulfato de estreptomycin, 25 mg/ml de anfotericina B como fungicida).

Después de suplementar el medio de cultivo se somete a prueba de esterilidad en las condiciones ya mencionadas.

6.1.3 PREPARACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA LOS EXPERIMENTOS DE MARCAJE DE PROTEINAS CON METIONINA RADIATIVA (S ³⁵)

El medio de cultivo utilizado se prepara de acuerdo a la formulación de GIBCO, pero libre de metionina (ver materiales y métodos). Se esteriliza por filtración. Su esterilidad se verifica, incubando a 37°C durante 5 días para comprobar que no exista contaminación bacteriana, ni micótica.

6.1.4 SUPLEMENTACION DEL MEDIO DE CULTIVO PARA EL MARCAJE DE PROTEINAS CON METIONINA RADIOACTIVA (S³⁵)

El suero fetal bovino se dializó durante 4 a 6 horas en solución salina isotónica (0.85%) a través de una bolsa de diálisis con un poro que selecciona moléculas entre 12,000 y 14,000 kDa. El objeto de dializar el suero, fue para facilitar la incorporación de la metionina radioactiva.

6.1.5 CULTIVO DE LAS CELULAS K-562

Para el cultivo de las células se emplean cajas petri estériles de 60 mm de diámetro conteniendo 5 ml del medio de cultivo RPMI- 1640. Se sembraron inóculos de 300,000 o 1 millón de células para obtener confluencia celular en poco tiempo. El cultivo se incubaba a 37°C, 5 % CO₂ y 95 % de humedad durante dos a cinco días de acuerdo al inóculo empleado.

6.2 DETERMINACION DE LA VIABILIDAD

Las células se cuantificaron empleando dos técnicas:

6.2.1 EXCLUSION DE COLORANTE. Esta técnica emplea el azul tripano. El azul tripano es un colorante vital que tiñe células muertas y células dañadas a nivel de membrana. Para medir la viabilidad celular, se tomó aproximadamente 1 µl de la suspensión celular y se resuspendió cuidadosamente, de tal manera que no se dañaran las células al momento de homogenizarlas. Se tomó una alícuota y se diluyó con 1 gota del colorante azul tripano. Se dejó 1 minuto a temperatura ambiente para permitir que el colorante penetre dentro de las células, se tomó una muestra y se colocó en un portaobjetos determinando rápidamente el porcentaje de viabilidad. Posteriormente si la viabilidad se encontraba entre el 100 y el 85 %, se contaron el número de células en una cámara de Neubauer. La cuenta de las células se realizó en los cuadrantes donde se cuentan leucocitos. Se calcula el porcentaje de viabilidad y para obtener el número total de células se realiza el siguiente cálculo:

NUMERO DE CELULAS = N DE LAS CELULAS EN LOS CUATRO CUADRANTES x EL VOLUMEN DE LA ALICUOTA x EL FACTOR DE DILUCION x EL VOL DE LA CAMARA (10,000).

N = PROMEDIO

6.2.2 REDUCCION DE LA SAL DE TETRAZOLIO (MTT) El contenido de cada pozo de las placas de cultivo se resuspendió con cuidado y se colocó en copillas para determinar la viabilidad. Una muestra de 1 ml de células, se centrifugó a 3000 rpm durante 4 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 200 µl de medio de cultivo RPMI 1640, se adicionaron 20 µl de una solución de 5 mg/ml de MTT (57). Finalmente se incubó durante 4 horas en una atmósfera de CO₂, 95% de humedad a 37°C. Posteriormente al tiempo de incubación se centrifugó la copilla a 5000 rpm durante 5 minutos, se aspiró el sobrenadante mediante vacío y la pastilla se disolvió con 500 µl de DMSO (61). Las muestras se leyeron a 540 nm.

$$\frac{\text{ABSORBENCIA. TIEMPO (1) x 100}}{\text{ABSORBENCIA. CONTROL T1}} = \text{NUMERO DE CELULAS}$$

6.3 CURSOS TEMPORALES DE LA CITOTOXICIDAD EN PRESENCIA DE LOS FARMACOS ANTINEOPLASICOS

Las células en fase exponencial fueron expuestas a los fármacos antitumorales vincristina y arabinósido de citosina.

6.3.1 Preparación de los fármacos

Las soluciones de los fármacos antitumorales de concentración 1 ng/µl, se filtraron en condiciones de esterilidad para posteriormente ser empleadas. Su preparación es recomendable en el momento de su uso debido a que el fármaco en solución es inestable.

6.3.2 Exposición de la línea K-562 a los fármacos antitumorales.

Se tomó una muestra de 1 x 10⁴ células en fase exponencial, se colocaron en cada uno de los 24 pozos de una placa de cultivo. Se adicionaron a cada pozo 2.5 ng/ml, 10 ng/ml y 30 ng/ml de cada uno de los fármacos. La suspensión se incubó durante los siguientes tiempos 12, 20, 30, 44 y 53 horas. Al cabo de esos tiempos se tomó una gota de la suspensión celular para determinar viabilidad. La determinación se realizó por triplicado.

6.3.3 ANALISIS MORFOLOGICO

Las células que fueron expuestas a las diferentes concentraciones de los fármacos antineoplásicos y a los diferentes tiempos se observaron al microscopio a fin de detectar cambios morfológicos en presencia de los fármacos antitumorales.

6.4 ANALISIS DE PROTEINAS POR ELECTROFORESIS EN GELES PAGE-SDS

Posteriormente a la exposición de los fármacos, se efectuó el análisis de proteínas, únicamente a las dosis de 2.5 ng/ml y 10 ng/ml de células. Para ello se tomó el contenido de cada pozo y se determinó la viabilidad por medio de la técnica de la reducción de la sal de bromuro de tetrazolio. Una muestra de 50 µl se designó para el análisis de las proteínas en los diferentes tiempos mediante electroforesis en geles de poliacrilamida uni y bidimensionales.

6.4.1 PREPARACION DE LA MUESTRA PARA LOS GELES EN UNA SOLA DIMENSION

El contenido del pozo se colocó en una copilla y se centrifugó a 4000 rpm durante 4 minutos se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó con medio de cultivo RPMI 1640 no suplementado.

Esto es importante para que la banda de albúmina sérica bovina no aparezca en los geles de poliacrilamida. La pastilla se resuspendió en 50 µl de buffer muestra para proteínas, se mezcló mediante vórtex y fueron conservadas a -70°C hasta el momento de su análisis

6.4.2 MARCAJE DE LAS PROTEINAS CON METIONINA (S^{35}) DE LAS CELULAS K-562 EXPUESTAS A LOS FARMACOS ARA-C Y VIN

Las células se cultivaron hasta obtenerlas en fase exponencial de crecimiento. Se sembraron 1×10^4 células aproximadamente en cada pozo y se adicionaron 2.5 ó 10 ng/ml de cada uno de los fármacos (vincistina y arabinosido de citosina).

En cada experimento se colocó una muestra control (para cada tiempo y para cada dosis). Las células se incubaron a diferentes tiempos 12, 20, 30, 35, 40, 52 Y 63 horas. Posteriormente al tiempo de incubación se adicionaron 15 µCi/ml de metionina S^{35} , incubándose durante 4 horas más, bajo las condiciones del cultivo normal.

Posteriormente se tomó una alícuota de 10 µl de la suspensión celular para determinar

la incorporación S³⁵.

6.4.3 MEDICION DE LA INCORPORACION DE METIONINA S³⁵

Se tomaron 10 µl de la suspensión celular y se recibieron en 500 µl de medio de cultivo suplementado normalmente + 0.1 % de metionina no radiactiva, para diluir la marca. Además se adicionaron 10 µl de SDS al 10%, se agitó en un vortex y se adicionó el contenido a un tubo de ensayo de 13 x 100 agregando 1.5 ml de medio de cultivo normal + 0.01 % de metionina fría. Posteriormente se llevó a ebullición a 100° C durante 5 minutos y se adicionaron 400 µl de TCA al 50% precipitando en hielo durante 30 minutos. El precipitado se filtró mediante un sistema millipore, se lavó el filtrado 3 ó 4 veces con TCA al 5% y una vez con etanol absoluto. Finalmente se secaron los filtros y ya secos se colocaron en un vial para medir la radioactividad agregando 5 ml de solución para centelleo.

6.4.4 ELABORACION DE GELES DE POLIACRILAMIDA

6.4.4.1 AJUSTE DEL NUMERO DE CELULAS PARA EL CORRIMIENTO ELECTROFORETICO. Para efectuar el análisis de proteínas por electroforesis se calculó el número de células por muestra. Esto se llevó a cabo midiendo la viabilidad celular por la técnica del MTT.

ABSORBENCIA DE LAS CELULAS NO EXPUESTAS A FARMACOS
ANTITUMORALES (CONTROL)----- 100 %

ABSORBENCIA DE CELULAS EXPUESTAS A FARMACOS
ANTITUMORALES----- X %

El ajuste se realizó de tal forma de tener la muestra en un volumen final de 10 µl. La absorbencia de las células expuestas al fármaco se relacionaron al 100 % de la manera siguiente:

PORCENTAJE DE CELULAS EXPUESTAS----- 10 µl

100 % DE VIABILIDAD----- X µl

TABLA 6.4 ESQUEMA DE TRABAJO PARA REALIZAR GELES EN UNA SOLA DIMENSION		
CARRIL	MUESTRA	VOLUMEN (μl)
1	Marcadores de baja masa molecular	10
2	Marcadores de alto masa molecular	10
3	Control	10
4	x Muestra problema	x μ l de la muestra problema

6.4.4.2 ELABORACION DE GELES EN UNA DIMENSION

Se utilizan placas de vidrio de 14.5 cm x 16.5 cm lavadas con extran (detergente aniónico) y con etanol al 70 %. A las placas limpias, se les adiciona grasa en los costados y en la base de la placa. Posteriormente se colocan los separadores formando un pequeño rectángulo abierto por la parte superior.

El bajo gel se virtió hasta una altura de aproximadamente de 8.5 cm de la base de la placa a la parte superior. Para la preparación de la solución de acrilamida, se mezcló en un vaso de precipitado 11.25 ml de TRIS 1 M a pH=8.8 + 150 μ l de SDS al 20 % + 12 ml de acrilamida-bisacrilamida + 150 μ l de Temed al 5 % + 300 μ l de persulfato de amonio al 10 % + 6.15 ml de agua destilada. En la parte superior del bajo gel se adicionaron 150 μ l de alcohol isopropilico con el objeto de mantener la superficie del bajo gel pareja. Se dejó gelificar por una hora. Posteriormente se lavó con agua destilada para eliminar el alcohol y se secó con un pedazo de papel filtro cuidando de no deteriorar la superficie del gel.

Sobre gel: En un vaso de precipitado de 150 ml se adicionaron 1.25 ml de TRIS pH=6.8 + 50 μ l de SDS al 20 % + 2 ml de acrilamida-biacrilamida + 50 μ l de Temed. Se colocó

el peine con cuidado de no introducir burbujas de aire para evitar que se deterioren las bolsas, en las cuales se colocó la muestra. El tiempo de polimerización es de 45 min aproximadamente. Después que el gel concentrador gelifica se retiraron las pinzas que sujetaban la placa y se colocaron en la cámara de electroforesis, se adicionó el buffer de corrida de Laemmli (58) y se verificó que no hubiera fugas entre la cámara superior e inferior. El peine es retirado de tal manera de no deformar las bolsas. La bolsa inicial y final de preferencia no son utilizadas por que existe la posibilidad de artificios en las orillas. La segunda bolsa se designa para los marcadores de masa molecular y en las bolsas restantes se colocan las muestras que correspondan a las células tratadas. Finalmente se retiran las burbujas de la parte de la cámara de abajo para permitir un buen contacto del mal gel con el buffer.

6.4.4.3 ELABORACION DE GELES EN DOS DIMENSIONES.(ISOELECTROENFOQUE)

PRIMERA DIMENSION.-Es indispensable lavar perfectamente los tubos que se emplean en la preparación de los geles de poli(acrilamida en una dimensión(para ello debe utilizarse mezcla crómica para eliminar cualquier residuo y enjuagar abundantemente). Los tubos limpios y secos se cubren con parafilm en uno de los extremos, posteriormente son llenados con la solución de acrilamida al 30 % (3 cm abajo del extremo).

Para la preparación de acrilamida se pesaron 5.5 g de urea, se colocaron en un vaso de precipitado de 50 ml, se agregaron 1.33 ml de la solución (D), 2 ml de la solución (E), 1.97 ml de agua destilada, 400 µl de anfolinas (pH=5-7) y 100 µl de anfolinas (pH=3-10). Se agitó mecánicamente hasta disolver la urea. Posteriormente se agregaron 10 µl de persulfato de amonio al 10% y 7 µl de Temed concentrado (59). Mediante una jeringa se introdujo la mezcla en los tubos cuidando de no dejar burbujas (puesto que la presencia de burbujas evita que la corrida sea correcta). Se adicionó urea 8 M hasta el borde del tubo y se dejó gelificar de 1 a 2 horas. Después de este tiempo se cambió la solución de urea por buffer de lisis, solución (A) mediante una jeringa (Hamilton). Posteriormente se retira la solución (A) remplazándola por solución (A) nueva. Los tubos fueron colocados con 20 µl de la muestra. A los tubos en la cámara de electroforesis se les adicionó H_3PO_4 0.01 M por la parte inferior, cuidando de no dejar burbujas. Se adicionan 20 µl de solución (A) a cada tubo y se cubre toda la cámara superior con la

solución de NaOH 0.02 M cuidando de no dejar burbujas en la parte superior de los tubos, se coloca la tapa que contiene los electrodos la cual a su vez debe tener las mangueras de agua conectadas para el enfriamiento de la cámara. Finalmente se conecta a la fuente de poder. Es necesario realizar una precorrida para generar el gradiente de pH necesario para la separación de las proteínas.

6.4.4.4 GENERACION DEL GRADIENTE DE pH

- a) 200 volt 15 min.
- b) 300 volt 30 min.
- c) 400 volt 30 min.

Después de la precorrida se vació únicamente la cámara superior mediante succión para ya no mover el carrusel y evitar la formación de burbujas en la parte inferior de los tubos. A continuación se retiró el buffer de lisis con la jeringa Hamilton y se colocó la muestra proveniente de las células expuestas a los fármacos. Cada tubo se cubrió con la solución K. Completándose con 0.02 M de NaOH y llenando nuevamente la cámara superior con la solución electrolito de NaOH 0.02 M.

6.4.4.5 CORRIMIENTO ELECTROFORETICO EN UNA DIMENSION

Se inicia la corrida a 400 volts durante 12 horas y a 800 volts durante 1 hora. Después de haber llevado a cabo la migración electroforética, los tubos se sacaron de la cámara cuidadosamente. Para ello se les administra presión por medio de una jeringa en uno de los extremos permitiendo que el gel de la primera dimensión se deslice del tubo. El gel se marcó por el extremo mediante un pequeño corte diagonal para diferenciar el extremo ácido del básico. Enseguida el gel se recibió en un tubo de ensayo de 16 x 150 mm el cual contiene 5 ml de solución buffer muestra-SDS. El gel ya en el tubo con el buffer muestra se dejó equilibrando a temperatura ambiente durante dos horas. Posteriormente se efectuó la electroforesis en la segunda dimensión (La técnica es exactamente igual que para la realización de un gel en una sola dimensión)

6.4.4.6 ELABORACION DE GELES BIDIMENSIONALES

Se utilizan placas de vidrio de 14.5 cm x 16.5 cm que deben estar perfectamente lavadas con extran (detergente aniónico) y con etanol al 70 %. Se procede de manera similar que

para los geles en una sola dimensión.

El bajo gel se virtió hasta una altura de aproximadamente de 8.5 cm de la base de la placa a la parte superior. Para la preparación de la solución de acrilamida, se mezclaron en un vaso de precipitado 11.25 ml de TRIS 1 M a pH=8.8 + 150 µl de SDS al 20 % + 12 ml de acrilamida-bisacrilamida + 150 µl de temed al 5 % + 300 µl de persulfato de amonio al 10 % + 6.15 ml de agua destilada. En la parte superior del bajo gel se adicionaron 150 µl de alcohol isopropílico para mantener la superficie del bajo gel derecha, dejándose gelificar por una hora. Posteriormente se lavó con agua destilada para eliminar el alcohol y se secó con un pedazo de papel filtro cuidando de no deteriorar la superficie del gel.

Sobre gel: En un vaso de precipitado de 150 ml se adicionaron 1.25 ml de TRIS pH=6.8 + 50 µl de SDS al 20 % + 2 ml de acrilamida-biacrilamida + 50 µl de temed. Se colocó un separador de forma vertical con la finalidad de formar una bolsa para adicionar los marcadores de masa molecular. Después de que gelificó, se colocó con sumo cuidado, el gel que corresponde a la primera dimensión. Se alineó el gel de forma paralela al sobregel con el extremo ácido hacia el lado derecho de la placa de electroforesis. Es importante hacer notar que no debe haber burbujas en el espacio que queda entre el sobre gel y el gel de la primera dimensión, en este caso para que la separación de las proteínas por peso molecular sea la adecuada.

Finalmente se selló con agarosa al 1%, se retiró el separador con cuidado para no deformar la bolsa y se realizó la corrida correspondiente. Después de que la agarosa gelificó, se retiraron las pinzas que sujetaban la placa y se colocó en la cámara de electroforesis. Se adicionó el buffer de corrida I verificando que no existan fugas de la cámara superior a la inferior.

6.4.4.7 CORRIMIENTO ELECTROFORETICO PARA LA SEGUNDA DIMENSION

La corrida se llevó a cabo a 80 volt durante una hora o hasta que la muestra sobrepasó el gel concentrador. Posteriormente se aumentó el voltaje a 120 volt y se dejó migrar hasta un centímetro antes de que terminara el gel. Al finalizar la corrida la fuente se apagó, se retiró la placa y los separadores laterales. Las placas de vidrio se abrieron con ayuda de una espátula cuidando de no romper el gel. El gel se fijó con una solución

colorante de azul de Coomasie. En el caso de la tinción con plata se dejó por lo menos 30 minutos en la solución fijadora (Ver materiales y métodos). En el caso de los geles marcados con azufre radiactivo el gel se secó para posteriormente ponerlo en contacto con una placa radiográfica, dando un lapso de 3 a 4 días para obtener la autoradiografía correspondiente. La cual se reveló para su análisis.

6.4.4.8 CONSERVACION DE LOS GELES DE POLIACRILAMIDA

Una vez terminada la corrida electroforética, el gel se fija durante toda la noche en una solución de metanol-agua al 25 % o bien se conservan en una solución de metanol al 20 % y glicerol al 3 %. Posteriormente el gel se colocó sobre un papel Whatman de 3mm, a su vez se cubrió con papel plástico adherente y se colocó en el secador de geles. Ya seco el gel se puede conservar de forma indefinida.

6.5 DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD DE LA GSHT

6.5.1 DETERMINACION BASAL DE LA ACTIVIDAD DE LA GSHT

Se tomó el contenido de una caja de cultivo de las células en fase exponencial. Posteriormente las células se centrifugaron a 5000 rpm durante 5 min, la pastilla se resuspendió en 1 a 3 ml de buffer (TED). Las células se lisaron por ultrasonido durante 15 minutos en frío, (para evitar que la proteína se degrade por el calentamiento del desintegrador). Fue necesario verificar si la lisis celular se completó, para lo cual se colocó en un portobjetos una gota de la suspensión de lisis que fue analizada al microscopio. Se toma 1 ml de la suspensión y se centrifugó 105 x G durante 1 hora, la fracción citosólica resultante se conservó como fuente de enzima almacenándose a -70°C para evitar la pérdida de actividad .

6.5.2 DETERMINACION DE LAS PROTEINAS EN LA FUENTE DE ENZIMA.

La determinación de proteína en la fuente de enzima se realizó mediante la técnica de Bradford (60)

TUBO	ALBUMINA 1 mg/ml (µl)	BUFFER (µl)	CANTIDAD DE PROTEINA (mg)
1	48	352	4.8
2	96	304	9.6
3	144	256	14.4
4	192	208	19.2
5	240	160	24.0
6	288	122	28.8
7	336	64	33.6
8	384	16	38.4

Para realizar la curva estándar se tomó una alícuota de 40 µl de cada muestra y se adicionaron 2 ml de reactivo de Bradford (60). Al blanco se le adicionaron 40 ml de buffer + 2 ml de reactivo de Bradford. Se incubó a temperatura ambiente durante 2 minutos, y se leyeron las muestras a 595 nm de longitud de onda. Debido a la necesidad de trabajar con una cantidad de proteína que se encuentre en un rango de linealidad adecuada.

TABLA 6.6 CINETICA ENZIMATICA DE LA GSHT. RELACION DE ACTIVIDAD-PROTEINA			
(I) μg de proteína en 900 μl	(II) CDNB 10 mM (μl)	(III) GSH 10 mM (μl)	(4) TCA 22 % (μl)
10	50	50	100
20	50	50	100
30	50	50	100
40	50	50	100
50	50	50	100
Incubar 1 min temp. ambiente Incubar 3 min a temp. ambiente			

Para la cuantificación de la actividad de la GSHT, a que se sabe que existe una reacción no enzimática en el tubo de reacción, se efectuó un control debido a la simple interacción de los sustratos es decir GSH y CDNB producen un aumento en la absorbencia a 345 nm (56), por lo cual la absorbencia del control se restó en cada uno de los problemas.

6.5.3 Determinación de la actividad de la GSHT

Una unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que conjuga 1 μmol de glutatión (GSH) con cloro dinitrobenzeno (CDNB) por minuto a 25 °C. La cantidad de proteína se cuantificó a partir de la gráfica obtenida de la absorción de proteína. El coeficiente de extinción del cloro dinitrobenzeno (CDNB) es de 9.6 mM⁻¹ cm⁻¹ / μmola . A partir de este valor se determinaron las micromolas/ min y finalmente se expresó la actividad enzimática en μg de proteína/ μmola / minuto, de acuerdo a los cálculos siguientes.

- 1) 9.6 mM⁻¹ cm⁻¹ 1 μmola
 x abs. x μmolas
- 2) x μmolas 3 minutos
 y μmolas 1 minuto

7. RESULTADOS

Con el objeto de poder identificar algunas proteínas diferentes a las ya reportadas y relacionadas al mecanismo de la resistencia a fármacos fue necesario optimizar el sistema con el cual se efectuarían los experimentos. Dicha optimización involucra: la estandarización de las condiciones de cultivo celular, determinar el tiempo de incubación de la sal de tetrazolio para la cuantificación de la viabilidad celular, la evaluación de la actividad enzimática de la GHST y las concentraciones a las cuales se obtienen condiciones similares a la resistencia con los fármacos utilizados.

7.1 CURVA DE CRECIMIENTO

Para establecer las diferentes fases del cultivo se determinó la curva de crecimiento en la línea K-562. Esta línea se creció en el medio de cultivo RPMI 1640 en las condiciones ya mencionadas en materiales y métodos. La determinación de la curva de crecimiento se efectuó empleando la técnica del MTT (57) (Reducción de las sales de tetrazolio). Se requirió previamente optimizar la técnica del MTT para lo cual se precisaron los siguientes parámetros:

- a) El tiempo de incubación óptimo para el metabolismo de la sal de MTT por las células K-562.
- b) El disolvente más adecuado para la disolución del formazán.

TIEMPO DE INCUBACION DE LA SAL DE TETRAZOLIO

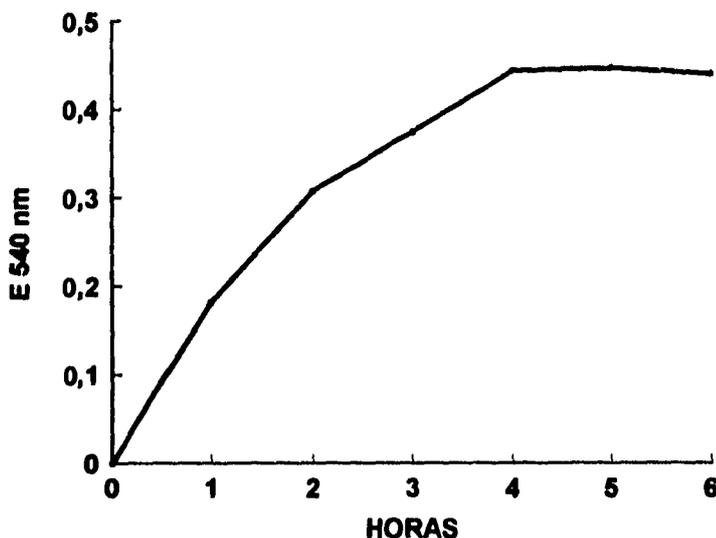


Fig. 7.1 (a) Determinación del tiempo de incubación para la reducción de la sal de tetrazolio (MTT) 5 mg/ml por la línea celular K-562, utilizando un inóculo de 2×10^4 células, a 37°C y en una atmósfera de 5 % de CO₂ y 95 % de humedad.

a) 7.1. Tiempo de incubación

El establecimiento de la técnica del MTT se inició con hepatocitos de rata, en donde encontramos que el tiempo necesario para reducir la sal de tetrazolio fue de 1 hora. Este tiempo era de esperarse puesto que el hepatocito es una de las células metabólicamente más activas. En cada uno de los diferentes tiempos de incubación se tomó 1 ml del contenido del pozo de cultivo y se dejó reaccionar con sal de tetrazolio. El producto colorido obtenido fue disuelto con 500 μ l de DMSO se leyó la absorbancia a 540 nm. Como puede observarse en la figura 7.1, el tiempo en el cual la línea K-562 alcanza un máximo para la reducción de la sal de MTT fue de 4 horas, tiempo en el cual la absorbancia obtenida ya no cambia. Cabe destacar que este tiempo de 4 horas obtenido en el presente trabajo coincide con lo reportado en la literatura por Mosmann (67) en la línea ELG' y por Park (62) en la línea NCI-H54.

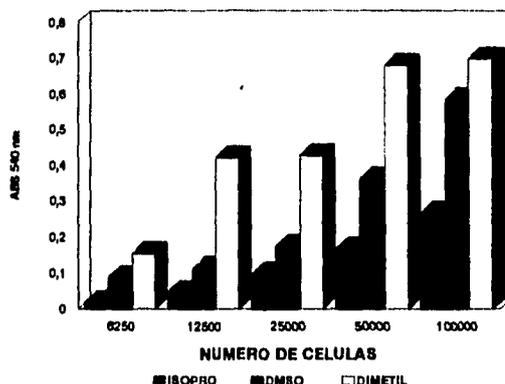


fig. 7.2

Fig. 7.2 Selección del disolvente óptimo del formazán por medio de la técnica del MTT (5µg/µl). La gráfica muestra la absorbancia del formazan, producido por la línea K-562 con diferentes solventes, tales como: isopropanol, DMSO y dimetilformamida.

7.2 b) Selección del disolvente más adecuado para disolver el formazán.

En la figura 7.2 se muestran los resultados obtenidos utilizando diferentes disolventes. Como lo demuestran estos resultados el disolvente más adecuado fue el DMSO, debido a que disuelve en mayor proporción el producto formado (formazán). Se observó que existe una notable diferencia en relación a la intensidad de la coloración con respecto a la cantidad de células, es decir que aún cuando la dimetilformamida tiene mayor capacidad de disolución que el isopropanol, no existe una proporcionalidad en relación al número de células. Por lo anterior, se seleccionó el DMSO por considerarse que era el más adecuado. De los disolventes empleados el compuesto que presenta los valores de absorbancia más pequeños es el isopropanol acidificado esto significa que este disolvente es el menos eficiente. Se ha reportado en la literatura que una de las ventajas del uso de esta técnica es la proporcionalidad que existe entre el número de células y

la intensidad de la coloración, lo cual se observa con DMSO pero no con la dimetilformamida. Aún cuando aparentemente este último disolvente posee más capacidad de disolución, no cumple con la proporcionalidad mencionada. Finalmente con base a estos resultados se decidió utilizar el DMSO como disolvente en todos los experimentos.

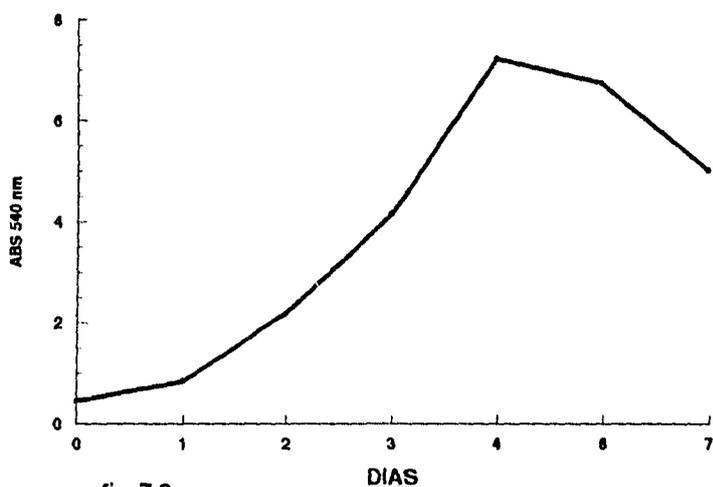


fig. 7.3

Curva de crecimiento de la línea K-562, las células se cultivaron a 37°C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad, durante 7 días partiendo de un inóculo de 2×10^4 , se utilizó DMSO para disolver los cristales de formazan producidos leyendose a 540 nm de longitud de onda.

Determinación de la curva de crecimiento

En la gráfica 7.3 se pueden observar las diferentes fases de crecimiento, encontrándose que la fase exponencial se inicia al segundo y tercer día de crecimiento y la fase estacionaria entre el quinto y sexto día. Una vez determinadas las diferentes fases, se seleccionó la fase exponencial de crecimiento para agregar el fármaco. La fase exponencial es una etapa en que las células cuentan con su maquinaria bioquímica regulada y bien establecida.

7.4 CURSOS TEMPORALES DE LA VIABILIDAD CELULAR EN PRESENCIA DE LOS FARMACOS ANTITUMORALES

Se realizaron cursos temporales de la viabilidad celular en presencia de los fármacos antineoplásicos. En un experimento preliminar se expusieron las células a la vincristina y al arabinosido de citosina a concentraciones de 2.5, 10 y 30 ng/μl. Durante 12, 20, 30, 35, 40, 52, 59 y 63 horas. Posteriormente fueron seleccionadas las concentraciones 2.5 y 10 ng/ml para los subsecuentes experimentos. (fig 7.4)

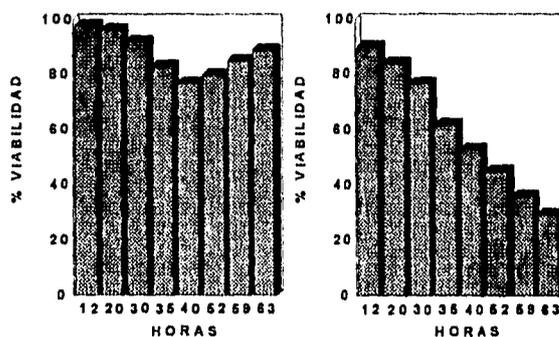


fig. 7.4a

fig. 7.4b

Efecto de la vincristina a 2.5. (7.4a) y 10 ng/μl (7.4b) sobre el crecimiento de la línea celular tumoral K-562. El efecto citotóxico es determinado a través de la disminución de la viabilidad celular.

Efecto citotóxico de la vincristina

Es importante resaltar el comportamiento de la línea tumoral a la dosis de 2.5 ng/μl, puesto que a las 40 horas de exposición tiene una disminución máxima de viabilidad. Sin embargo es interesante notar que a partir de las 52 horas se comienza a recuperar la viabilidad en hasta un 90 %. Estos resultados sugieren que a este tiempo se presentó la resistencia al vincristina. A la concentración de 10 ng/μl se observa una disminución continua de la viabilidad celular en relación al tiempo de exposición, lo cual indica que a esta concentración las células son sensibles al fármaco durante los diferentes tiempos de exposición.

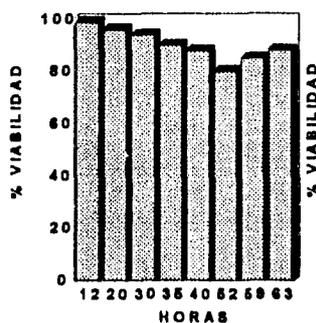


fig. 7.5a

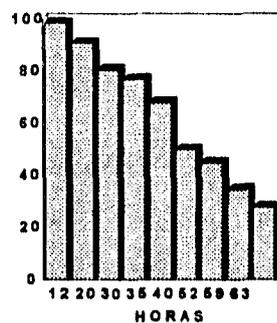


fig. 7.5b

FIGURA 7.5 Efecto del arabinósido de citosina a 2.5 (FIG. 7.5a) y 10 ng/μl (7.5b) sobre el crecimiento de la línea celular tumoral K-562. El efecto citotóxico es medido a través de la disminución de la viabilidad celular mediante la técnica de MTT a los tiempos mostrados.

Efecto citotóxico del arabinósido de citosina

La dosis de 2.5 ng/μl, del arabinósido de citosina promueve un comportamiento similar al que se observó con vincristina, es decir que a las 52 horas de exposición se presenta una disminución máxima de la viabilidad celular. Posteriormente se observa una recuperación a las 59 horas de exposición al fármaco. Esto sugiere que las células a las 60 horas inician un proceso similar a la resistencia. Por el contrario a la dosis de 10 ng/μl la viabilidad disminuyó en relación al tiempo de exposición. El tiempo de recuperación en las células K-562 en presencia del arabinósido de citosina es mayor que con la vincristina. Las observaciones efectuadas a nivel morfológico presentaron claras diferencias: En presencia de vincristina se observa que las células no se dividen completamente. En esta etapa se observaron células de gran tamaño a diferencia de las células expuestas a ARA-C, donde se observaron pocos cambios. Las alteraciones morfológicas demuestran la toxicidad del fármaco en las células tumorales.

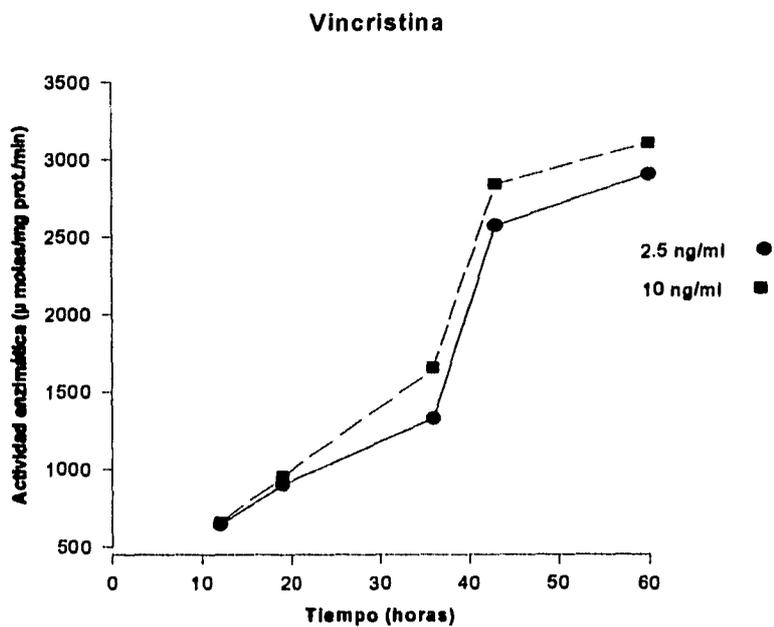
7.6 INDUCCION DE LA GSHT EN LA LINEA K-562 EN PRESENCIA DE LOS FARMACOS

La enzima glutatión sulfhidrilo transferasa es una enzima inducible que participa activamente en los procesos de detoxificación .

Existen diferentes isoenzimas, tales como la GSHT α , μ y π , que están asociadas con la resistencia a diversos fármacos antitumorales; por lo que se ha sugerido que un aumento de la actividad de esta enzima se pueda considerar como un marcador de la resistencia a fármacos. La determinación de la actividad de esta enzima se efectuó espectrofotométricamente y bajo las condiciones ya mencionadas en materiales y métodos. En la tabla 7.6 se presentan los resultados obtenidos en la línea celular K-562 expuesta a los fármacos antitumorales.

TABLA 7.6 ACTIVIDAD DE GSHT EN LA LINEA K-562 EXPUESTA A LOS FARMACOS ANTITUMORALES				
VINCRISTINA ng/ml	* ACTIVIDAD μ molas/ mg de proteína/ min	ARA-C ng/ml	* ACTIVIDAD μ molas/ mg de proteína/ min	T HORA S
Co	0.05970	Co	0.05970	12
2.5	0.06458	2.5	0.06750	
10	0.06579	10	0.06889	
Co	0.06730	Co	0.06610	19
2.5	0.0902	2.5	0.0815	
10	0.09550	10	0.0960	
Co	0.1025	Co	0.1025	36
2.5	0.1328	2.5	0.1302	
10	0.1654	10	0.1805	
Co	0.2290	Co	0.2290	43
2.5	0.2569	2.5	0.2430	
10	0.2838	10	0.2987	
Co	0.2591	Co	0.2591	60
2.5	0.2900	2.5	0.2910	
10	0.3100	10	0.3095	

*Cada resultado representa el promedio de 3 experimentos, en donde cada determinación se efectuó por triplicado. Co=control (células en ausencia de fármaco).



FIGUR

A 7.6 (a) Cinética de la GSHT en presencia de arabinósido de citosina. Se utilizaron como sustratos: GSH Y CDNB. La actividad se reporta en unidades de actividad específica (micromolas/ mg de proteína/ min.)

Arabinósido de citosina

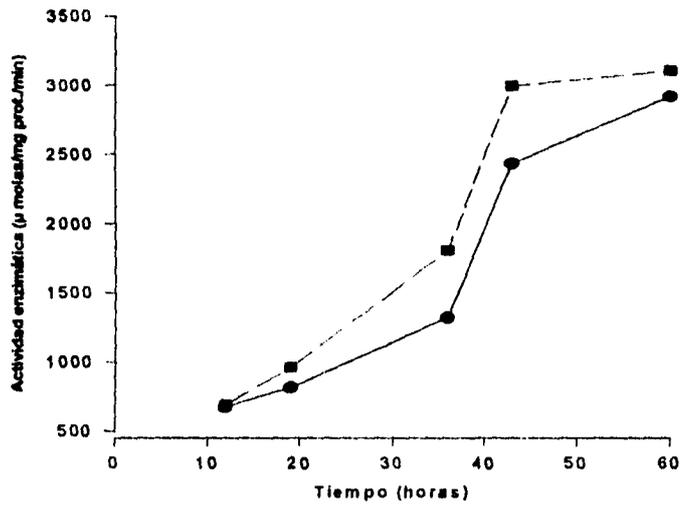


FIGURA 7.6 (b) Cinética de la GSHT en presencia de vincristina. Se utilizaron como sustratos: GSH Y CDNB. La actividad se reporta en unidades de actividad específica (micromolas/ mg de proteína/ min.)

La tabla 7.1 y las figuras 7.6 (a) y (b) muestra los resultados de la inducción de GSHT en las células K-562 expuestas a los fármacos antineoplásicos arabinósido de citosina y vincristina. En presencia de 2.5 ng/μl y 10 ng/μl, se observó un aumento de la actividad de la enzima. Las observaciones se llevaron a cabo a los tiempos 12, 19, 36, 43, y 60 horas. La actividad que aquí se muestra, representa la suma de las actividades de las tres isoenzimas (α , μ y π) que conforman a la GSHT. Por lo anterior no es posible referir cual de las isoformas contribuye en mayor proporción al aumento de la actividad. Es posible inferir a partir de los resultados obtenidos, que la actividad de la GSHT aumenta en relación a las concentraciones de los fármacos empleados y al tiempo de exposición, pero no se encuentran diferencias significativas en la actividad de la enzima en presencia de los fármacos.

El aumento de la actividad de GHST que se observa con respecto a la actividad enzimática y al mecanismo de la resistencia a fármacos, se pudiera deber al papel detoxificante que presenta esta enzima en presencia de un xenobiótico en las células normales. La actividad de GSHT puede presentarse en la célula normal frente a la presencia de un compuesto xenobiótico, como mecanismo de detoxificación. En el presente trabajo se empleó una línea tumoral ya establecida K-562, en la cual la inducción de la actividad de GSHT puede considerarse como un parámetro para la evaluación de la resistencia, en las condiciones establecidas que corresponden al tratamiento con 2.5 ng/μl. De los experimentos de la figura 7.4a y 7.4 b se observa una reversión de la citotoxicidad en presencia de cada uno de los fármacos. Para el caso de la vincristina a la concentración de 2.5 ng/ml reversión fue a partir de las 52 horas y para arabinosido de citosina a 10 ng/ml a partir de las 59 horas. No obstante la concentración de 10 ng/μl presentan una actividad enzimática muy similar a la que se presenta con 2.5 ng/μl solo que en este caso no se observó reversión de la citotoxicidad celular. En relación a la actividad de la GSHT obtenida de acuerdo a los resultados de la tabla 7.6, se observa que existe una concordancia entre el % de viabilidad y las respuesta de las células tratadas con 10 ng/ml de cada uno de los fármacos. Las células K-562 aún cuando no son genéticamente resistentes en presencia de 2.5 ng/μl simulan el fenotipo de resistencia a fármacos. Estos resultados abren la posibilidad de continuar el estudio empleando anticuerpos específicos dirigidos hacia las tres isoformas

de la GSHT de tal manera, que se pueda determinar cual de las isoenzimas contribuye activamente y cual se encuentra más comprometida con el fenómeno de la resistencia.

7.7 ANALISIS DE LAS PROTEINAS POR ELECTROFORESIS UNI Y BIDIMENSIONAL MARCADAS CON S³⁵ EN LA LINEA CELULAR K-562 EXPUESTA A ARA-C Y VIN

Con el objeto de conocer si se presentan cambios en el patrón de expresión de las proteínas de la línea celular tumoral K-562 en presencia de los fármacos, se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida SDS las proteínas marcadas a diferentes tiempos con metionina S³⁵. Geles PAGE-SDS 12% marcados con S³⁵ A,D,G,J=10 ng/ml ARA B,E,H,K=10 ng/ml VIN y C,F,I,L=CONTROL

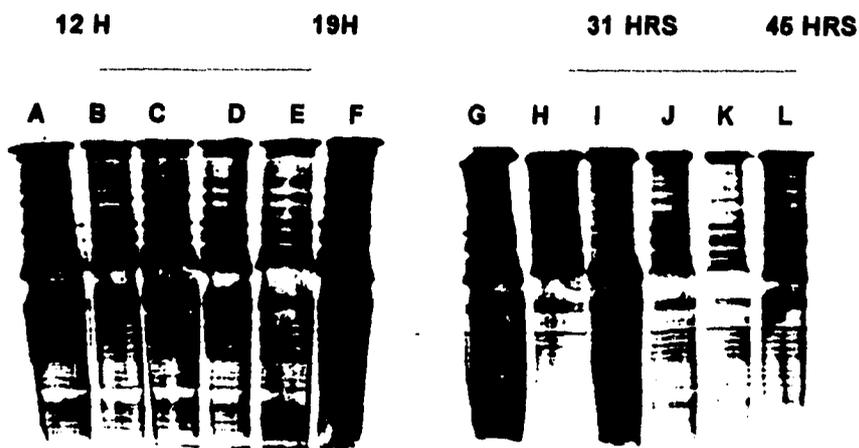


FIGURA 7.7 La línea K-562 se crece en placas de cultivo de 24 pozos bajo las siguientes condiciones: 37°C, 5 % de CO₂ y 95 % de humedad. La exposición de las células a los fármacos antitumorales vincristina y arabinósido de citosina, se realiza a 2.5 ng/μl y 10 ng/μl a diferentes tiempos, en presencia de un control, al cual no se le adiciona ningún fármaco.

A las 4 horas de finalizar el tiempo de exposición con el fármaco, se adicionaron 15 μCi/ml de metionina radioactiva en los pozos de la placa de cultivo, bajo las condiciones ya mencionadas con la finalidad de efectuar el marcaje de las proteínas recién sintetizadas. La muestra se analizó por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% (PAGE-SDS) después de secado el gel se lleva a cabo la autoradiografía correspondiente la cual se expuso en un cassette con pantalla intensificadora durante 7 días, posteriormente se revela y se analiza el patrón de proteínas.

Los resultados se muestran en la fig. 7.6. En donde no se observan diferencias en el patrón de expresión de las proteínas en las células tratadas y el control. Con el objeto de proporcionar mayor resolución en el análisis de proteínas, se empleó la electroforesis bidimensional. Esta técnica permite separar a las proteínas no sólo en base a su masa molecular, sino también con respecto a su punto isoelectrico, de tal forma que aún cuando existan proteínas con idéntica masa molecular se podrán observar diferencias si las proteínas difieren en el punto isoelectrico. Con respecto a los resultados obtenidos en los geles de dos dimensiones se observaron algunas diferencias en el patrón de expresión de algunas proteínas. Sin embargo debido a que estos resultados no son lo suficientemente claros, se decidió no presentarlos. Una de las razones más importantes para no efectuar conclusiones acerca de estos resultados fue, que los geles correspondientes a las células control no tuvieron una resolución adecuada. Por lo que aún cuando se observa supresión de algunas proteínas, no es posible inferir conclusiones acerca de estos hallazgos.

8.0 DISCUSION

El establecimiento de las condiciones necesarias para el empleo de la técnica de la reducción de la sal de tetrazolio (MTT), permitió cuantificar la viabilidad celular de una forma sencilla y reproducible.

La técnica del MTT permitió evaluar el efecto citotóxico de un xenobiótico sin importar el mecanismo de acción por el cual este último daña a la célula. La sal de tetrazolio es metabolizada por la enzima succinato deshidrogenasa, por lo cual cuando se evalúa la viabilidad celular por este método, se obtiene entonces un reflejo de la actividad mitocondrial de la célula. Esta técnica es más adecuada en relación a la técnica de exclusión de colorante.

Con respecto al comportamiento que muestran las células tumorales en presencia de los fármacos antineoplásicos, fue interesante observar que la línea tumoral K-562 tratada con la concentración de 2.5 ng/ml de vincristina y arabinosido de citosina presentaron un efecto similar al de una línea celular resistente ya establecida. A tiempos tempranos de la acción del arabinósido de citosina a la concentración de 10 ng/ml no se observa una disminución importante de la viabilidad celular entre 12 y 20 horas. Sin embargo a las 36 horas la viabilidad disminuye al 80 %. Posteriormente se observa una recuperación de la viabilidad hasta del 90 % a las 63 horas. Esto podría deberse a lo siguiente: Que al incrementarse la actividad de GSHT esta permite la disminución del efecto citotóxico del fármaco a esa concentración observándose una recuperación en la viabilidad celular a través del tiempo. Sin embargo cuando las células fueron expuestas a 10 ng/ml de los fármacos la citotoxicidad aumenta observándose 60 % de viabilidad a las 36 horas, esta continúa disminuyendo hasta cerca de un 30 % . En este caso no se presentó resistencia a los fármacos empleados, ya que la concentración utilizada es mayor, probablemente la célula requiere de más tiempo para la recuperación del efecto citotóxico. En cuanto a la inducción de la actividad de la GSHT, se observa aumento de la actividad en función del tiempo y de la concentración. En las cinéticas presentadas en la figura 7.6, se observa que la actividad de la GSHT en presencia de 10 ng/ml es ligeramente mayor que con 2.5 ng/ml con Ara-c y Vin con respecto al control. Esto sugiere que la actividad de la GSHT es una

enzima inducible y que se incrementa en forma directamente proporcional a la dosis de cualquiera de los dos fármacos en función del tiempo de exposición. Con base a estos resultados no es posible designar a la GSHT como parámetro de la resistencia, quizá para ello se debería detectar cual de las isoenzimas se esta incrementando en mayor proporción y determinar si es la misma isoforma para cada uno de los fármacos. Con esta información se podría entonces considerar como un parámetro en el estudio de la resistencia a los fármacos antitumorales, en presencia de una línea celular no tumoral, como por ejemplo la línea de fibroblastos 3T3 la cual presenta niveles de la actividad de GSHT similares, a los que presenta una línea tumoral bien establecida como la K-562. En este caso si los niveles tanto basales como en presencia de algún fármaco fuesen más bajos, entonces esto sugeriría que sí podría considerarse como un buen parámetro de la resistencia. Los resultados obtenidos del análisis por electroforesis en geles unidimensionales de las células tratadas en presencia de los fármacos, no presentaron cambio en cuanto a la expresión de proteínas. El análisis de los patrones de expresión de proteínas obtenidas en los geles bidimensionales no nos permitieron concluir si algunas proteínas pudieran sobreexpresarse. Sin embargo no se excluye la posibilidad de poder llevar a cabo experimentos posteriores que permitan esta posibilidad. Finalmente con respecto a las hipótesis planteadas, la hipótesis I no se cumplió en sus totalidad debido a que por falta de resolución en los geles no se sabe si existe inducción o inhibición de las proteínas cuando en el análisis bidimensional. La hipótesis II se cumplió parcialmente, debido a que si se observó un aumento en la actividad enzimática de la GSHT, sin embargo faltó probar en una línea no tumoral, de tal forma de verificar si los incrementos que fueron observados tienen significancia real.

9. PERSPECTIVAS

Las perspectivas de este trabajo son caracterizar cuales de las isoenzimas participan en la inducción de la detoxificación y cuales en la resistencia, en la línea tumoral K-562 tratada con los fármacos antineoplásicos ARA-C y Vin, así como utilizando otras tres líneas tumorales y otros fármacos. Lo anterior podría llevarse a acabo utilizando técnicas de western blot y anticuerpos monoclonales dirigidos contra cada una de las tres isoenzimas que conforman a enzima GSHT. Además la elaboración de geles bidimensionales permitiría identificar cual de los integrantes de esta familia de isoenzimas es la que presenta aumento tanto de actividad como de expresión a nivel de proteína. También podría estudiarse si adicionalmente a estas proteínas, se inducen otras que han sido reportadas que se producen en la resistencia fármacos antineoplásicos como por ejemplo la proteína GP-170.

10.0 CONCLUSIONES

1.- La técnica de reducción de la sal de tetrazolio es una técnica adecuada para medir, citotoxicidad y viabilidad celular. En el caso de la línea celular tumoral K-562 (eritroleucemia linfocítica crónica) se demostró que el tiempo óptimo al cual la célula es capaz de metabolizar la sal de tetrazolio es de 4 horas.

2.- De los solventes empleados para la disolución del formazan se probaron: isopropanol acidificado, dimetil formamida y DMSO, este último fue el disolvente más adecuado puesto que presentó una relación directa entre la intensidad de la coloración y la cantidad de células.

3.- Los cursos temporales de la citotoxicidad efectuados en la línea celular K-562 en presencia de ARA-C y VIN a la concentración de 2.5 ng/ μ l, demostraron una reversión de la inhibición de crecimiento. La recuperación de las células alcanzó un 90 % de viabilidad celular. Sin embargo a la concentración de 10 ng/ μ l, no se observa recuperación de la viabilidad con ninguno de los fármacos.

4.-Las alteraciones morfológicas observadas por efecto de los fármacos empleados fueron los siguientes:

En presencia de vincristina se observaron células, que no completaron su división celular, mientras que con arabinosido de citosina los cambios que presentaron las células, fueron poco perceptibles.

6.- En relación a la inducción de la actividad de la enzima GSHT, en presencia de los fármacos antineoplásicos, arabinósido de citosina y vincristina se observó un aumento en función del tiempo. Sin embargo no identificamos cual de las isoenzimas es la que presentó mayor aumento de actividad.

11. BIBLIOGRAFIA

- 1.-Darnell,J., Lodish,H., Balltimore,D. "Biología Celular y Molecular". Primera Edición. Editorial Labor. España, pp. 1035-1080.1986.
- 2.-Toffoli, G., Frustaci, S., Tumiotto, R., Talamini, R., Gherlinzoni, F., Picci, P. and Blocchi, M. Expression of MDR1 and GST pi in human soft tissue sarcomas: Relation to drug resistance and biological aggressiveness. *Annals of Oncology* 3: 63-69, 1992.
- 3.-Boylard, E. and Chasseaud, LF.The role of Glutathione S Transferases in Mercapturic Acid Biosynthesis. *Advances in Enzymology*. 32: 173-219, 1969.
- 4.-Moscow, AJ., Farchild, RC., Madden, JM., Ramson, DT., Wieand, SH., O'brien, EE., Poplack, GD., Cossman, J., Myers, EC. and Cowan, HK. Expression of Anionic Gluathione- S-transferase and P-Glycoprotein Genes in Human Tissues and Tumors. *Cancer Research*. 49: 1422-1428, 1989.
- 5.-Gnant, X.F.M., Blijham, G., Reiner, M., Schutte, B., Aschevan, C., Steger, G. and Jakesk, R. DNA Ploidy and Other Results of DNA Flow Cytometry as Pronostic Factors in Operable Breast Cancer:10 Years Results of Randomised Study. *Eur J Cancer*. 28 (2-3):711-716,1992.
- 6.- Gilvarry, U., Farrell, D., Lynch, V., Moriarty, D., Law, E. and Clynes, M. Cytological Differences Between Normal and Malignant Human Cell Populations Culture. *Cancer Res*. 50: 3390-3393, 1990.
- 7.-Moore, EG., Gerner, ER. and Franklin A. Culture of Normal Human Leukocytes. *The J of American Medical Association*. 199 (8): 519-524, 1967.

- 8.-Jayme, WD., Epstein, AD. and Conrad, RD. Fetal Bovine Serum Alternatives (Product Review). *Nature*. 344: 547-548, 1988.
- 9.-Biedler, L., Hansjörg, R., Peterson, F.H.R. and Spengler, AB. Membrane-Mediated Drug Resistance and Phenotypic Reversion to Normal Growth Behavior of Chinese Hamster Cells. *J Cancer Institute*. 55(3): 671-677, 1975.
- 10.-Biedler, LJ., Shrecker, WA. and Hutchinson, JD. Selection of Cromosomal Variant in Amethoptrin-Resistant Sublines of Leukemia L-1210 with Increased Levels of Dihydrofolate Reductase. *J of National Cnacer Institute*. 31 (3): 575-588, 1963.
- 11.-Lozzio, BC. and Lozzio, BC. Human Chronic Myelogenous Leukemia Cells Line with Positive Philadelphia Chromosome Blood. *Blood*. 45 (3): 321-333, 1975.
- 12.-Koeffler, HP. and Golde, WM. Human Myeloid Leukemia Cells Lines. A Review. *Blood*. 56 (3): 344-350, 1980.
- 13.-Anderson, CL., Nilsson, K. and Grahmberg, GC. Human Erythroleukemic Cell Line. *Int. J Cancer*. 23: 143-147.
- 14.-Riggs, EC. and Bennett, PJ. *Comprehensive Textbook of Oncology: Seccion D Chemotherapy. Chapter 55: Principles of Cancer Chemoterapy. Editorial Williams and Wilkins, pp.336-527, 1991.*
- 15.-*ibid*, Chapter 56: Clinical Pharmacology of Individual Antineoplastic Agentes. pp. 537-568.

- 16.-Plagemann, W.G.P. and Wollhueter, M.R. Transport and Metabolism of Deoxycitidine and 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine into Culture Novikoff Rat Hepatoma Cells, Relationship to Phosphorylation, and Regulation of Triphosphate Synthesis. *Cancer Res.* 38: 978-989, 1978.**
- 17.-Kessel, D., Hall, T.C. and Wodinsky, J. Transport and Phosphorilation as Factors in the Antitumor Action of Cytosine Arabinoside. *Science.* 156: 1240-1241, 1947.**
- 18.-Kande, K.R. and Chabner, B.A. Pyrimidine Nucleoside Monophosphate Kinase from Human Leukemic Blasts Cells. *Cancer Res.* 38: 579-585, 1978.**
- 19.-Cheng, Y. and Capizzi, R.L. Enzimology of Cytosine Arabinoside. *Med. Ped. Oncol, suppl.* 1: 27-31, 1982.**
- 20.-Rogers, A.M., Hill, R., Lehmann, A.R., Arlett, C.F. and Burns, V.W. The induction and Characterization of Mouse Lymphoma L5178Y Cell Lines Reistant to 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine. *Mutant Res.* 69: 139-148, 1980.**
- 21.-Tanaka, M. and Yoshida, S. Altered Sensetivity to 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine 5- Triphosphate of DNA Polimerase Alfa from Leukemic Blasts of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Res.* 42: 649-653, 1982.**
- 22.-Kees, R.U. Resistance to 1- β -D-Arabinofuranosylcytosine after High Dose Treatment in Chilhood Lymphoblastic. Leukemia Isolation of Drug Resistance an a Sensitive Cell Line. *Cancer Res.* 47: 3088-3091, 1987.**

- 23.-Owells, R.J., Hartke, C.A., Dickerson, R.M. and Hanes, F.O. Inhibition of Tubulin- Microtubule Polymerization by Drugs of the Vinca Alkaloid Class. Cancer Res. 36: 1499-1502, 1970.**
- 24.-Jordan, A.M., Thrower, D., and Wilson, L. Inhibition of Cell Proliferation by Vinca Alkaloids. Cancer res. 51: 2212-2222, 1991.**
- 25.-Jordan, A.M., Himes, H.R. and Wilson, L. Comparison of the Effects of Vinblastine, Vincristine, Vindesine and Vinorelbine on Microtubule Dynamics and Cell Proliferation in vitro. Cancer Res. 45: 2741-2747, 1985.**
- 26.-Biedler, J.L. and Peterson, R.H.I. In Molecular Actions and Targets for Cancer Chemotherapeutic Agents. Sartorelli, A.C., Lazo, J.S. and Bertino, J.R. Eds. Academic Press, New York. pp. 453-482, 1981.**
- 27.- Kartner, N., Shales, M., Riordan, J.R. and Ling, V. Daunorubicin Resistant Chinese Hamster Ovary Cells Expressing Multidrug Resistance and a Cell-Surface P-Glycoprotein. Cancer Res. 43: 4413-4419, 1983.**
- 28.-Fojo, A., Akiyama, S., Gottesman, M.M. and Pastan, I. Reduced Drug Accumulation in Multiply Drug Resistant Human KB Carcinoma Cell Lines. Cancer Res. 45: 3002-3007, 1985.**
- 29.-Inaba, M., Kobayashi, H., Sakurai Y. and Johnson K.R. Active Efflux of Daunorubicin and Adriamycin in Sensitive and Resistant Sublines of P388 Leukemia. Cancer Res. 39: 2200-2203, 1979.**

- 30.**-Horio, M., Gottesman, M.M, Pastan, I. ATP-dependent transport of Vinblastine in Vesicles from Human Multidrug Resistant Cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 85: 3580-3584, 1988.
- 31.**-Gros, P., Croop, J. and Housman, D. Mammalian Multidrug Resistance Gene: Complete cDNA Sequence Indicates Strong Homology to Bacterial Transport Proteins. Cell. 47: 370-380, 1986.
- 32.**-Goodman, E.G., Yen, P.Y., Cox, C.T. and Crowley, J. Effect of Verapamil on *in vitro* Cytotoxicity of Adriamycin and Vinblastine in Human Tumor Cells. Cancer Res. 47: 2295-2304, 1987.
- 33.**-Skovsgaard, T. Circumvention of Resistance to Daunorubicin by N-Acetyldaunorubicin in Erlich Ascites Tumor. Cancer Res. 40: 1077-1083, 1980.
- 34.**-Tsuruo, T., Iida, H., Tsukagoshi, S. and Sakurai, Y. Overcoming of Vincristine Resistance in P388 Leukemia *in vivo* and *in vitro* through Enhanced Cytotoxicity of Vincristin and Vinblastine by Verapamil. Cancer Res. 41: 1967-1972, 1981.
- 35.**-Kartner, N., Everden, P.D., Bradly, G., Ling, V. Detection of P-Glycoprotein in Multidrug-Resistance Cell Lines by Monoclonal Antibodies. Nature. 316: 820-823, 1985.
- 36.**-Dinota, A., Tazzari, L.P., Michieli, M., Visani, G., Gobbi, M., Bontadini, A., Tassi, C., Fanin, R., Damiani, D., Grandi, M., Pileri, S., Bolognesi, A., Stirpe, F., Baccarini, M., Tsuruo, T. and Tura, S. *In vitro* Bone Marrow Purging of Multidrug-Resistant Cells with a Mouse Monoclonal Antibody Directed Against MR, 170,000 Glycoprotein and Saporin Conjugated Anti-Mouse, Antibody. Cancer Res. 50: 4291-4294, 1990.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- 37.-**Thiebaut, T., Tsuruo, T., Hamada, H., Gottesman, M.M., Pastan, I. and Willingham, C.M. Cellular Localization of the Multidrug Resistance Gene Product P-Glycoprotein in Normal Human Tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7735-7738, 1987.
- 38.-**Meyers, B.M., Scheider, A.K., Spengler, A.B., Chang, T-D. and Biedler, L.J. Sorcin (V 19), a Soluble Acidic Calcium-Binding Protein Over Produced in Multidrug-Resistant Cells. Identification of the Protein by Anti-sorcin Antibody. *Biochemical Pharmacology.* 36(14): 2372-2380, 1987.
- 39.-**Croop, M., Gros, P. and Housman, E.D. Genetics of Multidrug Resistance. *Perspectives. J. Clin. Invest.* 81: 1363-1369, 1988.
- 40.-**Lönn, V., Lönn, S., Nylén, V. and Stenkvist, B. Appearance and Detection of Multiple Copies of the *mdr-1* Gene in Clinical Samples of Mammary Carcinoma. *Int. J. Cancer.* 51: 682-686, 1992.
- 41.-**Riordan, R.J., Kathryn, D., Kartner, N., Alon, N., Teint, J. and Ling, V. Amplification of P-Glycoprotein Genes in Multidrug-Resistant Mammalian Cell Lines. *Letters Nature.* 1: 817-819, 1985.
- 42.-**Boyland, E., Chasseaud, F.L. Enzyme-Catalysed Conjugations of Glutathione with Unsaturated Compounds. *Biochem J.* 104: 95-102, 1967.
- 43.-**Booth, J., Boyland, E. and Sims, P. An Enzyme from Rat Liver Catalysing Conjugations with Glutathione. *J Biochem.* 79: 516-524, 1961.
- 44.-**Dulik, D.M., Fenselau, C. and Hilton, J. Characterization of Melphalan Glutathione Adducts whose Formation is Catalized by Glutathione Transferases. *Biochem Pharmacol.* 35: 3405-3409, 1986.

- 45.-Tew and Wang. Selective Toxicity of Haloethyl Nitrosoureas in Cracinoma Cell Line Resistant to Bifunctional, Alkylating Agents. Mol. Pharmacol. 21: 729-738, 1982.**
- 46.-Barnes, M.M., James, P.S. and Wood, B.P. The Formation of Mercapturic. Formation of Mercapturic Acid and the Levels of Glutathione in Tissues . Biochem. J. 71: 680-690, 1959.**
- 47.-Smith, M.T., Evans, G.C., Setzer, D.P., Castro, M.V., Tahi, K.M. and Mannervick, B. Denitrosation of 1,3Bis (2-Chloroethyl)-1 Nitrosourea by Class Mu Glutathione Transferase and its Role in Cellular Resistance in Rat Brain Tumor Cells. Cancer Res. 49: 2621-2625, 1989.**
- 48.- Guthenberg, C., Akerfeldt, K. and Mannervick, B. Purification of Glutathione S-Transferase from Human Placenta. Acta. Chem. Scand. Ser. B. 33: 595-600, 1979.**
- 49.- Shiratori, Y., Soma, Y., Maruyama, H., Sato, S., Takano, A. and Sato, K. Immunohistochemical Detection of the Placental form of Glutathione S-Transferase in Dysplastic and Neoplastic Human Uterine Cervix Lesions. Cancer Res. 47: 6806-6809, 1987.**
- 50.- Dillio, C., Del Boccio, G., Aceto, A. and Frederici, G. Selenium Level and Glutathione Dependent Enzyme Activities in Normal and Neoplastic Human Lung Tissue. Carcinogenesis. 8: 861-864, 1987.**

- 51.-** Kantor, S.R.R., Giardina, L.S., Bartolazzi, A., Townsend, J.A., Myers, E.C., Cowan, H.K., Longo, L.D. and Natali, G.P. Monoclonal antibodies to Glutathione S-Transferase π Immunohistochemical Analysis of Human Tissues and Cancers. *Int J.C.* 47: 193-201, 1991.
- 52.-** Mannervik, B., Alin, P. and Guthenberg, C. Identification of the Three Classes of Cytosolic Glutathione Transferase Common to several Mammalian Species Correlation between Structural Data and Enzymatic Properties. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 82: 7202-7206, 1985.
- 53.-** Mukhtar, H. and Bend, R.J. Serum Glutathione S- Transferase: Perinatal Development, Sex Difference and Effect of Carbon Tetrachloride Administration on Enzyme Activity in the Rat. *Life Sciences.* 21: 1277-1286, 1977.
- 54.-** Alkassab, S., Boyland, E., and Williams, K. *Biochem. J.* 87;4-9, 1963.
- 55.-** Nemoto, N., Gelboin, H.V., Habing, W. H.; Ketley, J.N., and Jacoby, W.B. *Nature* 255:512,1975
- 56.-** Habing, W.H., Pbst, M.J. and Jakoby, W.B.J. *Biol. Chem.* 249: 7130-7139, 1974.
- 57.-** Mosmann, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J. of Immunological Methods.* 65: 55-63, 1983.
- 58.-** Laemmli, U.K. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature.* 227: 680-685, 1970.

- 59.- O'Farrel, H.P. Resolution Two-Dimensional Electrophoresis. The J. of Biological Chemistry. 250: (10): 4007-4021, 1975.**
- 60.- Bradford, M.M.A. Rapid and sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principles of Protein-Dye Binding. Analytical Biochemistry. 72: 248-254, 1976.**
- 61.- Fine, D.L., Abbot, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H. and Boyd M.R. Feasibility of Drug Screening with Panels of Human Tumor Cell Lines Using a Microculture Tetrazolium Assay. Cancer Res. 48: 589-601, 1988.**
- 62.- Park, G.J; Kramer, SB; Steinberg S.M; Carmichael, J; Collins, J.M; Mina, D.M and Gazdar, F.D. Chemosensitivity Testing of Human Colorectal Carcinoma Cell Lines Using a Tetrazolium-based Colorimetric Assay. Cancer. Res. 47: 5875-5879, 1987.**