



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"EVALUACION DE LOS EFECTOS CITOTOXICOS,  
CITOSTATICOS Y GENOTOXICOS DE LAS ARGENTATINAS  
A Y B"

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

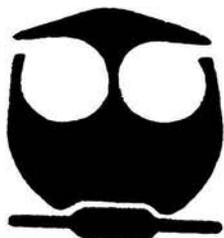
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

FATIMA GARCIA PILLADO



MEXICO, D.F.

EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

2004



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. Jesús Fernando Montiel Aguirre
Vocal	Prof. Francisco Hernández Luis
Secretario	Profa. Hortensia Parra Delgado
1er. Suplente	Prof. Felipe Cruz García
2º. Suplente	Profa. Ma. Benita Leonor Fernández Salgado

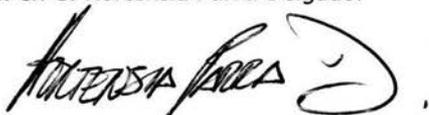
**Sitio donde se desarrolló el tema:**

Departamento de Medicina Genómica y Toxicología Ambiental.  
Instituto de Investigaciones Biomédicas.

Este trabajo fue apoyado por el proyecto DGAPA: IN-224802

**Asesor del tema:**

M. en C. Hortensia Parra Delgado.



**Supervisor técnico:**

Q.F.B. Lourdes Monserrat Sordo Cedeño.



**Sustentante:**

Fátima García Pillado.



La sustentante fue beneficiada con una beca de la  
Universidad Nacional Autónoma de México (proyecto DGAPA IN-224802).

A mis padres y hermano, por confiar en mí más de lo que yo misma soy capaz.  
Espero que algún día estén tan orgullosos de mí como yo de ustedes.

## AGRADECIMIENTOS

A mi padres por permitirme crecer y madurar a su lado y hacer de mí la persona que ahora soy. Gracias por su amor y su paciencia, por el interés y constante estímulo en todas las etapas de mi vida. Este es solo uno de los logros que obtenemos juntos, gracias por creer y confiar en mí.

Los amo.

A mi hermano Ulises por los momentos buenos y malos que hemos compartido, por ser mi cómplice en muchas ocasiones y por ser una inagotable fuente de tonterías que me han dado tantos momentos de alegría. Te amo y me siento orgullosa de ti.

A Hortensia Parra, por su apoyo en la dirección y realización de este trabajo, por dejarme ser, exprimir mi capacidad y por mostrarme el gran ser humano que es. Te quiero.

A la Dra. Patricia Ostrosky y al Dr. Mariano Martínez por aceptarme y apoyarme en este proyecto, por su valiosa ayuda y sus acertados comentarios y sugerencias.

A Monserrat Sordo por tener los brazos llenos de manos y echármelas cuando más falta me hacen, por tus consejos, ese empujoncito extra y la gran sonrisa que siempre tienes para mí. Te quiero Monsecita.

A mis compañeros del laboratorio de Biomédicas (Yair, Dorys, Miriam, Maru, Any, Elias, Martita, Andrés y Andrea) por crear un ambiente donde no sólo puedo discutir mi trabajo, sino todo lo que sale de mi cabeza. Sin ustedes, mi vida en la investigación probablemente habría sido más corta.

A todos mis donadores estrella, sin los cuales no tendría linfocitos que atormentar.

A mis amigos Gerardo, Beto, Jonathan, Hugo, Beatriz, Adriana, Charmina, Maricela, Anayetzin, Carmen, Rafael, Alfredo y a todos aquellos que siempre estuvieron conmigo. Gracias por su amistad y su sinceridad disfrazada de ironía; por ayudarme a crecer y a encontrar mi lugar en este mundo, por darme días llenos de risas y sus hombros para llorar. Los quiero a todas.

A Lourdes y a Moni y las 5 herencias, socias en delirios y aventuras, gracias por ser mis amigas inseparables y darle a mi locura un lugar especial en este mundo. Las quiero muchísimo !!

A mis todos mis profesores por contribuir en mi educación profesional y personal y por darme las herramientas para salir adelante. Gracias.

A los miembros del H. Jurado por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por permitirme crecer en todos los aspectos de mi vida, por ofrecerme las oportunidades que contribuyeron a mi formación y porque aquí he vivido las mejores etapas de mi vida.

A TODOS mil gracias.

## INDICE GENERAL

	Página
<b>1. ANTECEDENTES</b>	9
1.1    Cáncer y quimioterapia.	9
1.2    Fármacos antineoplásicos.	11
1.3    Principios activos de origen vegetal.	13
1.4 <i>Parthenium argentatum</i> (guayule).	15
1.5    Detección de compuestos con potencial antineoplásico.	17
1.6    El cultivo de linfocitos en la detección de sustancias con potencial antineoplásico.	19
<b>2. HIPÓTESIS</b>	25
<b>3. OBJETIVOS</b>	26
<b>4. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	27
<b>5. RESULTADOS</b>	31
<b>6. DISCUSIÓN</b>	37
<b>7. CONCLUSIONES</b>	41
<b>8. BIBLIOGRAFÍA</b>	42
<b>9. ANEXO</b>	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
<b>Figura 1.</b> Estructura química de las Argentatinas A (1) y B (2).	15
<b>Figura 2.</b> Microfotografías de células (a) mononucleadas, (b) binucleadas y (c) polinucleadas típicas.	21
<b>Figura 3.</b> Microfotografías de una célula binucleada típica (a) y una célula binucleada que presenta un puente nucleoplásmico (b).	22
<b>Figura 4.</b> Microfotografías de una célula polinucleada (a) y una célula binucleada en proceso de apoptosis (b).	22
<b>Figura 5.</b> Microfotografías de células binucleadas con micronúcleos.	23
<b>Figura 6.</b> Porcentaje de viabilidad de linfocitos humanos tratados con Argentatina A.	31
<b>Figura 7.</b> Porcentaje de viabilidad de linfocitos humanos tratados con Argentatina B.	32
<b>Figura 8.</b> Cinética de proliferación de linfocitos humanos tratados con Argentatina A.	33
<b>Figura 9.</b> Índice de División Nuclear calculado para cada grupo de tratamiento con Argentatina A.	33
<b>Figura 10.</b> Cinética de proliferación de linfocitos humanos tratados con Argentatina B.	34
<b>Figura 11.</b> Índice de División Nuclear calculado para cada grupo de tratamiento con Argentatina B.	35
<b>Figura 12.</b> Efecto de la Argentatina A sobre la frecuencia de CBN con MN.	36

	Página
<b>Figura 13.</b> Efecto de Argentatina B sobre la frecuencia de CBN con MN.	36
<b>Figura 14.</b> Estructuras químicas de algunos agentes alquilantes.	47
<b>Figura 15.</b> Estructuras químicas del ácido fólico y metrotexato.	48
<b>Figura 16.</b> Estructuras químicas de análogos de purinas y pirimidinas.	48
<b>Figura 17.</b> Estructuras químicas de algunos antimitóticos.	49
<b>Figura 18.</b> Estructura química de algunos inhibidores de las topoisomerasas.	50
<b>Figura 19.</b> Estructura química de algunos antibióticos antitumorales.	51
<b>Figura 20.</b> Estructura química del Tamoxifeno.	52
<b>Figura 21.</b> Estructura química de algunos agentes antitumorales diversos.	52

## **1. ANTECEDENTES**

### **1.1 Cáncer y quimioterapia**

El nombre cáncer abarca todas aquellas enfermedades que tienen en común una proliferación anormal de las células y la capacidad de estas de sufrir metástasis y formar tumores secundarios<sup>1</sup>. Esta enfermedad se caracteriza por cambios en los mecanismos de control que regulan la proliferación y diferenciación de las células<sup>2</sup>. Estos cambios son el resultado de anomalías genéticas que puede aparecer por la mutación de un grupo específico de genes. Muchos de estos genes actúan normalmente suprimiendo o estimulando la continuidad del ciclo celular, y su pérdida o inactivación da lugar a una división celular descontrolada<sup>3</sup>.

Hoy en día, el cáncer constituye una de las principales causas de muerte de la humanidad. Cada año más de 10 millones de personas son diagnosticadas con cáncer, de estas, 6 millones mueren representando el 12% de las muertes en el ámbito mundial y se estima que para el año 2020 el número de nuevos casos se incrementará a 15 millones<sup>4</sup>. Según los registros de la Secretaría de Salud, desde 1990 en México, el cáncer ocupa el segundo lugar como causa de muerte. En el caso de los hombres los principales tipos de cáncer fueron, el de pulmón, el de próstata y el de estómago; mientras que en las mujeres el cáncer cervicouterino y el de mama fueron los de mayor importancia<sup>5</sup>.

Debido a los altos índices de incidencia, así como su impacto a nivel económico y social es que se reconoce al cáncer como un problema importante de salud pública a nivel mundial y ocupa un lugar de especial importancia en los programas de salud pública, asistencia médica, prevención e investigación<sup>1</sup>.

### *Quimioterapia del cáncer*

La quimioterapia se puede definir como un procedimiento terapéutico farmacológico, que consiste en la utilización de fármacos, denominados antineoplásicos, para el tratamiento curativo o paliativo del cáncer.

En la actualidad, se cuenta con tres estrategias principales para el tratamiento del cáncer: 1) procedimientos quirúrgicos, 2) radiación y 3) quimioterapia sistémica.

La detección temprana del cáncer permite, que una tercera parte de los pacientes con este padecimiento puedan curarse con un tratamiento local –cirugía y/o radiación-<sup>3</sup>. En los casos restantes, donde se detecta una metástasis temprana, se requiere de un método sistémico para curar o paliar efectivamente el cáncer diseminado<sup>2</sup>. La quimioterapia se emplea en fases tempranas del tratamiento (a menudo en combinación con cirugía o radiación) ya que es entonces cuando los tumores son más curables y el paciente tiene mayor capacidad de tolerar el tratamiento <sup>6</sup>. Hoy en día, casi el 50% de los pacientes con cáncer pueden ser curados; y de estos el 17% es atribuible a la quimioterapia <sup>2</sup>.

En el tratamiento farmacológico del cáncer es frecuente la administración de asociaciones de antineoplásicos, ya que de esta forma el tratamiento es más eficaz <sup>6</sup>. Muchos de los agentes citotóxicos más potentes actúan en fases específicas del ciclo celular, inhibiendo las células que se encuentran en proceso de división. De ahí, que las neoplasias que muestran mayor susceptibilidad a la quimioterapia son las que tienen una fracción elevada de células en proliferación y crecimiento <sup>7</sup>.

Recientemente, se han comenzado a explorar otro tipo de estrategias para el tratamiento del cáncer, tales como: la terapia génica, las manipulaciones del sistema inmunitario y de los sistemas hematopoyéticos normales, así como la inducción de diferenciación en tejidos tumorales y la inhibición de la angiogénesis <sup>6</sup>.

## **1.2 Fármacos antineoplásicos.**

Los antineoplásicos, son fármacos utilizados en el tratamiento del cáncer. Estos se pueden administrar con fines curativos o paliativos, ya que algunos cánceres avanzados pueden ser controlados con terapia farmacológica durante períodos prolongados aumentando la esperanza de vida del paciente <sup>3</sup>. Puesto que los antineoplásicos se distribuyen en el organismo vía circulatoria, están indicados en cánceres diseminados, que resultan incontrolables con cirugía o radioterapia. En algunos casos se pueden emplear en cánceres localizados donde el fármaco suele administrarse como tratamiento coadyuvante (postoperatorio) y/o neoadyuvante (preoperatorio) <sup>6</sup>.

El objetivo fundamental del tratamiento antineoplásico es la destrucción de las células cancerosas afectando lo menos posible a las células normales, sin embargo los fármacos antineoplásicos presentan un margen terapéutico muy estrecho, una elevada toxicidad y pueden inducir la aparición de resistencia en las células cancerosas <sup>6</sup>. La elevada toxicidad que presentan, se debe fundamentalmente a que no actúan sólo sobre las células tumorales sino también sobre células sanas, que en condiciones normales tienen una tasa de proliferación elevada; en especial, las de la mucosa gástrica, la médula ósea y los folículos pilosos. Como consecuencia de este efecto citotóxico sobre células normales se producen alteraciones gastrointestinales, anemia, trombocitopenia, leucopenia y alopecia <sup>6</sup>.

A pesar de los beneficios derivados de las terapias antineoplásicas, los efectos tóxicos relacionados al tratamiento reducen substancialmente la calidad de vida del paciente con cáncer y limitan la utilidad de los productos farmacológicos <sup>6</sup>.

La mayoría de los agentes antineoplásicos descubiertos en los primeros 20 años de quimioterapia oncológica (1950 a 1970) interactúan de manera específica con el DNA o causándole un daño irreparable. En la actualidad, se cuenta con compuestos que actúan sobre el huso mitótico, dañan la integridad del DNA, o bloquean la síntesis de sus precursores; por ello la mayoría son más efectivos en células en proliferación activa, afectando exclusivamente en la fase S o en la mitosis <sup>5,6</sup>.

Hasta hace algunos años, los fármacos antineoplásicos se identificaban mediante la evaluación, a gran escala, de sustancias químicas sintéticas y de productos naturales en sistemas tumorales animales. El considerable incremento en el conocimiento de aspectos biológicos, genéticos y moleculares de las enfermedades neoplásicas ha llevado al desarrollo de metodologías de cernimiento más específicas <sup>8</sup>.

La búsqueda de compuestos efectivos y selectivos contra el cáncer continúa y se ha ampliado desde el área de los productos naturales hasta campos de investigación totalmente nuevos.

---

<sup>8</sup> Ver Anexo 1.

### **1.3 Principios activos de origen vegetal.**

Las plantas han constituido la base de los sistemas tradicionales de medicina e históricamente han sido una fuente inagotable de agentes medicinales. Muchos compuestos de origen natural han resultado ser compuestos líder a partir de los cuales se ha logrado desarrollar numerosos fármacos <sup>9</sup>; es por ello, que el estudio de compuestos de origen natural se mantiene vigente como una estrategia de búsqueda de nuevos agentes terapéuticos.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que aproximadamente el 80 % de la población mundial ha utilizado la medicina tradicional en sus cuidados de salud. Se calcula que los productos naturales representan alrededor del 50 % de los fármacos de uso clínico en países desarrollados y de estos el 25 % derivan de plantas superiores <sup>10</sup>. De tal manera que no solo las plantas continúan siendo fuente importante en el descubrimiento de nuevos fármacos; sino que también es posible aislar moléculas susceptibles a ser transformadas, con el fin de optimizar una determinada actividad biológica.

En relación al tratamiento del cáncer, existen limitaciones en cuando a la quimioterapia se refiere, ya que muchas de las moléculas existentes carecen de selectividad y en algunos casos las células cancerosas desarrollan resistencia a ellas. Por otro lado, los agentes terapéuticos existentes destruyen tanto células cancerosas como no cancerosas <sup>11</sup>. De ahí que exista la necesidad de encontrar nuevos agentes con la capacidad de destruir a las células cancerosas manteniendo una toxicidad reducida para las células que no lo son<sup>11</sup>.

La mayoría de los agentes farmacéuticos con actividad anticancerígena se han descubierto a partir de productos naturales obtenidos de plantas, organismos marinos y microorganismos. La vinblastina y vincristina, la camptotecina y el taxol son ejemplos de compuestos derivados de plantas que se emplean en el tratamiento del cáncer<sup>12</sup>.

Los agentes antineoplásicos de origen natural son capaces de inhibir la proliferación celular a través de una amplia gama de mecanismos, por ejemplo inhibiendo la replicación del DNA, interfiriendo en la formación del citoesqueleto como los alcaloides de la vinca (Vincristina y Vinblastina) o interfiriendo a nivel de transducción de señales<sup>11</sup>.

Entre los compuestos de origen natural con potencial antineoplásico se encuentran algunos triterpenoides que han demostrado poseer una amplia gama de efectos biológicos; entre ellos: citotoxicidad a líneas celulares tumorales <sup>13, 14</sup>, antagonistas de receptores a estrógenos <sup>15</sup>, efectos proapoptóticos <sup>16</sup>, actividad antiproliferativa <sup>16, 17</sup>, antioxidantes<sup>17</sup>, hepato-protectores<sup>14, 18</sup>, anti-inflamatorios <sup>18, 19</sup>, inmuno-regulatorios<sup>18</sup>, entre otros.

Si bien los triterpenoides han sido ampliamente empleados con propósitos medicinales en muchos países asiáticos, esta clase de moléculas no han tenido un impacto en las prácticas medicinales occidentales <sup>19</sup>.

Los triterpenoides se sintetizan en la naturaleza por la ciclación del escualeno; de tal manera que conservan un esqueleto de 30 átomos de carbono. En la literatura se encuentran descritos una gran variedad de triterpenoides que muestran actividad anti-proliferativa (citostática) y citotóxica. Los triterpenos mas estudiados corresponden a los tipos cicloartano, ursano y oleanano. La mayoría de los compuestos que se han evaluado actúan a nivel de la replicación del DNA, generalmente inhibiendo enzimas como la DNA polimerasa y/o las topoisomerasas<sup>11</sup>. Debido a esto, los triterpenoides se perfilan como potenciales agentes antineoplásicos.

#### 1.4 *Parthenium argentatum* (guayule).

La especie *Parthenium argentatum* Gray (guayule), un pequeño arbusto productor de hule natural <sup>20-23</sup> nativo del norte de la República Mexicana, ha demostrado ser una fuente rica de compuestos biológicamente activos <sup>15, 23</sup>, entre los que se encuentran algunos triterpenos.

En México, el aprovechamiento industrial del guayule alcanzó su auge durante la segunda guerra mundial; auge que decayó, a la llegada del hule producido sintéticamente. Pese a que ha dejado de ser una especie de amplia importancia industrial, hoy en día aún es aprovechada y rinde algunas utilidades a los campesinos de las regiones en las que crece la planta <sup>24</sup>.

Durante el proceso de industrialización del guayule se obtiene como subproducto un componente resinoso que constituye aproximadamente el 5% del peso seco de la planta. El estudio sistemático de la resina del guayule ha revelado la presencia de grandes cantidades de compuestos triterpénicos que representan cerca del 55% de los componentes totales <sup>15</sup>; de estos, el 27% lo representan las Argentatinas A, B y C <sup>19</sup>.

Estructuralmente las Argentatinas A y B (Fig. 1) son triterpenos pertenecientes al grupo cicloartano.

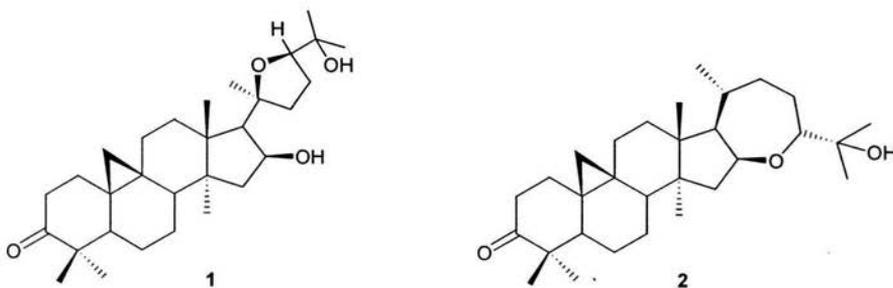


Figura 1. Estructura química de las Argentatinas A (1) y B (2).

En el caso particular de las Argentatinas, nuestro grupo de trabajo demostró que la Argentatina B es un inhibidor no-competitivo de la unión de  $^3\text{H}$ -estradiol a su receptor en tumores de mama humanos dependientes de hormonas <sup>15</sup> y que la Argentatina A posee propiedades antimicrobianas <sup>23</sup>.

Por otro lado, en un primer acercamiento a la determinación del potencial antineoplásico de las Argentatinas A y B, se evaluaron los efectos de estos compuestos sobre la proliferación de 5 líneas de cáncer humano empleando el modelo de Sulforrodamina B <sup>5</sup> y se determinó la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) para cada línea celular. En este estudio, se demostró que tanto la Argentatina A como la B, inhibieron la proliferación (o crecimiento) de las líneas celulares empleadas. La Argentatina A muestra mayor actividad antiproliferativa [CI<sub>50</sub> 20.22 a 38.61  $\mu\text{M}$ ] que la Argentatina B [CI<sub>50</sub> 24.14 a 79.38  $\mu\text{M}$ ]. Estos valores de CI<sub>50</sub> resultan similares a los informados para otros triterpenos como el ácido ursólico que posee actividad citostática y citotóxica en diversas líneas de cáncer humano <sup>11, 16</sup>.

El modelo de sulforrodamina B empleado en los estudios preliminares de la actividad biológica de las Argentatinas A y B no permite determinar si los efectos sobre la proliferación se deben a la muerte de las células (citotoxicidad) o a la detención del ciclo celular en alguna de sus fases (citostaticidad), por esta razón, se decidió evaluar los efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos de las Argentatinas A y B empleando un modelo alternativo que fuera más informativo.

---

<sup>5</sup> Parra-Delgado, H.; García-Pillado, F.; Ramírez-Apan, T.; Sordo, M.; Martínez-Vázquez, M.; Ostrosky-Wegman, P. Evaluation of the cytotoxicity, cytostaticity and genotoxicity of argentatins A and B from *Parthenium argentatum* (Gray). En revisión.

## 1.5 Detección de compuestos con potencial antineoplásico.

La quimioterapia antitumoral representa una amplia área de investigación debido a la necesidad de nuevas moléculas con actividad antitumoral y el desarrollo de nuevos sistemas de análisis y estudios moleculares. Por tanto, la identificación de numerosas de dianas potenciales es un reto común en muchas áreas de investigación.

La detección de la actividad biológica de un compuesto, ya sea natural o sintético, se realiza a través de un programa de cernimiento de la actividad biológica buscada que establezca las bases para llevar el compuesto de interés a pruebas a nivel clínico.

En la actualidad, muchos laboratorios así como centros académicos e institutos de investigación como el Instituto Nacional del Cáncer en Estados Unidos (INC) desarrollaron programas de búsqueda y aislamiento de nuevos agentes anticancerígenos que incluyen compuestos tanto sintéticos como de origen natural. El INC cuenta con una colección de compuestos en estudio mayor a los 600,000; de estos, 50,000 se han obtenido de plantas superiores. El INC cuenta con un programa que emplea un panel de 60 diferentes líneas celulares tumorales humanas para evaluar *in vitro* las sustancias en estudio <sup>25</sup>.

Este esquema de trabajo presenta la posibilidad de inferir el mecanismo de acción de nuevos compuestos basándose en la búsqueda de similitud de patrones de respuesta de compuestos con mecanismos de acción conocidos <sup>25</sup>. Además, permite determinar una especificidad relativa para ciertos tipos tumorales dada la cantidad y diversidad de líneas celulares empleadas <sup>25</sup>.

Aunque tales estrategias poseen ventajas en la búsqueda de compuestos con potencial antineoplásico, también pueden llegar a ser complicadas y costosas para implementar en muchos laboratorios debido a la gran cantidad de compuestos que se evalúan y al manejo de muchas líneas celulares. Por lo anterior y dado que la quimioterapia sistémica continúa siendo uno de los principales métodos de tratamiento, existe una clara necesidad de descubrir o diseñar nuevos agentes, así como estrategias de cernimiento más accesibles, sensibles e informativas.

## **1.6 El cultivo de linfocitos en la detección de sustancias con potencial antineoplásico.**

Existen estudios que demuestran que la proliferación celular puede verse alterada por la exposición *in vivo* o *in vitro* a fármacos administrados experimental o terapéuticamente <sup>26</sup>.

Los cultivos de linfocitos humanos han sido empleados durante décadas como sistema de prueba para la evaluación de los efectos genotóxicos tanto de sustancias químicas <sup>27-29</sup> como de la radiación ionizante <sup>28</sup>, así como efectos sobre proliferación celular<sup>29</sup>. Estos cultivos representan células humanas con características propias de células normales.

El cultivo de linfocitos ha demostrado ser útil en la determinación de la actividad antineoplásica de diversos compuestos como el cisplatino y la bleomicina <sup>29</sup>, mostrando ser un modelo sensible y reproducible. Por ello es considerado un buen método para el cernimiento primario de sustancias con actividad antineoplásica <sup>29</sup>.

Es conocido que más de un agente antineoplásico empleado en la clínica, posee efectos mutagénicos, genotóxicos e incluso carcinogénicos <sup>30</sup>. Por esta razón, resulta importante evaluar la genotoxicidad de cualquier compuesto con potencial antineoplásico. Existen varios parámetros que pueden ser utilizados para evaluar los efectos genotóxicos de agentes químicos. Uno de los métodos más empleados en la actualidad debido a su especificidad, sensibilidad y sencillez es la determinación de la frecuencia de células con micronúcleos ya sea por exposición *in vivo* o *in vitro* a una sustancia de prueba.

Los micronúcleos son biomarcadores de daño al DNA, que representan rompimientos cromosómicos y/o la pérdida de cromosomas completos provenientes de eventos espontáneos o como resultado de la exposición a agentes xenobióticos. Contienen fragmentos cromosómicos acéntricos o cromosomas completos que fueron incapaces de migrar hacia los polos durante la mitosis <sup>31</sup>.

El uso de los micronúcleos como marcadores de daño cromosómico en linfocitos de sangre periférica fue propuesto por Countryman y Heddle en 1976; y en 1985 Fenech y Morley mejoraron la técnica con la introducción de la citocalasina B (Cyt B) como agente inhibidor de la citocinesis<sup>31, 32</sup>. El bloqueo de la citocinesis empleando Cyt B es la metodología que revolucionó la prueba de MN por ser efectiva para identificar células que solo se han dividido una vez en el tiempo de cultivo, ya que permite observarlas con una apariencia binucleada debido al efecto inhibidor de la Cyt B sobre la citocinesis sin alterar la cariocinesis. De esta manera, es posible observar células mononucleadas (CMN) que representan a las células que no se han dividido en cultivo, las células binucleadas (CBN) y células tri, tetra o polinucleadas (CPN) que son aquellas que se han dividido más de una vez en el tiempo de cultivo.

Debido a que el bloqueo de la citocinesis no afecta la cariocinesis es posible establecer un índice de proliferación, conocido como Índice de división nuclear (IDN). Este parámetro permite determinar el patrón de respuesta mitogénica inducida y de esta manera establecer si el agente de prueba empleado en el estudio es capaz de inducir un efecto citostático<sup>32, 33</sup>.

El IDN se calcula con la siguiente fórmula:

$$\text{IDN} = [\text{CMN} + 2 (\text{CBN}) + 3 (\text{CPN})] / \text{N}$$

Donde: CMN, CBN y CPN es la frecuencia de células mono-, bi- y polinucleadas en un total de 200 células y N representa el número total de células contadas.

Para determinar la frecuencia de cada población de células se realiza un análisis microscópico, en donde se observan características morfológicas propias de cada población; las cuales se presentan en la Figura 2.

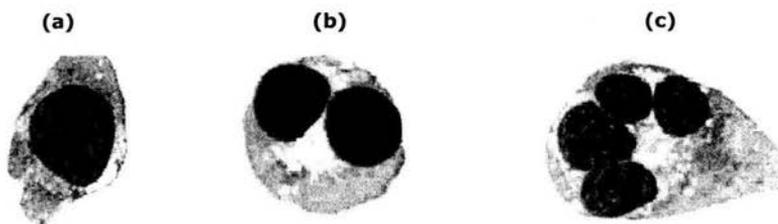


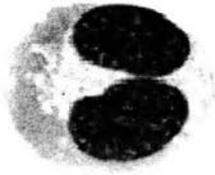
Figura 2. Microfotografía de células (a) mononucleadas, (b) binucleadas y (c) polinucleadas típicas. Tomadas de <sup>34</sup>.

Por otro lado, la determinación de la frecuencia de MN requiere de la observación microscópica de CBN en laminillas preparadas a partir de cultivos de células tratadas con el compuesto de interés. La evaluación de la frecuencia de MN se realiza analizando 1000 CBN. Los criterios de identificación de CBN y MN en CBN son:

*Criterios de identificación de Células Binucleadas<sup>34</sup>.*

- ◇ La célula debe ser binucleada, es decir presentar dos núcleos redondos u ovals, mantener su membrana casi intacta y distinguible de células adyacentes.
- ◇ Los núcleos deben estar separados, ser de tamaño similar y presentar un patrón de tinción similar.
- ◇ Los núcleos pueden estar muy juntos o incluso parcialmente traslapados, pero la membrana nuclear debe distinguirse.
- ◇ Ambos núcleos pueden encontrarse unidos por puentes nucleoplásmicos que no excedan  $\frac{1}{4}$  del diámetro nuclear (Figura 3b).

(a)



(b)

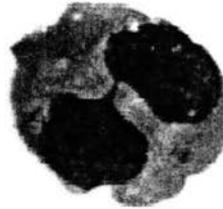
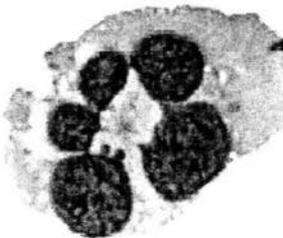


Figura 3. Microfotografías de una célula binucleada típica (a) y una célula binucleada que presenta un puente nucleoplásmico (b) .Tomadas de <sup>34</sup>.

Para el análisis de la frecuencia de micronúcleos no se toman en cuenta:

- a) células trinucleadas, tetranucleadas, o polinucleadas (Figura 4a).
- b) células donde el (los) núcleo(s) principal(es) se observen en apoptosis (Figura 4b).

(a)



(b)



Figura 4. Microfotografías de una célula polinucleada (a) y una célula binucleada en proceso de apoptosis (b). Tomadas de <sup>34</sup>.

*Criterios de identificación de micronúcleos*<sup>34</sup>.

- ◇ Son cuerpos de forma redonda u oval.
- ◇ Su diámetro varía entre 1/16 a 1/3 del núcleo principal en una célula mononucleada ó 1/25 a 1/9 del diámetro de un núcleo en una célula binucleada.
- ◇ Debe estar separado de los núcleos principales sin traslapamiento.
- ◇ No debe ser refringente.
- ◇ Debe presentar las mismas características tintoriales del núcleo principal (aunque en ocasiones puede presentarse más intenso).
- ◇ Debe presentar la misma condensación de cromatina que los núcleos principales.

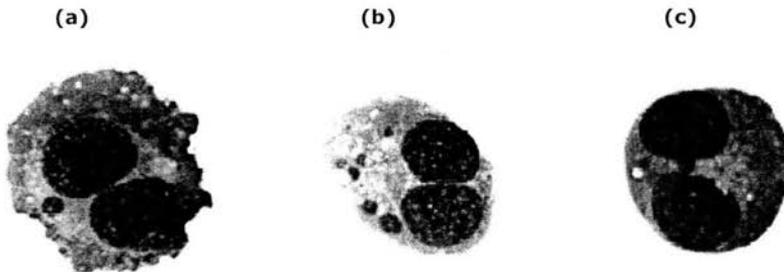


Figura 5. Microfotografías de células binucleadas con micronúcleos. Las figuras a y b muestran típicas células micronucleadas y la (c) muestra una célula donde un micronúcleo se encuentra tocando ambos núcleos. Tomadas de<sup>34</sup>.

Este ensayo presenta muchas ventajas sobre otras técnicas ya que no requiere de preparaciones de metafases, puede aplicarse a células en interfase (con la estimulación por medio de un mitógeno), no es invasivo, su costo es bajo y es relativamente más fácil de realizar que un ensayo de aberraciones cromosómicas. Al mismo tiempo puede emplearse en combinación con otras técnicas para discriminar entre eventos clastogénicos y aneugénicos <sup>33</sup>. Entre estas técnicas se encuentran el marcaje CREST que emplea anticuerpos anti-cinetocoro provenientes del suero de pacientes con una enfermedad autoinmune, y la técnica FISH con sondas centroméricas o teloméricas <sup>33</sup>.

Por las razones antes descritas, se decidió utilizar el ensayo de micronúcleos con bloqueo de la citocinesis para la evaluación de los efectos citostáticos y genotóxicos de las Argentatinas A y B.

## **2. HIPÓTESIS**

Se ha demostrado que muchos terpenoides, entre ellos triterpenos tetracíclicos del tipo cicloartano, presentan actividad citostática y citotóxica en diversas líneas celulares de cáncer; por lo tanto es posible que los triterpenos denominados Argentatinas A y B puedan inducir efectos sobre la proliferación y la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos de sangre periférica.

### **3. OBJETIVOS**

#### **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos *in vitro* de las Argentatinas A y B en cultivos de linfocitos humanos de sangre periférica.

#### **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Evaluar el efecto citotóxico de las Argentatinas en linfocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro*.
2. Determinar el efecto de las Argentatinas A y B sobre la proliferación celular de linfocitos humanos estimulados.
3. Evaluar el efecto genotóxico de las Argentatinas A y B en función de la frecuencia de micronúcleos en linfocitos humanos de sangre periférica tratados *in vitro*.

## **4. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Obtención de Argentatínas A y B**

Las Argentatínas A y B fueron amablemente donadas por el Dr. Mariano Martínez Vázquez y la M. en C. Hortensia Parra Delgado del Instituto de Química de la UNAM.

A partir de los compuestos proporcionados se prepararon dos soluciones concentradas de 1 y 10 mM que se usaron para llevar a cabo el tratamiento correspondiente (Tablas 1 y 2).

### **Donadores**

Se obtuvieron muestras sanguíneas de seis individuos sanos (3 hombres y 3 mujeres) con una edad promedio de 25 años, que no estuvieran bajo ningún régimen medicamentoso, así como que no hubieran cursando por algún cuadro sintomático previo o durante la semana de muestreo.

### **Evaluación del efecto citotóxico de Argentatínas A y B.**

Se evaluó el efecto citotóxico de las Argentatínas A y B mediante una técnica de doble tinción con una solución de Diacetato de fluoresceína-Bromuro de etidio (FDA-BrEt)<sup>35</sup>. Para cada compuesto se empleó la sangre de 3 donadores realizando 3 experimentos independientes por duplicado de cada donador.

En tubos eppendorf de 1.5 mL se colocaron 912.5  $\mu$ L de medio RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco) y L-Glutamina (Sigma), 62.5  $\mu$ L sangre entera y 25  $\mu$ L de fitohemaglutinina (Gibco). Los cultivos se incubaron a 37°C durante 48 h. Transcurrido este tiempo cada cultivo se trató de acuerdo al esquema que se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Esquema de tratamiento (concentración final en el volumen de cultivo).

GRUPO	TRATAMIENTO		
	Vehículo	Compuesto de prueba	MMC
Control	----	----	----
DMSO	< 0.5%	----	----
Arg5	----	5 $\mu$ M	----
Arg15	----	15 $\mu$ M	----
Arg25	----	25 $\mu$ M	----
MMC	----	----	1 $\mu$ M

Después de aplicado el tratamiento, los cultivos se incubaron a 37° C durante 24h más. Transcurridas las 24h los tubos se centrifugaron, se extrajo el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular.

Posteriormente se tomaron 25  $\mu$ L de la suspensión celular y se transfirieron a un tubo eppendorf nuevo en el que se adicionaron 25  $\mu$ L de la solución de tinción de FDA-BrEt. Se homogeneizó el contenido del tubo, se tomaron 25  $\mu$ L de la suspensión y se depositaron en portaobjetos limpios; posteriormente se les colocó un cubreobjetos y se evaluaron al microscopio. Para evaluar la citotoxicidad se determinó la frecuencia de células vivas (verdes) y muertas (rojas) en 200 células para obtener el porcentaje de viabilidad.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

Tabla 1. Esquema de tratamiento (concentración final en el volumen de cultivo).

GRUPO	TRATAMIENTO		
	Vehículo	Compuesto de prueba	MMC
Control	----	----	----
DMSO	< 0.5%	----	----
Arg5	----	5 $\mu$ M	----
Arg15	----	15 $\mu$ M	----
Arg25	----	25 $\mu$ M	----
MMC	----	----	1 $\mu$ M

Después de aplicado el tratamiento, los cultivos se incubaron a 37° C durante 24h más. Transcurridas las 24h los tubos se centrifugaron, se extrajo el sobrenadante y se resuspendió el paquete celular.

Posteriormente se tomaron 25  $\mu$ L de la suspensión celular y se transfirieron a un tubo eppendorf nuevo en el que se adicionaron 25  $\mu$ L de la solución de tinción de FDA-BrEt. Se homogeneizó el contenido del tubo, se tomaron 25  $\mu$ L de la suspensión y se depositaron en portaobjetos limpios; posteriormente se les colocó un cubreobjetos y se evaluaron al microscopio. Para evaluar la citotoxicidad se determinó la frecuencia de células vivas (verdes) y muertas (rojas) en 200 células para obtener el porcentaje de viabilidad.

## Evaluación del efecto citostático de las Argentatinas A y B.

Para determinar el posible efecto citostático de las Argentatina A y B se empleó la técnica de micronúcleos con bloqueo de citocinesis. Para la evaluación de cada compuesto se utilizó la sangre de 3 donadores (Argentatina A: 2 hombres y 1 mujer, y Argentatina B: 2 mujeres y un hombre) realizando 3 experimentos independientes por duplicado de cada donador.

En tubos Falcon de 15 mL se colocaron 6.3 mL de medio de cultivo RPMI-1640 (Sigma) suplementado con 1% de aminoácidos no esenciales (Gibco) y L-Glutamina (Sigma), 0.5 mL sangre entera y 0.2 mL de fitohemaglutinina (Gibco). Los cultivos se incubaron a 37°C durante 48 h. Transcurrido el tiempo de incubación los cultivos se trataron de acuerdo al esquema que se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2. Esquema de tratamiento (concentración final en el volumen de cultivo).

GRUPO	TRATAMIENTO		
	Vehículo	Compuesto de prueba	MMC
Control	----	----	----
DMSO	< 0.5%	----	----
Arg5	----	5 $\mu$ M	----
Arg15	----	15 $\mu$ M	----
Arg25	----	25 $\mu$ M	----
MMC	----	----	1 $\mu$ M

Después de la aplicación del tratamiento, se adicionó el agente inhibidor de citocinesis Citalasina-B (Sigma) hasta una concentración final de 6  $\mu$ g/mL. Los cultivos se homogeneizaron y posteriormente se incubaron a 37°C durante 24 h más.

Transcurrido el tiempo de tratamiento los paquetes celulares se resuspendieron y se transfirieron a tubos de vidrio donde fueron prefijados con 600  $\mu$ L de una solución de metanol-ácido acético (3:1).

Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 1200 rpm durante 10 min y después se extrajo el sobrenadante; los paquetes celulares se resuspendieron y fijaron con la misma solución (metanol-ácido acético 3:1). Una vez fijados se realizaron lavados con la misma solución hasta obtener un botón celular limpio. Después de obtener el botón celular limpio, este se resuspendió en 0.2 mL de fijador y se goteó cuidadosamente en portaobjetos fríos bañados en agua y se dejaron secar al aire. Finalmente las preparaciones se tiñeron siguiendo la técnica de Giemsa, y se evaluaron al microscopio.

Para realizar la evaluación del efecto citostático se determinó la frecuencia de células mono-, bi- y polinucleadas analizando 200 células por laminilla; y con esos datos se calculó el Índice de División Nuclear.

$$IDN = [CMN + 2 (CBN) + 3 (CPN)] / N$$

### **Evaluación del efecto genotóxico de las Argentatinas A y B.**

La evaluación de el efecto genotóxico de las Argentatinas A y B se evaluó en el microscopio empleando las mismas preparaciones donde se evaluó el efecto citostático. Se analizó la frecuencia de CBN con micronúcleos en un total de 1000 células binucleadas por laminilla.

### **Análisis estadístico**

Se realizó un análisis de varianza para determinar la diferencia entre los grupos control (DMSO) y los grupos tratados. Valores de  $p < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

## 5. RESULTADOS

### Viabilidad.

Como se puede observar en las figuras 6 y 7, el DMSO a la concentración empleada no afecta la viabilidad celular ( $p > 0.05$ ).

La actividad citotóxica de la Argentatina A se evaluó a tres diferentes concentraciones (5, 15 y 25  $\mu\text{M}$ ) y se observó una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la viabilidad de linfocitos humanos solo a la concentración de 25  $\mu\text{M}$  (Fig. 6). Por otro lado, la Argentatina B no mostró un efecto citotóxico estadísticamente significativo ( $p > 0.05$ ) sobre la viabilidad de linfocitos humanos a ninguna de las concentraciones evaluadas (Fig. 7).

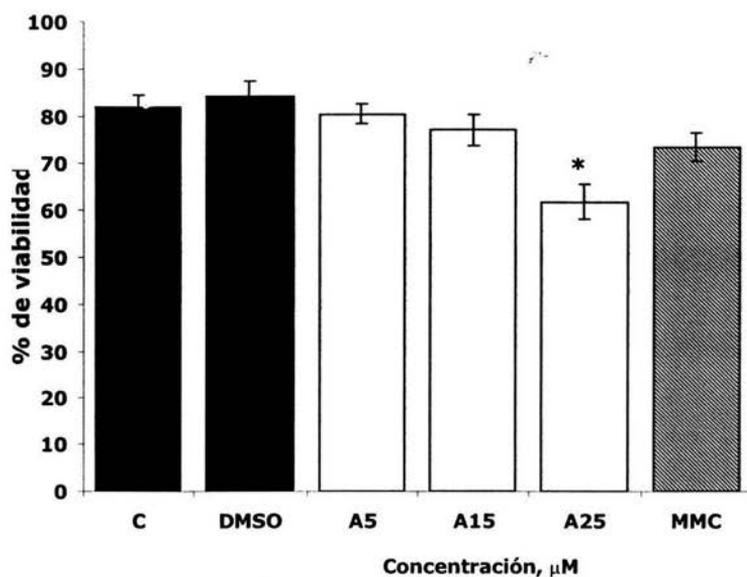


Figura 6. Porcentaje de viabilidad de linfocitos humanos tratados con Argentatina A (5, 15 y 25  $\mu\text{M}$ ) y Mitomicina C (MMC) a 1  $\mu\text{M}$ . Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. de tres experimentos por duplicado de tres donadores diferentes (\* $p < 0.05$ ).

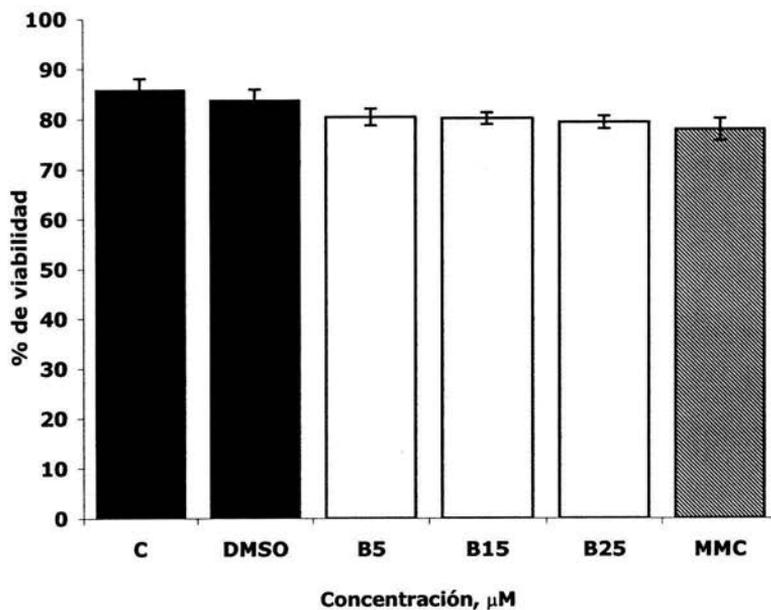


Figura 7. Porcentaje de viabilidad de linfocitos humanos tratados con Argentinina B (5, 15 y 25  $\mu\text{M}$ ) y Mitomicina C (MMC) a 1  $\mu\text{M}$ . Cada barra representa la media  $\pm$  E.E. de tres experimentos por duplicado de tres donadores diferentes.

### Efecto citostático de las Argentininas A y B.

La Argentinina A no mostró efectos sobre el porcentaje de células mono-, bi- o polinucleadas a ninguna de las concentraciones empleadas (Figura 8); de igual manera, los valores calculados de IDN no son estadísticamente diferentes a los calculados para el control de DMSO (Figura 9).

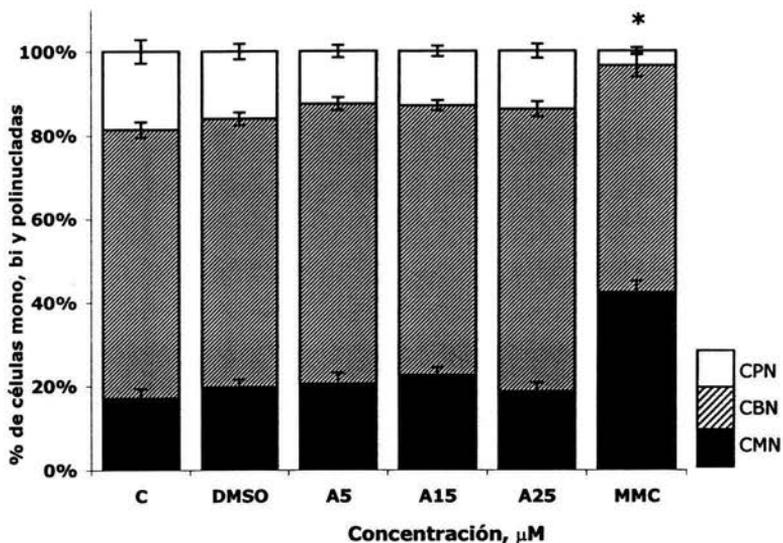


Figura 8. Cinética de proliferación de linfocitos humanos tratados con Argentinina A (5, 15 y 25  $\mu\text{M}$ ) y Mitomicina C (MMC) a 1 $\mu\text{M}$ . Las barras representan la media  $\pm$  E.E. de tres experimentos por duplicado de tres donadores diferentes (\* $p < 0.05$ ).

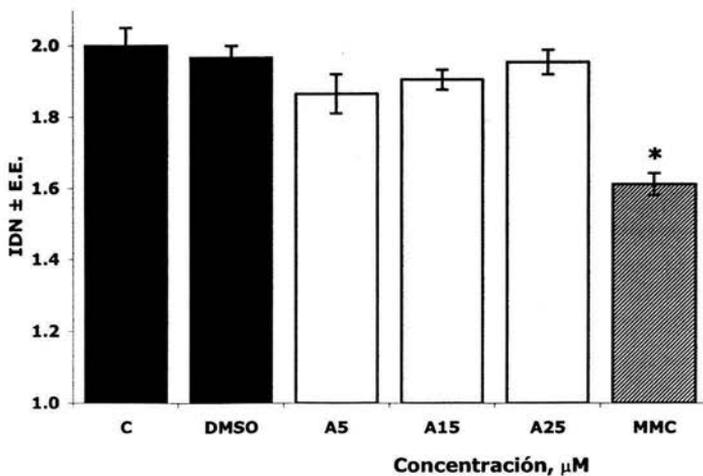


Figura 9. Índice de División Nuclear calculado para cada grupo de tratamiento con Argentinina A. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. de tres experimentos por duplicado de tres donadores diferentes (\* $p < 0.05$ ).

La Argentatina B indujo un incremento estadísticamente significativo, con respecto al control de DMSO ( $p < 0.05$ ), en el porcentaje CMN y una disminución de CBN y CPN a partir de la concentración de 5  $\mu\text{M}$  (Figura 10). Este efecto sobre la proliferación no es atribuible a un efecto citotóxico, ya que a estas concentraciones el compuesto no mostró citotoxicidad. De la misma manera los valores del IDN calculados muestran una disminución estadísticamente significativa con respecto al control a las mismas concentraciones (Figura 11).

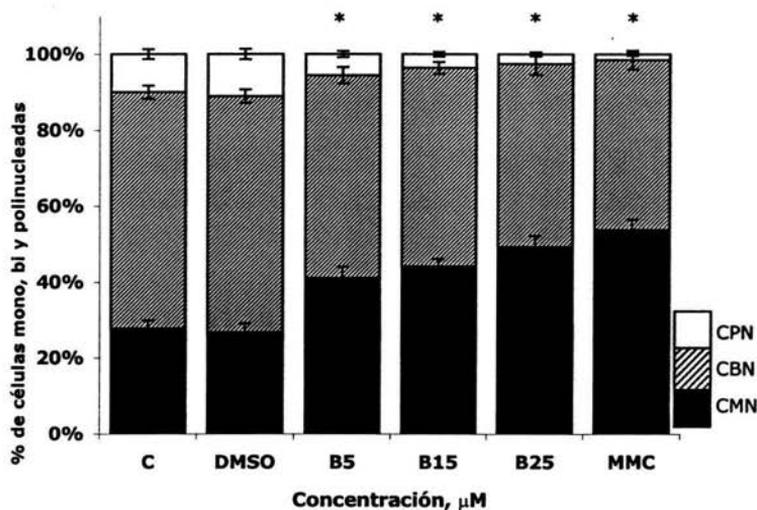


Figura 10. Cinética de proliferación de linfocitos humanos tratados con Argentatina B (5, 15 y 25  $\mu\text{M}$ ) y Mitomicina C (MMC) a 1  $\mu\text{M}$ . Las barras representan la media  $\pm$  E.E. de tres experimentos por duplicado de tres donadores diferentes ( $*p < 0.05$ ).

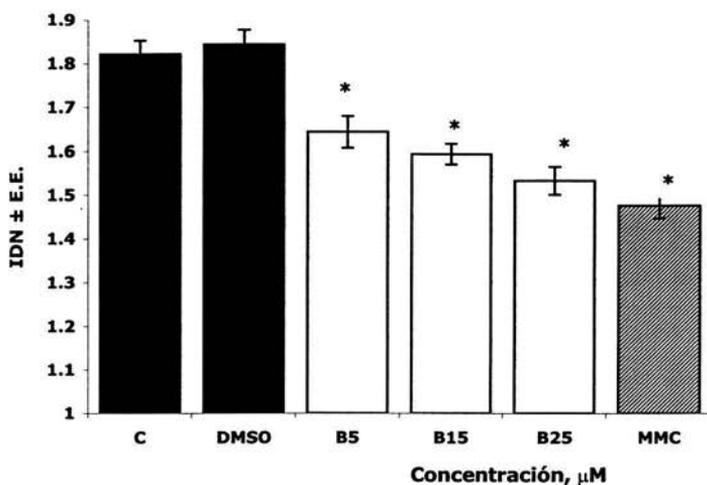


Figura 11. Índice de División Nuclear calculado para cada grupo de tratamiento con Argentatina B. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. de tres experimentos por duplicado de tres donadores diferentes (\* $p < 0.05$ ).

### Efecto genotóxico de las Argentatinas A y B.

Una vez realizados los ensayos para determinar si las Argentatinas A y B afectaban la viabilidad de linfocitos humanos estimulados y/o inducían modificaciones sobre la proliferación de estos, se realizaron los ensayos de genotoxicidad empleando las mismas concentraciones de los compuestos de prueba. Como se observa en las Figuras 12 y 13 ninguna de las dos Argentatinas evaluadas incrementan significativamente la frecuencia de CBN con MN a ninguna de las concentraciones de prueba.

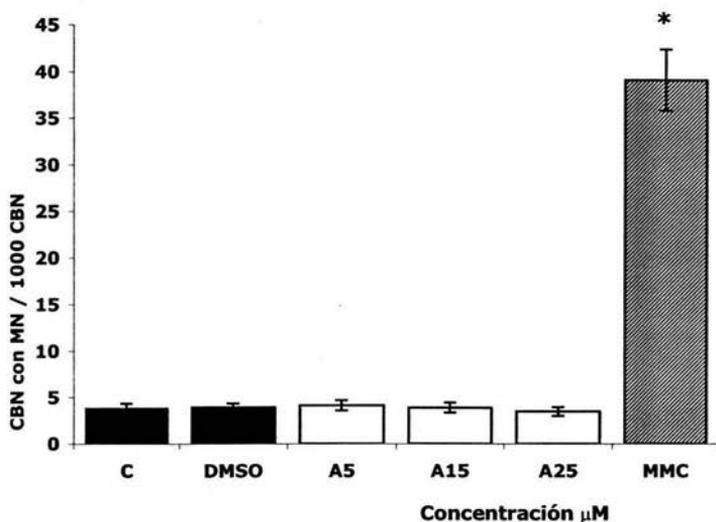


Figura 12. Efecto de la Argentinina A (5, 15 y 25  $\mu\text{M}$ ) y MMC (1 $\mu\text{M}$ ) sobre la frecuencia de CBN con MN. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. de tres experimentos por duplicado de tres donadores diferentes (\* $p < 0.05$ ).

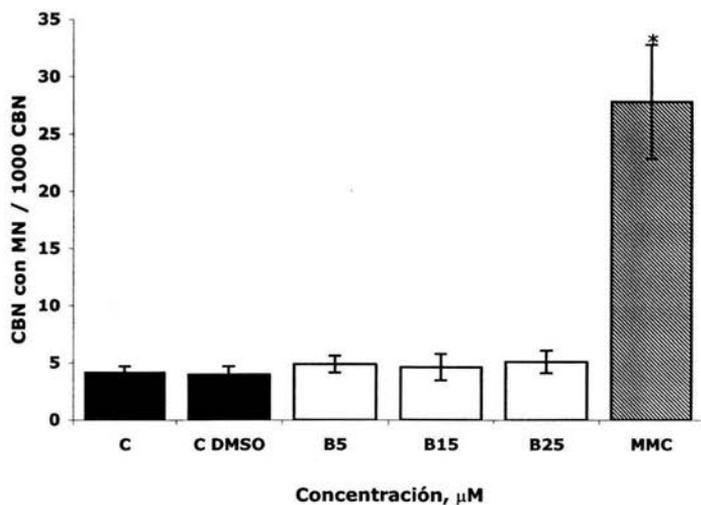


Figura 13. Efecto de Argentinina B (5, 15 y 25  $\mu\text{M}$ ) y MMC (1 $\mu\text{M}$ ) sobre la frecuencia de CBN con MN. Las barras representan la media  $\pm$  E.E. de tres experimentos por duplicado de tres donadores diferentes (\* $p < 0.05$ ).

## 6. DISCUSIÓN

*Parthenium argentatum*, Gray (guayule), es una especie endémica del norte de la República Mexicana que ha demostrado ser una fuente rica en compuestos biológicamente activos<sup>15, 23</sup>. Las Argentatinas A y B son los principales componentes del subproducto resinoso procedente de la industrialización de esta planta<sup>20-23</sup>.

En un estudio reciente, nuestro grupo de trabajo demostró que las Argentatinas A y B son citotóxicas en 5 diferentes líneas celulares de cáncer humano.

Considerando lo anterior, en este trabajo se evaluaron los efectos citotóxicos, citostáticos y genotóxicos de las Argentatinas A y B en linfocitos humanos de sangre periférica.

Debido a que en la actualidad la búsqueda de nuevos compuestos con actividad antineoplásica está basada principalmente en la evaluación de la actividad citotóxica *in vitro* sobre líneas celulares tumorales humanas; este trabajo propuso emplear linfocitos humanos como sistema biológico de células no cancerosas donde se evaluó la citotoxicidad de ambos compuestos mediante una técnica de doble tinción con FDA-BrEt<sup>35</sup>.

Como se observa en la Figura 6 la Argentatina A reduce la viabilidad celular en un 25% (Figura 6), mientras que la Argentatina B no mostró efectos sobre la viabilidad de en ninguna de las concentraciones evaluadas (Figura 7). Ya que no se observan diferencias significativas entre los grupos a los que se aplicó tratamiento y los grupos con DMSO, los resultados sugieren que el efecto citotóxico mostrado por la Argentatina A solo se debe a las diferencias estructurales entre esta y la Argentatina B.

Debido a que los agentes citostáticos muestran un gran potencial en el tratamiento del cáncer, se determinó el potencial citostático de las Argentatinas mediante la evaluación de dos parámetros, la CP y el IDN. La CP provee información acerca de la citostaticidad de un compuesto, ya que permite establecer

sí un xenobiótico es capaz de detener la proliferación celular. Este efecto se pone en evidencia si se observa que la población de células que no se han dividido en el tiempo de cultivo (CMN) es mayor en comparación a la observada en el control. De esta manera es posible inferir que si las células no se están dividiendo se debe a la presencia del compuesto de prueba en el cultivo; por lo tanto ese compuesto es capaz de detener el ciclo celular en cualquiera de sus fases.

Por su parte el valor numérico del IDN permite determinar el patrón de respuesta mitogénica inducida y así establecer si el compuesto empleado es capaz de inducir un efecto citostático. El valor calculado representa el efecto citostático global y no variaciones en la frecuencia de poblaciones celulares en el cultivo, como el caso de la CP.

Los resultados obtenidos demuestran que la Argentatina A no produce efectos sobre la proliferación ya que no modifica la proporción de células mono-, bi- o polinucleadas ni el IDN en ninguna de las tres concentraciones evaluadas (Figuras 8 y 9); estos resultados sugieren que la Argentatina A no se comporta como un agente citostático.

Por otra parte la Argentatina B sí es capaz de inducir un efecto citostático sobre linfocitos humanos estimulados. Como se observa en la Figura 10 la Argentatina B mostró un efecto dependiente de la concentración a partir de 5  $\mu\text{M}$  en donde se observó un incremento significativo en el porcentaje de células mononucleadas y la disminución del porcentaje de células bi- y polinucleadas. De la misma manera, los valores calculados de IDN disminuyeron significativamente a partir de la misma concentración (Figura 11).

Debido a que la Argentatina B no disminuyó la viabilidad celular en los cultivos tratados, el incremento en la cantidad de CMN y la disminución del IDN solo pueden atribuirse a la detención del ciclo celular en alguna de sus fases. Estos efectos producidos concuerdan con efectos antiproliferativos mostrados por otros triterpenos como el ácido ursólico (triterpeno pentacíclico) que ha demostrado ser

capaz de detener la proliferación arrojando a las células predominantemente en G<sub>0</sub> y G<sub>1</sub> <sup>16</sup>.

Como previamente se ha expuesto, más de un compuesto antineoplásico utilizado en la clínica es capaz de generar efectos genotóxicos <sup>30</sup>. Por esta razón, resultó importante para este trabajo realizar la evaluación de la genotoxicidad de las Argentatinas A y B.

La evaluación de la genotoxicidad de ambos compuestos de prueba se llevó a cabo empleando el modelo de MN. Como se observa en las Figuras 12 y 13, ninguno de los dos compuestos presentó actividad genotóxica *in vitro*, ya que no incrementaron la frecuencia de linfocitos binucleados con micronúcleos a las concentraciones evaluadas.

La formación de un MN puede llevarse a cabo de manera espontánea o inducida ya sea por eventos clastogénicos o aneugénicos; en otras palabras un MN está formado por un fragmento de cromosoma o por un cromosoma completo <sup>31-33</sup>. Si un compuesto induce la formación de MN se dice que este es capaz de dañar directamente al DNA (actividad clastogénica) y / o perturbar la "maquinaria mitótica" generando aneuploidias <sup>36</sup>. Ya que en el modelo lo permite y de conforme a los resultados obtenidos es posible descartar que:

- 1) ambos compuestos dañen de manera directa al DNA (actividad clastogénica) y,
- 2) que tengan actividad aneugénica *in vitro* en linfocitos humanos estimulados a las concentraciones evaluadas.

Por otra parte, el uso de los parámetros propuestos (CP, IDN y frecuencia de CBN con MN) nos permitió determinar que ambos compuestos presentan un patrón de actividad diferente. La Argentatina A es un compuesto citotóxico y que no presenta actividad citostática ni genotóxica *in vitro* en linfocitos humanos estimulados, mientras que la Argentatina B no es citotóxica ni genotóxica pero sí es capaz de inducir un efecto citostático comparable al inducido por la mitomicina C, sobre linfocitos en proliferación (Figuras 10 y 11). De hecho, no existen diferencias estadísticamente significativas entre el IDN calculado para la Argentatina B a 25µM

y el calculado para la Mitomicina C (MMC) a  $1\mu\text{M}$ . Esto sugiere que la Argentatina B es capaz de presentar efectos citostáticos con la misma eficacia que la MMC, no así con la misma potencia. Este resultado aunado a que la Argentatina B no es un compuesto citotóxico ni genotóxico en linfocitos humanos tratados *in vitro*, refleja la importancia de este compuesto y lo presenta como un candidato para futuras investigaciones.

## 7. CONCLUSIONES

La Argentatina A disminuye la viabilidad de linfocitos humanos a una concentración de 25  $\mu\text{M}$  en cultivos de linfocitos humanos, sin inducir efectos citostáticos ni genotóxicos a ninguna de las concentraciones evaluadas.

Por su parte la Argentatina B no presenta actividad citotóxica *in vitro* a ninguna de las concentraciones evaluadas; pero sí es capaz de inducir un efecto citostático *in vitro* a partir de 5 $\mu\text{M}$ , en linfocitos estimulados sin resultar genotóxico.

Tanto la Argentatina A como la Argentatina B carecen de actividad genotóxica *in vitro* sobre linfocitos humanos estimulados en las concentraciones evaluadas.

Los resultados de esta investigación demuestran la importancia de continuar con los estudios de la Argentatina B para la determinación de los mecanismos de acción, así como las relaciones estructura actividad de este tipo de compuestos.

## 8. BIBLIOGRAFIA

1. World Health Organization: <http://www.who.int/cancer/en/>
2. Gibbs, J. B. 2000. Mechanism-based target identification and drug discovery in cancer research. *Science* **287**, 1969-1973.
3. Katzung, B.G. 1999. Farmacología básica y clínica. 7ª edición. Ed. El Manual Moderno, México. pp 1011-1013.
4. Klug, S. W.; Cummings, R.M. 1999. Conceptos de Genética. 1ª. Edición, Ed. Prentice Hall Iberia, Madrid. pp 625-626.
5. a) SECRETARIA DE SALUD: <http://www.ssa.gob.mx>  
b) <http://www.dgepi.salud.gob.mx/diveent/RHNM.htm#situacion>
6. Chabner, B.A.; Calabresi, P. 1996. Quimioterapia de las enfermedades neoplásicas en Las bases farmacológicas de la terapéutica (Edit. Goodman y Gilman). 9a. edición, Ed. MacGraw-Hill Interamericana, New York, **Vol.2**. pp 1301-1309.
7. Kim, J. A. 2003. Targeted therapies for the treatment of cancer. *Am. J. Surg.* **186**, 264-268.
8. Papac, R. J. 2001. Origins of Cancer Therapy. *Yale J. Biol. Med.* **74**, 391-398.
9. Lee, K. H. 1999. Anticancer drug design based on plant-derived natural products. *J. Biomed. Sci.* **6**, 236-250.
10. Laza, L. D.; Rodríguez, L. I. 2003. Descubrimiento y desarrollo de agentes cancerígenos derivados de plantas medicinales. *Rev. Cubana Plant. Med.* [on line] **8** p.0-0. ISSN 1028-4796.
11. Setzer, W. N.; Setzer, M. C. 2003. Plant-Derived Triterpenoids as Potential Antineoplastic Agents. *Mini Rev. Med. Chem.* **3**, 540-556.

12. Da Rocha, A. B.; Lopes, R. M.; Schwartzmann, G. 2001. Natural products in anticancer therapy. *Curr. Opin. Pharmacol.* **1**, 364-369.
13. Barre, J. T.; Bowden, B. F.; Coll, J. C.; De Jesus, J.; De, L. F.; Janairo, G.C.; Ragasa, C. Y. 1997. A bioactive triterpene from *Lantana camara*. *Phytochem.* **45**, 321-324.
14. Zhu, M.; Chang, Q.; Wong, L. K.; Chong, F. S.; Li, R. C. 1999. Triterpene antioxidants from *Ganoderma lucidum*, *Phytother. Res.* **13**, 529-531.
15. Calzada, L.; Salazar, E-L.; Téllez, J.; Martínez, M.; Martínez, R. 1995. Effect of tetracyclic triterpenes (argentatins A, B and D) on the estradiol receptor of hormone-dependent tumors of human breast. *Med. Sci. Res.* **23**, 815-816.
16. Kim, D. K.; Baek, J. H.; Kang, C. M.; Yoo, M. A.; Sung, J. W.; Chung, H. Y.; Kim, N. D.; Choi, Y. H.; Lee, S. H.; Kim, K. W. 2000. Apoptotic activity of ursolic acid may correlate with the inhibition of initiation of DNA replication. *Int. J. Cancer* **87**, 629-636.
17. Li, J.; Guo, W. J.; Yang, Q. Y. 2002. Effects of ursolic acid and oleanolic acid on human colon carcinoma cell line HCT15. *World J. Gastroenterol.* **8**, 493-495.
18. Mizushina, Y.; Iida, A.; Ohta, K.; Sugawara, F.; Sakaguchi, K. 2000. Novel triterpenoids inhibit both DNA polymerase and DNA topoisomerase. *Biochem J.* **3**, 757-63.
19. Suh, N.; Honda, T.; Finlay, H. J.; Barchowsky, A.; Williams, C.; Benoit, N. E. 1998. Novel Triterpenoids suppress inducible nitric oxide synthase (iNOS) and inducible cyclooxygenase (COX-2) in mouse macrophages. *Cancer Res.* **58**, 717-723.
20. Rodriguez-Hanh, L.; Romo de Viva, A.; Ortega, A.; Aguilar, M.; Romo, J. 1970. Determinación de las estructuras de las Argentatins A, B y C del guayule. *Rev. Latinoamer. Quim.* **1**, 24-38.

21. Komoroski, R. A.; Gregg, E. C.; Shockcor, J. P.; Geckle, J. M. 1986. Identification of guayule triterpenes by two-dimensional and multipulse NMR techniques. *Magn. Res. Chem.* **24**, 534-543.
22. Martínez, R.; Martínez- Vázquez, M.; Zamorano-Macías, O. 1990. Electrón impact mass spectrometry of triterpenoids from Guayule. *Org. Mass Spectr.* **25**, 237-238.
23. Martínez-Vázquez, M.; Martínez R.; Espinoza, G. 1994. Antimicrobial properties of argentatine A isolated from *Parthenium argentatum*. *Fitoterapia* **LXV**, 371.
24. Semarnat:  
[http://carpetas.semarnat.gob.mx/pfnm3/fichas/parthenium\\_argentatum.htm](http://carpetas.semarnat.gob.mx/pfnm3/fichas/parthenium_argentatum.htm)
25. Monga, M.; Sausville, E.A. 2002. Developmental Therapeutics Program at the NCI: molecular target and drug discovery process. *Leukemia* **16**, 520-526.
26. Rojas, E. 1992. Evaluación de sustancias antineoplásicas. El cultivo de linfocitos como sistema de prueba. Tesis Doctoral en Ciencias Biológicas. UNAM. México D. F.
27. Ramirez, V.; Cuenca, P. 2001. Micronuclei frequency in lymphocytes of individuals occupationally exposed to pesticides. *Rev. Biol. Trop.* **49**, 1-8.
28. Mi-Young, A.; Tae-Hwan, K. 2002. Frequencies of micronuclei in peripheral lymphocytes in Korean populations after chronic low-dose radiation exposure. *J. Vet. Sci.* **3**, 213-218.
29. Rojas, E.; Herrera, L. A.; Sordo, M.; Gonsebatt, M. E.; Montero, R.; Rodríguez, R.; Ostrosky-Wegman, P. 1993. Mitotic Index an cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Anti-cancer Drugs* **4**, 637-640.

30. Tohamy, A. A.; El-Ghor, A. A.; El-Nahas, S. M.; Noshay, M. M. 2003.  $\beta$ -glucan inhibits the genotoxicity of Cyclophosphamide, adriamycin and cisplatin. *Mutat. Res.* **541**, 45-53.
31. Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. *Mutat Res.* **455**, 81-95.
32. Bonassi, S.; Fenech, M.; Lando, C.; Lin, Y. P.; Ceppi, M.; Chang, W. P.; Holland, N.; Kirsch-Volders, M.; Zeiger, E.; Ban, S.; Barale, R.; Bigatti, M. P.; Bolognesi, C.; Jia, C.; Giorgio, M. Di; Ferguson, L. R.; Fucic, A.; Lima, O. G.; Hrelia, P.; Krishnaja, A. P.; Lee, T. K.; Migliore, L.; Mikhalevich, L.; Mirkova, E.; Mosesso, P.; Muller, W. U.; Odagiri, Y.; Scarffi, M. R.; Szabova, E.; Vorobtsova, I.; Vral, A.; Zijno, A. 2001. HUMAN MicroNucleus project: international database comparison for results with the cytokinesis-block micronucleus assay in human lymphocytes: I. Effect of laboratory protocol, scoring criteria, and host factors on the frequency of micronuclei. *Environ. Mol. Mutagen.* **37**, 31-45.
33. Kirsch-Volders, M.; Elhajouji, A.; Cundari, E.; Van Hummelen, P. 1997. The in vitro micronucleus test: a multi-endpoint assay to detect simultaneously mitotic delay, apoptosis, chromosome breakage, chromosome loss and non-disjunction, *Mutat. Res.* **392**, 19-30.
34. Fenech, M.; Chang, W. P.; Kirsch-Volders, M.; Holland, N.; Bonassi, S.; Zeiger, E. 2003. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.* **534**, 65-75.
35. Yang, H.; Acker, J.; Chen, A.; McGann, L. 1998. In situ assessment of cell viability. *Cell transplant* **7**, 443-451.
36. Evans, H. J. 1997. Historical perspectives on the development of the in vitro micronucleus test: a personal view. *Mutat. Res.* **392**, 5-10.

## ANEXO

## Mecanismo de acción de los fármacos antineoplásicos <sup>6</sup>.

Los fármacos antineoplásicos utilizados en el tratamiento del cáncer, presentan una gran variedad de mecanismos de acción y pueden clasificarse en distintas clases según su actividad bioquímica y su origen.

■ **Agentes de alquilación.** Los agentes de alquilación son compuestos capaces de contribuir, en situaciones fisiológicas, con grupos alquilo a macromoléculas biológicas como el DNA. Los agentes de alquilación tienen en común la propiedad de convertirse en potentes electrófilos y formar enlaces covalentes con fracciones nucleófilas como grupos fosfato, amino, hidroxilo, sulfhidrilo, carboxilo e imidazol. Los efectos citotóxicos que presentan se deben a la alquilación del DNA ya que el nitrógeno 7 de la guanina es susceptible a la acción de agentes alquilantes. A diferencia de otros antineoplásicos específicos de una fase del ciclo celular estos agentes pueden actuar en cualquiera. Sin embargo su toxicidad es más evidente durante la etapa S del ciclo, bloqueando la progresión del mismo. Ejemplos de agentes alquilantes son: Mecloretamina, ciclofosfamida y melfalan.

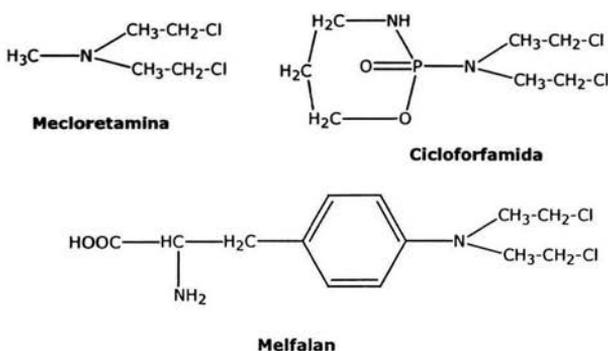


Figura 14. Estructuras químicas de agentes alquilantes.

■ **Antimetabolitos.** Estos fármacos tienen una de estructura similar a componentes del metabolismo intermediario. La mayoría de los fármacos de este grupo son análogos de bases púricas (*mercaptopurina*) y pirimidínicas (*fluorouracilo*). Estos compuestos que interfieren con la biodisponibilidad normal de los precursores de los nucleótidos de purina o pirimidina que participan en la biosíntesis de las bases nitrogenadas del DNA, por lo que actúan en la fase S del ciclo celular. Entre estos agentes se encuentran análogos del folato como el Metotrexato, que actúa inhibiendo la dihidrofolato reductasa, enzima que interviene en la síntesis de bases púricas y pirimidínicas.

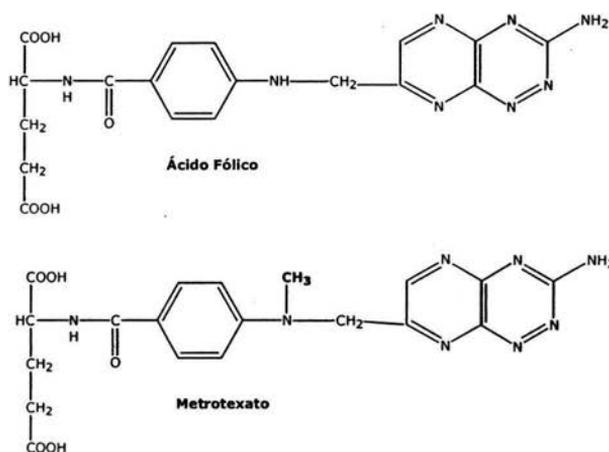


Figura 15. Estructuras químicas del ácido fólico y metotrexate.

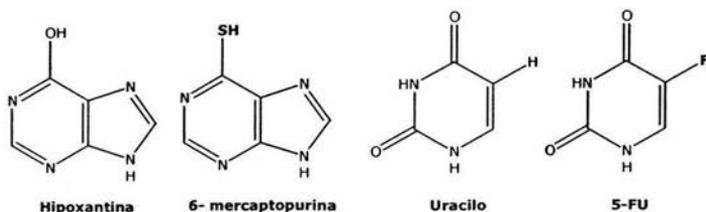


Figura 16. Estructuras químicas de análogos de purinas y pirimidinas.

- **Alcaloides vegetales.** Este tipo de moléculas son metabolitos secundarios nitrogenados extraídos de fuentes vegetales. De manera general se pueden dividir en dos grupos dependiendo del blanco molecular sobre el cual actúan:

**Antimitóticos.** Estos compuestos no afectan directamente al ADN, sino se unen a los microtúbulos, necesarios para formar el huso cromático en la mitosis, impidiendo su formación (alcaloides de la Vinca) o promoviendo la formación de estructuras microtubulares alteradas que no pueden participar en la mitosis (Taxoides). Ejemplos de inhibidores de microtúbulos son la Vinblastina y el Paclitaxel.

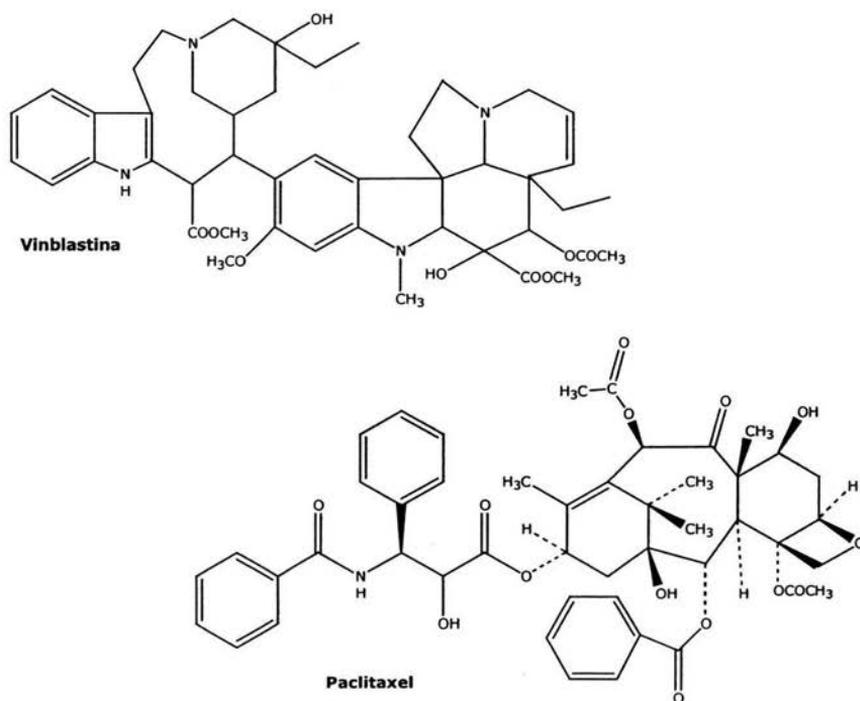


Figura 17. Estructuras químicas de inhibidores de antimitóticos.

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

**Inhibidores de topoisomerasas.** Esta clase de fármacos se compone de dos grupos diferentes: Las Podofilotoxinas y las Camptotecinas.

Del grupo de las *podofilotoxinas* destacan el Etopósido y tenipósido. Ambos son derivados semisintéticos de las podofilotoxinas que se extraen de la mandrágora. Estructuralmente son muy parecidos y ambos bloquean el ciclo celular en la fase S-G2 al inhibir la topoisomerasa II formando un complejo ternario fármaco-DNA-topoisomerasa II. Debido a la formación de este complejo se producen cortes de doble cadena, que no pueden ser restaurados.

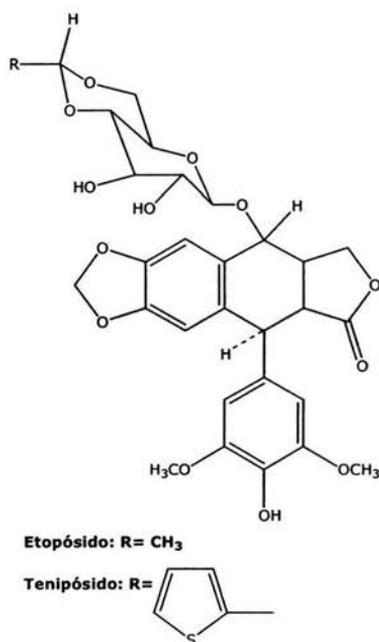


Figura 18. Estructura química de algunos inhibidores de las topoisomerasas.

Las *camptotecinas* son alcaloides vegetal derivados de *Camptotheca accuminata*. El Topotecan y el Irinotecan son los principales derivados. Ambos compuestos actúan inhibiendo a la topoisomerasa I, enzima responsable del corte y reparación de ADN monocatenario, por lo que su inhibición resulta en daño al DNA.

- **Antibióticos antitumorales.** Los antibióticos empleados en la terapéutica del cáncer tienen en común su origen natural, son producidos por hongos y tienen la capacidad de interferir con el crecimiento celular alterando el ADN por mecanismos variados. Algunos se fijan al ADN bloqueando la síntesis de ADN y ARN, otros ejercen sus efectos por su acción sobre la topoisomerasa II, los más producen rompimientos mono- o bicatenarios por generación de radicales libres. Además algunos son capaces de interactuar con las membranas celulares y afectar sus funciones. Ejemplos de este tipo de fármacos son la Mitomicina y la Doxorubicina (Adriamicina).

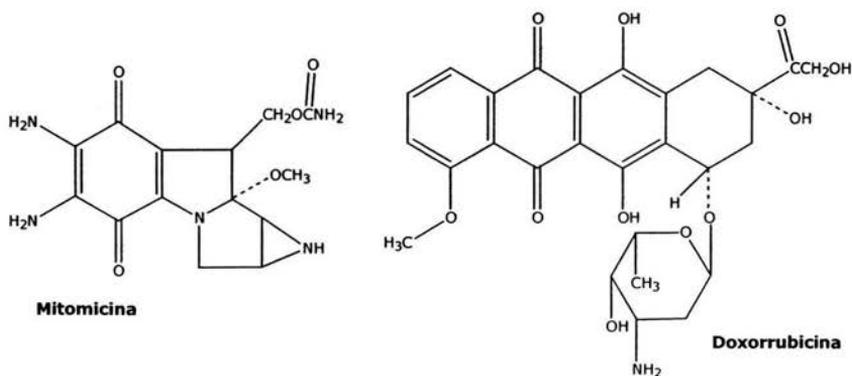


Figura 19. Estructura química de algunos antibióticos antitumorales.

■ **Agentes hormonales.** Este tipo de agentes terapéuticos se utilizan fundamentalmente en procesos dependientes del estímulo hormonal (como en el cáncer de mama y próstata). Pueden actuar bloqueando receptores o inhibiendo la formación de hormonas endógenas. Como consecuencia se inhiben los efectos promotores del crecimiento celular en determinados tejidos. Un ejemplo de este tipo de agentes es el Tamoxifeno.

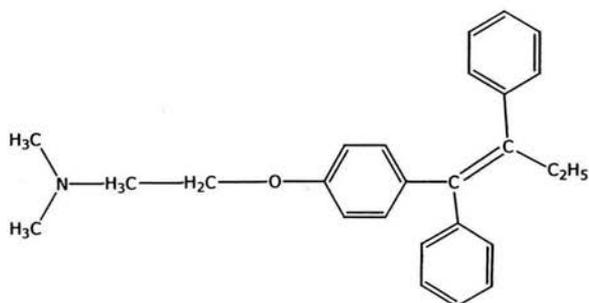


Figura 20. Estructura química del Tamoxifeno.

■ **Agentes diversos.** A este grupo pertenecen agentes con mecanismos de acción diversos. Ejemplos son el cisplatino que atraviesa la membrana plasmática por difusión pasiva y su citotoxicidad se relaciona con la formación de puentes intra- e intercatenarios en el DNA, inhibiendo la replicación y transcripción. La procarbazina, inhibe la síntesis de DNA y RNA y la actividad de la L-Asparaginasa, enzima que hidroliza la asparagina, privando a las células tumorales de este nutriente que no pueden sintetizar y que es necesario para la síntesis de proteínas.

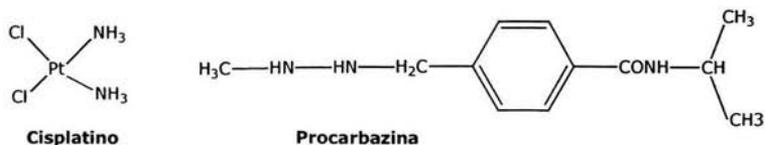


Figura 21. Estructura química de algunos agentes antitumorales diversos.