



78
2Ej

Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

**“EVALUACION DEL EFECTO CITOTOXICO
DE METABOLITOS SECUNDARIOS DE
LABIADAS MEXICANAS”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A:
MARIA RUIZ CAMPOS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

México, D. F.

1988



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.

I N D I C E

	PAG.
RESUMEN	1
ANTECEDENTES	4
OBJETIVOS	43
MATERIAL Y METODOS	44
RESULTADOS	52
DISCUSION	62
CONCLUSIONES	73
APENDICES	74
BIBLIOGRAFIA	80

RESUMEN

El cáncer es un conjunto de enfermedades caracterizadas por la presencia de células malignas que crecen en forma incontrolada, invadiendo tejidos adyacentes y diseminándose hacia órganos distantes dando lugar a la formación de metástasis o tumores secundarios. Actualmente existen varios tratamientos terapéuticos, en los que se encuentra la quimioterapia.

La quimioterapia del cáncer está dirigida a destruir todas las células malignas por medio de sustancias químicas definidas, sin dañar a las células normales, desafortunadamente, aún no se han encontrado sustancias que actúen de esta manera, por lo que la quimioterapia actual ataca a ambas por igual (14); sin embargo existe un grupo numeroso de investigadores que trabajan para este fin.

Existe una gran variedad de productos químicos usados en la quimioterapia del cáncer, algunos con buenos resultados. Sin embargo, subsiste la necesidad de encontrar agentes quimioterapéuticos con un amplio espectro de actividad antitumoral y menor toxicidad que los agentes usados actualmente.

En México, además de lo mencionado, la necesidad de importación de estos productos, y su costo muy elevado, hace que el desarrollo y la investigación de productos antineoplásicos tenga alta prioridad. Conscientes de esta situación, un grupo de investigadores del Instituto de Química de la UNAM, en colaboración con el Instituto de Biología, han dirigido sus esfuerzos al estudio de extractos de plantas, ya que algunas de estas sustancias han evidenciado actividad antitumoral.

El interés en los productos naturales se basa en que de las plantas de la familia Labiatae se han aislado una variedad de bi y triciclos diterpenoides que muestran propiedades antitumorales (10,36), y tomando en cuenta que en México, la familia Labiatae está representada aproximadamente por 50 géneros y 350 especies; entre ellas el género *Salvia* del que se conocen casi 300 especies (26). En el Instituto de Química, en colaboración con el Instituto de Biología, se ha emprendido un estudio sistemático, tanto botánico como fitoquímico, de especies mexicanas de este género. Así, un grupo de investigadores del Instituto de Química ha logrado aislar varios productos diterpénicos cuya estructura está muy relacionada con la de la taxodiona, producto aislado por Kupchan y colaboradores de *Taxodium distichum*, y que mostró propiedades citotóxicas (17). El objetivo principal del presente trabajo, es determinar si alguna de las sustancias obtenidas presenta actividad citotóxica.

(3)

En el presente trabajo se llevó a cabo una investigación con respecto a citotoxicidad y posible efecto antitumoral de 8 metabolitos extraídos de plantas del género *Salvia* de la familia Labiatae; los cuales fueron proporcionados por el Instituto de Química de la UNAM, utilizando^d dos líneas celulares; el mieloma murino X63 Ag 8 (H-2^d) y el linfoma murino L5178y (H-2^d).

Los metabolitos se probaron a diferentes dosis en sistemas in vitro en dichas células y en condiciones preestablecidas; se obtuvo la curva dosis-respuesta para cada uno de los compuestos, realizándose análisis de evaluación de la viabilidad.

De los resultados obtenidos se concluyó que 3 de estas sustancias presentan un efecto citotóxico a la célula tumoral; pese a ello este no es un resultado definitivo, es necesario que se lleven a cabo estudios en células normales para saber el efecto en ellas, además de ver el efecto en sistemas in vivo.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Las investigaciones realizadas sobre el cáncer se iniciaron en el año de 1775, cuando el científico Sir Percival Pott realizó los primeros estudios sobre un carcinoma de escroto presentado por los mineros expuestos al contacto cotidiano con el hollín. (39,40).

Las investigaciones en materia del cáncer han avanzado notablemente en las últimas décadas, algunas de las conclusiones a las que se han llegado, indican que el cáncer es una alteración que afecta a todos los organismos pluricelulares, dando como resultado la reproducción celular incontrolada de un tejido, por lo que se clasificó como enfermedad neoplásica (39).

Las neoplasias se clasifican en 2 grandes grupos: Neoplasias benignas y Neoplasias malignas (40).

Las neoplasias benignas son tumores que suelen estar formados por células semejantes a las de origen, se diferencian bien aunque hayan sufrido alteraciones por lo que se forma la masa tumoral (40).

Las neoplasias malignas son tumores constituidos por células que han perdido totalmente su semejanza con las células normales; son

células pleomórficas, se altera la membrana celular y se pierde el fenómeno de inhibición por contacto, etc. (40). Otra característica de las células neoplásicas malignas, es que tienen la facultad de dar metástasis, cosa que los tumores benignos no presentan (40).

Para que una metástasis se presente deben existir varios factores:

1) Liberación de células o fragmentos tumorales que tengan la capacidad de supervivencia autónoma.

2) Vías de diseminación

3) Condiciones adecuadas en el sitio de implantación para que la siembra cozca (40).

La etiología de las neoplasias es muy grande por lo que se clasifican en 3 grupos:

1.- Agentes Químicos: En este grupo se encuentran los carcinógenos, que son sustancias químicas capaces de incrementar de modo significativo la proporción de cáncer en una población dada de seres vivos (40); los carcinógenos se pueden encontrar en los alimentos, como aditivos, por ejemplo edulcorantes, colorantes, conservadores, etc; como contaminantes, por ejemplo insecticidas, fungicidas y herbicidas; como resultado del proceso de conservación, por ejemplo ahumado, asado, curado, etc. (40).

2.- Agentes Físicos: En este grupo se encuentran las radiaciones como son: Rayos X, Rayos U.V., Rayos solares y Rayos gamma (40).

3.- Agentes Biológicos: Estos se subdividen en 2 grupos:

a) Predisposición genética.

b) Virus. (39,40).

TRATAMIENTO DEL CANCER

En general la terapia del cáncer está dirigida hacia la inhibición del crecimiento tumoral, tratando de que el resto del organismo no se dañe. Estos tratamientos pueden ser de 4 tipos:

1.- Cirugía

2.- Radioterapia

3.- Inmunoterapia

4.- Quimioterapia

los cuales pueden ser utilizados solos o combinados. (39).

La elección del método o métodos ideales de tratamiento, depende de una serie de factores como son: La situación del tumor o del órgano dañado, el tiempo de evolución, la determinación de la malignidad del mismo y en consecuencia los posibles focos de metástasis, el tipo de tumor, es decir, si es sólido o de órganos hematopoyéticos, etc. (39).

CIRUGIA

La cirugía esta conciderada como el tratamiento de elección de muchos cánceres; en muchos pacientes la cirugía no es curativa totalmente, sino que es parcial o paliativa, con el fin de disminuir la sintomatología y prolongar la esperanza de vida (39,40).

RADIOTERAPIA

Es utilizada frecuentemente después de la cirugía; debe tomarse en cuenta la radiosensibilidad del tumor y dependiendo de ésta, será el grado de radiación que se dé (39,40).

INMUNOTERAPIA

La aplicación de la inmunoterapia en el control del cáncer en humanos, está siendo otra de las posibles alternativas para el tratamiento de esta enfermedad, aunque los resultados no han producido respuestas comparables con otros tratamientos, por lo que probablemente se use como complemento (39,40).

QUIMIOTERAPIA

La quimioterapia en el cáncer esta orientada a destruir las células malignas sin dañar a las normales, por medio del uso de

(8)

sustancias químicas. Se utiliza antes y después de la cirugía para evitar metástasis y destruir residuos respectivamente; también se aplica a pacientes que no pueden ser intervenidos quirúrgicamente, como es el caso de las leucemias.

AGENTES ANTINEOPLÁSICOS

Los criterios usados para la clasificación, de los agentes antineoplásicos (Tabla 1) (30), incluyen sus mecanismos de acción, su estructura química o su acción fisiológica (Fig 2).

Algunos agentes fueron clasificados arbitrariamente, debido a que no se sabía a ciencia cierta su mecanismo de acción o su función fisiológica, y otros no entraron en ninguna de las categorías (agentes misceláneos) (28).

A pesar de ello, esta clasificación es útil para la elaboración de terapias antitumorales, cuando se tiene suficiente información sobre la cinética del tumor, ya que esto nos permite hacer una selección más razonable, y los agentes seleccionados se usan en forma combinada.

A continuación se describirán brevemente los diferentes agentes antineoplásicos:

a) Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes son un grupo de diversos compuestos químicos, que interaccionan con moléculas como ADN, ARN, proteínas,

TABLA 1.- AGENTES ANTINEOPLASICOS (28)

CLASIFICACION	TIPO	EJEMPLO
Agentes alquilantes	Mostazas nitrogenadas	Clorambucil
	Derivados de etilenimina	Tiotepa
	Nitrosourea	Carmustina
	Sales de metales	Cis-platino
Antimetabolitos	Triazinas	Dacarbazina
	Análogos del Ac. fólico	Metotrexate
	Análogos de pirimidina	Citarabina
	Análogos de purina	Mercaptopurina
Productos naturales	Inhibidor mitótico	Vinblastina
	Derivados de <i>Podophyllum</i>	Etoposido
	Antibióticos	Mitomicina
	Enzimas	Asparaginasa.
Agentes hormonales	Androgenos	
	Corticoesteroides	
	Estrógenos	
	Progestinas	
Agentes miscelaneos	Antagonistas de los estrogenos	
	Sustituto de la urea	Hidroxiurea
	Derivados de la metilhidrazina.	Procarbasina
	Inhibidores de la síntesis de esteroides.	Aminoglutetimida
	Supresores de adrenocorticales.	Mitotane

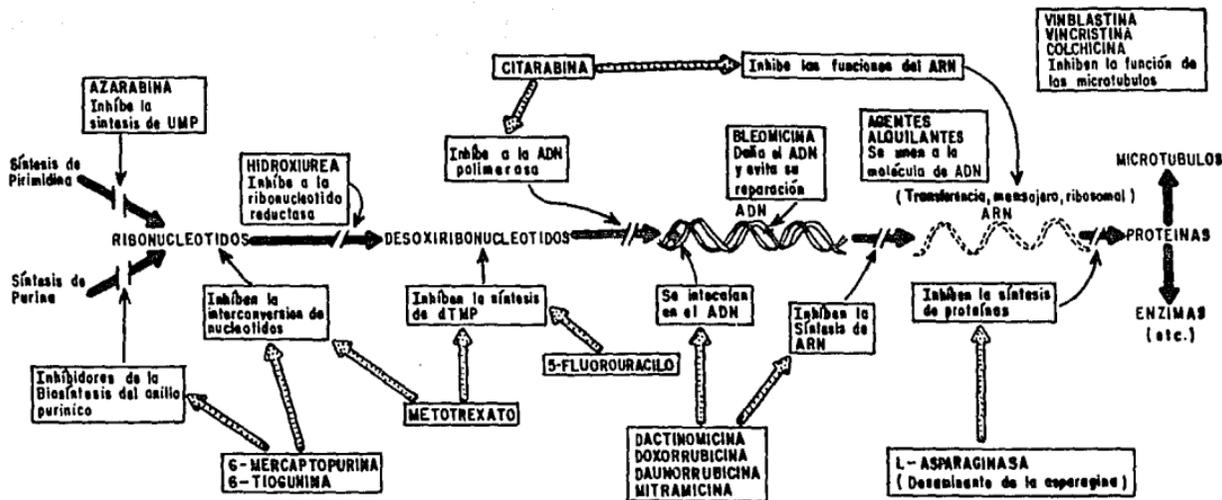


Fig. 2.- Mecanismos y sitios de acción de algunos antineoplásicos. (12)

y moléculas de bajo peso molecular; esta interacción es por uniones electrofílicas con las moléculas, ya que provocan que se polaricen y puedan unirse con ellas.

La parte más sensible del ADN, es la posición 7 del nucleótido de guanosina donde interactúan los agentes alquilantes, produciendo una alteración en el código del ADN y esto va a provocar la muerte celular debido a una inhibición en la replicación del ADN, o en la producción de una mutante celular, cuando la replicación del DNA no es completamente fiel al original (28).

b) Antimetabolitos

Son un grupo de compuestos de bajo peso molecular, que ejercen su efecto, debido a que su estructura o función es similar a la de los metabolitos involucrados con la síntesis de ácidos nucleicos, por lo que la célula no distingue entre éstos y los metabolitos normales, y los introduce dentro de ella, provocando así una inhibición importante en las enzimas involucradas en la síntesis de ácidos nucleicos, o incorporándolos dentro del mismo ácido nucleico, produciendo errores en el código. Este tipo de mecanismo de acción provoca una inhibición de la síntesis del ADN y la muerte celular.

Los antimetabolitos son más tóxicos para las células que están en crecimiento activo ya que tienen un comportamiento altamente específico para las diferentes fases del ciclo celular (14,28,31).

c) Productos naturales

En este grupo se incluyen productos derivados de una fuente natural y no se considera su mecanismo de acción.

Las drogas de este tipo que se usan en la clínica son; productos de plantas y productos bacterianos.

Dentro del grupo de productos de plantas se encuentran la vinblastina y vincristina que son derivados de *Catharanthus roseus* y su principal actividad es sobre la proteína microtubular, produciendo una inhibición de la mitosis, porque detiene a las células en metafase (14,22,28,31).

También se han evaluado los derivados obtenidos de las plantas del género *Podophyllum*, uno de ellos el Etoposido que es un derivado semisintético de la toxina de *Podophyllum peltatum* actúa sobre las células deteniendo su ciclo celular en la fase G2, también tiene efectos sobre síntesis de proteínas, de ADN y de ARN. (28).

Los antibióticos obtenidos de bacterias usados como agentes antitumorales, son un grupo de compuestos con relativa actividad antimicrobiana producidos por varias especies de Streptomyces. Su efecto citotóxico (lo cual limita su uso como antimicrobiano) ha sido de gran valor en el tratamiento de un amplio número de cánceres. Todos los antibióticos usados en la clínica (Mitomicina, Bleomicina, Dactinomicina), afectan la función y síntesis de los ácidos nucleicos (Fig 2) (28).

En el grupo de las enzimas, la asparaginasa es el único ejemplo de agentes de este tipo; cataliza la hidrólisis de la asparagina, produciendo ácido aspártico y amonio, privando selectivamente a las células malignas de un aminoácido esencial para su supervivencia (14,28,31).

d)Agentes hormonales

Estos compuestos son muy activos contra el cáncer a nivel clínico, cada agente tiene diversos efectos, algunos de los cuales son directamente a nivel celular, por unión de las drogas con receptores citoplasmáticos específicos, otros efectos son a través de una acción indirecta sobre el hipotálamo y sus hormonas que regulan a la pituitaria (28,31).

Todos estos agentes tienen en común, que en muchos casos surge a la larga una malignidad celular, porque se altera la sensibilidad a las hormonas que regulan el crecimiento celular, produciendo un crecimiento desordenado (28).

Una excepción de estos mecanismos, es el efecto de los corticosteroides sobre las leucemias y linfomas, porque actúan directamente sobre las células linfoides anormales, produciendo lisis celular, ya que estas tienen un gran número de receptores glucocorticoides (28).

LA HERBOLARIA EN EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER

Desde la antigüedad, la farmacopea del México indígena, fincaba la mayor parte de su experiencia en la herbolaria.

Se han escrito varios tratados sobre las hierbas medicinales empleadas por los indios del siglo XVI, en donde se mencionan varias plantas y arbustos cuyas hojas se usaban para retraer los crecimientos anormales.

En los tiempos contemporáneos entre las plantas usadas como antitumorales podemos mencionar a *Podophyllum peltatum*, que era usada por los indios Penobscot originarios del Perú para curar los crecimientos anormales. Uno de los derivados de *Podophyllum* que ha sido estudiado es el Etoposido que es un derivado semisintético de la toxina de *P. peltatum*, y que actúa sobre las células deteniendo su ciclo celular en la fase G2 y también tiene efectos sobre la síntesis de proteínas, del ADN y del ARN (28).

Se han realizado investigaciones para encontrar principios activos vegetales con actividad antitumoral, entre las que se puede mencionar la que llevaron a cabo Bhakuni y col. (3,4,5) mediante la recolección, extracción y prueba de 519 especies diferentes de vegetales, contra varias líneas celulares cancerígenas, obteniendo

resultados positivos para 14 extractos con actividad plenamente confirmada, entre estos extractos figuran el de *Cassia obtusa*, de donde se aislaron varios compuestos que inhibieron significativamente la leucemia linfocítica P-388 (PS) en ratones (3); y el de *Digitalis purpurea* variedad *alba* que elabora glucósidos empleados desde 1775 como cardiotónicos y que mostraron citotoxicidad tumoral en ratones (4).

Otra de las investigaciones que podemos mencionar es la realizada por Kupchan, quien laboró con numerosos botánicos y bioquímicos durante los años de 1969-1974 en varias regiones del mundo, logrando aislar y probar principios activos de más de 100 plantas, entre las que se cuentan las siguientes:

- 1) Las plantas de la familia *Celastraceae*, *Maytenus ovatus* y *Iciclecygium wilfordi*, que poseen principios activos antileucémicos probados *in vivo* en ratones e *in vitro* contra células derivadas del carcinoma nasofaríngeo humano (KB) (15).
- 2) *Colchicum speciosum* de donde se extrajeron la colchicina y la desmetilcolchicina; la colchicina fue una de las primeras sustancias en ser empleadas como citostático (16).
- 3) *Elephantopus scellatus* y *Vernonia hymenolepis* de las cuales se obtuvieron 4 compuestos del tipo lactonas sesquiterpénicas, y

(18)

que fueron probadas contra la leucemia linfocítica P-388 en ratones y contra el carcinoma de Walker (256-WM) en ratones (15); estos compuestos son:

Elefantina y elefantopina obtenidos de Elephantopus scaber, y Vernolepina y vernomenina obtenidos de Vernonia hymenolepis (15).

Lee y col. (18) demostraron la alta citotoxicidad de la helenalina que extrajeron de H. autumnalis y de H. microcephala, probandolas en cultivos de células HEP-2, KB y en fibroblastos humanos normales. También la probaron *in vivo* en ratones con tumor de ascitis de Ehrlich.

Se ha visto que algunas de estas sustancias impiden el crecimiento celular al interferir con ciertos sistemas enzimáticos, como por ejemplo: la helenalina y la tenulina impiden la síntesis proteica y la del colesterol, además de que inhiben la elaboración del ADN y la actividad de la ADN-polimerasa. Ambas lactonas incrementan la concentración del adenosin 3'5'-monofosfato e interfieren con los procesos energéticos (20).

Entre los productos naturales uno de los descubrimientos más importantes han sido los productos obtenidos de Cathartus coccineus

o ~~Vinca rosea~~ su actividad antileucémica fué descubierta por Noble, Beer y Cutts en 1956 (23) cuando estudiando el empleo popular de esta especie como antidiabético, se dieron cuenta de que conejos con esta enfermedad, a los pocos días de que se les administró un extracto de la planta, morían víctimas de una infección causada por la bacteria *Pseudomonas* sp, la cual se encuentra normalmente en su habitat sin afectarlos; al analizar su sangre observaron un marcado descenso en el número de leucocitos, razón por la cual pierden su defensa a la infección. Esta acción selectiva de reducción del número de glóbulos blancos, fue la que sugirió su posible empleo como antileucémico.

Las investigaciones de Noble, Beer y Cutts (23) demostraron que los alcaloides responsables de la leucopenia eran la vincalencoblastina (VLB) y la vincristina (VCR), ambas sustancias han sido evaluadas ampliamente a nivel preclínico y clínico y en la actualidad son parte de la quimioterapia de 47 tipos de cáncer, específicamente ha quedado demostrada su utilidad en oncohematología pediátrica (22).

LABIADAS MEXICANAS

Nuestro país cuenta con una amplia variedad de recursos naturales, en donde destaca la gran cubierta vegetal, con más de 20,000 especies de plantas vasculares (11).

El territorio nacional cuenta con una flora más vasta que la de la Unión Soviética y del mismo orden que la de E.U. y Canadá juntos (11).

Entre los elementos que constituyen la flora mexicana uno de los más importantes es el formado por la familia Labiada (Labiatae o Lamiaceae) con 550 especies, pertenecientes a 42 géneros.

Se sabe que la familia de las Labiadas está formada por aproximadamente 180 géneros y 3500 especies (11).

Las plantas pertenecientes a esta familia, han sido objeto de diversos estudios, tanto biológicos como químicos y en el aspecto económico, por el uso de los aceites esenciales de estas plantas en la industria de la perfumería.

(21).

En el aspecto biológico, su importancia radica en las diferentes actividades farmacológicas que se han observado en compuestos aislados de estas plantas; entre sus actividades farmacológicas se cuentan: las bactericidas, las antivirales, las sedativas, y las espasmolíticas.

Así mismo se han aislado de plantas pertenecientes al género *Isodon* (*Rhabdosis*) una gran cantidad de diterpenos biológicamente activos como antimicrobianos y antitumorales (11).

En el aspecto químico estas plantas son importantes por su rica variedad de metabolitos secundarios.

El conocimiento sobre la composición química de las Labiadas es incompleto, ya que tan sólo algunos de los 180 géneros pertenecientes a esta familia, han sido estudiados sistemáticamente, entre estos están los géneros: *Sideritis*, *Teucrium*, *Ajuga* y *Rhabdosis*.

De los 42 géneros de Labiadas pertenecientes a nuestro país, el más abundante es el género *Salvia*, que cuenta con aproximadamente 275 especies.

Este género se subdivide en 4 subgéneros, denominados: *Leonia*, *Salvia*, *Sclarea*, y *Calosphace* (11), el más abundante es el *Calosphace*, al cual pertenecen las 275 especies que hay en nuestro país (11).

Desde la antigüedad, las plantas Labiadas han sido usadas por el pueblo mexicano de diferentes maneras; entre ellas las siguientes:

-Como condimentos: *Oreganum* sp (oregano), *Rosmarinus officinalis* (romero), *Mentha* sp (yerbabuena) *Thymus* sp (tomillo).

-Para preparar aguas frescas: Semillas de *Salvia hispanica* y *Salvia filicesfolia* (agua de chía).

-Como plantas medicinales: *Salvia macrostema* (té de monte), *Agastache mexicana* (toronjil), *Salvia microphylla* (mirto), *Salvia fulgens* (mirto), *Mentha piperita* (té de menta) y *Eucalia lythrifolia* (poles).

-Como psicotrópicos: *Salvia divinorum*

En los últimos años el Dr. T.P. Ramamoorthy del Instituto de Biología de la U.N.A.M. (26) ha realizado un estudio sistemático, tanto botánico como fitoquímico, de especies mexicanas

pertenecientes al género *Salvia*. Hasta la fecha se tienen datos de la composición química de unas 9 especies, y un grupo del Instituto de Química de la U.N.A.M. ha logrado aislar algunos productos diterpénicos de 6 de las 9 especies mencionadas, los cuales constituyen, probablemente, la característica química más relevante de las Salvias mexicanas y cuya estructura, está muy relacionada con la de la taxidiona, producto aislado por Kupchan y col. de *Taxodium distichum*, y que mostró propiedades citotóxicas (17).

CICLO CELULAR

La duplicación de todos los constituyentes de la célula, seguida de su división en dos células hijas, se conoce como el ciclo celular.

Se ha visto que el tiempo de duración del ciclo, en la mayoría de las líneas celulares en cultivo, se encuentra entre 10 y 30 hrs. (fig 1).

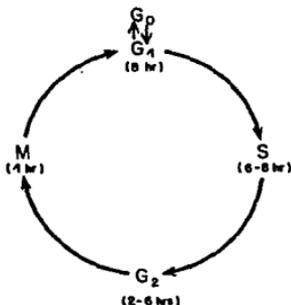


Fig. 1.- Esquema del ciclo celular, mostrando la duración de cada una de las cuatro fases en una célula típica. (35)

En los órganos pluricelulares, las células se dividen a diferentes velocidades, de acuerdo con el tipo de célula. Esta diferencia es debida principalmente al tiempo de permanencia en la

fase G₁, que tiene cada célula, pero en sí, el tiempo de duración del ciclo celular desde la fase S y hasta que termina la fase M, es constante en todas las células.

En 1953 Howard y Pelc descubrieron que la síntesis del ADN entre dos divisiones celulares consecutivas, no es continua, sino que esta separada por periodos, los cuales se denominaron fases G₁ y G₂. Tiempo después Lajtha (30) descubrió que existían células que no se dividían, sino que estaban en reposo, a este estado se le denominó fase G₀. Durante esta fase, hay un contenido bajo de ARN, el cual se incrementa cuando se induce la proliferación celular (30). La célula en fase G₀, es relativamente inactiva con respecto a la síntesis de macromoléculas, y es consecuentemente, insensible a muchos agentes quimioterapéuticos, particularmente aquellos que afectan la síntesis de macromoléculas (28). La mayoría de las células transformadas, particularmente las infectadas por virus, no pueden entrar en esta fase (24).

Se ha visto que las células que se encuentran en fase G₀, sintetizan algunas variantes de histonas, tienen un bajo contenido de ARN y se requiere la proteína p53 para salir de la fase G₀, (30) por lo que se concluye que el estado G₀ es fisiológicamente distinto al estado G₁, y que los genes que regulan el paso de G₀ a G₁ pueden ser la clave en el control de la proliferación celular (24).

Toda célula inicia su crecimiento durante un proceso post-mitótico o fase G1 (fig 1) durante la cual el núcleo aumenta de tamaño, aumenta el número de ribosomas y la síntesis de ARN ribosomal, se incrementa la síntesis de los diferentes tipos de ARN y RNAPolimerasas, hay una gran actividad en la síntesis de proteínas (proteína inestable (R), actina, ornitina descarboxilasa, proteína p53, proteínas citoplasmáticas) y se sintetizan en mínima cantidad, las 5 histonas constituyentes de la cromatina (8).

Algunos estudios han demostrado que los niveles de calmodulina, la principal proteína que capta el calcio en las células no musculares y que regula varias enzimas intercelulares sensibles al calcio, se incrementan cuando la célula entra a fase S considerandose que esta proteína es importante en la regulación de la síntesis de ADN (30).

En cuanto a las proteínas involucradas en la duplicación del ADN, estas se sintetizan durante la fase G1 tardía, y en esta fase se inicia la fosforilación de la histona H1.

En la fase S los eventos principales que se llevan a cabo son la síntesis de ADN y de histonas, las cuales se realizan aproximadamente en un periodo de 6 a 8 hrs.

Para la síntesis de ADN cada fibra está dividida en muchas unidades de duplicación llamadas duplicones y cada uno de estos tiene un centro, a partir del cual se origina la duplicación en ambas direcciones (24).

Durante el desarrollo embrionario, la activación de duplicones es simultánea y la fase S es corta, en cambio en un adulto, la síntesis de ADN se lleva a cabo en diferentes cromosomas y segmentos de un mismo cromosoma, a diferentes tiempos; en general se replica primeramente la eucromatina y posteriormente la heterocromatina (8).

El mecanismo por el cual se mantiene el orden de iniciación, no se ha determinado, se ha propuesto que la metilación está involucrada en el mantenimiento de este orden, pero esto no ha sido confirmado.

Es muy diverso el grupo de enzimas que se requieren para la síntesis del ADN, algunas de las más importantes son las siguientes:

ADN polimerasas, ligasas, timidina cinasa, ribonucleótido reductasa y un complejo proteínico, formado por la mayoría de las proteínas requeridas para la síntesis y proteínas asociadas.

Con respecto a la síntesis de histonas se sabe que está acoplada a la síntesis de ADN (30) y que son proteínas de gran importancia para el empaquetamiento del ADN; durante la fase S continúa la fosforilación de la histona H1, además, aparecen receptores de superficie para diferentes factores de crecimiento.

Cuando la síntesis de ADN se termina, la célula entra a un periodo pre-mitótico o fase G2 (28) durante el cual, la célula se prepara para la mitosis, por lo que se producen cambios bioquímicos y hay una gran condensación cromosómica (28,30). Durante esta fase se sintetizan proteínas específicas, necesarias para la división celular, unas de ellas, son las requeridas para la formación y operación del aparato mitótico, y las usadas en la condensación cromosómica, las cuales se denominan "factores mitóticos" y son del tipo de las no histonas.

Otro evento importante durante la etapa G2 es la realización de un proceso de reparación del ADN conocido como reparación G2, que ha sido ampliamente estudiado y evidenciado por Kihlman y Hartley en 1968 (24).

La fase G2 es seguida inmediatamente por la mitosis que es la fase con la que culmina el ciclo celular; en ella se llevan a cabo dos procesos: la división nuclear o cariocinesis y la división

citoplasmática o citocinesis; tiene un tiempo de duración de aproximadamente 1 hr. (30,35). Durante esta fase la síntesis de proteínas y de RNA son prácticamente nulas.

Esta fase está constituida por varias fases, en las cuales se llevan a cabo diferentes eventos importantes para la división celular; ellas son las que siguen:

- a) **PROFASE:** en ella la célula tiende a adoptar una forma esférica, aumenta su refringencia y viscosidad; el núcleo se hincha, los cromosomas se organizan en filamentos largos, los nucleolos desaparecen, los centriolos se ven rodeados por pequeños filamentos denominados ásters y emigran hacia los polos celulares, la membrana nuclear se desintegra y el material nuclear se mezcla con el citoplasma (8,30).
- b) **PROMETAFASE:** en esta fase se empieza a formar el huso acromático y los cromosomas, que ya se han dividido longitudinalmente en dos cromátides hermanas, se acomodan al azar en la parte media del huso (8).
- c) **METAFASE:** los cromosomas se encuentran ya en la parte ecuatorial del huso, y alcanzan aquí su máxima condensación (30), esta fase es importante para estudios citológicos, ya

que hay sustancias como la colchicina (inhibe la formación del huso acromático) que detienen la mitosis en esta fase, y usando métodos de rompimiento celular, se logran extender los cromosomas, para poder ser observados al microscopio (8).

d) ANAFASE: se produce la separación de los centrómeros, y las cromátides de cada cromosoma emigran hacia los polos (30). Se desconoce el mecanismo por el cual los cromosomas se dirigen a los polos, una teoría postula que las fibras del huso se contraen en presencia de ATP y empujan los cromosomas hacia los polos (35).

e) TELOFASE: los cromosomas han llegado a los polos, se extienden y vuelven a posición de reposo, se forma la membrana de cada núcleo y se inicia la separación del citoplasma para formar las dos células hijas.

En esta etapa los factores mitóticos son inactivados por los "inhibidores de los factores mitóticos", los cuales permanecen activos hasta la fase G₁ (24).

FACTORES QUE REGULAN EL CICLO CELULAR

El ciclo celular puede ser afectado o regulado por varios factores como por ejemplo: Las células cultivadas in vitro

disminuyen o detienen su ciclo celular, cuando son colocados en concentraciones limitadas de nutrientes, de factores de crecimiento o si se les añade un inhibidor de la síntesis de proteínas; en el caso de las células normales, responden a este estado subóptimo para su crecimiento, entrando en fase G₀, pero después deberán elegir entre iniciar la fase G₀ o continuar con su ciclo celular, Pardee en 1974 definió a este momento como punto de no regreso, y si las células lo superan, deberán terminar su ciclo celular a una velocidad normal independientemente de las condiciones o factores externos, es por esto que en ocasiones, aunque se añadan drogas que afectan el ciclo celular, las células que han superado este punto de no regreso, no se ven afectadas. Rossow et al en 1979 sugieren que para superar este punto de no regreso las células deberán acumular proteínas inestables, denominadas proteínas "U" y que estas representan el estímulo que induce la duplicación del ADN (24).

Aparte de este punto de no regreso o punto de restricción, las células cuentan con otros dos puntos reguladores del ciclo, los cuales se encuentran en la fase G₂ temprana y en la profase temprana, ambos puntos también son regulados por acúmulos de proteínas específicas (24).

Pardee et al en 1978 (24) realizaron una revisión en cuanto a las necesidades y cambios bioquímicos que presentan las células

cuando son estimuladas para entrar en crecimiento, entre estos están:

-Factores de crecimiento: Son una mezcla de proteínas, vitaminas, hormonas polipeptídicas, aminoácidos, cationes divalentes, etc. que son necesarios para el crecimiento celular (24).

-Superficie celular: Se ha observado que existe una relación entre la superficie celular y el crecimiento, pues hay evidencias de que las glicoproteínas de la superficie actúan como receptores y son importantes en la inhibición del crecimiento dependiendo de la densidad celular, también se ha visto que están asociadas con el rearreglo de microtúbulos y microfilamentos para regular el paso de factores de crecimiento a través de la membrana (8,24).

-Transporte a través de la membrana: Es importante para proveer a la célula de los nutrientes necesarios para su crecimiento (24).

-Síntesis y degradación: Se ha visto que cuando las células son estimuladas a crecer, se incrementa la síntesis proteica y se disminuye la degradación de otras proteínas; hay incremento en los niveles de ARN ribosomal, de transferencia y mensajero, y hay un incremento en las poliaminas y la ornitina

descarboxilasa (enzima que regula la síntesis de poliaminas) las cuales son requerimiento para una síntesis óptima del ADN.

-Nucleótidos cíclicos: Algunos nucleótidos como el AMPc y GMPc están involucrados en la regulación del ciclo celular; el AMPc es un inhibidor del crecimiento y el GMPc es un promotor del mismo (8,24).

-Cambios nucleares: Cuando las células son estimuladas a proliferar, se presentan cambios en la estructura y función de la cromatina, lo que representa la activación de los genes y/o la preparación para la subsecuente síntesis de ADN (8,24).

En 1986 de acuerdo con la información acerca de los cambios bioquímicos y las moléculas que regulan el crecimiento celular, Pardee consideró que son los factores de crecimiento exógenos los que regulan la proliferación de las células normales; algunos de estos factores de crecimiento, son usados a través de la fase G1, donde la célula se prepara para la síntesis de ADN, pero después de esto la célula continúa a través de las fases S, G2 y M sin requerir factores de crecimiento, hasta que llega de nuevo a fase G1 (24).

Hasta la fecha no se conoce completamente ninguno de los mecanismos que regulan el tiempo del ciclo celular, se han

realizado muchos estudios para analizar y caracterizar tales mecanismos, entre los que se encuentran:

-El aislamiento de mutantes sensibles a la temperatura que son bloqueadas en puntos específicos del ciclo celular (30).

-El análisis de las diferencias entre las células normales y las transformadas (30)

-El estudio de los factores que estimulan la proliferación de las células en reposo (30) y

-Los estudios de los efectos producidos por drogas que inhiben en forma específica los procesos bioquímicos (30)

MÉTODOS DE CERNIMIENTO DE LA ACTIVIDAD CITOESTÁTICA

Cuando las sustancias han sido obtenidas o diseñadas considerando una actividad específica, la evaluación inicial incluye pruebas de cernimiento de la actividad específica, estas pruebas deben ser rápidas, sensibles, baratas y propias para la evaluación de un gran número de sustancias. En el cernimiento de la actividad antineoplásica, las pruebas que se utilizan incluyen desde bacterias hasta mamíferos, a estos últimos se les inducen tumores experimentalmente (2,27).

Los agentes anticancerígenos usados comúnmente en la clínica, incluyen drogas de tipo sintético y de origen natural.

Debido a que la mayoría de las sustancias usadas en la clínica como anticancerígenos, actúan directa o indirectamente produciendo daño en el ADN, los diversos estudios tienen en común encontrar agentes que sean capaces de interactuar con el ADN (13).

Existen diversos sistemas de prueba para la evaluación de sustancias con actividad citostática potencial, como son:

- 1.- ENSAYO DE LA INDUCCIÓN BIOQUÍMICA (BIA)
- 2.- PRUEBA COLORIMÉTRICA PARA "SOS"
- 3.- MUTANTES EN EL SISTEMA DE REPARACIÓN DEL ADN

4.- PRUEBA DE ADN LIBRE PARA COMPUESTOS QUE INTERACTUAN CON EL ADN

5.- PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD CON CULTIVOS CELULARES

ENSAYO DE LA INDUCCION BIOQUIMICA (BIA)

Este ensayo puede ser aplicado en el cernimiento de mutágenos, carcinógenos y carcinostáticos, y se basa en la capacidad que se tiene para inducir la activación de un fago que está en ciclo lisogénico, para entrar a ciclo lítico.

A principios de los años sesentas los laboratorios Bristol describieron un ensayo de inducción del profago λ en *Escherichia coli* para el cernimiento de un filtrado de fermentación, en busca de antibióticos antineoplásicos (Lein et al. 1962, Heinemann and Howard 1964, Price et al. 1964) (13). La inducción del profago fue determinada por la cuantificación de las placas de lisis producidas por el fago después de haber incubado un cultivo lisogénico de *E. coli* λ con muestras del filtrado de fermentación.

Con el paso de los años se generó un nuevo ensayo, más rápido y sencillo, en el cual la inducción se determina cuantificando la síntesis de una enzima específica, en lugar de cuantificar la liberación de fagos. Uno de estos ensayos, es el de la inducción

bioquímica (BIA) en el cual se han evaluado productos naturales para el cernimiento de compuestos antitumorales; en el BIA, el profago λ lleva adherido el gen lac Z de *E. coli*, el cual ha sido suprimido en el genoma bacteriano (*E. coli*), el fago, el infectar a la bacteria, sólo puede llevar a cabo su ciclo lisogénico, debido a que es deficiente en algunas funciones genéticas que requiere para su desarrollo y producir lisis celular, por lo que la inducción del profago no va a provocar la aparición de partículas fágicas, sino que dicha inducción se determina por la producción de la enzima β -galactosidasa debido a que se realiza la transcripción del gen lac Z, esto puede ser evaluado por métodos colorimétricos, usando el sustrato de la enzima (13).

Para aumentar la sensibilidad de esta prueba, la cepa lisogénica *E. coli* λ ha sufrido una mutación en los genes *uvrB* y *envA* para producir, en el primer caso una reparación deficiente del daño al ADN y en el segundo, el aumento de la permeabilidad en la membrana externa.

PRUEBA COLORIMÉTRICA PARA "SOS"

La prueba colorimétrica para "SOS", monitorea la expresión del gen *sfiA*, que está involucrado en la regulación de la respuesta "SOS" en la inhibición de la división celular, como parámetro para detectar daño en el ADN. El gen lac Z de *E. coli* ha sido unido al

gen *sfIA* por medio de un transposon, de modo que la producción de la β -galactosidasa puede ser cuantificada por un ensayo colorimétrico como una medida del daño al ADN, de manera similar al BIA. Nuevamente, la cepa ha sufrido una delección en la región normal *lac*, una mutación en el sistema de reparación y una mutación para aumentar la permeabilidad de la membrana externa (13).

MUTANTES EN EL SISTEMA DE REPARACION DEL ADN

Se ha visto que las cepas de mutantes bacterianas con una reparación deficiente del ADN, se caracterizan por ser más sensibles a la destrucción por varios tratamientos físicos y químicos que dañan al ADN.

Estas cepas han sido usadas para el cernimiento de productos naturales con potencial antitumoral. Los compuestos que dañan al ADN pueden ser detectados específicamente por su elevada actividad contra las cepas mutantes, comparándola con la actividad contra cepas silvestres.

El ensayo se realiza en placas de agar que contienen diferentes muestras de los productos naturales; se hacen cultivos de la mutante y de la cepa silvestre, y se compara el diámetro del halo de inhibición del crecimiento de ambas cepas (13).

PRUEBA DE ADN LIBRE PARA COMPUESTOS QUE INTERACTUAN CON EL ADN

Se ha desarrollado un sistema sensible de prueba usando ADN circular aislado del fago PM-2, para detectar la actividad de los antibióticos productores de rompimientos en las cadenas del ADN (Mong et al. 1979, Strong and Crooke 1978) (13).

Una ruptura simple en una de las cadenas del ADN puede ser determinada por un cambio en el movimiento electroforético del ADN en gel de agarosa o por una disminución en la fluorescencia después de dar un tratamiento con bromuro de etidio (13).

PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD CON CULTIVOS CELULARES

Así como los microorganismos han demostrado ser una herramienta extremadamente útil en el programa de cernimiento de nuevos productos antimicrobianos, de manera análoga, las pruebas de citotoxicidad con cultivos celulares, usando líneas tumorales ya establecidas, como son: el carcinoma nasofaríngeo humano KB, la leucemia L1210 y la leucemia linfocítica P388, han sido aplicadas por muchos años como un sistema sencillo, rápido y barato, para el cernimiento de nuevos antitumorales (13).

La citotoxicidad de un compuesto o su capacidad de inhibir la

proliferación celular se mide en sistemas de prueba con cultivos de líneas celulares de mamífero, normales y obtenidas de tumores, una de estas pruebas utiliza células pluripotenciales de tumores humanos, las cuales son obtenidas a partir de biopsias. Para la determinación, se prepara una suspensión de estas células y se cultivan en un medio semisólido de agar con nutrientes, durante 3 semanas; las células normales no son capaces de formar colonias en este medio, mientras que las células pluripotenciales sí pueden hacerlo (Hamburger and Salmon 1977) (13).

Se hacen suspensiones de estas células y se separan en alícuotas, que son expuestas a las diferentes drogas; para muchos tipos de tumores humanos, la preparación de la suspensión celular es difícil, por lo que las células quedan dañadas, esto altera su viabilidad y su respuesta a la droga, lo que disminuye la capacidad de las células tumorales para formar colonias.

A pesar de este problema, este sistema de prueba *in vitro* ha sido usado por muchos investigadores para predecir la sensibilidad de un paciente a las drogas usadas (13).

Otra prueba en la que se usan líneas celulares, es el ensayo de diferenciación.

Aunque se ha demostrado que hay diferencias entre células normales y células neoplásicas, ambas células tiene en común muchos procesos de regulación del crecimiento.

Para este ensayo se han usado diferentes líneas de células tumorales, tales como: eritroleucemia murina inducida por virus (Friend et al 1971), leucemia mieloide murina (M1) (Ichikawa 1969), y leucemia promielocítica humana (HL-60) (Collins et al. 1977) (13), todas han sido empleadas como modelos para estudiar la posible inducción de diferenciación en células tumorales.

Estas células pueden ser inducidas a diferenciarse en células benignas, expresando sus funciones especializadas semejantes a las de su homólogo normal. Esto se ha visto en un sistema *in vivo* usando ratones singénicos, los cuales son inoculados con células de leucemia mieloide murina y tratados con las drogas, observandose un aumento en el tiempo de sobrevivencia (13).

Las pruebas de cernimiento más utilizadas consisten en la evaluación de la citotoxicidad de los compuestos o su capacidad de inhibir la proliferación celular en las líneas mencionadas, determinando la viabilidad de las células mediante el uso de colorantes vitales o midiendo la incorporación de timidina tritiada por las células en cultivo (8,20). Estas pruebas son las que

utilizamos en el presente estudio, por lo que se describen en el capítulo de Material y Metodos, y se discuten posteriormente.

OBJETIVOS

-OBJETIVOS:

- a.- Desarrollar e identificar el método más adecuado para la evaluación de la citotoxicidad, en cultivos celulares.
- b.- Evaluar el efecto citotóxico de metabolitos secundarios obtenidos de plantas Labiadas mexicanas.

MATERIAL Y METODOS

MATERIAL Y METODOS

1.-Lineas celulares

Se utilizaron el mieloma X63 Ag B (H-2^d) y el linfoma L5178y (H-2^d), los cuales se mantuvieron in vitro

2.-Mantenimiento de las lineas celulares in vitro

Precauciones:

Cuando se tiene un cultivo de células es necesario extremar los cuidados al trabajar, así como en la esterilización del material y de las soluciones que se van a utilizar; por lo que:

- a) Todo el material fue lavado, enjuagado con agua bidestilada y esterilizado antes de iniciar el trabajo.
- b) Todas las manipulaciones del cultivo celular se realizaron en un laboratorio exclusivo para el cultivo celular y en campanas de flujo laminar.
- c) El material utilizado en el laboratorio de cultivo fue ocupado única y exclusivamente para el mismo.

2.1. CULTIVO DE LAS CELULAS

Las células X63 y L5178y se cultivaron en medio RPMI-1640 (Apendice II)

Las células mantenidas *in vitro*, se lavaron con el medio de cultivo por centrifugación a 400g durante 10 min; se resuspendieron en 5-10 ml de medio, se tomó una alícuota de 100 ul y se tiñó con un volumen igual de colorante vital azul tripano; las células se contaron en un hematocitómetro y se calculó el número de cel/ml con la siguiente ecuación (9).

$$\# \text{ cel/ml} = \text{NC} \times d \times 10^4$$

Donde: NC = número de células contadas

d = factor de dilución

10^4 = factor obtenido de considerar el área y la altura del hematocitómetro.

Las células deben mantenerse a una densidad de 1×10^5 cel/ml, lo cual se logró diluyendo 1:5 diariamente con medio de cultivo. Todas las células se mantuvieron a 37 C^o y en una atmósfera húmeda con 7 % de CO₂.

3.-SUSTANCIAS QUIMICAS

Las sustancias utilizadas son metabolitos secundarios de plantas labiadas mexicanas pertenecientes al subgénero *Salvias* y fueron obtenidas y caracterizadas por investigadores del Instituto de Química dirigidos por la Dra. Lydia Rodríguez-Hahn (Tabla 2).

3.1. PREPARACION DE DOSIS

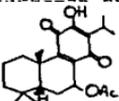
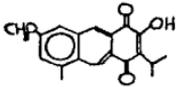
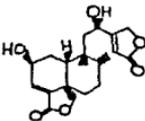
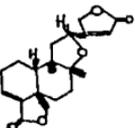
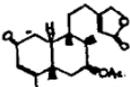
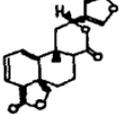
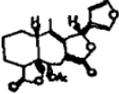
Se prepararon soluciones patrón de cada uno de los metabolitos, usando como disolvente dimetil sulfóxido (DMSO) (1 mg:100 ul), a partir de éstas se hicieron diluciones con el medio de cultivo sin suplementar para obtener las dosis de trabajo (0.05-50 ug/ml), teniendo en cada una de ellas una concentración final de 0.25 % de DMSO.

3.2. TRATAMIENTO DE LAS CELULAS PARA LOS ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD:

Se hizo una suspensión celular, ajustando la concentración a 2×10^5 cel/ml de 95-100 % viables y en una placa de 96 pozos se colocaron 3×10^4 cel/pozo (150 ul de suspensión celular).

Después de sembrar las células se les adicionaron 50 ul de la sustancia problema y se incluyeron varios pozos con los controles:

T A B L A 2.- METABOLITOS OBTENIDOS DE LABIADAS MEXICANAS

CLAVE	ESTRUCTURA QUIMICA	NOMBRE	EXTRACTOS DE:
DSD-1		7-acetoxi roileanona	<i>Salvia fruticulosa</i> Benth
DSD-2		Fruticulina-A	<i>Salvia fruticulosa</i> Benth
DSD-3	DESCONOCIDA		<i>Salvia candicans</i>
BZ-6a		Semiatriina	<i>Salvia semiatcata</i> Zucc
DSK-1		Keerlina	<i>Salvia keerlii</i> Benth
DSC-1		Lasiantina	<i>Salvia lasianta</i> Benth
DSL1-1		1,10-dehidro salviarina	<i>Salvia lineata</i> Benth
DSF		Salvigenólida	<i>Salvia fulgens</i> Cav.

células + RPMI y células + RPMI + DMSO 0.25 %; y se incubaron las placas a 37 C en atmósfera húmeda con 7% de CO₂ durante 24 hrs.

4.-EVALUACION DE LA VIABILIDAD

Después de el periodo de incubación la viabilidad se evaluó con las siguientes técnicas:

4.1. TINCION CON COLORANTES VITALES

Para la evaluación de la viabilidad celular, se utilizó la eosina, que es un colorante vital de tipo ácido, impermeable a la membrana celular (33).

Se tomó una alícuota de 100 ul de cada pozo y se tñeron las células con un volumen igual de colorante eosina al 0.1 % en PBS (Apendice III), quedando teñido de rojo sólo el citoplasma de las células muertas.

Las células se contaron en un hematocitómetro y se calculó el porcentaje de mortalidad con la siguiente ecuación:

$$\% \text{ mortalidad real} = \frac{\% \text{ mortalidad exp.} - \% \text{ mortalidad control}}{100 - \% \text{ mortalidad control}} \times 100$$

donde: % mortalidad exp = % de células muertas en pozo experimental
 % mortalidad control = % de células muertas en pozo control.

4.2. INCORPORACION DE TIMIDINA TRITIADA [H³]TdR

Para evaluar la viabilidad celular por incorporación de [H³]TdR, se utilizó la línea celular X63; cultivos de esta línea preparados en placas de 96 pozos, sembrando una concentración de 3×10^4 cel/pozo, fueron expuestos a diferentes dosis de controles positivos (mitomicina y cis-platino), a DMSO (0.25 %) sustancia que se usó para disolver los metabolitos, y a 8 diferentes metabolitos secundarios de Labiadas mexicanas. Las placas ya preparadas se incuban durante 18 hrs. a 37 °C en una atmósfera húmeda con 7 % de CO₂, después se agrega a cada pozo 1 uCi (10 ul) de [H³]TdR (6.7 Ci/mmol New England Nuclear) diluida 1:10 en medio de cultivo sin suplementar se deja incubar durante 8 hrs más y posteriormente se cosechan las células por filtración, utilizando una cosechadora de células (Cell Harvester Brandel MH-12), con papel filtro Whatman Glass Microfibre filters 934-AH, se cosecha el contenido de cada pozo, se hacen 4 lavados con agua para eliminar el excedente de timidina no incorporada y para romper las células quedando libre el ADN marcado, se deja secar el papel filtro y se coloca cada trozo de papel seco en un frasco vial conteniendo 4 ml de líquido de centelleo y se cuenta la radiactividad de cada frasco en un contador de radiaciones beta (Contador beta Packard Tri-carb 300) (19,37).

Este método de evaluación se fundamenta en que al adicionar ³H TdR al cultivo celular, las células que están vivas la utilizan para la replicación de su ADN, por lo que la ³H TdR queda incorporada dentro del ADN celular, y esto es un índice que se puede cuantificar por centelleo de la radioactividad incorporada (21,32).

4.3. APRECIACION OPTICA DE LA ALTERACION MORFOLOGICA (6)

En este caso para evaluar la viabilidad celular, se utilizó el método de apreciación óptica de la alteración morfológica ya que al observar las células en el microscopio, se vió que el efecto citotóxico producido por las sustancias era bastante notorio y se podían observar diferentes grados de alteración morfológica de acuerdo con la dosis y con la sustancia que se estuviera examinando, por esta razón, se eligió el método de apreciación óptica para evaluar la viabilidad celular.

La apreciación óptica se realizó de la siguiente manera: Se dejaron incubar las placas ya preparadas como se indicó anteriormente, durante 3 días a 37 C^o y 7 % de CO₂, después de este período se sacaron y se observaron con un microscopio invertido de contraste de fases y se evaluó de acuerdo a la siguiente escala:

++++	-----	100 % de mortalidad
+++	-----	75 % de mortalidad
++	-----	50 % de mortalidad
+/-	-----	25 % de mortalidad
(-)	-----	0 % de mortalidad

es decir: ++++ para el caso en que sólo se observaron restos celulares

+++ cuando se observó un poco de células viables y más restos celulares.

++ cuando se observó aproximadamente en proporciones iguales células viables y restos celulares

+/- cuando se observó mayor cantidad de células viables que restos celulares

(-) cuando el pozo está cubierto por células viables.

Todos los pozos fueron comparados con el pozo control de células si'n fármaco.

RESULTADOS

RESULTADOS

EVALUACION DE LA ACTIVIDAD CITOTOXICA

Para evaluar la actividad citotóxica de los metabolitos obtenidos de Labiadas en las líneas celulares utilizadas, se determinó la viabilidad celular en presencia de los mismos a través de los siguientes métodos:

1.-Determinación de viabilidad por tinción con colorantes vitales

En la tabla 3 y fig. 3, se muestran los datos obtenidos para la evaluación de la citotoxicidad por tinción con eosina al 0.1%, en la línea celular L517By, expuesta a diferentes dosis de los 8 metabolitos de prueba, los datos obtenidos indican que los metabolitos DSQ-1, DSQ-2 y DSQ-3 son citotóxicos y sólo el metabolito DSQ-2 en las dosis usadas, presentó un efecto dosis-respuesta (fig 3).

Con respecto a los metabolitos restantes, los efectos no son evidentes y algunos de los metabolitos inclusive tienen un ligero efecto estimulador (DSF y DSLi-1).

2.-Evaluación del daño morfológico por apreciación óptica

Se usaron cultivos celulares de las líneas X63 y L517By, los

T A B L A 3

Evaluación de la citotoxicidad en la línea celular L517By expuesta a diferentes dosis de los 8 metabolitos de prueba (tinción con eosina al 0.1 %)

DOSIS			
METABOLITO	ug/ml	[M]	% MORTALIDAD
DSQ-1	1	2.6×10^{-6}	68.4
	5	1.3×10^{-5}	40.0
	10	2.6×10^{-5}	100.0
	20	5.3×10^{-5}	87.6
DSQ-2	1	3.0×10^{-6}	9.2
	5	1.5×10^{-5}	20.0
	10	3.0×10^{-5}	35.3
	20	6.0×10^{-5}	100.0
DSC-1	1	2.6×10^{-6}	5.5
	5	1.3×10^{-5}	+1.5
	10	2.6×10^{-5}	+4.6
	20	5.3×10^{-5}	+1.5
DSF	1	2.5×10^{-6}	---
	5	5.0×10^{-5}	4.6
	10	2.5×10^{-5}	+4.6
	20	5.0×10^{-5}	+27.6
DSK-1	1	2.9×10^{-6}	+4.6
	5	1.4×10^{-5}	7.6
	10	2.9×10^{-5}	3.0
	20	5.8×10^{-5}	+1.5
DSL1-1	1	2.9×10^{-6}	1.5
	5	1.4×10^{-5}	+7.6
	10	2.9×10^{-5}	+13.8
	20	5.8×10^{-5}	+30.7
82Ba	1	2.7×10^{-6}	+1.5
	5	1.3×10^{-5}	16.9
	10	2.7×10^{-5}	4.6
	20	5.5×10^{-5}	18.5
DSQ-3	1	2.6×10^{-6}	11.0
	5	1.3×10^{-5}	11.3
	10	2.6×10^{-5}	6.5
	20	5.3×10^{-5}	100.0

La viabilidad se evaluó por tinción con eosina 0.1 %, las cifras indican porcentaje de células muertas con respecto al control de células sin fármaco, de un sólo experimento.

+ Presentaron mayor viabilidad que el control

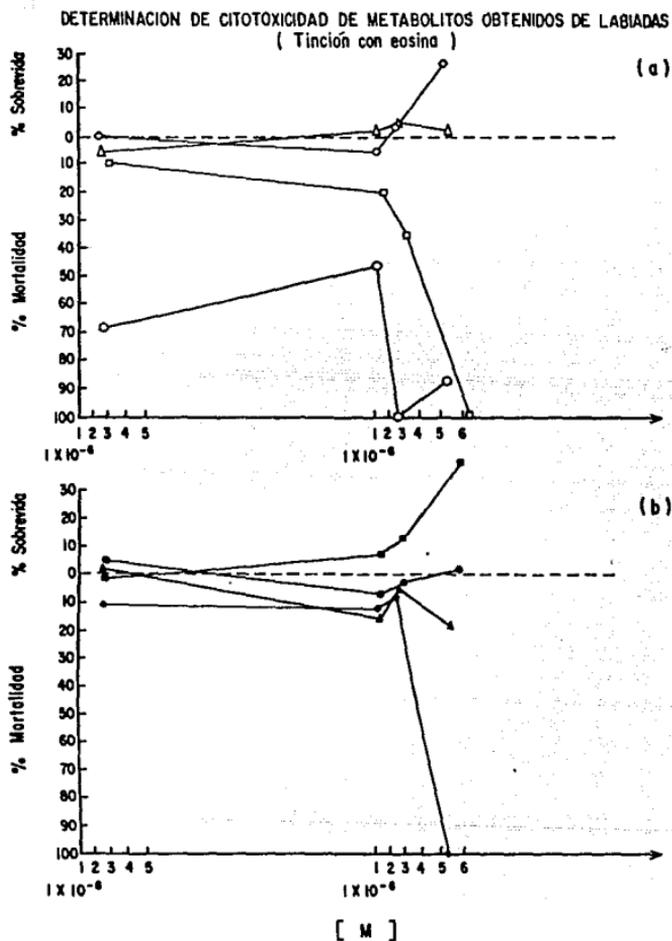


Fig. 3.- % de mortalidad de los 8 metabolitos obtenidos de labiadas evaluado por tinción con eosina en la línea celular L5178y.
 a) ○ DSO-1, □ DSO-2, △ DSC-1, ∅ DSF
 b) ● DSK-1, ■ DSLI-1, ▲ 82Sa, ◆ DSQ-3

cuales fueron expuestos a diferentes dosis de los 8 metabolitos de prueba, los datos obtenidos se muestran en la tabla 4, en donde se observa que en general la línea L5178y es muy sensible a los efectos citotóxicos ya que independientemente de la concentración la sola presencia de los metabolitos produjo cierta mortalidad y tan sólo pudo apreciarse un efecto evidente para los metabolitos DSO-2 y DSO-3 en ambas líneas celulares; cabe señalar que también se observa cierto efecto del metabolito DSO-1 en la línea X63.

3.-Cuantificación de síntesis de ADN por incorporación de timidina tritiada

Para la cuantificación de síntesis de ADN se usó la línea celular X63.

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5; estos resultados nos indican que a 50 ug/ml (Fig 4) todos los metabolitos evaluados muestran actividad citotóxica.

También se puede observar que 3 de estos metabolitos (DSO-1, DSO-2 y DSO-3), a una concentración de 10^{-5} M (5 ug/ml) presentaron una citotoxicidad significativa muy cercana a la producida por los controles positivos (Tabla 6, Fig. 5).

T A B L A 4

Apreciación óptica del daño morfológico en las líneas celulares X63 y L5178y inducido por diferentes dosis de cada metabolito

METABOLITO	DOSIS		X63	L5178y
	ug/ml	[M]		
DSQ-1	1	2.6×10^{-6}	±	-
	5	1.3×10^{-5}	±	-
	10	2.6×10^{-5}	++	±
	20	5.3×10^{-5}	++	±
DSQ-2	1	3.0×10^{-6}	-	±
	5	1.5×10^{-5}	-	±
	10	3.0×10^{-5}	++	++
	20	6.0×10^{-5}	++++ §	++++ §
DSC-1	1	2.6×10^{-6}	-	±
	5	1.3×10^{-5}	-	±
	10	2.6×10^{-5}	-	±
	20	5.3×10^{-5}	-	++
DSF	1	2.5×10^{-6}	-	±
	5	5.0×10^{-5}	-	±
	10	2.5×10^{-5}	-	±
	20	5.0×10^{-5}	±	++
DSK-1	1	2.9×10^{-6}	-	±
	5	1.4×10^{-5}	-	±
	10	2.9×10^{-5}	-	±
	20	5.8×10^{-5}	-	±
DBL1-1	1	2.9×10^{-6}	-	±
	5	1.4×10^{-5}	-	±
	10	2.9×10^{-5}	-	±
	20	5.8×10^{-5}	-	±
B2Sa	1	2.7×10^{-6}	-	±
	5	1.3×10^{-5}	-	±
	10	2.7×10^{-5}	-	±
	20	5.5×10^{-5}	-	±
DSQ-3	1	2.6×10^{-6}	-	±
	5	1.3×10^{-5}	-	±
	10	2.6×10^{-5}	+++	+++
	20	5.3×10^{-5}	++++	++++

La evaluación se realizó con respecto al control de células sin fármaco de un sólo experimento efectuado por triplicado.

§ Sólo se observaron restos celulares

CLAVE: ++++ ----- 100 % mortalidad
 +++ ----- 75 % "
 ++ ----- 50 % "
 + ----- 25 % "
 - ----- 0 % "

T A B L A 5

Citoroxicidad de 8 metabolitos obtenidos de labiadas, en la línea celular X63, evaluada por incorporación de [H]TdR.

METABOLITO	DOSIS		1ª EVALUACION		2ª EVALUACION		** % MORTALIDAD REAL	
	µg/ml RPMI	[M]	CPM	% M*	CPM	% M*	1ª EVAL.	2ª EVAL.
			101363		112010			
	RPMI/DMSO		98469	2.85	108650	2.99		
DSO-1	0.05	1.3 x 10 ⁻⁷	93578	4.96	102229	5.9	2.1	3
	0.5	1.3 x 10 ⁻⁶	61357	37.68	92430	14.92	36.0	12.3
	5.0	1.3 x 10 ⁻⁵	36331	63.1	50012	53.96	62.0	52.5
	50.0	1.3 x 10 ⁻⁴	32531	66.96	73741	32.12	66.0	30.02
DSO-2	0.05	1.5 x 10 ⁻⁷	131105	+33.14	119627	+10.10	+36.0	+13.15
	0.5	1.5 x 10 ⁻⁶	121146	+23.02	84306	22.4	+27.0	20.0
	5.0	1.5 x 10 ⁻⁵	756	99.23	3248	97.01	99.2	97.0
	50.0	1.5 x 10 ⁻⁴	279	99.71	556	99.48	99.7	99.5
DSC-1	0.05	1.3 x 10 ⁻⁷	131102	+33.14	111141	+2.29	+36.0	+ 5.4
	0.5	1.3 x 10 ⁻⁶	130243	+32.26	107923	0.67	+35.0	+ 2.4
	5.0	1.3 x 10 ⁻⁵	105942	+ 7.58	79061	27.23	+11.0	25.0
	50.0	1.3 x 10 ⁻⁴	71364	27.52	61120	43.74	25.0	42.0
DSF	0.05	1.2 x 10 ⁻⁷	136646	+38.77	110196	+1.42	+43.0	+ 4.5
	0.5	1.2 x 10 ⁻⁶	129714	+31.73	118066	+8.66	+35.6	+12.0
	5.0	1.2 x 10 ⁻⁵	104803	+ 6.43	109295	+0.59	+ 9.5	+ 3.7
	50.0	1.2 x 10 ⁻⁴	60806	38.24	66059	39.2	36.0	37.3
DSK-1	0.05	1.4 x 10 ⁻⁷	120952	+22.83	92929	14.46	+26.0	11.8
	0.5	1.4 x 10 ⁻⁶	116912	+18.72	88176	18.84	+22.0	16.3
	5.0	1.4 x 10 ⁻⁵	114215	+16.0	86686	20.21	+19.0	17.7
	50.0	1.4 x 10 ⁻⁴	105919	+ 7.6	76974	29.15	+10.7	27.0
DSL1-1	0.05	1.4 x 10 ⁻⁷	117326	+19.15	121772	+12.07	+22.6	+15.5
	0.5	1.4 x 10 ⁻⁶	99981	+ 1.53	103968	4.3	+ 4.5	1.3
	5.0	1.4 x 10 ⁻⁵	111130	+12.85	91078	16.17	+16.1	13.6
	50.0	1.4 x 10 ⁻⁴	79950	18.8	20288	81.32	16.4	80.6
B2Sa	0.05	1.3 x 10 ⁻⁷	120661	+22.53	102165	5.96	+26.1	3.06
	0.5	1.3 x 10 ⁻⁶	154125	+56.52	92414	14.92	+61.1	12.3
	5.0	1.3 x 10 ⁻⁵	126654	+28.62	106690	1.8	+32.4	+ 1.22
	50.0	1.3 x 10 ⁻⁴	31003	68.51	66617	38.68	67.5	36.7
DSO-3	0.05	1.3 x 10 ⁻⁷	116324	+18.13	115933	+ 6.7	+21.6	+ 9.9
	0.5	1.3 x 10 ⁻⁶	105540	+ 7.18	129614	+19.29	+10.3	+22.9
	5.0	1.3 x 10 ⁻⁵	19765	79.92	55987	48.47	79.3	46.8
	50.0	1.3 x 10 ⁻⁴	386	99.6	8043	92.59	99.5	92.3

Las cifras expresan promedios de CPM de 2 experimentos efectuados por triplicado

(+) Presentaron CPM mayores que el control (% Sobrevida Fig.5)

* Los porcentajes son considerados con relación al control

** Los porcentajes son calculados con la fórmula de % mortalidad real

DTOTOXICIDAD DE METABOLITOS OBTENIDOS DE LABADAS (Incorporación de $[^3H]$ TDR)

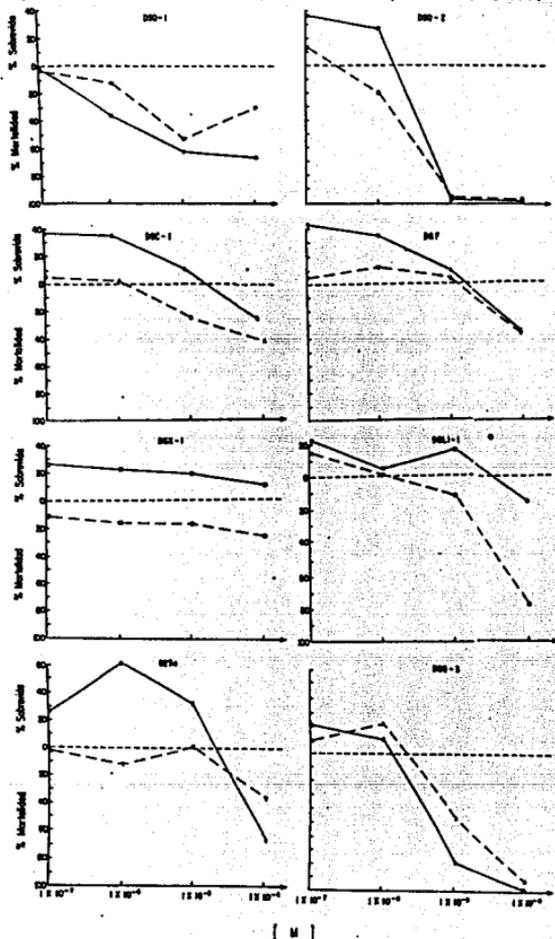


Fig. 4 - Curva dosis-respuesta de la citotoxicidad de 8 metabolitos obtenidos de labadas evaluada por incorporación de $[^3H]$ TDR en la línea celular X63. (—) Primera evaluación (---) Segunda evaluación

T A B L A 6

Citotoxicidad de los controles positivos, en la línea celular X63,
 evaluada por incorporación de ^3H TdR.

METABOLITO	DOBIS			CPM	% MORTALIDAD	
	ug/ml	[M]			% Mexp.	% Mreal
	RPMI			112010		
	RPMI/DMSO			108650	2.99	
Cis-platino	0.5	1.6×10^{-6}		31547	70.97	70.07
	5.0	1.6×10^{-5}		13252	87.90	87.52
	50.0	1.6×10^{-4}		5453	95.0	94.84
Mitomicina	0.1	2.9×10^{-7}		11391	89.6	89.27
	1.0	2.9×10^{-6}		4469	95.89	95.76
	10.0	2.9×10^{-5}		1147	98.95	98.60

* Los porcentajes son considerados con relación al control

** Los porcentajes son calculados con la fórmula de % mortalidad real

CONTROLES POSITIVOS (Incorporación de $[^3\text{H}]$ TdR)

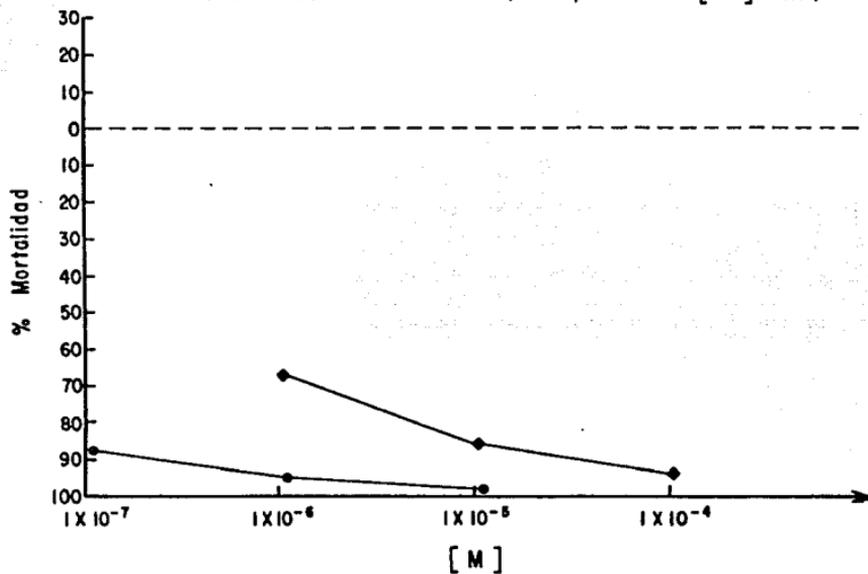


Fig. 5.- Citotoxicidad de los controles positivos mitomicina (—●—) y cis-platino (---●---) evaluada por incorporación de $[^3\text{H}]$ TdR en la línea celular X63.

(61)

Los datos obtenidos indican que los metabolitos DSO-1, DSO-2 y DSO-3 presentan actividad citotóxica a la célula tumoral en los diferentes sistemas de prueba utilizados.

DISCUSSION

DISCUSION

La existencia de productos naturales usados en la clinica como agentes anticancerigenos, ha llevado a la busqueda de nuevos productos de origen natural con actividad antineoplásica (14).

De algunas plantas de la familia Labiatae se ha aislado una variedad de bi y triciclos diterpenoides que muestran propiedades antitumorales (10,36) así como lactonas sesquiterpénicas que contienen en su molécula el sistema $O=C-C=CH$ el cual ha mostrado ser indispensable en la actividad antineoplásica de algunos metabolitos (18,19,20).

En estudios realizados con especies mexicanas pertenecientes a esta familia, también se han obtenido lactonas sesquiterpénicas y triciclos diterpenoides que contienen el sistema $O=C-C=CH$ en su molécula. En el presente trabajo se propuso la evaluación de la actividad citotóxica de 8 metabolitos secundarios obtenidos de labiadas mexicanas por la Dra. Lydia Rodríguez-Hahn y Baldomero Esquivel en el Instituto de Química de la U.N.A.M.

Existen varios métodos para el cernimiento de actividad citotóxica (13,18,19,20). En el presente trabajo y con el objetivo de seleccionar el más adecuado, se utilizaron los siguientes:

A) Apreciación Óptica de la alteración morfológica (6), B) Tinción con colorantes vitales (18,19,34) y C) Incorporación de radioisotopos (19,20).

El último de los métodos mencionados es uno de los más usados, ya que puede aplicarse tanto para evaluaciones *in vitro* como *in vivo* (19,20,34).

EFEECTO CITOTOXICO DE METABOLITOS OBTENIDOS DE LABIADAS MEXICANAS

Los 8 metabolitos fueron evaluados en los 3 diferentes sistemas de prueba utilizando las líneas celulares X63 y L5178y.

En la evaluación del daño morfológico por apreciación óptica los resultados obtenidos mostraron que los metabolitos DSQ-2 y DSQ-3 son citotóxicos para ambas líneas celulares (Tabla 4) y el metabolito DSQ-1 tiene un pequeño efecto sobre la línea X63, con respecto a los metabolitos restantes se observó que en general la línea L5178y es más sensible ya que independientemente de la concentración los metabolitos produjeron una cierta mortalidad.

A pesar de que esta técnica ha sido usada por diversos autores (6,7,18) para la evaluación de citotoxicidad de productos naturales en los cuales han obtenido resultados positivos de inhibición del

crecimiento celular; los datos obtenidos parecen indicar que este tipo de evaluaciones es útil tan sólo en los casos evidentes en los que la sustancia es muy citotóxica; en el caso de sustancias cuya actividad no es muy evidente, pero sin embargo es útil, la técnica no es capaz de detectar las diferencias, posiblemente debido a una gran desventaja intrínseca ya que la evaluación es cualitativa y no cuantitativa, además de que la apreciación individual varía.

En el método de tinción con colorantes vitales la viabilidad se evaluó tñendo las células con eosina al 0.1%, los datos revelaron que los metabolitos DSQ-1, DSQ-2 y DSQ-3 son citotóxicos (Tabla 3) y que el metabolito DSQ-2 es citotóxico presentando un efecto dosis-respuesta (Fig. 3), con respecto al resto de los metabolitos, las diferencias no son evidentes e inclusive los metabolitos DSF y DSLi-1 tienen un leve efecto estimulador.

Este método es adecuado para medir los efectos a nivel de membrana celular, ya que los colorantes son impermeables, por lo que si las células se tñen es debido a que existe una alteración en la membrana celular, por esta razón si las células se observan viables parecería ser que el metabolito no tuvo efecto, aunque también existe la posibilidad de que las células que se observan viables, estén afectadas por los metabolitos, entrando en un estado de reposo y no llevan a cabo su ciclo celular, por lo que para confirmar esta posibilidad se usan técnicas más sensibles como es

la incorporación de radioisótopos.

Esta técnica ha sido usada para valorar el efecto citotóxico de algunas lactonas sesquiterpénicas (19,20,34) en sistemas *in vivo* e *in vitro* en donde se ha observado que este tipo de sustancias inhiben la incorporación de radioisótopos en el ADN celular y puesto que muchas de las drogas de origen natural usadas en la clínica como anticancerígenos inhiben el crecimiento celular inespecíficamente interfiriendo de una u otra manera con la síntesis o utilización de ácidos nucleicos, en el presente trabajo se usó la incorporación de timidina tritiada para evaluar el efecto de los metabolitos sobre el ADN celular en un sistema *in vitro*; los resultados obtenidos mostraron una citotoxicidad positiva para los metabolitos en la dosis de 10^{-4} M (50 ug/ml) (Fig. 4) este efecto puede deberse a muchas razones, entre las cuales puede estar un efecto osmótico producto de la elevada concentración, aunque no descartamos que puede haber otra causa, por lo que sugerimos que se realicen ensayos más sensibles buscando la explicación de este fenómeno; los resultados también mostraron que los metabolitos -- DSQ-1, DSQ-2 y DSQ-3 son citotóxicos a una dosis de 5 ug/ml.

Este sistema de prueba es más sensible que los anteriores, pero no lo suficiente como para saber a que nivel existe el daño celular, puesto que sólo podemos saber si las células llevan a cabo su síntesis de ADN o no, ya que solamente las células que la

realicen podrán incorporar la timidina tritiada.

Varios autores refieren que las lactonas sesquiterpénicas que contienen el sistema $O=C-C=CH$ en su molécula, sufren una reacción de adición de tipo Michael con los grupos sulfhidrilos del glutatión reducido y la L-cisteína, con lo cual se inhibe la actividad de la ADNpolimerasa y la síntesis de ADN (18,19,20,34), por lo que se piensa que este sea el posible mecanismo de acción de los metabolitos DSQ-1, DSQ-2 y DSQ-3.

Otros autores refieren los posibles mecanismos de acción de los citotóxicos, basándose en ensayos de NMR, gradientes de sacarosa, ensayos electroforéticos, etc. (13,14) estudiando sólo la formación de aductos de los citotóxicos con el ADN o nucleótidos, pero esto no es muy válido, ya que estos aductos los obtienen a partir de enfrentar ADN libre con los agentes químicos pero no los obtienen de los cultivos con las células completas, es decir, para que estos datos tengan validez hay que tomar en cuenta todos los pasos que sufre el metabolito dentro de la célula. Una investigación más a fondo de la sensibilidad de los diferentes métodos de evaluación permitirá la identificación de los mecanismos responsables de los efectos citotóxicos y en los que sin lugar a dudas juega un papel importante la farmacocinética de los compuestos en los diferentes sistemas de prueba.

Si bien es cierto que tres de estos metabolitos presentan efecto citotóxico a la célula tumoral, este no es un parámetro definitivo, debido a que en un sistema *in vivo* existe una gran variedad de enzimas que llevan a cabo la biotransformación de sustancias, así como diversos valores de pH, los cuales no se encuentran en un sistema *in vitro*, y que afectan en una forma muy diferente el comportamiento y efecto del metabolito; lo que fundamenta el desarrollo de estudios adicionales en sistemas *in vivo* como son: el carcinoma de ascitis Walker 256, el tumor de ascitis de Ehrlich y la leucemia linfocítica P388 en ratones CF; así como la evaluación en sistemas *in vitro* que contengan sistemas de transformación metabólica (fracción microsomal S9 obtenida de hígado de rata) con el propósito de establecer el potencial antineoplásico de estos tres metabolitos.

Cabe mencionar que es importante considerar que algunos medicamentos pueden unirse a las proteínas del suero tanto *in vivo* como *in vitro*, lo que disminuye la cantidad de los medicamentos que llegan a las células (25), por lo que pudiera considerarse que las variaciones en el comportamiento de los metabolitos son debidas al suero que se adiciona al medio, sin embargo no se hicieron los experimentos comparativos que pudieran confirmar o rechazar esta hipótesis.

Aunque de acuerdo con la bibliografía revisada (19,20,25), en un

sistema *in vivo* existen una gran variedad de barreras de protección que influyen en el efecto del fármaco, también en los sistemas *in vitro* existen factores que afectan el comportamiento de un fármaco como por ejemplo: cambios en el pH, la osmolaridad del medio, la temperatura, el porcentaje de CO₂, etc.

2

Cabe señalar que los metabolitos no son solubles en agua y fue necesario utilizar DMSO para preparar soluciones homogéneas de ellos, en nuestra experiencia el DMSO solo en la concentración en la que se usó (0.25%) no produjo citotoxicidad; como se conoce que aumenta la permeabilidad celular, posiblemente favorece la acción citotóxica de algunos agentes químicos, pero como los metabolitos con los que se trabajó no son hidrosolubles, no se pudieron realizar los experimentos comparativos para confirmar o descartar esta hipótesis.

Por otro lado hay que considerar que a pesar de la discrepancia en los resultados la citotoxicidad de los metabolitos DSO-1, DSO-2 y DSO-3 en cualquiera de los tres sistemas de prueba, indica que son los metabolitos con mayor posibilidad de poseer actividad antineoplásica.

De acuerdo con nuestro objetivo de seleccionar el método más adecuado para la evaluación de citotoxicidad, de los tres

diferentes sistemas de prueba utilizados en el presente trabajo, el más adecuado es la incorporación de radioisótopos, aunque cabe señalar que no existe una prueba infalible que por sí sola nos permita seleccionar a los antineoplásicos, por esto, los grupos de expertos internacionales recomiendan el uso de una batería de pruebas que evalúen diferentes tipos de daño en distintas clases de células.

Es importante tener presente además que los resultados obtenidos en un sistema *in vitro*, aún en los cultivos con transformación metabólica pueden ser por completo distintos a lo que se obtiene cuando se administra la sustancia a un organismo tan complejo como lo es el hombre.

Un resultado positivo en cualquier prueba de cernimiento, tan solo nos indica que la sustancia puede poseer actividad antineoplásica, pero se requiere de un conocimiento integral de sus efectos, para que se cumpla tal aseveración.

A pesar de que los citotóxicos fueron evaluados en cultivos de células tumorales, la extrapolación de los datos obtenidos *in vitro* a la situación *in vivo* debe manejarse con mucho cuidado, pues solamente nos sirven como guía de la posible actividad *in vivo*, ya que existen algunos fármacos que muestran ser efectivos en un

sistema *in vitro* y a la misma concentración no presentan ningún efecto *in vivo* (25), y esto se debe principalmente a que en el cultivo las células están expuestas directamente a la sustancia, mientras que en el sistema *in vivo* existen factores que afectan la farmacocinética de las sustancias como por ejemplo: su reactividad con proteínas, las diferentes condiciones de pH, la accesibilidad al tejido blanco, etc.; por esta razón los datos obtenidos *in vitro* no pueden tener el mismo valor que los obtenidos *in vivo* ya que las múltiples barreras disminuirán la dosis y los efectos, de ahí la necesidad de poseer suficientes herramientas para entender y establecer cuando un efecto es real.

También es importante tomar en cuenta los efectos indeseables del metabolito, ya que existen algunas sustancias que al administrarse se unen a proteínas séricas y se depositan en los tejidos, donde pueden quedarse por muchos años, y a la larga presentarse los efectos de una sobredosificación.

Actualmente entre los agentes usados en la quimioterapia del cáncer, existen sustancias que son mutagénicas y carcinogénicas, por lo que se tiene el riesgo de que a largo plazo produzca metástasis o tumores secundarios; el hecho de que una droga sea muy citotóxica nos permite inferir que probablemente no sea mutagénica ya que al inhibir la división celular no se transmiten las

alteraciones producidas.

En el presente trabajo se realizó el cernimiento del efecto citotóxico sobre sistemas *in vitro* con líneas celulares, aunque en la bibliografía se reporta que algunos autores (13) usan sistemas bacterianos para el cernimiento de agentes con posible actividad antineoplásica; en nuestro caso no usamos estos sistemas de prueba ya que la farmacocinética de las bacterias difiere mucho de la farmacocinética de células de mamífero, pues posiblemente el sistema de reparación de daño al ADN en las bacterias es diferente a los sistemas de reparación de las células de mamífero. Otro sistema que se usa en el cernimiento de nuevos agentes antineoplásicos, es el análisis espectrofotométrico del rojo neutro el cual consiste en cuantificar espectrofotométricamente la cantidad del colorante rojo neutro que es incorporado por las células viables, este sistema tiene la ventaja sobre el sistema de tinción con colorantes vitales de que se puede eliminar el excedente de colorante no incorporado cosa que no puede hacerse en este último sistema, por lo que el análisis espectrofotométrico es un sistema recomendable para el cernimiento del efecto citotóxico (6,7).

Con respecto al sistema de tinción con colorantes vitales consideramos que es demasiado subjetivo ya que depende de la interpretación del observador y es mayormente cualitativo que

cuantitativo. Por lo que sería conveniente buscar una modificación del método que nos permita eliminar el excedente de colorante y así la interpretación sea más objetiva.

Para finalizar, quiero comentar que no puede excluirse que una sustancia que no mostró efectos citotóxicos en los diversos sistemas, constituya un agente anticancerígeno, así como tampoco se puede atribuir para el humano el significado biológico de los resultados obtenidos en pruebas de citotoxicidad en otros organismos (19,20).

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Tres de los metabolitos estudiados presentan un efecto citotóxico en las células tumorales usadas, sin embargo, este estudio no cubre los requerimientos para poder decir que son ideales anticancerígenos, ya que el estudio debe ser completado con pruebas en células normales, como en sistemas *in vivo*, además de hacer más estudios en células tumorales, para ver el efecto producido por los metabolitos en los diferentes sistemas y así poder definir si tienen capacidad anticancerígena o no.

APENDICES

APENDICE I

SOLUCIONES UTILIZADAS PARA EL MANTENIMIENTO DE LAS LINEAS CELULARES

1.- Aminoácidos no esenciales (100 x) GIBCO:

L-alanina	0.89 mg/ml
L-asparagina	1.5 mg/ml
L-acido aspartico	1.33 mg/ml
L-acido glutámico	1.47 mg/ml
glicina	0.75 mg/ml
L-prolina	1.15 mg/ml
L-serina	1.05 mg/ml

2.- L-Glutamina 200 mM (100x) GIBCO

3.- Antibióticos: penicilina/estreptomina (100x) (penicilina 100 mg/ml y estreptomina 100 mg/ml)

4.- β -mercaptoetanol 10^{-5} M

5.- Piruvato de sodio 100 mM (100x) GIBCO

6.- Suero: Se utilizó suero fetal bovino (Flow laboratories, Virginia, USA.) libre de micoplasma y de inmunoglobulinas. Antes de utilizarse, el suero se descomplementó calentandolo durante 30 min. en un baño de agua a 56 C.

APENDICE II

MEDIO DE CULTIVO RPMI 1640

Para un litro:

Medio RPMI 1640 (GIBCO)	1 sobre
Bicarbonato de sodio (NaHCO_3)	2.0 g
Agua desmineralizada	1 Lt

Manera de prepararse:

El medio se preparó disolviendo el contenido de un sobre en un litro de agua desionizada, se agregaron 2g de NaHCO_3 por litro de medio, se ajustó el pH a 7.3 y se esterilizó por filtración en doble filtro milipore de 0.22 μ , finalmente se almacena a 4 °C en alcuotas de 500 ml.

Al momento de utilizarse, cada 100 ml de medio se complementaron con lo siguiente:

- 1ml de sol. de antibióticos
- 1ml de sol. de glutamina
- 10ml de suero fetal bovino
- 1ml de piruvato de sodio
- 1ml de aminoácidos no esenciales
- 36 μ l de β -mercaptoetanol (10⁻⁵ M)

(76)

APENDICE III

SOLUCION DE AZUL TRIPANO 1:5

Solución de azul tripano:

Trypan blue stain (GIBCO) 0.4 %

0.4 g /100 ml Normal saline

Tomar 1 ml de solución de azul tripano y diluirlo 1:5 con 4 ml de PBS 1x

SOLUCION DE PBS (1X)

NaCl	8.0 g
KCl	0.2 g
Na HPO _{2 4}	1.15 g
KH PO _{2 4}	0.2 g
Agua desmineralizada	1 Lt

Colocar las sales en un matraz aforado de 1 Lt. y aforar con agua desmineralizada.

Se ajusta el pH a 7.2 y conserva a 4 ° C.

(77)

APENDICE IV

SOLUCION DE EOSINA 0.1 %

Eosina 0.1 g

Solución de PBS 100 ml

Pesar 0.1 g de eosina y disolverlos en 100 ml de PBS ix

(78)

APENDICE V

LIQUIDO DE CENTELLED

PPD	4.0 g
POPOP	0.1 g
TOLUENO	1.0 Lt

Se pesan las sustancias y se colocan en un frasco con tapa, se agrega el tolueno y se deja agitando toda una noche en refrigeración, se mantiene en el cuarto frio.

(79)

ESTA TESTIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

APENDICE VI

ABREVIATURAS

ADN	ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO
ARN	ACIDO RIBONUCLEICO
AMPc	ADENOSIN MONOFOSFATO CICLICO
GMPC	GUANOSIN MONOFOSFATO CICLICO
mg	MILIGRAMOS
ml	MILILITROS
M	CONCENTRACION MOLAR
mM	MILIMOLAR
min	MINUTOS
u	MICRAS
ul	MICROLITROS
ug	MICROGRAMOS
DMSO	DIMETILSULFOXIDO
$^{\circ}\text{C}$	GRADOS CENTIGRADOS
$\frac{3}{\text{H}}\text{TdR}$	TIMIDINA TRITIADA
Cl	CURIS
uCi	MICROCURIS
mmol	MILIMOLES
hrs	HORAS
NMR	RESONANCIA MAGNETICA NUCLEAR

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- 1.-Bernard J. (1967)
Treatment of leukemias, Hoodkin's disease and allied diseases by natural products.
Lloydia 30 (4) 291-292.
- 2.-Beyer H. Karl Jr.
Discovery, development and delivery of new drugs
Monographs in Pharmacology and Physiology
Vol. 3 pag. 87
SP Medical and Scientific Books.
- 3.-Bhakuni, D.S., Bittner, M. and M. Silva. (1972)
Anticancer agents from chilean plants, *Cassia obtusa*
Revista Latinoamericana de Quimica 4 (1)
- 4.-Bhakuni, D.S. et al (1974)
Anticancer agents from chilean plants *Digitalis purpurea* L. var *alba*
Revista Latinoamericana de Quimica 5 (4) 230-235.
- 5.-Bhakuni, D.S., J.L. Hartwell, et al (1976)
Screening of chilean plants for anticancer activity. I.
Lloydia 39 (4) 225-243.
- 6.-Borenfreund Ellen (1985)
Toxicity determined *in vitro* by morphological alterations and neutral red absorption.
Toxicology Letters 24, 119-124.
- 7.-Borenfreund Ellen., H. Babich (1987)
Structure-activity relation (SAR), models established *in vitro* with the neutral red citotoxicity assay.
Toxicology in vitro. Vol 1, No. 1, pp 3-9
- 8.-Brachet Jean. (1985)
Molecular cytology. Vol I, The cell cycle.
Academic Press. Inc.
- 9.-Davidshon, I. y Nelson, M.D. (1978)
Diagnóstico clínico por el laboratorio
Editorial Salvat. 2a. edición.
- 10.-Esquivel R. Baldomero, Rodriguez-Hahn Lydia (1985)
Structure of salvigenolide, a novel diterpenid with a rearranged neo-clerodane skeleton from *Salvia fulgens*
Tetrahedron Vol 41, No. 16, 3213-3217.

- 11.-Esquivel R. Baldomero (1986)
Estudio quimiotaxonómico de la sección fulgentes del género *Salvia* (Labiatae).
Tesis (Maestría) México
- 12.-Goodman Louis S. and Alfred Gilman
The Pharmacological Basis of Therapeutics.
5a. edición.
- 13.-Greenstein M., W.M. Maiese. (1984)
Prescreens for novel antitneoplastic agents.
Developments in Industrial Microbiology. Vol 25, pag. 267.
- 14.-Hellman K. (1972)
Anticancer drugs.
Chemistry in Britain B , pag. 69.
- 15.-Kupchan S.M. (1962)
Cancer Chemotherapy Rep. 25 (1).
- 16.-Kupchan S.M. *et al* (1973)
Lloydia 36 (3) 338-346.
- 17.-Kupchan S.M. (1974)
Novel natural products with antitumor activity.
Fred. Proc. 33, No. 11.
- 18.-Lee K.H., Furukawa H. and E.S. Haung (1971)
Citotoxicity of sesquiterpene lactons.
Cancer Research 31, 1649-1654.
- 19.-Lee K.H., E. Chun Mar, *et al* (1977)
Antitumor agents. A proposed mechanism for inhibition of cancer growth by Tenuilin and Helenalin and related cyclopentenones.
Journal of Medical Chemistry. Vol 20, No. 3, pag. 333.
- 20.-Lee K.H., E. Chun Mar *et al* (1977)
Sesquiterpene antitumor agents: Inhibitors of cellular metabolism.
science Vol 196, abril, pp 533-535.
- 21.-Mazia Daniel (1961)
Como se dividen las células.
Scientific American, Septiembre.
- 22.-Neuss N., I.S. Johnson, J. Armstrong and C.J. Jensen (1964)
The *Vincæ* alkaloids (antitumor agents)
Advance Chemiotherapy 1; 133-174.

- 23.-Noble, R.L., Beer C.T. and J.H. Cutts (1958)
Role of chance observations in chemotherapy; *VIIOLA CORONA*
Annals N.Y. Acad. Sci. 76; 882-894.
- 24.-Ortiz Muñiz A. Rocio. (1987)
Efecto de la desnutrición sobre las células de la médula ósea
de rata.
Tesis (Doctorado) México.
- 25.-Ostrosky W. Patricia (1986)
Efectos genotóxicos de drogas antiparasitarias
Tesis (Doctorado) Fac. de Medicina, México.
- 26.-Ramamoorthy T.P. (1984)
Pi Syst. Evol. (146) 141.
- 27.-Rodríguez Carranza Rodolfo.
Investigación Preclínica en el desarrollo de medicamentos.
- 28.-Roland T., Skeel M.D.
Manual of cancer chemotherapy.
Little Brown and Company (Boston).
- 29.-Sainsbury Malcom (1979)
Natural Products in the fight against cancer.
Chemistry in Britain 15; 127.
- 30.-Sanchez Aguirre Frco. J. (1987)
Intercambio de cromátides hermanas y ciclo celular en
diferentes subpoblaciones de linfocitos T humanos.
Tesis (Maestría) Fac. de Medicina, México.
- 31.-Stock J.A. (1970)
Chemotherapy of cancer
Chemistry in Britain 6, pag. 11
- 32.-Trice R., E.L. Schneider (1976)
The utilization of Bromodeoxyuridine incorporation into DNA for
the analysis of cellular kinetics.
- 33.-Todd Sanford
Diagnóstico clínico por el laboratorio
Salvat editores.
- 34.-Victor L. Sylvia, Hycong L. Kim (1977)
The sesquiterpene lactone Hymenoxon acts as a bifunctional
alkylating agent.
Cell Biology and Toxicology. Vol 3, No. 1, Marzo, pp 39-49.

- 35.-Villo Claude A. (1978)
Biología.
7a. edición. Editorial Interamericana, México.
- 36.-Wagner H. (1977)
Pharmaceutical and economic use of the Labiatae and Rutaceae
fam.
Revista Latinoamericana de Química 8; 16-25.
- 37.-Warren John R., Vincent F. Simmon (1980)
Properties of hypolipidemic peroxisome proliferators in the
lymphocyte H3 Thymidine and Salmonella mutagenesis assay.
Cancer Research 40. 36-41 January.
- 38.-E. Hurwitz., D. Burowski (1986)
A synergistic effect between anti-idiotypic antibodies and
antineoplastic drugs in the therapy of a murine B-cell tumor.
Int. J. Cancer; 37, 739-745.
- 39.-Tello Alfonso Julieta P. (1986)
Estudios citotóxicos *in vitro* de algunos derivados de plantas
de la familia de las compuestas con probable actividad
anticancerígena
Tesis (Licenciatura) Facultad de Química UNAM.
- 40.-Vidalas Ibarra Guadalupe Teresita (1987)
Estudio de la citotoxicidad *in vitro* de 2 dilactonas
sesquiterpénicas con posible actividad anticancerosa
Tesis (Licenciatura) Escuela de Química, Universidad la Salle.