



300627

8

UNIVERSIDAD LA SALLE

2ej

Escuela de Química Incorporada a la U.N.A.M.

DETERMINACION "IN VITRO" DE LA DOSIS
EFECTIVA MEDIA DE ALGUNAS LACTONAS
SESQUITERPENICAS

TESIS PROFESIONAL
que para obtener el título de
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA :

Silvia Leticia Wong Arámbula

México, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está 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.

INDICE

	Página
I - Introducción.....	1
II - Generalidades.....	3
III - Objetivo.....	13
IV - Material y Métodos	
1.- Material Biológico.....	14
2.- Substancias Químicas.....	15
3.- Metodología de Trabajo.....	17
V - Resultados.....	20
VI - Discusión.....	27
VII - Conclusiones.....	32
VIII - Resumen.....	33
IX - Apéndices	
1.- Medio Basal de Eagle.....	34

2.- Azul de Tripán.....	35
3.- Solución de Tripsina.....	36
4.- Tinción de Jacobson.....	37
5.- Fórmulas empleadas en el análisis estadístico..	39
6.- Lista de abreviaturas.....	42
X - Bibliografía.....	43

I - INTRODUCCION

El cáncer en la humanidad representa una enfermedad que ha adquirido gran importancia debido a su frecuencia y alta mortalidad. Esto ha provocado que un gran número de investigadores dirijan sus estudios hacia su prevención y tratamiento.

El cáncer es un trastorno de la reproducción celular que lleva a una multiplicación ilimitada de determinados grupos de células que escapan a los controles normales del organismo. Esta reproducción desenfrenada generalmente se acompaña de una insuficiente diferenciación celular y resulta en la producción de una masa nueva que ocupa espacio en el organismo e infiltra los tejidos vecinos (6). Poco se sabe acerca del origen y desarrollo del cáncer; sin embargo, se han postulado numerosos agentes etiológicos, tanto físicos, químicos y biológicos, capaces de provocar cáncer en animales de experimentación, muchos de los cuales son frecuentes en el ambiente ecológico del hombre.

La selección del tratamiento adecuado es muy variable y depende de la extensión que haya alcanzado el proceso neoplásico y de su localización. La quimioterapia se enfoca al uso de productos de origen animal, vegetal, sintético, de fermentación o mineral, que han sido identificados como anticancerígenos de los que se han elegido principalmente aquellos con efecto inhibidor del crecimiento. De éstos, las lactonas sesquiterpénicas obtenidas de plantas despertaron el interés de algunos investigadores por su demostrada actividad anticancerígena, pro

piciando una gran cantidad de estudios, que van desde su obtención hasta experimentos de citotoxicidad "in vitro" e "in vivo".

II - GENERALIDADES

Los datos más antiguos que se conocen sobre el cáncer en humanos son los reportados por Sir Percival Pott, quien observó la elevada frecuencia del cáncer del escroto en los limpiadores de chimeneas de Londres y asoció la permanencia del hollín en los pliegues del escroto de los deshollinadores con la aparición de la enfermedad. Sin embargo, en cuanto a padecimientos ocupacionales, ya en el siglo XVI se tenía conocimiento de una enfermedad progresiva de los pulmones, invariablemente mortal, en los trabajadores de las minas de Erz en Sajonia; pero fué hasta 1879 que se le identificó como un proceso cancerígeno producido por radiación ionizante de Radón (6,20)

Los primeros trabajos experimentales de importancia fueron los realizados por Hanau en 1889 trasplantando un cáncer de una rata a otra, pero estos trabajos fueron despreciados hasta 1901 cuando Loeb realizó experimentos similares a mayor escala, siendo éstos concluyentes y demostrativos de que el cáncer es trasplantable.

Un adelanto importante en el campo de la etiología fué el descubrimiento de los que hoy son llamados virus oncogénicos. Los primeros datos fueron proporcionados por Sanarelli quien en 1898 reconoció la naturaleza viral de la mixomatosis del conejo, que es una condición similar al cáncer. Posteriormente, Ellermann y Bang reportaron causas similares en la leucemia de pollos y en 1911 Peyton Rous encontró que en el pollo un

sarcoma puede ser transmitido a otros animales de la misma especie por medio de un virus filtrable (14).

Después de las observaciones realizadas por Pott, muchos investigadores trataron de producir experimentalmente cáncer en animales utilizando materiales similares al hollín de las chimeneas. En 1916 los investigadores Yamagiwa e Ichikawa observaron que cuando las orejas de los conejos se untaban con alquitrán de hulla durante mucho tiempo, se producían papilomas los cuales terminaban en carcinomas. Esto desencadenó una intensa investigación a fin de encontrar la naturaleza química de la sustancia carcinógena; así, en 1930, Kennaway y Cook identificaron químicamente el 1,2,5,6-dibenzoantraceno, el primer agente carcinógeno descubierto (6).

Los esfuerzos para comprender esta enfermedad no se han detenido, y se sabe que el cáncer es una alteración en la reproducción celular sin control por el individuo, por lo que se le clasifica como una enfermedad neoplásica.

Tomando en cuenta el comportamiento biológico de las neoplasias, éstas se separan en dos grandes grupos: benignas y malignas. Un tumor o neoplasia benigna es aquella cuyo crecimiento es lento y solo compromete la vida del enfermo por su posición, su volumen o por sus secreciones. Un tumor maligno crece rápidamente, invade los tejidos circundantes y desarrolla focos secundarios de crecimiento tumoral (metástasis) en órganos distantes, que ocurre después de que las células cancerosas penetran a la sangre o vías linfáticas y son transportadas a --

otras partes del cuerpo (1).

Poco se sabe acerca del origen y desarrollo del cáncer; sin embargo, se han postulado numerosos agentes etiológicos tanto físicos, químicos y biológicos capaces de provocar cáncer en animales de experimentación, como los virus, las radiaciones ionizantes y una gran cantidad de productos químicos, muchos de los cuales son frecuentemente encontrados en el ambiente ecológico del hombre (36).

Se ha propuesto que el cáncer, en su evolución, presenta dos fases principalmente: 1) la fase de iniciación, que corresponde a alteraciones moleculares permanentes de la célula y 2) la fase de promoción, que se caracteriza por una proliferación celular. Esta teoría fué propuesta por Berenblum en 1941, quien comprobó que substancias que por ellas mismas no son carcinógenas, pueden estimular la carcinogénesis (promotores). Después de la iniciación con un carcinógeno, la aplicación de aceite de croton (promotor) aumenta el número de tumores y abre vía el período de latencia; dosis idénticas de iniciador y de aceite de croton, administradas en orden invertido, no proporcionaron tumores (1,49).

Está comprobado que la célula neoplásica plenamente desarrollada difiere en varios aspectos de la célula normal. En la célula cancerosa los núcleos presentan de manera característica pleomorfismo, esto es, variación en el tamaño y forma; el núcleo es desproporcionadamente voluminoso para las células, y la relación núcleo-citoplasma puede acercarse a 1:1 en lugar

de la cifra normal 1:4 o 1:6 (42). Otro carácter importante es la formación de células tumorales gigantes, algunas de las cuales poseen exclusivamente un núcleo polimórfico voluminoso, en tanto que otras tienen dos o más núcleos en la misma célula.

Los estudios con el microscopio electrónico han añadido poca información a la caracterización de las células neoplásicas, pero se han encontrado algunas alteraciones como simplificación del retículo endoplásmico rugoso, donde también se advierten deficiencias de enzimas del tipo de estererasas y fosfatasas, y variación en el volumen y forma de las mitocondrias. Frecuentemente las células neoplásicas utilizan mecanismos glucolíticos incluso en presencia de aportes adecuados de oxígeno, fenómeno conocido como "Efecto Warburg"; parece que este efecto depende de una disfunción de las mitocondrias, quizá bajo el estímulo de las elevadas demandas energéticas de la población celular en rápida división (19,35,51).

Los cambios en la membrana celular son de lo más estudiados y se han encontrado disminución en la adhesividad celular, disminución en la inhibición por contacto, permeabilidad anormal a ciertas enzimas intracelulares, reaparición de antígenos embrionarios y desaparición de algunos antígenos órgano-específicos, así como anomalías en la biosíntesis de ácidos grasos y proteínas (5,19,44,52).

Los tratamientos médico-quirúrgicos están encaminados a la destrucción de los tumores y la selección del mismo depende de la extensión que haya alcanzado el proceso neoplásico. _

Básicamente, los tratamientos son de cuatro tipos: quirúrgicos, radioterápicos, inmunoterápicos y quimioterápicos.

** Cirugía.

Como tratamiento para tumores localizados, la cirugía puede ser muy efectiva porque reduce el volumen del tumor y la posibilidad de metástasis. Así, la cirugía es considerada como tratamiento primario cuando la neoplasia es pequeña y la cantidad de tejido que es necesario quitar para tener un adecuado margen de escisión no es demasiado. Sin embargo, muchos tumores son inoperables debido al grado de propagación en el momento del diagnóstico, o debido a su posición y a la pérdida de la función que podría resultar en la muerte del individuo (34).

** Radioterapia.

La radioterapia tiene la ventaja sobre la cirugía de menor mutilación. En radioterapia los resultados óptimos se obtienen cuando el tumor es totalmente erradicado y el tejido normal circundante muestra poca o ninguna evidencia de daño funcional o estructural. El factor importante en este tratamiento es la diferencia en radiosensibilidad de las células normales y neoplásicas. La diferencia depende de la capacidad de reparación intracelular de las células normales y neoplásicas y de la habilidad de los órganos normales para continuar funcionando si

están dañados parcialmente. Cuando el tejido que circunda a un tumor puede tolerar la dosis de radiación aplicada al tumor, entonces el tumor es radiosensible. Sin embargo, al igual que en el tejido normal, diferentes tumores poseen diferentes radiosensibilidades, existiendo casos en que se requieren dosis tan altas que no es posible utilizar este tratamiento (9).

Algunos de los efectos de la radiación pueden aparecer durante o al finalizar el tratamiento, como son: náuseas, vómito y baja de la presión sanguínea, que generalmente son reversibles. Sin embargo, a largo plazo, la radiación altera el sistema de información de las células siendo más sensibles las de rápida división o las de tejidos en crecimiento. Esta alteración se atribuye a modificaciones del ADN teniendo como consecuencia enfermedades como cataratas y cáncer en la piel, entre otras (12,21,31,45,48).

** Inmunoterapia.

Dado que el sistema inmunológico del huésped puede estar involucrado en el control del proceso maligno, se están haciendo investigaciones en el campo de la inmunología. Algunos tumores animales han sido tratados con éxito con inmunoterapia activa y pasiva, y se han establecido ciertos principios basados en estos experimentos que podrían ser aplicados a estudios en humanos. Para una reducción máxima del tumor se debe aplicar primeramente un tratamiento quirúrgico, radioterápico o qui

mioterápico, y el huésped debe ser inmunocompetente. La mayoría de los agentes anticancerígenos son inmunopresivos, y después de que el paciente se recobra de estos efectos, su actividad inmunológica puede estar temporalmente elevada, hecho que podría resultar en un tiempo óptimo para la inmunoterapia.

La aplicación de la inmunoterapia al control de tumores malignos en humanos aparece como prometedora. Sin embargo, en este momento las aproximaciones no han producido respuesta comparable a otras modalidades terapéuticas. Es necesaria más investigación adicional antes de que el papel de la inmunoterapia en el manejo de pacientes con cáncer pueda ser definida. Su mayor utilidad está probablemente como complemento de la cirugía, radioterapia y quimioterapia (9).

** Quimioterapia.

La quimioterapia es la única esperanza para las víctimas de leucemia y tumores sólidos inalcanzables por la cirugía y radioterapia, aún cuando no exista una sola sustancia efectiva para todos los casos. El primer intento afortunado de quimioterapia del cáncer se cree que fué el uso del líquido de Fowler en 1865 para el tratamiento de las leucemias; pero no fué hasta la introducción de mostazas nitrogenadas, hormonas y antagonistas de ácido fólico, durante los años 40, que inició el desarrollo de la quimioterapia del cáncer.

La adquisición de nuevos agentes con valor quimioterap

péutico resulta una tarea difícil dado que los agentes anticancerígenos deben ser letales o bien incapacitar a las células tumorales sin provocar un daño excesivo a las células normales. Para conseguir nuevos agentes anticancerígenos más específicos se han explorado una gran variedad de fuentes que incluyen la síntesis química y microbiana, extractos de plantas y muchas modificaciones análogas. De acuerdo con Montgomery y colaboradores (33), los agentes quimioterápicos pueden clasificarse en:

- | | |
|------------------------|-------------------------|
| a) agentes alquilantes | d) productos de plantas |
| b) antimetabolitos | e) hormonas |
| c) antibióticos | f) agentes varios |

Las plantas han sido particularmente valiosas en la búsqueda empírica de nuevos fármacos, ya que existe un legado histórico enorme de variados usos de preparaciones de plantas en medicina. Muchas clases de sustancias químicas activas biológicamente tienen su origen en el reino vegetal, como la morfina que dió lugar a todos los analgésicos narcóticos y la cocaína que condujo a cientos de anestésicos locales. Un punto de gran importancia a favor de las plantas es la estructura química del principio activo, que tiende a ser compleja y podría ser difícil de ser sintetizada; también la estereoquímica de los productos vegetales es en general compleja y de los compuestos relacionados que han sido preparados y probados, los isómeros naturales tienden a tener la mayor actividad (17,37).

De los principios activos derivados de las plantas, los que han presentado mayores posibilidades como agentes anti-

cancerígenos son los alcaloides y los terpenos (8). Los sesqui-
terpenos se caracterizan por tener un esqueleto básico de quin-
ce átomos de carbono formado por una repetición regular de uni-
dades de isopreno. Los sesquiterpenos son sustancias cataloga-
das como metabolitos secundarios y son casi inodoras debido a
su baja volatilidad; pero la mayoría presentan sabor amargo,
siendo particularmente intenso en las lactonas sesquiterpénicas
que se han encontrado principalmente en extractos de flores o
partes aéreas de las plantas compuestas (18). Las lactonas son
sustancias de farmacología poco estudiada, pero las sesquiter-
pénicas despertaron gran interés (especialmente aquellas susti-
tuídas con muchas funciones oxígeno) ya que se demostró que al-
gunas de ellas como la elefantina y la elefantopina, presentan
actividad citotóxica contra la leucemia linfocítica P-388 en ra-
tones y contra el carcinoma de Walker (256-WM) en ratones (10,
28).

Por lo tanto, se inició una gran búsqueda de lactonas
sesquiterpénicas con posible actividad citotóxica (26,29,30).
Kupchan y colaboradores, al trabajar con este tipo de compues-
tos, encontraron que la mayoría de las lactonas biológicamente
activas eran α -metilen- γ -lactonas que tenían otros grupos fun-
cionales tales como epóxido, éster insaturado, lactona insatura-
da y grupos cetona insaturados. De sus estudios posteriores
concluyeron que una de las estructuras básicas requeridas para
la actividad citotóxica de las lactonas era el grupo α -metilen-
 γ -lactona, ya que la hidrogenación de este sistema producía

compuestos inactivos. Así mismo, encontraron una gran reactividad de este grupo funcional con tioles y enzimas como la fosfofructocinasa (16,22,23,27).

En México ya se han realizado estudios utilizando lactonas sesquiterpénicas (15,38,47). En el desarrollo del presente trabajo se utilizaron sustancias con esta estructura, aisladas en el Instituto de Química de la UNAM.

III - OBJETIVO

Determinar en dos líneas celulares, una de origen normal y otra de origen canceroso, la concentración de las lactonas sesquiterpénicas denominadas VO₅ y Dilactona I, que inhiba el 50% del crecimiento celular y, por otra parte, hacer estudios morfológicos de las células tratadas con ambas lactonas como parte inicial de una serie de estudios que permitan saber si es posible su aplicación en estudios "in vivo".

IV - MATERIAL Y METODOS

1.- Material Biológico.

En el presente trabajo se utilizaron dos líneas celulares diferentes, Hep-2C y L929, las cuales poseen las siguientes características:

a) Hep-2C, carcinoma epidérmico laríngeo humano.

Fué establecida en 1952 y proviene de tumores que fueron producidos en ratas destetadas, radiadas y tratadas con cortisona, después de una inoculación con un carcinoma epidérmico proveniente de la laringe de un hombre de 56 años. Ha sido utilizada para estudios experimentales de producción de tumores en ratas, hamsters, ratones y pacientes voluntarios con cáncer terminal. Se cultiva en medio basal de Eagle (apéndice 1). La morfología es del tipo de las células epiteliales y su cariólogía presenta un número modal de cromosomas de 76 con un rango entre 73-79; se han encontrado varios cromosomas marcadores, siendo los más frecuentes 2 cromosomas largos con centrómeros subterminales (41).

b) L929, fibroblastos derivados de tejido conectivo murino LM proveniente de una clona NCTC 929 L de ratón.

La cepa L original fué derivada de tejido areolar subcutáneo y adiposo normal de un ratón macho C3H/An de 100 días. La cepa L fué empleada inicialmente en estudios de carcinogénesis "in vitro". La clona 929 ha sido utilizada en el desa-

rollo de estudios nutricionales, metabólicos, enzimáticos, virales, inmunológicos, toxicológicos, etc. Se cultivan en medio basal de Eagle (apéndice 1). Su morfología es del tipo de los fibroblastos y su cariología presenta un número modal de cromosomas de 66 con un rango entre 56-241. Un cromosoma largo metacéntrico con una constricción secundaria se observa en el 77% de las células (41).

En el momento de iniciar los experimentos, las líneas celulares Hep-2C y L929 se encontraban en los subcultivos número 184 y 85 respectivamente en el Laboratorio de Biología Celular, después de ser obtenidas del American Type Tissue Collection.

2.- Substancias Químicas.

En el Instituto de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México se realizó un estudio de la *Zinnia flavicom* para establecer si su composición química era semejante a la encontrada en otras especies de *Zinnia*, las cuales se han caracterizado principalmente por su contenido de elemenólidas.

Del extracto de raíz y parte aérea de esta planta, se aislaron 8 nuevos compuestos, 6 de los cuales poseen estructura de elemendiólidas y las 2 restantes son elemenólidas. La estructura y estereoquímica de estas lactonas fué elucidada mediante técnicas espectroscópicas.

De las substancias extraídas, en el presente trabajo

se utilizó una de ellas, a la que se denominó como Dilactona I. Esta sustancia tiene un punto de fusión entre 221-224°C y posee la estructura que se presenta en la figura 1 (39).

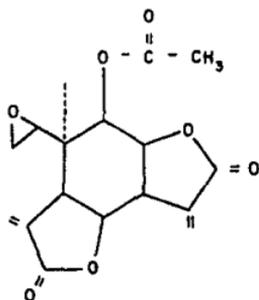


Figura 1.- Estructura de la Dilactona I

La otra sustancia que fué utilizada es una lactona denominada VO₅ obtenida de plantas de la familia de los Glaucólidos, cuyo punto de fusión se encuentra entre 176-178°C y posee probablemente la estructura representada en la figura 2 -- (46).

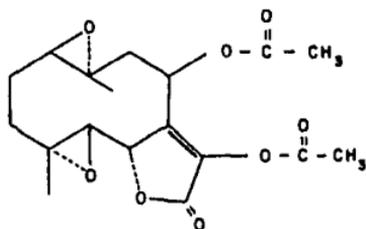


Figura 2.- Estructura probable de la lactona VO₅

3.- Metodología de Trabajo.

En el desarrollo del proyecto se tomó en consideración los compuestos a probar, que en este caso fueron dos lactonas proporcionadas por el Instituto de Química de la UNAM ya cristalizadas y purificadas, así como las líneas celulares que fueron una de origen normal (L929) y otra de origen neoplásico (Hep-2C).

Se sembraron para cada dosis y controles ocho tubos Leighton sin laminilla y tres tubos con laminilla. La selección del número de tubos estuvo basada en experimentos previos realizados en el Laboratorio de Biología Celular con los que se determinó que este número ofrecía validez estadística. Los tubos sin laminilla se utilizaron para conteo celular y los tubos con laminilla para test de exclusión y análisis morfológico.

Se sembraron aproximadamente 60,000 células por mililitro en medio basal de Eagle suplementado con 10% de suero fetal bovino, 100 UI de penicilina por mililitro y 100 ug de estreptomycinina por mililitro (apéndice 1). Los tubos se incubaron durante 24 hrs. a 37°C en atmósfera de 95% de aire y 5% de CO₂. Al término de este tiempo se prepararon las diferentes dosis de los compuestos a experimentar de la siguiente manera:

- a) pesar 1 mg del compuesto.
- b) disolver el compuesto en 50 ul de propilenglicol con ligero calentamiento.
- c) agregar 10 ml de medio basal de Eagle.
- d) de esta solución preparar las diluciones a las concentraciones

nes deseadas.

Se cambió el medio de cultivo original por el medio _
conteniendo los compuestos en estudio a las dosis de 50 a 0.1 _
ug/ml, así como el control por medio fresco para cada línea ce-
lular y compuesto. Los tubos se incubaron nuevamente bajo las_
mismas condiciones durante 72 hrs. Al final de la incubación _
se realizaron las siguiente pruebas:

1.- Test de exclusión o % de viabilidad celular.

El procedimiento fué el siguiente:

- a) de un tubo con laminilla desechar el medio de cultivo.
- b) añadir 1 ml de azul de tripán (apéndice 2).
- c) dejar actuar el colorante durante 5 min.
- d) sacar la laminilla del tubo Leighton y colocarla sobre un _
portaobjetos de manera que las células queden en contacto _
con el cristal.
- e) llevar a cabo 4 conteos de 100 células cada uno en diferen--
tes zonas utilizando microscopio de luz.

2.- Conteo celular.

Se realizó de la siguiente manera:

- a) de un tubo sin laminilla decantar el medio de cultivo en un_
frasco de 20 ml etiquetado en forma adecuada.
- b) lavar el tubo con 2 ml de solución salina al 0.9%
- c) eliminar la solución salina en el frasco etiquetado.
- d) agregar al tubo 1 ml de tripsina al 0.25% y dejarla actuar _

hasta que se despeguen las células (apéndice 3).

- e) agitar el tubo y vaciar la tripsina en el frasco etiquetado.
- f) lavar el tubo 2 veces con 8 ml de solución salina y vaciar al frasco obteniendo un volumen total de 20 ml.
- g) contar las células en un contador electrónico de partículas (Coulter Counter model B. Hialeah, Fla. USA).

3.- Análisis morfológico.

Se realizó mediante el siguiente procedimiento:

- a) eliminar el medio de cultivo de un tubo con laminilla.
- b) lavar 3 veces con 3 ml de solución salina al 0.9%
- c) agregar 5 ml de metanol para fijar las células.
- d) tapar el tubo y dejar el metanol por un mínimo de 20 min. y un máximo de 15 días.
- e) teñir por el método de Jacobson (apéndice 4).
- f) llevar a cabo 3 conteos de 1000 células cada uno en diferentes zonas utilizando microscopio de luz.

Para determinar si existía relación entre las dosis y los resultados obtenidos, así como para localizar la dosis efectiva media exacta de cada compuesto, se llevó a cabo el estudio estadístico denominado Probitas (Probits) que es una de las variantes de correlación lineal. Las fórmulas utilizadas en este estudio se encuentran en el apéndice 5 (7,11).

V - RESULTADOS

Los experimentos iniciales realizados para el estudio citotóxico de cualquier fármaco requieren un análisis preliminar. En este proyecto se realizaron pruebas con cada una de las lactonas a dosis de 100, 10 y 1 ug/ml, con el fin de localizar la dosis que inhibiera el 50% de crecimiento en relación al control (4).

Los presentes resultados muestran el estudio más detallado con dosis más cercanas al valor obtenido en el estudio preliminar, con el propósito de precisar la Dosis Efectiva media (DE_{50}).

Los valores obtenidos de la evaluación citotóxica de las dos lactonas con dos diferentes líneas celulares están anotados en las tablas 1 y 2.

Como puede observarse en la tabla 2, con la Dilactona I el 50% de inhibición del crecimiento en la línea Hep-2C en relación al control se localizó en la dosis de 1ug/ml, mientras que en la dosis de 0.1ug/ml no hubo inhibición celular. Con la línea fibroblástica L929 no se trabajó con la dosis de 50ug/ml ya que no se observó crecimiento celular con esta dosis en la línea epitelial Hep-2C (ver tabla 1). En la línea fibroblástica la DE_{50} experimental se localizó entre las dosis de 1 y 0.1ug/ml.

La DE_{50} calculada fué de 1.51ug/ml y 0.26ug/ml con la línea Hep-2C y L929 respectivamente (ver tabla 3). Las diferen

cias observadas en la DE_{50} fueron estadísticamente significativas cuando se efectuó la comparación de promedios por medio de la "t de student" para muestras independientes. Aparentemente existe una relación dosis-respuesta en ambas líneas celulares, sin embargo, el coeficiente de correlación fué de 0.58 para la línea Hep-2C y 0.81 para L929 los cuales no mostraron significancia estadística para regresión lineal.

En cuanto al análisis morfológico, en la tabla 4 se puede observar que la línea Hep-2C sufrió una elevada inhibición que no permitió que se llevaran a cabo lecturas que fueran significativas a las dosis de 50 y 10ug/ml; pero a la dosis de 5ug/ml se observó un elevado porcentaje de células multinucleadas en relación al control que disminuyó junto con la dosis llegando hasta un 84% en la dosis de 0.1ug/ml. Por lo que respecta al número de mitosis no se observó relación con la dosis siendo estos datos similares o por arriba del control como se ve en la dosis de 0.1ug/ml. En la línea fibroblástica L929 se presentó también una elevada inhibición que no permitió obtener lecturas a las dosis de 10 y 5ug/ml. A la dosis de 1ug/ml se observó una elevación tanto en el porcentaje de células multinucleadas como en el porcentaje de mitosis en relación al control que disminuyó en ambos casos a la dosis de 0.1ug/ml.

Por lo que respecta al compuesto VO_5 se estudiaron las dosis de 50, 10, 5 y 1ug/ml. Con la dosis de 50ug/ml se observó un mayor porcentaje de inhibición del crecimiento celular

en la línea L929 que en la línea Hep-2C; sin embargo la DE_{50} experimental se localizó en la dosis de 10ug/ml aproximadamente para ambas líneas celulares (ver tabla 2).

Por medio del análisis estadístico se obtuvieron las DE_{50} de 7.24ug/ml para la línea epitelial Hep-2C y de 9.24ug/ml para la línea fibroblástica L929, mismas que se muestran en la tabla 3. A diferencia de la lactona anterior, en las células L929 y Hep-2C al aumentar la dosis la inhibición fué mayor en una correlación lineal de tipo dosis-respuesta ($r = 0.98$ para L929 y $r = 0.85$ para Hep-2C).

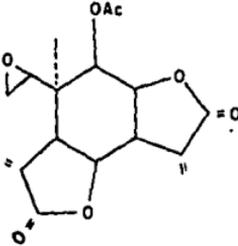
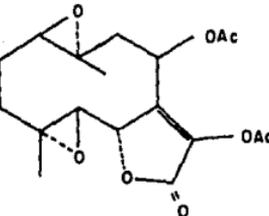
De los datos del análisis morfológico, en la línea epitelial Hep-2C se observó una elevación en el porcentaje de células multinucleadas en relación al control que decreció junto con la dosis, pero aún a la dosis de 1ug/ml este porcentaje se mantuvo por arriba del control (ver tabla 5). En las mitosis se presentó una elevación sobre el 100% con respecto al control solo en la dosis de 50ug/ml, mientras que en las dosis restantes los porcentajes se encontraron por debajo del control en una proporción muy similar entre si. En la línea L929 no se obtuvieron lecturas a la dosis de 50ug/ml por las razones expuestas en el caso de la Dilactona I. Esta línea presentó un marcado aumento en el porcentaje de células multinucleadas con relación al control siendo el mayor de éstos 3 veces más a la dosis de 10ug/ml. Los porcentajes de mitosis con respecto al control mostraron una disminución importante ya que todos ellos fueron aproximadamente el 50% del control.

Tabla 1

Compuesto	Dosis (ug/ml)	% crecimiento* Hep-2C	% crecimiento* L929
Dilactona I	50	0	----
	10	2.82 ± 4.04	0.31 ± 0.08
	5	21.35 ± 0.74	0.89 ± 0.71
	1	53.50 ± 5.72	31.33 ± 4.10
	0.1	117.99 ± 11.8	72.42 ± 5.25
VO ₅	50	20.27 ± 0.82	0.77 ± 0.10
	10	40.11 ± 17.3	51.07 ± 7.88
	5	75.87 ± 9.80	59.45 ± 8.13
	1	82.04 ± 6.83	77.79 ± 11.4

* El % de crecimiento y la desviación estándar se obtuvieron a partir del promedio de los experimentos, considerando al control como el 100% de crecimiento en cada línea celular.

Tabla 2

Compuesto	Línea celular	Dosis (ug/ml)	% inhibición crecimiento	% viabilidad
<p>Dilactona I</p> 	Hep-2C	50	100	0
		10	97.18	8
		5	78.65	53
		1	46.50	82
		0.1	0*	94
	L929	10	99.69	3
		5	99.11	3
		1	68.67	80
0.1		27.58	83	
<p>VO₅</p> 	Hep-2C	50	70.73	50
		10	59.89	60
		5	24.13	84
		1	17.96	90
	L929	50	99.23	4
		10	48.93	53
		5	40.55	87
		1	22.21	77

* Se considera valor 0 ya que el crecimiento celular fué similar o ligeramente superior al control.

Tabla 3

Compuesto	Línea celular	DE ₅₀	Límites de confianza inferior	confianza superior
Dilactona I	Hep-2C	1.51ug/ml	1.01ug/ml	2.23ug/ml
	L929	0.26ug/ml	0.00012ug/ml	1.06ug/ml
VO ₅	Hep-2C	7.24ug/ml	2.62ug/ml	31.55ug/ml
	L929	9.24ug/ml	--- *	--- *

* debido a que la relación entre la pendiente y el error estándar es muy grande, los valores para los límites de confianza no son significativos.

Tabla 4. Análisis morfológico de células tratadas con el compuesto Dilactona I

Línea celular	Dosis (ug/ml)	Células mononucleadas #	Células multinucleadas		Mitosis	
			#	%	#	%
Hep-2C	Control	924	50	100	26	100
	50	---	--	---	---	---
	10	---	--	---	---	---
	5	871	102	204	27	104
	1	886	91	182	23	88
	0.1	920	42	84	38	146
L929	Control	971	15	100	14	100
	10	---	--	---	---	---
	5	---	--	---	---	---
	1	912	72	180	16	114
	1	912	72	180	16	114
	0.1	983	12	80	5	36

Tabla 5. Análisis morfológico de células tratadas con el compuesto VO₅

Línea celular	Dosis (ug/ml)	Células mononucleadas	Células multinucleadas		Mitosis	
		#	#	%	#	%
Hep-2C	Control	937	44	100	19	100
	50	889	88	200	23	121
	10	915	70	159	15	79
	5	915	70	159	15	79
	1	921	65	147	14	74
L929	Control	958	22	100	20	100
	50	---	--	---	--	---
	10	920	70	318	10	50
	5	953	34	155	13	65
	1	951	40	182	9	45

VI - DISCUSION

De los datos experimentales obtenidos se puede hacer _
notar que la Dilactona I fué la más efectiva de los dos compues-
tos analizados puesto que las DE_{50} para ambas líneas celulares _
fueron mucho menores que las correspondientes para la lactona _
 VO_5 . De acuerdo a los protocolos para el análisis de agentes _
químicos y productos naturales en contra de tumores animales y _
otros sistemas biológicos, establecidos por el Cancer Chemothe-
rapy National Service Center (CCNSC, Drug Evaluation Branch, -
National Cancer Institute, National Institute of Health, ---
Maryland) (4), en el protocolo #1-1.901 para cultivo de tejidos
el criterio secuencial para extractos de plantas dice que la Do-
sis Efectiva media (DE_{50}) deberá ser menor o igual a 30ug/ml pa-
ra la fase 1 y menor o igual a 20ug/ml para la fase 2, pudiendo_
llevarse a cabo ambas fases de estudio en el mismo laboratorio.

Así, de acuerdo a este criterio, las dos sustancias _
analizadas cumplieron con el requisito de tener una dosis menor_
o igual a 20ug/ml en la segunda fase en las dos líneas celulares
ya que la dosis efectiva media más alta encontrada corresponde a
9.24ug/ml para la lactona VO_5 y la más pequeña a 0.26ug/ml para_
la Dilactona I.

La Dilactona I mostró ser más tóxica a dosis de 50 y _
10ug/ml con la línea epitelial Hep-2C y aún a 5ug/ml con la lí-
nea L929, como se muestra en el análisis de viabilidad celular _
(ver tabla 2), en donde los porcentajes de muerte celular están_

por arriba del 90%. Estos valores corresponden a porcentajes de crecimiento sumamente bajos (menores al 5%) lo que puede indicar que la muerte celular provocada por la alta toxicidad del compuesto impidió el crecimiento celular (ver tabla 1). Así mismo, se pudo observar que la citotoxicidad disminuyó conforme la dosis fué menor obteniéndose, por lo tanto, porcentajes de crecimiento mayores.

Con la lactona VO₅ únicamente en la línea L929 y a dosis de 50ug/ml se presentó el mismo efecto de muerte celular drástica. Con las dosis restantes y en ambas líneas celulares el efecto fué inversamente proporcional a la dosis administrada.

En relación al análisis morfológico se encontró, para la línea Hep-2C tratada con la Dilactona I, el doble de células multinucleadas respecto al control a las dosis de 5 y 1ug/ml, y un número menor al control para la dosis de 0.1ug/ml. Estos datos pueden sugerir que a las dosis de 5 y 1ug/ml el proceso de división celular sufrió alteración (43), de acuerdo a lo reportado por Siskin. Sin embargo, a la dosis más baja las células multinucleadas volvieron casi a la normalidad con relación al control, pero hubo un incremento en el número de mitosis, mismo que podría explicarse con el crecimiento celular ligeramente por arriba del control (ver tabla 1). En la línea L929 se observó una variación de las células multinucleadas similar al mostrado por la línea Hep-2C, siendo importante señalar la disminución en el número de mitosis con respecto al control en la dosis menor, cuya posible explicación está en el crecimiento celular por aba-

jo del control y en relación directa con el efecto citotóxico del compuesto.

Analizando los resultados obtenidos con la lactona VO_5 , se encontró aumento en el número de células multinucleadas en todas las dosis probadas en la línea Hep-2C, con ligeras variaciones en el número de mitosis que indicaron posibles alteraciones del proceso de división celular (43), sin que se tuviera una dosis en la que el compuesto no causara este efecto. En la línea L929 se observó un aumento de más del 100% con respecto al control de células multinucleadas que fué acompañado de una importante disminución en el número de mitosis que podría indicar un efecto tanto en la división celular (43) como en el crecimiento celular.

La estructura química de los compuestos fué deducida mediante análisis realizados en el Instituto de Química de la UNAM, y muestra diversos grupos funcionales diferentes para cada uno de los compuestos. La Dilactona I posee dos grupos α -metilen- γ -lactona, un grupo epóxido y un acetato lateral. La lactona VO_5 presenta un grupo γ -lactona- α, β -insaturado, dos grupos epóxido y dos acetilos.

Kupchan y colaboradores, al trabajar con este tipo de compuestos, realizaron estudios tratando de encontrar cuales de los grupos funcionales de las lactonas contribuyen a la citotoxicidad de los compuestos (27). De sus estudios preliminares encontraron que la mayoría de las lactonas biológicamente activas eran α -metilen- γ -lactonas que tenían otros grupos

funcionales tales como epóxido, éster insaturado, lactona insaturada y grupos cetona insaturados. La demostrada actividad de estos grupos funcionales con tioles los llevó a pensar en una alquilación de centros nucleofílicos biológicos, que comprobaron haciendo reaccionar los compuestos con cisteína observando que el enlace se llevaba a cabo entre el grupo sulfhidrilo y el metileno exocíclico de la γ -lactona (22).

Al continuar los estudios tanto Kupchan y colaboradores (23) como Lee y colaboradores (29) concluyeron que una de las estructuras básicas requeridas para la actividad citotóxica de las lactonas era este grupo α -metileno- γ -lactona y que la hidrogenación de este sistema producía compuestos inactivos.

De los compuestos utilizados en el presente estudio, la Dilactona I es la que posee dos grupos funcionales de este tipo, por lo que se puede pensar en una doble adición de grupos tiol (provenientes de cisteína, por ejemplo) por molécula de compuesto, siendo posiblemente por este medio el modo de acción del compuesto. El producto probable de adición se muestra en la figura 3 (22).

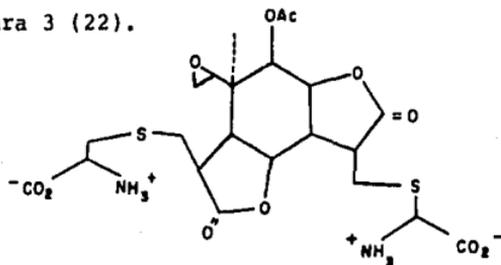


Figura 3.- Producto probable de adición de la Dilactona I con cisteína

La otra lactona, VO₅, no presenta el grupo α -metileno- γ -lactona, y el único sitio posible de reacción, de acuerdo a la literatura, es el grupo γ -lactona- α,β -insaturado. De acuerdo con Kupchan y colaboradores (24) los productos de adición de cisteína a este tipo de lactonas son mucho menos estables que los productos de exocíclicos análogos, así como también los compuestos endocíclicos presentan una menor reactividad. Este razonamiento va de acuerdo a los resultados experimentales del presente estudio en los que se observó una menor citotoxicidad por parte de este compuesto (VO₅) en comparación con una citotoxicidad muy significativa (de acuerdo a lo establecido por Kupchan que habla de una DE₅₀ menor o igual a 4ug/ml para considerar un compuesto significativamente citotóxico) (27) del compuesto Dilactona I que presenta el ya mencionado grupo α -metileno- γ -lactona.

VII - CONCLUSIONES

- 1.- Ambas sustancias estudiadas presentaron un efecto citotóxico directo con respecto a la dosis en las dos líneas celulares.
- 2.- Para la Dilactona I se obtuvo una DE_{50} de 1.51ug/ml para la línea Hep-2C y de 0.26ug/ml para la línea L929. Para la lactona VO_5 las DE_{50} fueron de 7.24ug/ml para la línea Hep-2C y de 9.24ug/ml para la línea L929.
- 3.- Las dosis efectiva media encontradas cumplieron con los requerimientos establecidos por el CCNSC para productos naturales extraídos de plantas para continuar su estudio como agente potencial anticancerígeno.
- 4.- La Dilactona I fué la sustancia más efectiva, porque a dosis más bajas se obtuvo el efecto deseado.
- 5.- La estructura química de los compuestos puede ser determinante en la citotoxicidad de éstos, de acuerdo a los estudios de Kupchan, Lee y otros investigadores (22,23,27,29).
- 6.- Es factible continuar los estudios con ambos compuestos con un modelo tumoral en ratones.

VIII - RESUMEN

Se probaron dos compuestos extraídos de plantas denominados VO₅ y Dilactona I en dos líneas celulares, Hep-2C y L929. Por lo tanto, se llevaron a cabo análisis morfológicos, de viabilidad celular y conteos celulares.

Se determinó la Dosis Efectiva media de cada compuesto y se observó su efecto sobre las células. De las dos lactonas, la Dilactona I presentó la mayor actividad citotóxica. Es posible continuar los estudios "in vivo" con ambos compuestos.

Apéndice 1

Medio Basal de Eagle

Medio en polvo suministrado por: Grand Island Biological Co.
3175 Stanley Road P.D. Box 68
Grand Island, N.Y. 14072
Cat #F-15 MEM

Para 5 litros:	Medio basal de Eagle en polvo	49.0 g
	Bicarbonato de sodio	11.0 g
	Piruvato de sodio 0.01M	50.0 ml
	Suero fetal bovino	500 ml
	Estreptomina	100 ug/ml
	Penicilina	100 UI/ml

Preparación:

Disolver el medio en polvo y el bicarbonato de sodio por separado en 1 litro de agua destilada. Mezclarlos, agregar el piruvato de sodio y aforar a 5 litros. Agitar bien y quitar 500 ml de la solución; agregar el suero fetal bovino, la estreptomina y la penicilina. Filtrar el medio lo antes posible.

Apéndice 2

Azul de Tripán

Colorante en polvo suministrado por: Roboz Surgical Instrument
Co. Inc.
810, 18th street, New York
Washington, D.C. 20006

Preparación: Solución amortiguadora de fosfatos 0.2M 100 ml
a pH 7.2
Azul de tripán en polvo 0.1 g

Preparación solución amortiguadora 0.2M

Sol. A: Fosfato de sodio monobásico 27.58 g
Agua destilada 1000 ml

Sol. B: Fosfato de sodio dibásico 28.38 g
Agua destilada 1000 ml

Para obtener pH 7.2 mezclar 28 ml de la solución A, 72 ml de la solución B y llevar a 200 ml.

Apéndice 3

Solución de Tripsina 0.25%

Preparación:

Agregar 2.5 g de tripsina en polvo a 1 litro de solución PD (IX) conc. Agregar la tripsina y la solución PD en un frasco grande y colocarlo sobre la plancha magnética durante -- 1 hr. Dejar reposar la solución de 30 min a 1 hr a 4°C. Esterilizar por filtración.

Preparación solución PD (IX) conc.

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.15 g
KH ₂ PO ₄	0.2 g
Rojo fenol	10.0 mg
Agua destilada	1000 ml

Colocar las sales en un recipiente de 1 litro y llenar con el agua destilada. Conservar a 4°C. Antes de usar, ca-
lentar a temperatura ambiente hasta que todas las sales estén _
en solución.

Apéndice 4

Tinción de Jacobson

Técnica:

- 1.- Teñir la laminilla previamente fijada con metanol con May _
Grünwald recién filtrado durante 20 min.
- 2.- Teñir con Giemsa diluido 1:10 y filtrado durante 15 min.
- 3.- Deshidratar en dos cambios de acetona y dos cambios de --
acetona-xilol durante 5 min cada uno.
- 4.- Pasar a xilol por un mínimo de 20 min.
- 5.- Montar sobre un portaobjetos con bálsamo de Canada.

Preparación de colorantes.

May Grünwald:	May Grünwald en polvo	0.3 g
	Alcohol metílico	100 ml

Giemsa:	Giemsa	0.8 g
	Glicerina	50 ml
	Alcohol metílico	50 ml

Moler el Giemsa y la glicerina en un mortero. Pasar _
a un frasco y calentar a baño maría entre 55 y 60°C hasta que _
el colorante se disuelva. Enfriar y agregar el alcohol. Guar-

dar de 2 a 3 semanas. Filtrar y guardar en botella oscura. Se diluye con solución amortiguadora stock.

Preparación solución amortiguadora stock.

Sol. A: Fosfato de sodio dibásico anhidro	9.5 g
Agua destilada	1000 ml

Sol. B: Fosfato de potasio monobásico	9.7 g
Agua destilada	1000 ml

Sol. de trabajo: Sol. A	61.1 ml
Sol. B	38.9 ml
Agua destilada	900 ml

La dilución en la solución amortiguadora stock se realiza mezclando 1 parte de Giemsa por 3 partes de la solución - amortiguadora.

Fórmulas empleadas en el análisis estadístico

* Media

$$\bar{x} = \frac{x_1 + x_2 + x_3 + \dots + x_n}{n}$$

* Desviación estándar

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

* Coeficiente de correlación

$$r = \frac{(SP_{xy})^2}{(SS_x)(SS_y)}$$

donde $SP_{xy} = xy - \frac{(\sum x)(\sum y)}{N}$

$$SS_x = x^2 - \frac{(\sum x)^2}{N}$$

$$SS_y = y^2 - \frac{(\sum y)^2}{N}$$

la significancia de r se estimó por la expresión:

$$t = \sqrt{\frac{r^2 (N - 2)}{1 - r^2}}$$

tomando como nivel de significancia un valor de $p < 0.05$

* Probits

Este método trabaja con una escala arbitraria de logaritmos base 10 para las dosis y una tabla de valores ya calculados que corresponden a los % de crecimiento con respecto al control.

$$b = \frac{SP_{xy}}{SS_x}$$

$$S_{yx}^2 = \frac{1}{N-2} \left[SS_y - b(SP_{xy}) \right]$$

$$S_{yx} = \sqrt{S_{yx}^2}$$

$$m = \frac{\bar{y} - \bar{y} - (b)(\bar{x})}{b}$$

donde $y = 5$ (Probit 5)

m = valor medio que corresponde a la DE_{50} en la escala logarítmica arbitraria

Para transformar de la escala logarítmica arbitraria al valor real en $\mu\text{g/ml}$:

$$DE_{50} = (m) (\log F) - (\log I)$$

donde $\log F$ = logaritmo del factor de diferencia de las dosis

$\log I$ = logaritmo del punto inicial

* Límites de confianza

$$g = \frac{t^2 (S_{yx}^2)}{b^2 (SS_x)}$$

donde t corresponde a una $P < 0.05$

$$\text{lim. confianza} = \frac{1}{1-g} \left[(m - \bar{x}) \pm \frac{t (S_{yx})}{b} \sqrt{\frac{1-g}{N} + \frac{(m - \bar{x})^2}{SS_x}} \right]$$

* t de student para muestras independientes

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{\sqrt{\frac{(N_1 - 1) (S_1^2) + (N_2 - 1) (S_2^2)}{N_1 + N_2 - 2} \left(\frac{1}{N_1} + \frac{1}{N_2} \right)}}$$

donde S^2 = varianza

t con una $P < 0.05$

Apéndice 6

Lista de abreviaturas

ADN - Acido desoxiribonucleico
UI - Unidades Internacionales
ug - microgramos
mg - miligramos
g - gramos
ul - microlitros
ml - mililitros
lt - litros
min - minutos
hrs - horas

X - BIBLIOGRAFIA

- 1.- Beremblum, I. 1974. Carcinogenesis as a Biological Problem. 1st ed., 7, Holland: North-Holland Publs.
- 2.- Cairns, J. 1975. The cancer problem. Sci. Amer. 233:64-78
- 3.- Campbell, T.C. 1980. Chemical carcinogens and human risk - assessment. Fed. Proc. 39:8;2467-2470
- 4.- Cancer Chemotherapy National Service Center. Protocols for _ screening chemical agents and natural products against animal tumors and other biological systems, in Cancer Chemotherapy Reports. 1st ed., 32, No. 25. (1962)
- 5.- Coman, D.R. 1974. Decreased mutual adhesiveness. A property of cells from squamous cell carcinomas. Cancer Res. --- 4:625-630
- 6.- Correa, F., Arias, J., Pérez Tamayo, R., Carbonell, L. 1970. Texto de Patología. 1a edición, 486, México: La Prensa Médica Mexicana.
- 7.- Daniel, W.W. 1979. Bioestadística. 1a ed., 243, México: _ Editorial Limusa.
- 8.- De Vita, V., Busch, H.S. 1979. Cancer drug development. - Part A. 1st ed., 100, USA: Academic Press.
- 9.- De Vita, V.T. 1980. Principles of cancer therapy, in -- Harrison's principles of internal medicine. 9th ed., 1597, _ USA: Mc Graw-Hill Book Company.

- 10.- Domínguez, X.A. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. 1a ed., 93, México: Editorial Limusa.
- 11.- Golstein, A. 1967. Biostatistics. 4th ed., 129, USA: - The Macmillan Company, New York
- 12.- Gon, K.O., Bauman, A., Bakemeier, A., Lee, H. and Woll, J.B. 1978. Leukemia in radiation treated patients: citogenetic _ studie in 8 cases. Amer. J. Med. Sci. 276:189-195
- 13.- González Diddi, M., Trujillo, J.M. y Drewinko, B. 1969. - Viabilidad de células inmunocompetentes, en cultivo de tejidos, después de tripsinización. Bol. Asoc. Mex. Patol. - (Mex.) 7:113-117
- 14.- Gross, L. 1970. Oncogenic viruses. 2nd ed., 7, USA: - Pergamon Press.
- 15.- Guerrero, C., Díaz, E. 1983. Estructura de la verafinina__ B, una elemenólida nueva aislada de *Verbesina aff. coahuilensis*. Rev. Latinoamer. Quim. 14:2;70-72
- 16.- Hanson, R.L., Lardy, H.A. and Kupchan, S.M. 1970. --- Inhibition of Phosphofructokinase by Quinone Methide and - α -Methylene Lactone Tumor Inhibitors. Science. 168:378-380
- 17.- Hartwell, J.L., Abbott, B.T. 1969. Antineoplastic --- principles in plants: Recent developments in the field, in Advances in pharmacology and chemotherapy. 1st ed., 117, USA: Academic Press.
- 18.- Herout, V. 1971. Biochemistry of sesquiterpenoids, in Aspects of terpenoid chemistry and biochemistry. 1st ed., _ 53, England: Academic Press.

- 19.- Hoelzé, D.F., Wallach, M.D. Generalized membrane defects in cancer. *Medical Progress*. 284:14;761-767
- 20.- Hopps, H.C. 1960. Patología. 1a ed., 226, México: Editorial Interamericana.
- 21.- Kollman, R.F. 1968. Methods for the study of radiation -- effects on cancer cells, in Methods in Cancer Research. - 1st ed., 309, vol IV, USA: Academic Press.
- 22.- Kupchan, S.M., Fessler, D.C., Eakin, M.A. and Giacobbe, T.J. 1970. Reactions of Alpha Methylene Lactone Tumor Inhibitors with Model Biological Nucleophiles. *Science*. 168:376-377
- 23.- Kupchan, S.M. 1970. Recent advances in the chemistry of -- tumor inhibitors of plant origin. *Trans. N.Y. Acad. Sci.* -- 32:85-106
- 24.- Kupchan, S.M., Giacobbe, T.J., Krull, I.S., Thomas, A.M., -- Eakin, M.A. and Fessler, D.C. 1970. Reaction of endocyclic α,β -unsaturated γ lactones with thiols. *J. Org. Chem.* -- 35:10;3539-3543
- 25.- Kupchan, S.M. 1970. Recent advances in the chemistry of -- terpenoid tumor inhibitors. *Pure Appl. Chem.* 21:227-246
- 26.- Kupchan, S.M., Davies, V.H., Fujita, T., Cox, M.R. and -- Bryan, R. 1971. Liatrin, a novel antileukemic sesquiterpen lactone from *Liatris chapmanii*. *J. Amer. Chem. Soc.* -- 93:19;4916-4918
- 27.- Kupchan, S.M., Eakin, M.A. and Thomas, A.M. 1971. Tumor -- inhibitors. 69. Structure-cytotoxicity relationships among the sesquiterpene lactones. *J. Med. Chem.* 14:12;1147-1152

- 28.- Kupchan, S.M. 1974. Novel natural products with antitumor activity. Fed. Proc. 33:11;2288-2295
- 29.- Lee, K.H., Huang, E.S., Piantadosi, C., Pagano, J.S. and Geissman, T.A. 1971. Citotoxicity of sesquiterpene lactones. Cancer Research. 31:1649-1654
- 30.- Lee, K.H., Hall, I.H., Mar, E.C., Starnes, C.O., Elgebaly, S.A. and Waddell, T.G. 1977. Sesquiterpene antitumor agents: inhibitors of cellular metabolism. Science. 196:533-537
- 31.- Mark, P., Johns, H.E. 1967. Ultraviolet effects on polynucleotids, in Canadian Cancer Conference. 1st ed., 353, vol 7, USA: Academic Press.
- 32.- Miller, E.C., Miller, J.A. 1981. Mechanisms of chemical carcinogens. Cancer. 47:1050-1064
- 33.- Montgomery, J.A., Johnston, T.P. and Shealy, Y.F. 1970. Drugs for neoplastic diseases, in Medicinal Chemistry. 3rd ed., 680, USA: Wiley-intescience.
- 34.- Mulligan, R.M. 1951. Syllabus of human neoplasms. 1st ed., 17, USA: Lea & Febiger.
- 35.- Murray, R.K., Suss, R. and Pitot, H.C. 1967. Isolation and characterization of cytoplasmic components of cancer cells, in Methods in Cancer Research. 1st ed., 239, vol II, USA: Academic Press.
- 36.- Nelson, N. 1981. Cancer prevention: enviromental, industrial and occupational factors. Cancer. 47:1065-1070

- 37.- Neuss, N., Gorman, M. and Johnson, I.S. 1967. Natural products in cancer chemotherapy, in Methods in Cancer Research. 1st ed., 633, vol III, USA: Academic Press.
- 38.- Ortega, A., Maldonado, E. 1984. Guaianolides from *Gochnatia Smithii*. Phytochemistry. 23:7;1507-1509
- 39.- Ortega, A., Maldonado, E. 1984. Nuevas dilactonas de *Zinnia flavicomma*. XI Simposium Internacional Química de Productos Naturales. Monterrey, N.L., México.
- 40.- Pérez Tamayo, R. 1965. Principios de patología. 1a ed., 501, México: La Prensa Médica Mexicana.
- 41.- Registry of animal cell lines. Certified by the Cell Culture Collection Committee. 1st edition. US Department of Health, Education and Welfare. (1964)
- 42.- Robbins, S.L., Contran, R.S. 1984. Patología estructural y funcional. 2a ed., 133, México: Nueva Editorial Interamericana.
- 43.- Sisken, J.E. 1981. Inhibitors and Stimulators in the Study of Cytokinesis, in Mitosis/Cytokinesis. 1st ed., 437, USA: Academic Press.
- 44.- Staehelin, L.A., Hull, E.B. 1978. Junction between living cells. Sci. Amer. 238:140-152
- 45.- Suit, H.D. 1967. Effects of radiation on tumor in animals, in Canadian Cancer Conference. 1st ed., 389, vol 7, USA: Academic Press.
- 46.- Taboada, J. Comunicación personal.

- 47.- Téllez Martínez, J., Taboada, J. y González Diddi, M. 1980. Citotoxicidad de algunas lactonas sesquiterpénicas "in vitro". Arch. Invest. Med. (Mex.) 11:435-443
- 48.- Thomas, E.D., Cronkite, E.P. 1980. Radiation injury, in Harrison's principles of internal medicine. 9th ed., 941, USA: Mc Graw-Hill Book Company.
- 49.- Van Lancker, J.L. 1977. Molecules, cells and disease. 1st ed., 273, USA: Springer-Verlag New York Inc.
- 50.- Waizel Bucay, J. 1979. Cultivo, aislamiento y variación de principios activos de tres especies de plantas, con propiedades anticancerígenas. (Tesis Doctor en Ciencias Biológicas) Colegio de Ciencias y Humanidades. UNAM.
- 51.- Weinhouse, S. 1955. Oxidative metabolism of neoplastic tissues, in Advances in Cancer Research. 1st ed., 270, - vol III, USA: Academic Press.
- 52.- Weiss, P. 1963. Cell interactions, in Canadian Cancer Conference. 1st ed., 241, vol V, USA: Academic Press.