

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA



EFFECTO GENOTOXICO DE LA T-514 OBTENIDA  
DE *Karwinskia humboldtiana* SOBRE  
LINFOCITOS HUMANOS *in vitro*

POR

MA. DEL ROBLE VELAZCO CAMPOS

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad  
en Farmacología y Toxicología

Enero 1999



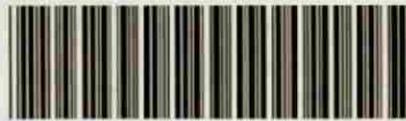
U ANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TD  
QP981  
.K37  
V4  
c.1



1080084926



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

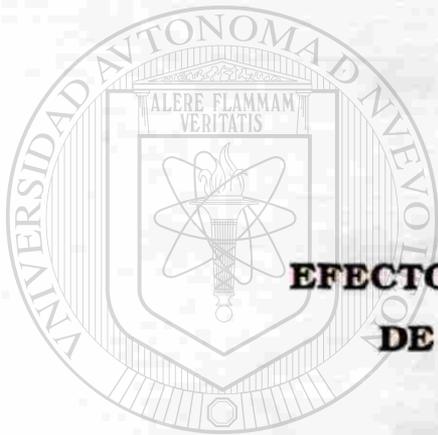
®

13397

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON**

**FACULTAD DE MEDICINA**

*De Karwinski*  
*in vitro*



**EFFECTO GENOTOXICO DE LA T-514 OBTENIDA  
DE *Karwinskia humboldtiana* SOBRE  
LINFOCITOS HUMANOS *in vitro***

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA **Por** DE NUEVO LEÓN

®

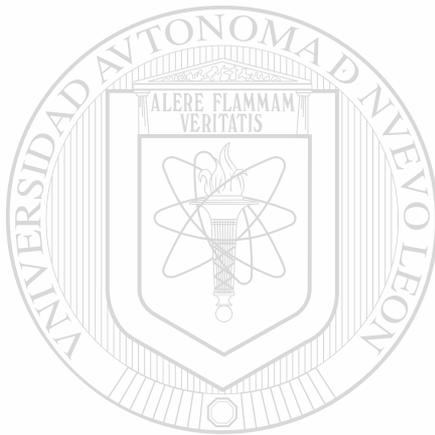
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
**MA. DEL ROBLE VELAZCO CAMPOS**

**Como requisito parcial para obtener el Grado de  
DOCTOR EN CIENCIAS con Especialidad  
en Farmacología y Toxicología**



**Enero 1999**

TD  
9 P981  
K3 2  
V4



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

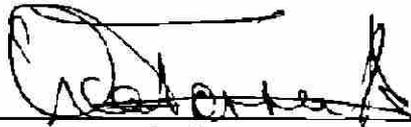
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



**"EFECTO GENOTOXICO DE LA T-514 OBTENIDA DE *Karwinskia humboldtiana* SOBRE LINFOCITOS HUMANOS *in vitro*"**

**Aprobación de la Tesis:**

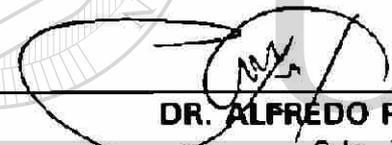


**DR. OSCAR TORRES ALANIS**  
Presidente

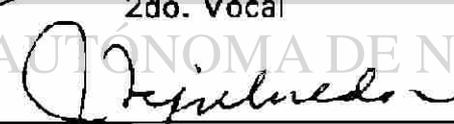
**DRA. LOURDES GARZA OCAÑAS**  
Secretario



**DRA. PATRICIA OSTROSKY WEGMAN**  
1er. Vocal



**DR. ALFREDO PIÑEYRO LOPEZ**  
2do. Vocal



**DR. JULIO SEPULVEDA SAAVEDRA**  
3er. Vocal



**DR. ROBERTO MERCADO LONGORIA**  
Subdirector  
de Investigación y Estudios de Posgrado



# UANL

---

**Asesores:**

**Dr. Med Oscar Torres Alanís**  
**asesor principal**

**Dra. Patricia Ostrosky Wegman**  
**asesor externo**

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. y en el Departamento de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la U.N.A.M.

## AGRADECIMIENTOS

A [CONACYT]

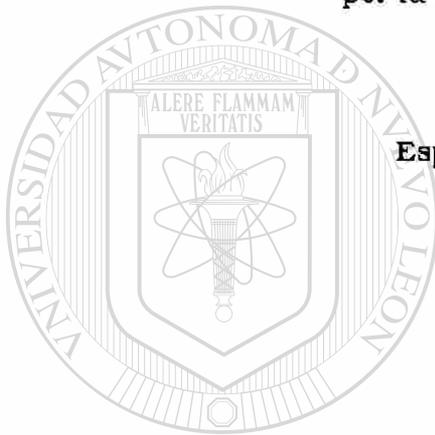
CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGIA

por la beca otorgada con No. de Registro 53047

Area: Ciencias Biomédicas

Grado: Doctorado

Especialidad: Farmacología y Toxicología



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A los miembros del Jurado Examinador, Dra. Garza Ocañas, al Dr. Torres Alanís, al Dr. Sepúlveda, por sus valiosos comentarios y sugerencias en la revisión de este trabajo,

Al Dr. Alfredo Piñeyro por brindarme su apoyo y confianza para la realización de mi tesis.



A la Dra. Laura Martínez de Villarreal por su apoyo y motivación a seguir aprendiendo,

A Regina por las experiencias inolvidables que pasamos dentro y fuera del laboratorio,

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

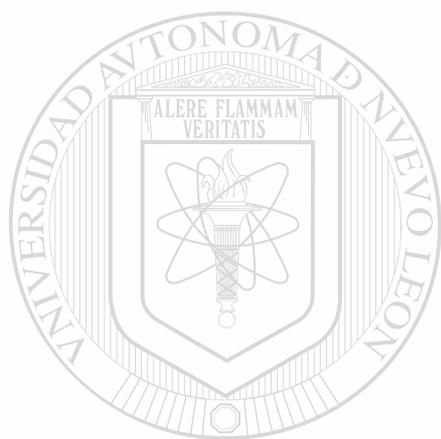


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A Ana Ma., Maricha, Paty Ramírez, Emilio, Luis Alonso, Luis Serrano, Montserrat, Aurora Castillo, Alejandra, Deyanira y Ernesto Torres por hacer del laboratorio un sitio en donde se comparten el trabajo y la amistad.

Con especial cariño y admiración a la Dra. Patricia Ostrosky Wegman.

Gracias por creer en mí y darme la oportunidad de aprender tus enseñanzas, por tu  
invaluable apoyo y amistad.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

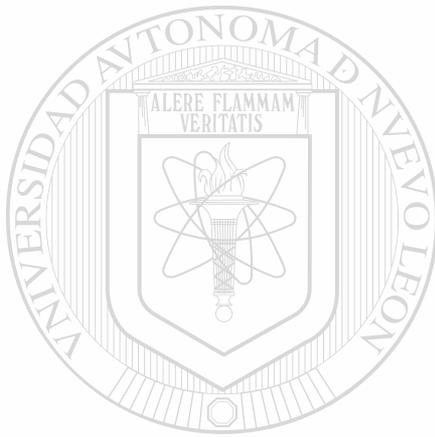
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA:

A mis padres, Ma. Elena y Marcelo,  
testigos amorosos y solidarios de mi vida;  
a mi hermana Alejandra,

a Manuel con todo mi amor

a Adan por iniciarme en un nuevo doctorado.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
<b>1 INTRODUCCION</b>	
1.1 Generalidades . . . . .	1
1.2 Carcinogénesis Química . . . . .	4
1.3 Productos Naturales en el Tratamiento del Cáncer . . . . .	6
<b>2 DERIVADOS ANTRAQUINONICOS Y ANTRACENONICOS</b>	
2.1 Generalidades . . . . .	10
2.1.1 Nomenclatura y Estructura Química . . . . .	11
2.1.2 Metabolismo . . . . .	11
2.2 Mutagenicidad . . . . .	14
2.3 Carcinogenicidad. . . . .	17
2.4 Actividad Citostática . . . . .	17
2.4 <i>Karwinskia humboldtiana</i> . . . . .	18
<b>3 EL CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS</b>	
3.1 Generalidades . . . . .	22
3.2 El Ciclo Celular. . . . .	24
3.3 Aberraciones Cromosómicas . . . . .	26
3.4 Intercambio de Cromátidas Hermanas . . . . .	27
3.5 Cinética de Proliferación Celular e Índice Mitótico. . . . .	30
3.6 Activación Metabólica . . . . .	32
<b>4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> . . . . .	34
4.1 Hipótesis de Trabajo . . . . .	35
4.2 Objetivo General del Trabajo . . . . .	36
4.2.1 Objetivos Específicos . . . . .	36

## 5 MATERIAL Y METODO

5.1	Linfocitos Humanos . . . . .	37
5.1.1	Donadores . . . . .	37
5.1.2	Cultivo de Linfocitos . . . . .	37
5.1.3	Preparación de Lamnillas . . . . .	38
5.1.4	Tinción . . . . .	39
5.1.5	Análisis Microscópico . . . . .	40
5.1.5.1	Índice Mitótico . . . . .	40
5.1.5.2	Cinética de Proliferación Celular . . . . .	41
5.1.5.3	Intercambios de Cromátidas Hermanas . . . . .	41
5.1.5.4	Aberraciones Cromosómicas . . . . .	41
5.1.6	Activación Metabólica. . . . .	42
5.1.7	Tratamientos . . . . .	42
5.1.8	Análisis Estadístico . . . . .	44
5.1.9	Citometría de Flujo . . . . .	45
5.1.9.1	Obtención de Células Mononucleadas . . . . .	46
5.1.9.2	Tinción . . . . .	47
5.2	<i>Salmonella typhimurium</i> (Prueba de Ames) . . . . .	48

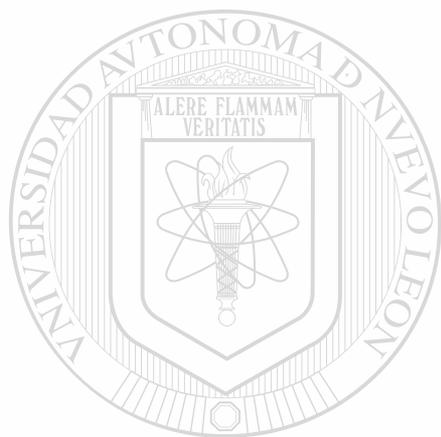
## 6 RESULTADOS

6.1	Cultivo de Linfocitos . . . . .	50
6.1.1	Aberraciones Cromosómicas . . . . .	50
6.1.1.1	Sin Activación Metabólica . . . . .	50
6.1.1.2	Con Activación Metabólica . . . . .	53
6.1.2	Intercambios de Cromátidas Hermanas . . . . .	56
6.1.2.1	Sin Activación Metabólica . . . . .	56
6.1.2.2	Con Activación Metabólica . . . . .	57
6.1.3	Cinética de Proliferación Celular e Índice Mitótico . . . . .	58
6.1.3.1	Sin Activación Metabólica . . . . .	58
6.1.3.2	Con Activación Metabólica . . . . .	62
6.1.4	Citometría de Flujo . . . . .	66
6.2	<i>Salmonella typhimurium</i> . . . . .	68

## 7 DISCUSION

7.1	Cultivo de Linfocitos . . . . .	71
7.1.1	Aberraciones Cromosómicas . . . . .	71
7.1.2	Intercambio de Cromátidas Hermanas . . . . .	72

7.1.3	Cinética de Proliferación Celular e Índice Mitótico	. . . . .	73
7.1.4	Citometría de Flujo	. . . . .	77
7.2	<i>Salmonella typhimurium</i>	. . . . .	78
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES , RECOMENDACIONES Y CONTRIBUCIONES</b>	. . . . .	<b>80</b>
	<b>REFERENCIAS</b>	. . . . .	<b>82</b>



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
<b>1</b> Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas Estructurales en Linfocitos . . . . .	51
<b>2</b> Frecuencia de Aberraciones Cromosómicas Estructurales en Linfocitos con Activación Metabólica . . . . .	54
<b>3</b> Efecto de la T-514 sobre la Cinética de Proliferación Celular . . . . .	59
<b>4</b> Efecto de la T-514 sobre la Cinética de Proliferación Celular con activación metabólica . . . . .	63
<b>5</b> Efecto de la T-514 sobre la Cinética de Proliferación Celular por 2 hrs sin activación metabólica . . . . .	65
<b>6</b> Efecto de la T-514 sobre la Cepa TA1537 de <i>Salmonella typhimurium</i> . . . . .	69
<b>7</b> Efecto de la T-514 sobre las Cepas TA98 y TA100 de <i>Salmonella typhimurium</i> . . . . .	70

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## LISTA DE FIGURAS

Figuras	Página
1 Clasificación de los Cambios Moleculares en el DNA que Aparecen como Resultado de la Mutación . . . . .	4
2 Diferentes Estructuras Químicas de los Derivados Antraquinónicos . . . . .	12
3 Diagrama Esquemático del Metabolismo de los Glucósidos y Ágliconas Antraquinónicas . . . . .	13
4 Estructuras Químicas de Algunos Compuestos Antracénónicos y Antraquinónicos . . . . .	18
5 Estructura Química de la T-514 . . . . .	20
6 Diagrama del Ciclo Celular que Muestra las Proporciones Ocupadas para cada Fase . . . . .	25
7 Representación Esquemática de un Modelo para el Mecanismo de ICH Espontáneo e Inducido por Mutágenos . . . . .	29
8 Incorporación de BrdU para el Análisis de la Cinética de Proliferación Celular . . . . .	32
9 Esquema del Cultivo de Linfocitos . . . . .	39
10 Esquema de los Intercambios y su Valor . . . . .	41
11 Intensidad de Fluorescencia Relativa. . . . .	45
12 Esquema del Procedimiento para la Detección de Mutágenos en <i>Salmonella typhimurium</i> . . . . .	48
13 Efecto de la T-514 sobre el Número de Rompimientos Totales . . . . .	52
14 Efecto de la T-514 sobre el Número de Células con Aberraciones . . . . .	53

<b>15</b>	<b>Efecto de la T-514 sobre el Número de Romplimientos Totales en Presencia de Activación Metabólica</b>	<b>55</b>
<b>16</b>	<b>Efecto de la T-514 sobre el Número de Células con Aberraciones en Presencia de Activación Metabólica</b>	<b>56</b>
<b>17</b>	<b>Efecto de la T-514 sobre la Frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas</b>	<b>57</b>
<b>18</b>	<b>Efecto de la T-514 sobre la Frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas en Presencia de Activación Metabólica</b>	<b>58</b>
<b>19</b>	<b>Comparación del Efecto de la T-514 y la MM-C sobre la Cinética de Proliferación Celular</b>	<b>60</b>
<b>20</b>	<b>Comparación del Efecto de la T-514 y la MM-C sobre el Índice de Replicación</b>	<b>61</b>
<b>21</b>	<b>Comparación del Efecto de la T-514 y la MM-C sobre la Inhibición del Índice Mitótico</b>	<b>62</b>
<b>22</b>	<b>Efecto de la T-514 sobre la Cinética de Proliferación Celular en Presencia de Activación Metabólica</b>	<b>63</b>
<b>23</b>	<b>Efecto de la T-514 sobre la Inhibición del Índice Mitótico y el Índice de Replicación en Presencia de Activación Metabólica</b>	<b>64</b>
<b>24</b>	<b>Efecto de la T-514 sobre la Cinética de Proliferación Celular por 2 hrs de Exposición</b>	<b>65</b>
<b>25</b>	<b>Efecto de la T-514 sobre la Inhibición del Índice Mitótico y el Índice de Replicación por 2 hrs de Exposición</b>	<b>66</b>
<b>26</b>	<b>Porcentajes de las Fases del Ciclo Celular en Cultivos de 24 hrs Tratados con T-514 y MM-C</b>	<b>67</b>

## NOMENCLATURA

<b>AC</b>	Aberraciones Cromosómicas
<b>Ac.PC</b>	Acido Pterolónico
<b>9-AAC</b>	9-Aminoacridina
<b>2-AA</b>	2-Aminoantraceno
<b>BrdU</b>	Bromodesoxiuridina
<b>Conc.</b>	Concentración
<b>CP</b>	Ciclofosfamida
<b>CPC</b>	Cinética de Proliferación Celular
<b>DNA</b>	Acido Desoxirribonucleico
<b>hrs</b>	Horas
<b>ICH</b>	Intercambio de Cromátidas Hermanas
<b>IM</b>	Indice Mitótico
<b>IR</b>	Indice de Replicación
<b>µM</b>	micro Molar
<b>mM</b>	milij Molar
<b>MM-C</b>	Mitomicina-C
<b>NADPH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Reducido
<b>p</b>	probabilidad
<b>PHA</b>	Fitohemaglutinina
<b>rpm</b>	Revoluciones por Minuto
<b>S9</b>	Sobrenadante microsomal obtenido a 9000 g

## RESUMEN

Ma. del Roble Velazco Campos

Fecha de graduación: Enero 1999

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina

**Título del Estudio:** EFECTO GENOTOXICO DE LA T-514  
OBTENIDA DE *Karwinskia humboldtiana*  
SOBRE LINFOCITOS HUMANOS *in vitro*

**Número de páginas:** 91

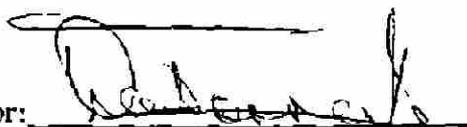
Candidato para el grado de  
Doctor en Ciencias con  
Especialidad en Farmacología y  
Toxicología

**Area de Estudio:** Toxicología Genética

**Propósito y Método del Estudio:** La toxicidad de la *Karwinskia humboldtiana*, planta perteneciente a la familia *Ranunculaceae*, se ha evaluado en numerosos estudios. De esta planta se han aislado cuatro antracenos diméricos, nombradas T-496, T-514, T-516 y T-544 de acuerdo a su peso molecular. La T-514 en particular ha mostrado ser tóxica en hígado y pulmón así como en líneas celulares tumorales, en especial para las células de hepatoma. Por esta razón, se ha sugerido que la toxina pudiera ser utilizada como un agente antineoplásico. El presente estudio se realizó con el fin de caracterizar la actividad biológica de la T-514 como un potencial agente citostático y genotóxico. Linfoцитos de sangre periférica en cultivo se utilizaron como un sistema de prueba, donde se evaluaron los siguientes parámetros de genotoxicidad: aberraciones cromosómicas e intercambios de cromátidas hermanas; y como parámetros de capacidad citotóxica y citostática, se evaluó el índice mitótico y la cinética de proliferación celular. Con el fin de evaluar mutaciones génicas, se utilizaron las cepas TA98, TA100 y TA1537 de *Salmonella typhimurium*.

**Contribuciones y Conclusiones:** Los resultados para genotoxicidad fueron negativos, sin embargo, la proliferación fue afectada por la toxina, demostrando una actividad citostática independiente del daño genotóxico. En *Salmonella typhimurium* la T-514 no indujo mutaciones génicas.

Firma del Asesor:



# CAPITULO I

## INTRODUCCION

### 1.1. Generalidades

El campo de la Toxicología aborda los efectos de los agentes químicos y físicos sobre sistemas vivos, con el propósito de definir los efectos sobre la salud, para lo cual se apoya especialmente en datos y metodología de varias ciencias básicas, tales como la fisiología, farmacología, genética, embriología, química y bioestadística.

Desde hace 30 años, la Toxicología ha proporcionado la fuente primaria de datos acerca de los efectos sobre la salud de productos químicos existentes o nuevos. Sin esta información, muchos compuestos químicos potencialmente peligrosos solo podrían haberse identificado mediante la exposición humana. De hecho esto ha ocurrido con algunos agentes, como el accidente con el metilisocianato en Bhopal, India en 1984, y el uso de armas químicas.

La Toxicología Genética identifica y analiza la acción de agentes potencialmente tóxicos hacia los componentes hereditarios de los sistemas vivos. Algunos tóxicos dañan al complejo genético a concentraciones que también producen citotoxicidad aguda no específica y muerte; el objetivo principal de la Toxicología Genética, sin

embargo, es el de detectar y analizar el daño potencial de aquéllos agentes que interaccionan directa o indirectamente con los ácidos nucleicos y que producen alteraciones en elementos genéticos a concentraciones subtóxicas modificando las características hereditarias o inactivando al DNA, agentes a los que se les denomina **genotóxicos**.

El surgimiento de esta disciplina se remonta a 1927 cuando se demostró que la radiación aumentaba la frecuencia de mutaciones espontáneas (Müller, 1927); veinte años después se demostró el mismo hallazgo con agentes químicos utilizando especies no mamíferas. Cattanaach (1966) sugirió por primera vez que algunas enfermedades hereditarias podrían tener un origen ambiental.

Con el descubrimiento de la estructura del ácido desoxirribonucleico (DNA) en los años 50 por Watson y Crick se abrieron nuevos horizontes para el estudio de la mutagénesis. En 1969 la Toxicología Genética fue reconocida como disciplina al fundarse la Sociedad de Mutagénesis Ambiental bajo el liderazgo del Dr. Alexander Hollaender en Estados Unidos. El concepto de carcinógenos mutagénicos fue revitalizado seguido de la introducción de la activación de procarcinógenos empleando la mediación de hospederos o de los sistemas de activación mediante microsomas *in vitro*.<sup>®</sup>

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Así, la Toxicología Genética ha desempeñado un papel dual en la evolución de programas de seguridad. Su primera función es la de implementar pruebas y métodos de asesoramiento de riesgo para definir el impacto de agentes genotóxicos que se encuentran en el ambiente y cuya presencia pudiera alterar la integridad de la reserva génica humana. La segunda función es la de aplicar las metodologías genéticas para la detección de agentes químicos carcinogénicos.

Los cambios en la composición de los pares de bases de un codón de un gen pueden dar como resultado un producto génico que no funcionará. Esto puede eventualmente expresarse como muerte celular o muerte del organismo, o en una forma alterada de la célula u organismo. Estos cambios son llamados **mutaciones**. Tanto la duplicación como la reparación del DNA no son perfectas, de manera que ocurren alteraciones espontáneas las cuales conforman la frecuencia basal de mutaciones. Los cambios espontáneos en el DNA ocurren a nivel nucleótido y cromosómico. Algunas mutaciones pueden ser neutrales o aún benéficas, sin embargo, la mayoría de las mutaciones son dañinas para las células y normalmente se pierden con rapidez de la población celular, bajo presiones de selección ambientales apropiadas. Algunas células mutantes sobreviven, y en caso de ser células somáticas se pueden duplicar y formar clonas que eventualmente pueden originar tumores; si son células germinales, éstas pueden ocasionar abortos o el nacimiento de un producto con malformaciones.

El daño al DNA se agrupa en dos amplias categorías: los efectos visibles detectables mediante el análisis citológico de los cromosomas (macrolesiones) y los cambios no visibles, los cuales ocurren a nivel de nucleótido y se denominan microlesiones (Brusick, 1987) (Figura 1). ®

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Para detectar agentes genotóxicos, la *Environmental Protection Agency* y otras agencias recomiendan que se usen varias pruebas *in vitro* e *in vivo* como la prueba de dominantes letales, el análisis citogenético, los intercambios de cromátidas hermanas (ICH), mutaciones génicas y micronúcleos, y se evalúe el compuesto de manera simultánea en cada una de ellas las cuales tienen su propio margen de detección. Las categorías para cada ensayo se clasifican como: alteraciones en la secuencia de bases y en la integridad del DNA,

inducción de rearrreglos o intercambios en el DNA, alteraciones en la segregación y en la integridad de los cromosomas (Brusick, 1987).

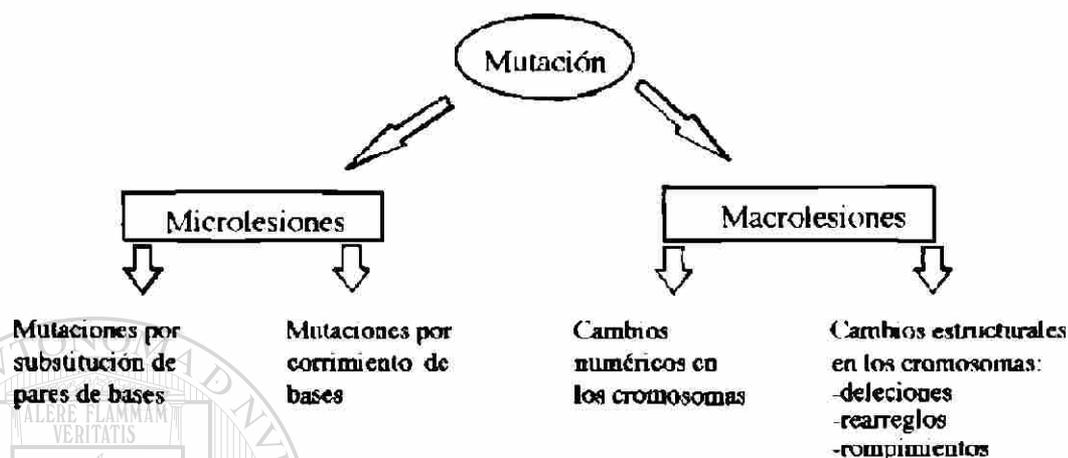


Figura 1. Clasificación de los cambios moleculares en el DNA que aparecen como resultado de la mutación. (Brusick, 1987).

## 1.2. Carcinogénesis química

La producción experimental de cáncer con sustancias químicas data de 1915, cuando los investigadores japoneses provocaron cáncer de piel por medio de alquitrán de hulla en conejos. Desde entonces, la lista de carcinógenos orgánicos e inorgánicos ha crecido en forma exponencial.

Aun así, por muchos años existió una paradoja: varios compuestos de potencia carcinogénica conocida eran relativamente inertes en cuanto a su reactividad química. La solución de este enigma se puso en evidencia a comienzos de 1960, cuando se comprobó que la

mayoría de los carcinógenos químicos requerían activación metabólica para que pudieran reaccionar con los constituyentes celulares.

De acuerdo con estas observaciones y teniendo en cuenta la íntima relación entre mutagenicidad y carcinogenicidad, una década después se desarrolló una prueba *in vitro* para identificar sustancias cancerígenas, la prueba de Ames, llamada así por el bacteriólogo genetista que la desarrolló (Rubin y Farber, 1990).

Los carcinógenos se clasifican en dos amplias categorías: los de acción directa y los de acción indirecta; estos últimos requieren activación metabólica. Los carcinógenos de acción directa, de los cuales hay unos cuantos, son compuestos electrofílicos reactivos (seleccionan y reaccionan con centros cargados negativamente de otras moléculas). La activación metabólica de los carcinógenos se lleva a cabo por enzimas que están presentes en el organismo. Los mamíferos poseen estas enzimas en sus tejidos, especialmente en el hígado y forman parte del sistema de detoxificación.

La activación se inicia con una serie de oxidaciones catalizadas por un grupo de proteínas llamadas citocromo P-450. Estas enzimas, las cuales están unidas a la membrana del retículo endoplásmico, pueden oxidar compuestos altamente no reactivos como los hidrocarburos aromáticos policíclicos. La oxidación de estas sustancias produce un epóxido, un grupo electrofílico muy reactivo, el cual se hidroliza lentamente por la epóxido hidratasa. Una vez adentro de la célula, los grupos electrofílicos pueden reaccionar con centros con carga negativa como las proteínas, el ácido ribonucleico (RNA) y principalmente con el DNA, produciendo mutaciones (Darnell y cols. 1990).

### 1.3. Productos Naturales 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 detener los "crecimientos anormales".

Bhakuni en 1972, realizó investigaciones para encontrar principios activos vegetales con actividad antitumoral, y obtuvo resultados positivos con 14 extractos, entre los que figuran los de *Cassia obtusa*, que inhibieron significativamente la leucemia linfocítica P-388 en ratones; y el de *Digitalis purpurea* var. *alba* que posee glucósidos que mostraron citotoxicidad tumoral en ratones (Bhakuni, 1974).

Actualmente entre las plantas empleadas como antitumorales está la mandrágora (*Podophyllum peltatum*), de la cual se extrajo la podofilotoxina, utilizada por los indios del Perú como remedio popular por sus efectos eméticos, catárticos y antihelmínticos. Los derivados del *Podophyllum* son el etopósido y tenipósido, glucósidos semisintéticos que actúan principalmente en las fases S y G<sub>2</sub> del ciclo celular. A diferencia de la podofilotoxina, no detienen las células en mitosis, sino que forman un complejo ternario con una topoisomerasa II y el DNA (Goodman y Gilman, 1996).

Uno de los descubrimientos más importantes ha sido el de los alcaloides de *Catharanthus roseus* o *Vinca rosea*. En tanto Noble y cols. en 1958 estudiaban las afirmaciones de que los extractos de la vinca tenían efectos benéficos en la diabetes mellitus, observaron

granulocitopenia y depresión de la médula ósea en ratas, datos que los condujeron a purificar un alcaloide activo. Investigaciones posteriores de Johnson y cols. (1963) demostraron la actividad de algunas fracciones alcaloides contra una neoplasia linfocítica aguda en ratones. Los efectos de la vinblastina y vincristina son específicos de cada fase del ciclo celular, bloquean a las células que están en mitosis; son capaces de ligarse específicamente a la tubulina y bloquear la facultad de dicha proteína para polimerizarse en microtúbulos (Goodman y Gilman, 1996).

La actinomicina A fue el primer antibiótico cristalino aislado del medio de cultivo de una especie de *Streptomyces* (Waksman y Woodruff, 1940). Más tarde se obtuvieron muchos antibióticos similares, incluida la actinomicina D (dactinomicina). La dactinomicina posee beneficios en el tratamiento de diversos tumores, en particular algunas neoplasias de niños, y el coriocarcinoma. La capacidad de las actinomicinas para ligarse con el DNA de doble hélice es el punto de partida de su actividad biológica y su citotoxicidad (Sobell, 1973)

Los antibióticos antraciclínicos, daunorrubicina, doxorubicina e idarrubicina y sus derivados, se cuentan entre los agentes antitumorales más importantes. Son producidos por el hongo *Streptococcus peucetius* var. *caestus*. La idarrubicina es un derivado sintético. La utilidad clínica de estos agentes queda limitada por la rara aparición de cardiomiopatía.

En la búsqueda de sustancias con gran actividad antitumoral pero poca toxicidad en corazón, se han preparado y estudiado cientos de derivados antraciclínicos y compuestos similares. Varios de ellos han sido promisorios en estudios clínicos, como la idarrubicina, epirubicina y el compuesto sintético mitoxantrona, que es una

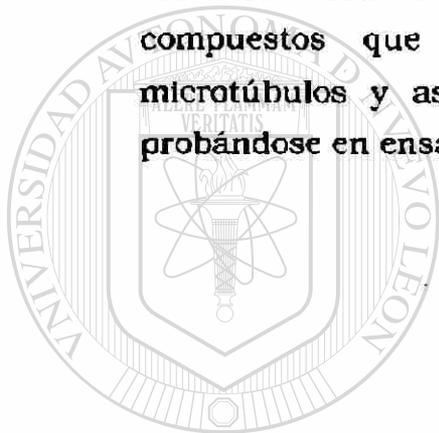
aminoantracenediona (Arlin y cols., 1990; Feldman y cols., 1993). Estos compuestos se intercalan en el DNA y por consiguiente inhiben la síntesis de DNA y RNA. Se producen roturas en filamentos solos o dobles, como ocurre en el intercambio de cromátidas hijas. Por tanto, las antraciclina son mutagénicas y carcinógenas. Se cree que el rompimiento del DNA es mediado por la acción de la topoisomerasa II o por la generación de radicales libres (Tewey y cols., 1984).

Las bleomicinas fueron descubiertas como producto de la fermentación de *Streptomyces verticillus* (Umezawa, 1973). El medicamento utilizado en seres humanos es una mezcla de dos péptidos quelantes de cobre, bleomicinas A<sub>2</sub> y B<sub>2</sub>. Su acción citotóxica es consecuencia de su facultad de fragmentar el DNA. Los estudios *in vitro* indican que causan acumulación de células en la fase G<sub>2</sub> del ciclo, y muchas de éstas muestran aberraciones cromosómicas que incluyen rompimientos cromatídicos, brechas y fragmentos, así como translocaciones (Twentyman, 1983).

Las mitomicinas fueron descubiertas por Hata en 1956 y su estructura química fue dilucidada hasta el año de 1962. Estas sustancias presentan un grupo uretano, una quinona y un anillo azididina, el cual es esencial para que presente la actividad antineoplásica (Kersten, 1975). En 1958, Wakaki y cols. aislaron a la Mitomicina C, la más activa de todas, de *Streptomyces caesptosus*. Este antibiótico sufre reducción química o enzimática en el interior de la célula y se vuelve un agente de alquilación bifuncional o trifuncional (Verwel] y cols., 1988). Este compuesto inhibe la síntesis de DNA. Se ha reportado como mutagénica para bacterias (Szybalsky, 1964), como agente clastogénico, teratógeno y carcinógeno en roedores (Cohen y Shaw, 1964; Nowell, 1964; Crooke y Bradner, 1976).

En 1992 se aprobó el uso del taxol (Paclitaxel) para el tratamiento del cáncer ovárico refractario a cisplatino. Este compuesto se aisló originalmente de la corteza del fresno (*Taxus brevifolia*) en 1971. El mecanismo de acción del taxol es el de estimular la formación de microtúbulos, los estabiliza e impide su despolimerización con la subsecuente interrupción del ciclo celular en mitosis (Schiff y Horwitz., 1979).

Las nuevas generaciones de estructuras diversas del taxol, han sido descubiertas a partir de los metabolitos secundarios de especies del coral *Eleutherobia*.. La eleuterobina y la sarcodictina A son compuestos que promueven la formación y estabilización de microtúbulos y así inhiben la división celular. Actualmente están probándose en ensayos clínicos en humanos (Holmes, 1997).



# UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

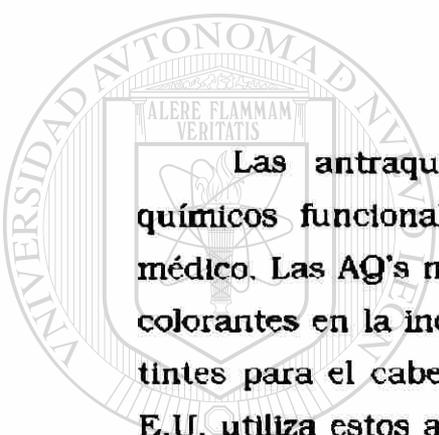


DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPITULO 2

### DERIVADOS ANTRAQUINONICOS Y ANTRACENONICOS

#### 2.1. Generalidades



Las antraquinonas (AQ's) forman un grupo de compuestos químicos funcionalmente diversos usados en el campo industrial y médico. Las AQ's naturales así como las sintéticas son utilizadas como colorantes en la industria de los alimentos, medicamentos, cosméticos, tintes para el cabello y de textiles. El departamento de la Defensa de E.U. utiliza estos agentes en cortinas de humo en el campo de batalla. En el área clínica, las AQ's son utilizadas como preparaciones purgantes y como agente antimicrobial y antitumoral (Traganos, 1983; Sendelbach, 1989). Las hidroxiantraquinonas (HAQ's) son los principios activos de muchos fármacos fitoterapéuticos, entre ellos, los laxantes derivados de plantas como aloe, senna, frángula y rheum. Adicionalmente, algunos extractos de plantas son usados para el tratamiento de cálculos en el riñón y vejiga (*Rubia tinctorium*) y como sedante moderado (*Hypericum*) (Westendorf 1990).

Los derivados antraquinónicos y antracenónicos están ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Varias familias de dicotiledóneas son ricas en derivados antracenónicos, tales como

Hypericaceae (*Hypericum*), Polygonaceae (*Rheum, Rumex, Polygonum*), Rhamnaceae (*Rhamnus*) y Rubiaceae (*Rubia, Morinda, Gallium*). En las monocotiledóneas, solo la familia Liliaceae (*Aloe*) contiene esta clase de compuestos. Cerca del 90% de éstos compuestos aparecen como derivados del compuesto 9,10-antracenediona con algunos grupos funcionales hidroxilo, como los grupos metilo, hidroximetilo y carboxilo (Westendorf y cols., 1990).

### 2.1.1. Nomenclatura y estructura química

La figura 2 ilustra la nomenclatura y las estructuras químicas de los derivados antraquinónicos. El nombre "Antraquinona" fue propuesto inicialmente por Graebe y Lieberman en 1868, quienes demostraron la misma relación estructural del antraceno y la AQ en la cual el grupo benceno es sustituido por una benzoquinona (Phillips M. citado en Sendelbach, 1989). Las posiciones 1, 4, 5 y 8 son referidas frecuentemente como  $\alpha$ ; las posiciones 2, 3, 6 y 7 son referidas como  $\beta$ .

Las AQ's naturales son compuestos glucuronizados en la molécula de glucosa por un enlace  $\alpha$ -glucosídico mientras que las AQ's sintéticas, como la alizarina y la lucidina, no contienen glucosa unida.

### 2.1.2. Metabolismo

Las AQ's naturales generalmente están presentes en las plantas como glucósidos (glucósido antraquinónico), después de la administración oral, el glucósido antraquinónico pasa por la parte superior del tracto gastrointestinal sin modificación química.

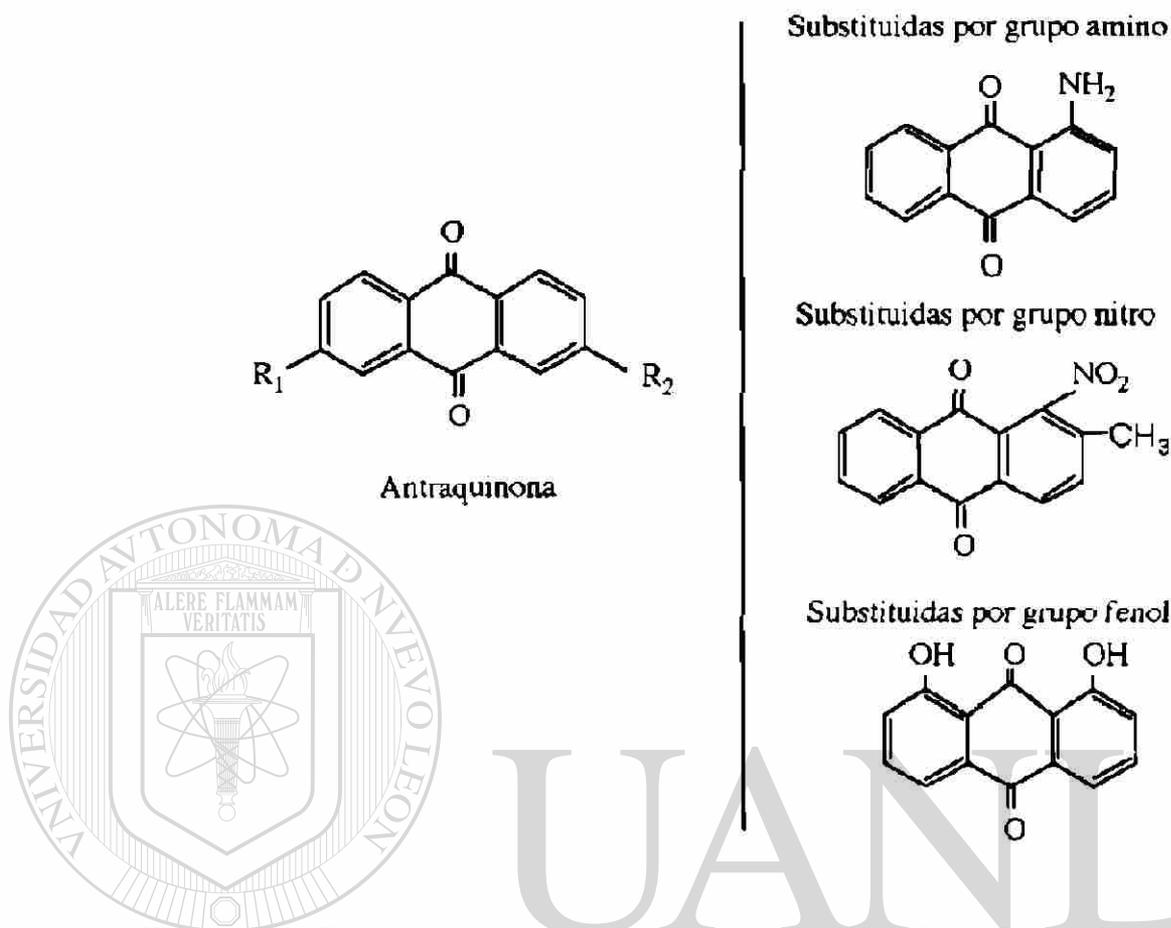


Figura 2. Diferentes estructuras químicas de los derivados antraquinónicos (Sendelbach, 1989).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

La porción del azúcar le confiere características hidrofílicas al glucósido antraquinónico lo que le impide ser absorbido por las células epiteliales del intestino (Figura 3). El enlace  $\alpha$ -glucosídico no es hidrolizado por el ácido del estómago o por las  $\alpha$ -glucosidasas del intestino delgado. Por lo tanto, el metabolismo de los glucósidos antraquinónicos toma lugar en el colon en donde el enlace  $\alpha$ -glucosídico se hidroliza por la flora intestinal liberando a la glucosa y dejando la AQ libre (aglicona antraquinónica).

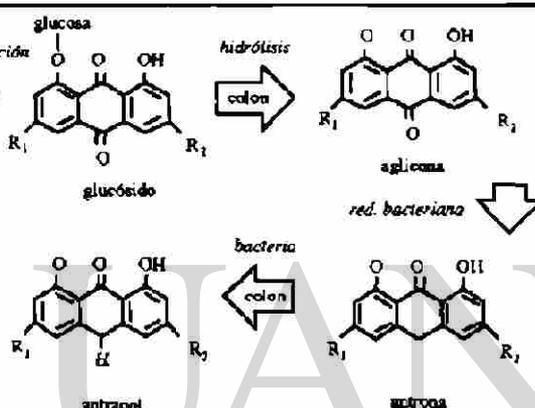
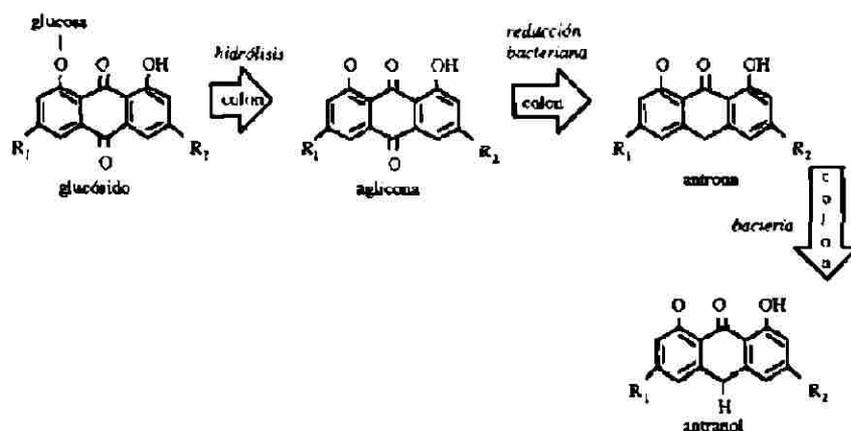


Figura 3. Diagrama esquemático del metabolismo de los glucósidos y agliconas antraquinónicas. (Sendebach, 1989).

### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Una vez separada, el metabolismo de la aglicona antraquinónica no es claro. Se ha demostrado la reducción bacteriana de las agliconas lo que ha llevado a pensar que la actividad catártica puede no ser por la AQ sino por las antronas o antranoles formados. Por lo que a los glucósidos antraquinónicos se les ha considerado como pro-fármacos, en los que el grupo azúcar tiene una función de transportador.

En contraste con los glucósidos antraquinónicos, las AQ's libres (aglicona antraquinónica) siguen un destino metabólico diferente

después de la administración oral. La lipofilia de las agliconas antraquinónicas facilita la absorción a través del intestino delgado, donde son transportadas al hígado y glucuronizadas. Los compuestos glucuronizados son excretados parcialmente en la orina y retornan al intestino a través de la bilis.

Así como la ruta del glucósido antraquinónico, la AQ glucuronizada que es soluble en agua, es transportada hacia el colon donde las enzimas bacterianas de la flora separan a la AQ libre (Brown, 1980 y Brugeman 1984). Por lo que la habilidad de las AQ's libres para ser absorbidas a través del intestino delgado parece determinar el potencial tóxico de estos compuestos, en contraste con los glucósidos antraquinónicos los cuales pasan libremente a la recirculación enterohepática (Sendelbach 1989).

## 2.2. Mutagenicidad

Los compuestos antracénicos se han reconocido como tóxicos y se sospecha que los derivados antraquinónicos también lo sean debido a su similitud estructural. Swanbeck (1966) reportó la interacción entre el DNA y algunos derivados antracénicos y antraquinónicos. En su trabajo señaló que los compuestos con grupos hidroxilo en las posiciones 1 y 8 y con un oxígeno o un grupo hidroxilo en la posición 9, formaron complejos con el DNA, detectados por espectroscopía en el rango visible.

Estudios realizados por Brown en 1980 demostraron el comportamiento mutagénico *in vitro* de ciertas AQ's y compuestos

relacionados en sistemas procarionticos. Brown y Dietrich (1979) reportaron que numerosos derivados antracénicos son mutagénicos en la prueba de *Salmonella typhimurium* con activación metabólica, con una particular sensibilidad a la cepa TA1537. En la misma prueba, Liberman y cols. (1982), reportaron que los derivados antraquinónicos probados fueron mutagénicos para la cepa TA1537 y ninguno de los compuestos antacénicos exhibieron actividad mutagénica.

Con base en sus experimentos, Tikkanen y Matsushima (1983), sugirieron que las HAQ's que tienen de uno a tres grupos hidroxilo son mutagénicas, mientras que los compuestos con más de tres grupos hidroxilo carecen de esta actividad.

Krivobok y cols. (1992) estudiaron la mutagenicidad de las HAQ's y metilantraquinonas, así como los compuestos dimericos skirina, rugulosina y rugulina en varias cepas de *S. typhimurium*, y sus resultados sobre las relaciones actividad mutagénica-estructura sugieren que el grupo 6-metilo juega un papel importante en dicha actividad después de la activación metabólica.

Se han realizado numerosas investigaciones sobre la emodina (1,6,8-trihidroxi-3-metilantraquinona), hidroxiantraquinona presente en plantas de la familia Polygonaceae y Rhamnaceae, de las cuales algunas especies son comestibles para el hombre en algunos países y utilizadas como laxantes (Figura 4). Estos estudios reportan que la emodina se metaboliza por el citocromo P-450 a 2-hidroxi-emodina, mutágeno de acción directa. Además, la emodina es producida por algunas especies de hongos de *Cladosporium*, *Penicillium* y *Aspergillus* (Masuda y Ueno, 1984; Masuda y cols., 1985; Tanaka y cols., 1987). En las cepas TA90, TA97, TA102, TA1537 y TA2637 de *S. typhimurium* la emodina fue mutagénica después de su activación metabólica (Brown, 1976, 1980;

Bruggeman y van der Hoeven, 1984), y requiere de la transformación microsomal para producir su metabolito activo, la 2-hidroxiemodina (Masuda y cols., 1984; Masuda y cols., 1985). Se demostró que no tenía interacción covalente con el DNA de *Salmonella*, ni en hígado de rata (Bösch y cols., 1987). Sin embargo, anteriormente se había demostrado por medición espectroscópica que la emodina y el ditranol, 1,8,9-trihidroxiantraceno, forman complejos con el DNA (Swanbeck, 1966).

La emodina ha mostrado resultados negativos en el ensayo de mutagenicidad con la prueba del locus *hprt* (hipoxantina-fosforribosil-transferasa) en células de cobayo V79, así como también para inducir ICH (Bruggeman y van der Hoeven, 1984). Sin embargo, se demostró que este compuesto fué mutagénico en células de carcinoma mamario de ratón y la 1,4-hidroxiantraquinona mostró una débil inducción de ICH en células V79 (Bruggeman y van der Hoeven, 1984). Finalmente, no indujo reparación no programada (UDS) en hepatocitos primarios de rata (Westendorf y cols., 1990)

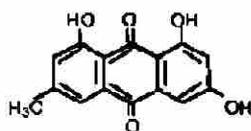
La luteoskirina, una hidroxiantraquinona dimérica tumorigénica y hepatotóxica, producida por el género *Penicillium* spp, mostró un efecto citostático a bajas concentraciones sobre las células tumorales de ascitis de Ehrlich en cultivo (Figura 4). Además encontraron los autores un incremento en la frecuencia de células multinucleadas. En células resistentes a la luteoskirina aisladas como una sublínea, se observaron aberraciones cromosómicas y cromosomas de mayor longitud (Schachtschabel y cols., 1969). Por otro lado, Akuzawa y cols.(1992) demostraron que la luteoskirina incrementó el nivel de residuos 8-hidroxidesoxiguanina en el DNA de células de hepatoma H4-II-E, y favoreció la degradación de la desoxirribosa en productos reactivos del ácido tiobarbitúrico en presencia de ácido ascórbico, ensayos que evalúan la generación de radicales oxígeno.

### 2.3. Carcinogenicidad

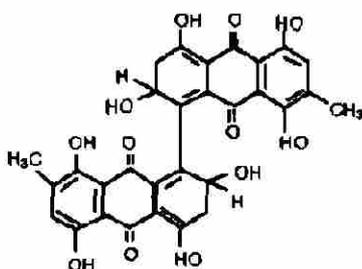
El dantron, 1,8-dihidroxi-antraquinona, actúa como promotor tumoral en fibroblastos de ratón C3H y estimula la síntesis de DNA en hepatocitos de rata de cultivo primario, y sugieren que las hidroxiantraquinonas con grupos hidroxilo en posiciones 1,8 pueden tener actividad promotora (Wölflé y cols., 1990). La lucidina, 1,3-dihidroxi-2-hidroximetil-antraquinona, fue capaz de formar aductos en el DNA en hepatocitos primarios de rata con activación metabólica *in vitro*, por lo que los autores sugieren que los efectos genotóxicos de este compuesto observados en pruebas *in vitro* son el resultado de una interacción covalente con el DNA celular, indicando una potencial actividad carcinogénica de estos compuestos (Poginsky y cols., 1991).

### 2.4. Actividad Citostática

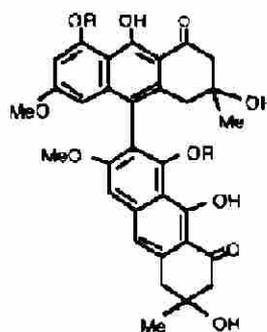
Algunas aminoantraquinonas y dihidroxiantraquinonas sustituidas han mostrado actividad citostática *in vivo*. Inhiben el crecimiento de células que se dividen rápidamente por lo que se asume que la hidroxilación en el sistema de anillos incrementa la potencia de estos compuestos (Traganos, 1983). Varias hidroxiantraquinonas estimularon, en diferentes grados, la producción de la anión superóxido a través del mecanismo de reducción de un electrón catalizado por la NADPH-citocromo- P450 reductasa (Mian y cols., 1991). Compuestos llamados flegmacinas y anhidroflegmacinas obtenidas de *Cassia torosa* (Figura 4) semejantes estructuralmente a la T-514 de *Karwinskia humboldtiana*, han sido patentados como agentes antineoplásicos (Takahashi y cols., 1977).



Emodina



Luteoskirina



Flgmacina

Figura 4. Estructuras químicas de algunos compuestos antraquinónicos y antraquinónicos.

## 2.5. *Karwinskia humboldtiana*

La familia Rhamnaceae agrupa al género *Karwinskia* conocido en nuestro país como tullidora, coyotillo, capulincillo o cacatsi. Esta planta se encuentra en hábitats semi desérticos y crece ampliamente en México, suroeste de Estados Unidos y algunas localidades de América Central. Durante los meses de Febrero a Noviembre, el arbusto produce drupas oscuras las cuales son dulces, debido a la presencia de glucosa en el mesocarpo. El principio tóxico se ha encontrado en las semillas del fruto del cual se han identificado y aislado cuatro antraquinonas dimericas denominadas por su peso molecular como T-496, T-514, T-516 y T-544 (Dreyer y cols, 1975).

Cuando accidentalmente se ingieren los frutos se produce una intoxicación caracterizada por una parálisis similar al síndrome de Guillian-Barre. El cuadro clínico se desarrolla a los 15 días aproximadamente después de la ingestión, con una neuropatía progresiva, con una parálisis ascendente, la cual puede terminar en muerte por paro respiratorio; si los pacientes sobreviven, la recuperación es lenta, pero completa (Escobar y Nieto, 1965; Dewan y cols., 1965).

Desde 1981 en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L. se inició una línea de investigación con el fin de estudiar las propiedades químicas y biológicas de esta planta. Se inició con el aislamiento de los productos biológicamente activos del fruto de *K. humboldtiana* (Guerrero y cols., 1987), posteriormente se realizaron estudios sobre la intoxicación aguda experimental en animales, con fruto maduro o con las toxinas purificadas. Los resultados revelaron que la T-544 causaba el daño neurológico y la T-514 (Figura 5) era capaz de afectar el pulmón y el hígado (Bermúdez y cols., 1986); además la ingestión del fruto maduro (0.70% de T-544 y 0.29% de T-514) producía lesiones en hígado y pulmones, las cuales causaban la muerte de los animales (Bermúdez y cols. 1992).

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Esta toxicidad se ha correlacionado con los hallazgos en cultivos primarios de hígado y piel de rata, en los cuales se observó que los hepatocitos mostraron mayor sensibilidad a ambas toxinas T-514 y T-544 que los queratinocitos, siendo la T-514 más hepatotóxica *in vitro* que la T-544 (Garza Ocañas y cols., 1992).

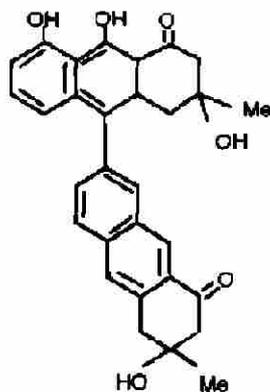


Figura 5. Estructura química de la T-514.

El efecto *in vitro* de la toxina T-514 se analizó en líneas celulares benignas y neoplásicas de hígado, pulmón y colon, de origen humano, y se comparó con medicamentos anti-neoplásicos conocidos; la toxina mostró toxicidad selectiva hacia las células tumorales, de manera similar al 5-Fluoruracilo, la Epidoxorrubicina y la Mitomicina-C; por lo que con base en estos resultados, se propuso que la T-514 podría tener actividad anti-neoplásica (Piñeyro y cols., 1994).

En 1993, la T-514 fue aceptada en el Programa de Desarrollo de Medicamentos del Instituto Nacional del Cáncer en E.U. Inicialmente fue incluida en las pruebas de selección *in vitro* en líneas celulares y recientemente mostró actividad antitumoral *in vivo* en el modelo "Hollow Fiber", el cual consiste en introducir fibras delgadas que contienen células tumorales en ratones, estos son tratados posteriormente con la T-514, y se extraen las fibras para que crezcan en cultivo y se determina su viabilidad. Posteriormente se evaluó en el programa de tumores *in vivo* ("xenografts"), el cual consiste en implantar células tumorales en ratones inmunodeficientes, se administró la T-514 (4, 6 y 9 mg/kg) vía intraperitoneal y se monitoreó el peso del animal y su mortalidad en un tiempo definido. Actualmente se está reevaluando en

los modelos de tumor de colon y de sistema nervioso central en los cuales mostró moderada actividad antitumoral.

Estudios bioquímicos y de ultraestructura han señalado que la toxina T-514 produce a dosis subletales (0.5, 1 y 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) , un daño selectivo e irreversible sobre los peroxisomas de levadura *in vivo*. (Sepúlveda y cols., 1992). Por lo que recientemente se le ha denominado "peroxisomicina A<sub>1</sub>" (Moreno-Sepúlveda y cols. (1995). Los mismos autores reportaron el efecto inhibitorio de la T-514 y otras antracenonas relacionadas sobre la actividad de la catalasa hepática *in vitro*, enzima de origen exclusivamente peroxisomal. En contraste con este reporte, se demostró que la T-514 no inhibe la actividad de la catalasa tisular por lo que concluyeron que la catalasa *in situ* e *in vivo* pudiera estar protegida por algún factor desconocido contra el efecto inhibitorio de la peroxisomicina A<sub>1</sub> (Moreno-Sepúlveda y cols. 1997). También se observó un incremento en la actividad específica de la NADPH-citocromo-P-450 reductasa en hígados de ratas tratadas con una dosis aguda de T-514, resultados que indican que la T-514 puede actuar como un inductor enzimático microsomal (Guerrero-Olazarán y Viader-Salvadó, 1996).

---

Se han aislado tres antracenonas diméricas de otras especies del género *Karwinskia*: la T-516, el isómero de la T-514 (peroxisomicina A<sub>3</sub>), el isómero de posición de la toxina 514 (peroxisomicina B<sub>3</sub>) (Rivas y cols., 1990) y el diasteroisómero denominado peroxisomicina A<sub>2</sub> obtenido de *K. parvifolia* (Waksman y Ramírez, 1992).

Martínez y cols. (1997) estudiaron el daño producido por el diasteroisómero de la T-514 en ratones CD1 y observaron un grado menor de daño en hígado y pulmones, en comparación con las extensas lesiones observadas con la T-514.

## CAPITULO 3

### EL CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS

#### 3.1 Generalidades

La sangre es uno de los tejidos más accesibles del humano y el crecimiento potencial es excelente después de la estimulación por un mitógeno. También es uno de los más fáciles de estudiar debido a que las células tienen un ciclo celular bien caracterizado. La sangre contiene diferentes tipos celulares. Las células blancas (leucocitos) son células nucleadas, de manera que poseen DNA y si se inducen a dividirse, proporcionan figuras mitóticas. Los tipos de células blancas presentes en la sangre periférica son: granulocitos, monocitos y linfocitos; existen subtipos de linfocitos. Estos tipos diferentes no pueden identificarse morfológicamente, pero con el uso de marcadores de superficie se pueden reconocer.

Los linfocitos T participan en la inmunidad mediada por células, los linfocitos B en la inmunidad humoral y las células NK tienen actividad citotóxica. Existen varios subtipos de linfocitos T como los T ayudadores, los T supresores y los T citotóxicos. En un adulto normal, alrededor del 70 % de los linfocitos circulantes ( $1.5-4 \times 10^9$  por litro) son células T, el resto son linfocitos B (Gosden y cols., 1992).

La proliferación linfocitaria inducida por los antígenos tiene lugar normalmente fuera de la sangre y del conducto torácico, y puede visualizarse *in vitro* al cultivar células linfoides junto con antígenos específicos. Las lectinas mitógenas (proteínas que se une formando enlaces cruzados en los residuos hidrocarbonados específicos de la superficie celular) estimulan policlonalmente a las células linfoides. Estas lectinas mitógenas (mitógenos) se derivan de varias plantas y bacterias. Su empleo *in vitro* ha demostrado que la activación de las células T y B da lugar a la producción de citocinas, como interleucinas, así como a la expresión de receptores para citocinas; ello conduce a las células hacia el ciclo celular (proliferación) y, finalmente, hacia la función efectora (maduración).

La activación linfocitaria, ya sea por antígenos o mitógenos, da lugar a modificaciones intracelulares y al desarrollo ulterior en el sentido de un linfoblasto. Se cree que la estimulación por mitógenos de los linfocitos *in vitro* imita la serie de hechos que tienen lugar *in vivo* tras su estimulación por los antígenos específicos.

Las células T y B se activan por mitógenos diferentes. Así, la fitohemaglutinina (PHA) y la concavalina A (Con-A) estimulan a las células T humanas y murinas. Los lipopolisacáridos (LPS) estimulan las células B murinas. El mitógeno de fitolaca americana estimula tanto las células T como las B humanas (Roitt y cols., 1991).

El cultivo de linfocitos humanos ha sido ampliamente utilizado como sistema de prueba para evaluar la actividad mutagénica de sustancias químicas y radiaciones (Obe y cols., 1975; Ostrosky-Wegman y cols., 1988), además se pueden evaluar los efectos de las sustancias sobre la proliferación celular (Gebhart, 1981; Ostrosky-Wegman y cols., 1991). En el cultivo de linfocitos se ha demostrado la presencia de

subpoblaciones y se ha determinado el tiempo del ciclo celular el cual puede variar en función de las condiciones de cultivo (Mutchnick y cols.,1980; Gonsbatt y Mutchnick.,1990), la edad de los donadores (Schneider y cols.,1982), el estado de salud (Ortiz y Betancourt,1990) y cuando se agregan ciertos agentes químicos (Morimoto y Wolff,1980).

### 3.2. El Ciclo Celular

El proceso de la formación de nuevas células depende del paso de cada una de ellas a través de tres procesos: crecimiento, duplicación del DNA y división celular, los cuales integran lo que comúnmente se define como ciclo celular. Las fases del ciclo celular fueron propuestas originalmente por Howard y Pelc en 1953, estos autores consideraron que un ciclo comienza cuando una célula termina la mitosis y finaliza con la siguiente división; así al tiempo entre la división celular y el comienzo de la síntesis del DNA se le llamó  $G_1$  (del inglés gap). Al período de duplicación del DNA se le llamó fase S (de síntesis), al lapso comprendido entre la síntesis y la mitosis subsecuente se le denominó  $G_2$  y por último al período de división celular fase M.

$G_1$ , S y  $G_2$  son estadios de continuo crecimiento celular y comprenden la interfase. La fase  $G_0$  existe como una parte del ciclo de vida de las células eucarióticas, en el cual ellas permanecen en un estado de "inactividad" con relación a la fase S (Figura 6). En las células de mamíferos, el control del crecimiento celular se ejerce principalmente en la fase  $G_1$ . Son críticos los factores que modulan la salida de  $G_0$  y la progresión hacia  $G_1$  para determinar la velocidad del crecimiento en general. Los puntos de restricción son pausas en el ciclo celular durante los cuales se revisa la fidelidad de la duplicación del DNA y la precisión

de la segregación de los cromosomas. Las pausas en los puntos de restricción permiten corregir y reparar la información genética con el fin de que cada célula hija reciba un complemento completo de información genética idéntica de la célula madre (Murakami y cols., 1995).

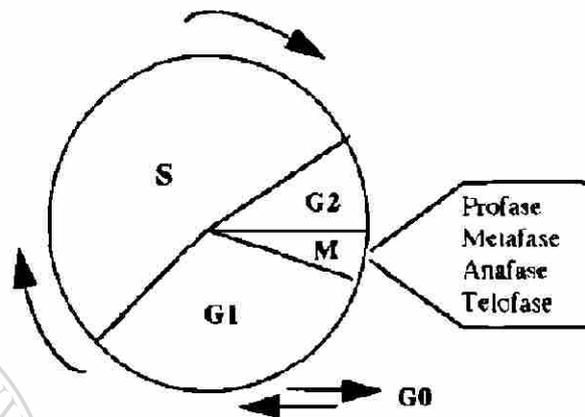


Figura 6. Diagrama del ciclo celular que muestra las proporciones ocupadas para cada fase. (Dean y Danford, 1984).

Se han descrito varias clases de ciclinas en  $G_1$  y sus cinasas dependientes de ciclinas (*cdks*), las cuales son consideradas integradores de las señales que median a los factores de crecimiento del ciclo celular. Los factores de crecimiento actúan en la fase  $G_1$  del ciclo celular al unirse a receptores específicos de la superficie de la célula, los cuales inician la cascada de señales que finalmente gobiernan la transcripción de genes de respuesta temprana inmediata y retardada.

Las decisiones de las células para entrar a la fase de síntesis del DNA (S) o para detenerse en  $G_1$  y diferenciarse son determinadas muy probablemente por genes los cuales retrasan temporalmente su inducción y que dependen de factores de crecimiento. En la fase  $G_1$  tardía, las señales que son inducidas por los factores de crecimiento, deben converger en el reloj del ciclo celular, una máquina compuesta de

ciclinas, cdk's, sus cinasas reguladoras y fosfatasas, con lo cual se asegura el compromiso de las células para entrar a la fase S. Una vez que se ha tomado la decisión para replicar el DNA cromosómico, sin embargo, las células se vuelven refractarias a las señales que inducen los factores de crecimiento y en cambio, dependen del funcionamiento intrínseco del reloj del ciclo celular para regular la progresión hacia la mitosis o fase M (Sherr, 1993).

Los cromosomas son descondensados durante  $G_1$ , S y  $G_2$  y posteriormente emplezan a condensarse durante la profase. Solo durante la metafase se vuelven visibles como cuerpos discretos. Bajo condiciones favorables, el tiempo del ciclo celular es casi constante. Sin embargo, la presencia de agentes tóxicos pueden prolongar importantemente  $G_1$  o provocar que las células entren a  $G_0$  temporalmente y por lo tanto, extender la duración del ciclo celular (Dean y Danford, 1984).

### 3.3. Aberraciones Cromosómicas

Las Aberraciones Cromosómicas (AC) inducidas por agentes químicos o físicos pueden estudiarse en cualquier población celular en ciclo o, si no está en ciclo, que pueda ser estimulada por un agente mitogénico. Para estudios de AC en humanos sólo se dispone de dos tipos de células a las que se puede tener acceso de una manera práctica. Estas son las células de médula ósea, las cuales son una población en ciclo; y los linfocitos de sangre periférica, los cuales normalmente no se están dividiendo pero cuya división puede ser estimulada *in vitro* cultivándolos con un mitógeno como la PHA.

Desde la observación de Moorhead de que los linfocitos podían estimularse con un mitógeno como la PHA y poder observarlos en metafase (Moorhead y cols., 1960) se ha obtenido una gran cantidad de datos sobre la inducción de alteraciones por radiaciones y agentes químicos utilizando este sistema (Preston y cols., 1981).

El daño al DNA inducido por agentes químicos en linfocitos no ciclantes no se convertirá en aberraciones hasta que las células sean estimuladas para entrar en ciclo y empezar la duplicación del DNA. Dado que el daño al DNA puede ser reparado en las células en la fase  $G_0$ , así como en  $G_1$ , la frecuencia de aberraciones no será necesariamente proporcional a la cantidad del daño inducido al DNA sino más bien a la cantidad de daño que se mantiene en el momento de la duplicación (WHO, 1985). Además el grado de reparación del DNA está influenciado por la fase del ciclo celular durante el tiempo de exposición al agente químico (Parshad y col., 1982), ya que el daño puede ocurrir en cualquier fase y dependerá de que se repare o no, el que permanezca.

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

#### **3.4. Intercambios de Cromátidas Hermanas**

Los Intercambios de Cromátidas Hermanas (ICH) ocurren durante la duplicación semiconservadora del material genético cuyo proceso probablemente involucre rompimientos, recombinación y reunión de DNA, aunque las bases moleculares no se han dilucidado en forma precisa (Carrano y cols., 1978). En el laboratorio los ICH se pueden observar en cualquier célula que haya completado dos ciclos duplicativos en presencia de un marcador análogo de algún nucleótido.

Estos fueron observados por primera vez utilizando timidina tritiada (Taylor y cols., 1957)

Los estudios realizados por numerosos grupos mostraron que varios clastógenos fuertes eran capaces de inducir un incremento en la frecuencia de ICH, por lo que esta técnica se empezó a utilizar en la detección de mutágenos tanto *in vivo* como *in vitro*. El Síndrome de Bloom, entidad autosómica recesiva, con predisposición al cáncer y con fragilidad cromosómica, presenta una frecuencia de intercambios de 15 a 20 veces mayor que la considerada normal, lo cual constituye un nexo particular entre las mutaciones génicas, el fenómeno de transformación neoplásica y el comportamiento cromosómico (Salamanca, 1990).

Perry y Wolf (1974) mejoraron esta metodología con el uso de bromodesoxiuridina (BrdU), un análogo no radiactivo de la timina. El mecanismo de formación más aceptado hasta el momento está explicado en la hipótesis propuesta por Painter (1980). Este modelo se basa en la posibilidad de que los rompimientos de la doble hebra de DNA ocurran frecuentemente en la conexiones de zonas de duplicación o replicones adyacentes durante la duplicación. Este principio se apoya en la evidencia de que ciertas enzimas, las topoisomerasas, en células de mamíferos, inducen y reúnen los rompimientos. Ocasionalmente, en lugar de una reunión normal, el rompimiento es sellado por la reunión de hebras hijas de una molécula duplicada a la molécula no duplicada.

En la Figura 7A se muestra la duplicación normal del DNA. Primero ocurre la separación de las hebras de la doble hélice con la síntesis de nuevo DNA a lo largo de cada hebra paterna. Después se forma una superhélice de la doble hélice conforme se alarga la horquilla de replicación.

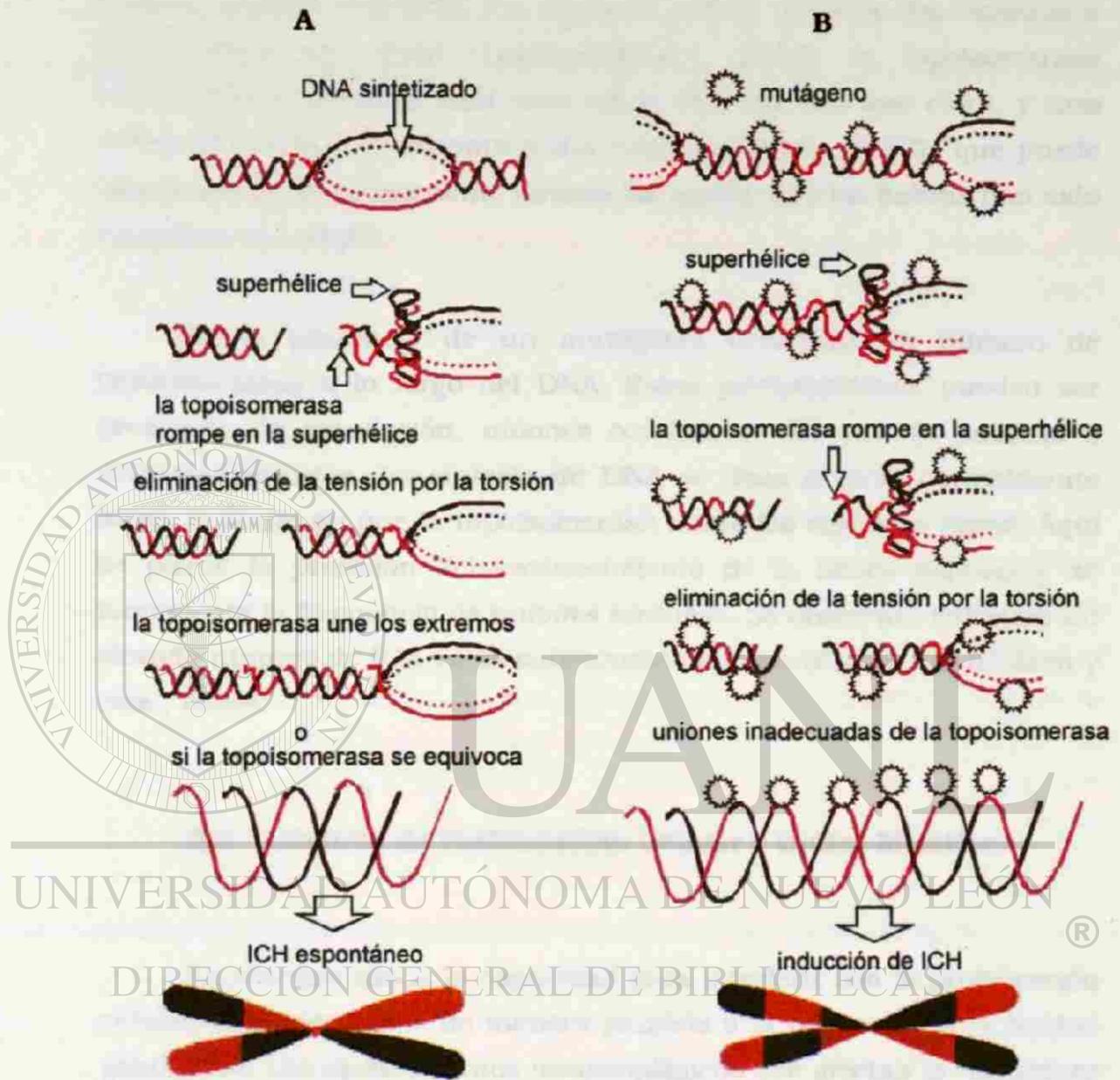


Figura 7. Representación esquemática de un modelo para el mecanismo de ICH espontáneo (A) e inducido por mutágenos (B). (Holden y cols., 1989)

La topoisomerasa rompe la doble hélice en la superhélice, y permite que las hebras se desenrollen y se elimine la tensión por la

torsión. La segunda función de la topoisomerasa es la de reunir las dos hebras paternas del DNA, por ejemplo, hebra oscura con oscura y hebra clara con clara. Ocasionalmente, puede la topoisomerasa equivocarse y entonces unir una hebra oscura con una clara, y una hebra clara con una oscura y dar como resultado un ICH que puede observarse en la subsecuente mitosis (se asume que las hebras han sido marcadas con BrdU).

En la presencia de un mutágeno, ocurrirán un número de perturbaciones a lo largo del DNA. Estas perturbaciones pueden ser productos de alquilación, uniones covalentes, dímeros de timidina o entrecruzamientos. La síntesis de DNA se lleva a cabo normalmente hasta el punto en que la topoisomerasa reúne los extremos libres. Aquí se pierde la precisión del reconocimiento de la hebra paterna y se incrementa la frecuencia de uniones erróneas. Se observará entonces un elevado número de ICH en la subsecuente mitosis (Figura 7B) (Holden y cols., 1989).

### **3.5. Cinética de Proliferación Celular e Índice Mitótico.**

En muchos casos la capacidad para interferir con la proliferación celular se ha estudiado de manera paralela a la búsqueda de actividad genotóxica. Los medicamentos antineoplásicos que afectan la estructura del DNA, también son capaces de retrasar la Cinética de Proliferación Celular (CPC).

Se han reportado inhibiciones que aumentan con la dosis en cultivos de linfocitos tratados con una amplia variedad de sustancias, en particular, los medicamentos antineoplásicos. Para producir este

efecto, no tienen necesariamente que interactuar con el DNA, sino que también pueden afectar proteínas asociadas con la regulación del ciclo celular, o bien, con el aparato mitótico.

Si las células se cultivan en presencia de BrdU durante el primer ciclo celular, cada cadena de la doble hélice del DNA sintetiza su cadena complementaria incorporando esta base. Durante la mitosis, las cromátidas hermanas no se distinguen entre sí por tener la misma composición química, es decir, un filamento original y otro que contiene BrdU.

Después del segundo ciclo celular, y por lo tanto de una segunda síntesis de DNA, cada cadena del DNA de un cromosoma servirá a su vez de molde a copiar con lo que se obtendrán dos tipos de cromátidas, en una existirán dos cadenas químicamente distintas, mientras que en la otra ambas cadenas tendrán BrdU en lugar de timina. En esta metafase, las cromátidas del cromosoma serán químicamente diferentes, lo que se puede poner de manifiesto por la tinción que dan cuando se agrega el colorante 33258 de Hoechst, compuesto derivado del benzimidazol que tiñe al DNA normal pero no aquel cuyas dos cadenas han sido sustituidas por BrdU. Los cromosomas muestran una cromátida con fluorescencia más intensa y otra opaca (Figura 8).

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Una ventaja de usar el método de fluorescencia más Giemsa en los estudios de genotoxicidad es que es posible analizar en paralelo el daño en la estructura del DNA y sus efectos en la progresión de la división celular. Esto ha llevado a algunas correlaciones entre ambos fenómenos como es el hecho que aquellos agentes que inducen daño cromosómico severo producen también una reducción en la velocidad de proliferación celular.

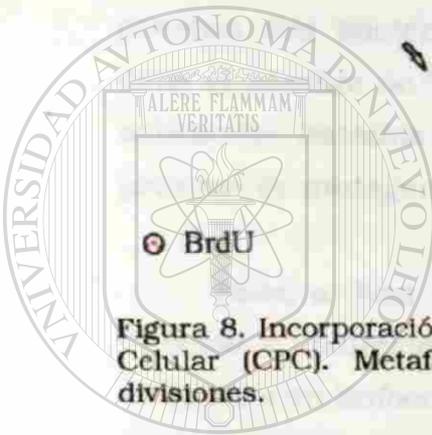
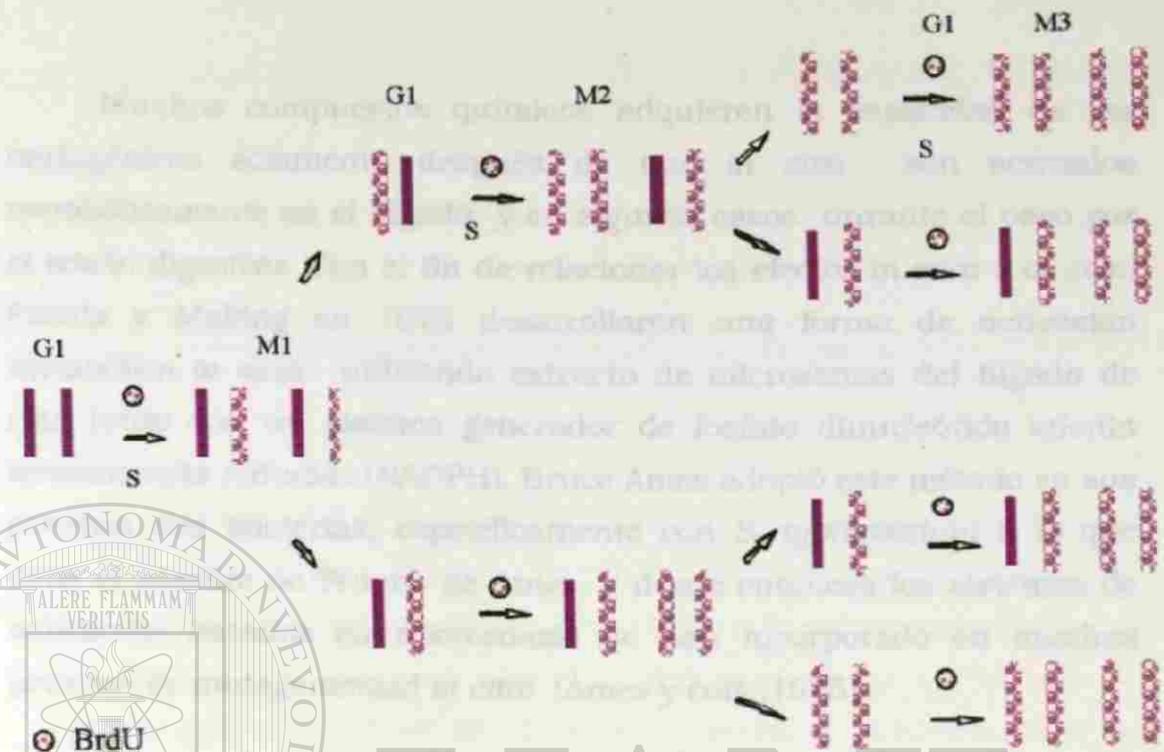


Figura 8. Incorporación de BrdU para el análisis de la Cinética de Proliferación Celular (CPC). Metafases en primera (M1), segunda (M2) y tercera (M3) divisiones.

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

El Índice Mitótico (IM) es un parámetro que determina el porcentaje de células que están en mitosis. El índice mitótico ha sido utilizado para la evaluación del crecimiento de cultivos y vacunas desde los años 60, pero recientemente de nuevo se ha utilizado en la investigación de mecanismos de toxicidad, sobre todo de fármacos con actividad citotóxica (Rojas y cols., 1992).

### 3.6 Activación metabólica

Muchos compuestos químicos adquieren la capacidad de ser mutagénicos solamente después de que *in vivo* son activados metabólicamente en el hígado y en algunos casos durante el paso por el tracto digestivo. Con el fin de relacionar los efectos *in vitro* e *in vivo*, Frantz y Malling en 1975 desarrollaron una forma de activación metabólica *in vitro* utilizando extracto de microsomas del hígado de rata junto con un sistema generador de fosfato dinucleótido adenín nicotinamida reducido (NADPH). Bruce Ames adoptó este método en sus pruebas con bacterias, específicamente con *S. typhimurium* a lo que debe el nombre de Prueba de Ames, y desde entonces los sistemas de activación basados en microsomas se han incorporado en muchas pruebas de mutagenicidad *in vitro* (Ames y cols., 1975).

Aunque han sido exitosos los estudios *in vivo* de mutágenos directos e indirectos y los estudios *in vitro* de mutágenos directos realizados en linfocitos humanos, los ensayos *in vitro* de mutágenos que requieren activación se han restringido debido a los efectos tóxicos de la preparación microsomal sobre los linfocitos (White y Heskett, 1980). Las cepas de *S. typhimurium* empleadas para el ensayo general de mutagénesis contienen mutaciones en el operón de la histidina. Además de esta mutación contienen mutaciones que incrementan importantemente su capacidad para detectar mutágenos, como es el aumento en la permeabilidad y en el sistema de reparación por escisión. La cepa TA 1537 se usa para detectar varios tipos de mutágenos que se intercalan en el DNA corriendo el apareamiento de las bases. En la TA98 y en la TA100 ambas ocurre corrimiento en la lectura de bases por formación de aductos y por inserciones o deleciones de bases respectivamente (Maron y Ames, 1983).

## CAPITULO 4

### PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Uno de los esfuerzos más importantes del tratamiento contra el cáncer es el desarrollar nuevos agentes con actividad antineoplásica. El Instituto Nacional del Cáncer de E.U. (NCI) reporta que entre 1990 y 1992, se probaron cerca de 27,000 compuestos químicos definidos y miles de extractos crudos de productos naturales, más importantes, con base en los resultados *in vitro*, aproximadamente cerca del 4 % de estas sustancias se han referido para su posterior ensayo. De estos, cerca de 1000 continuaron la segunda evaluación *in vitro* e *in vivo*. (Greever y cols. 1992)

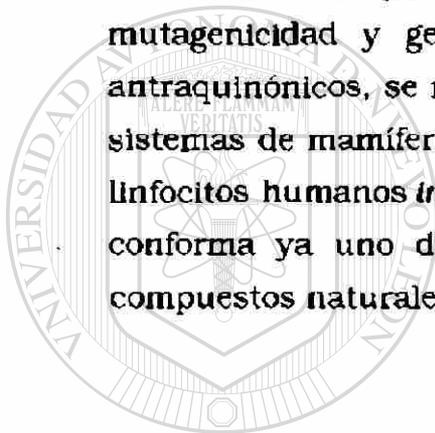
En el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., están en desarrollo una serie de pruebas dirigidas a investigar la potencial acción antineoplásica de la T-514. Ya que en México es necesario importar productos útiles en el tratamiento contra el cáncer y el costo de los mismos es muy elevado, el desarrollo de compuestos antineoplásicos a bajo costo ha adquirido alta prioridad en nuestro país.

La mayoría de los agentes antineoplásicos empleados en la terapéutica actúan mediante mecanismos de citotoxicidad y genotoxicidad. Algunos de ellos, interactúan con el DNA, de esta forma

impiden la duplicación de las células cancerosas.

Se ha planteado que la T-514 pudiera emplearse como un agente antineoplásico con base en los antecedentes que se han descrito en relación a su acción sobre líneas celulares, sin embargo es de particular importancia el analizar su **genotoxicidad** así como sus efectos sobre la proliferación celular que puedan revelar si la actividad citostática de dicho compuesto sigue el mismo patrón de los agentes quimioterapéuticos que interactúan con el DNA.

Por otra parte, los datos en la literatura acerca de la mutagenicidad y genotoxicidad de los derivados antracenónicos y antraquinónicos, se reportan principalmente en bacterias; los datos en sistemas de mamíferos son escasos. La investigación que se realizó en linfocitos humanos *in vitro* sobre este derivado antracenónico, la T-514, conforma ya uno de los documentos pioneros para este grupo de compuestos naturales.



UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

#### 4.1 Hipótesis de Trabajo



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La T-514 es capaz de dañar el DNA, lo cual se puede detectar como mutaciones génicas (microlesiones) en microorganismos y como macrolesiones en células eucarióticas.

## 4.2. Objetivo General de Trabajo

Evaluar el potencial genotóxico de la T-514 sobre linfocitos humanos *in vitro* y en el sistema de Ames.

### 4.2.1. Objetivos Específicos

1) Analizar los efectos de la toxina T-514 en cultivos de linfocitos humanos evaluando los siguientes parámetros:

-El DNA, determinando la frecuencia de aberraciones cromosómicas estructurales y de intercambios de cromátidas hermanas

-La proliferación celular, evaluando la capacidad de proliferación con base en la cinética de proliferación celular, la proporción de células en metafase (índice mitótico) y sobre las otras fases del ciclo celular mediante la citometría de flujo.

---

2) Investigar la capacidad de la toxina para producir mutaciones en *Salmonella typhimurium*. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

3) Investigar si la T-514 requiere de una activación metabólica para actuar como genotóxico en linfocitos y *Salmonella* mediante la evaluación de los mismos parámetros arriba mencionados en presencia de enzimas microsomales.

## CAPITULO 5

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 5.1. Linfocitos Humanos

##### 5.1.1. Donadores

Se obtuvo sangre periférica heparinizada por venopunción de ocho donadores sanos, con una edad promedio de 30.7 años con los siguientes criterios de inclusión: sujetos mayores de 18 años, de ambos sexos y de condición saludable. Los criterios de exclusión fueron: antecedentes de exposición reciente y directa a plaguicidas, sustancias químicas u hormonas; estar bajo tratamiento médico; ser fumador y haber estado expuesto a rayos X en el mes anterior a la toma de la muestra.

##### 5.1.2. Cultivo de linfocitos

Los cultivos se realizaron por duplicado para cada tratamiento. A cada cultivo se le agregó 0.5 ml de sangre completa en medio de cultivo RPMI 1640 (Flowlab) complementado con 0.1mM de aminoácidos no esenciales (Gibco), 2 mM de L-glutamina (Gibco) y 32  $\mu$ M de BrdU; Sigma) y se estimularon con PHA (Microlab). El volumen final fue de 7 ml. No se adicionaron antibióticos (Montero y cols., 1993). Los

tratamientos fueron agregados a los cultivos a las 48 hrs de incubación. Las concentraciones se eligieron de acuerdo a lo establecido por Dean y Danford (1984): 1) que la concentración más alta demostrara evidencia de inhibición mitótica y 2) que los intervalos de las concentraciones fueran la mitad del logaritmo de las mismas.

Los cultivos se mantuvieron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub>. A las 70 hrs de incubación se agregó a cada cultivo 0.2 ml de colcemida (10µg/ml; Microlab) y la incubación continuó por 2 hrs más. Los cultivos se centrifugaron a 1,200 rpm por 10 min, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió el precipitado en 10 ml de KCL 0.075 M y se mantuvieron a 37°C durante 20 min, enseguida se centrifugaron a 1,200 rpm durante 10 min, se eliminó el sobrenadante y las células fueron fijadas resuspendiendo con solución de Carnoy (metanol-ácido acético 3:1). El lavado con solución fijadora se repitió hasta que se obtuvo un paquete celular blanco, el cual se resuspendió en solución fijadora y se guardó a 4°C.

### **5.1.3. Preparación de laminillas**

Los paquetes celulares se centrifugaron después de 24 hrs, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió con 0.5 ml de la misma solución fijadora. Con una pipeta Pasteur se homogeneizó la suspensión y se goteó sobre portaobjetos limpios previamente sumergidos en alcohol etílico absoluto a 4°C los cuales se secaron a la flama y posteriormente se observaron en un microscopio óptico con un sistema de contraste de fases para asegurarse de obtener una buena dispersión de los cromosomas (Figura 9).

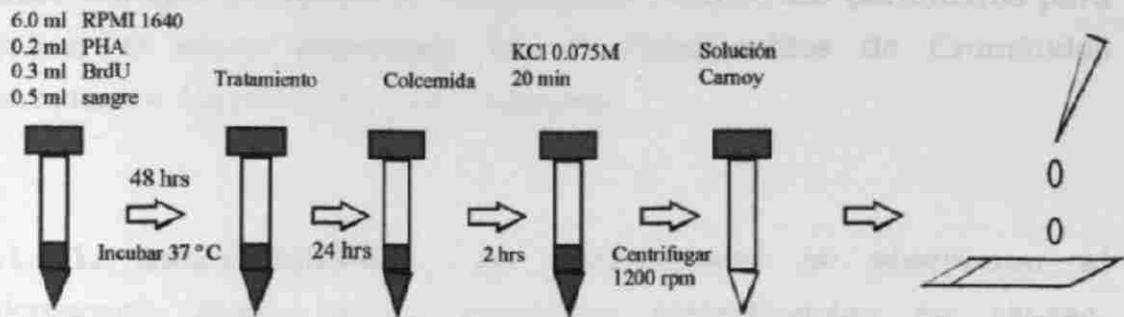


Figura 9. Esquema del cultivo de linfocitos.

#### 5.1.4. Tinción

Las laminillas se sumergieron en una solución de Hoechst 33258 (1 mg/ml) en agua destilada por 30 min en ausencia de luz, se lavaron en agua corriente y se secaron. Posteriormente se cubrieron con solución amortiguadora de fosfatos ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  66 mM,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  66 mM, pH 6.8) y se expusieron a luz negra por 1:30 hrs. Las laminillas fueron lavadas en la misma solución amortiguadora y se sumergieron en una solución de Giemsa (Merck) al 4% en solución amortiguadora de fosfatos por 3 min, se lavaron en agua corriente y se secaron (Perry y Wolff, 1974).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

#### 5.1.5. Análisis microscópico

Las preparaciones se observaron en un microscopio óptico de campo claro (Olympus CH/CHK) a 200 y 1000 aumentos. Todas las preparaciones se codificaron, de manera que fueron analizadas en ciego. Los parámetros para evaluar la capacidad de proliferación fueron:

Índice Mitótico y Cinética de Proliferación Celular. Los parámetros para evaluar el efecto genotóxico fueron: Intercambios de Cromátidas Hermanas y Aberraciones Cromosómicas.

**5.1.5.1. Índice Mitótico.** Las preparaciones se observaron al microscopio óptico a 20 aumentos recorriéndolas en zig-zag, comenzando de la parte central de la laminilla para contar un total de dos mil núcleos y de ellos determinar cuántos estaban en división (metafase). Se registraron como núcleos aquéllos que podían ser reconocidos por su morfología, de forma aproximadamente esférica, de tinción clara y de tamaño relativamente grande. Como metafase se señalaron a las agrupaciones de cromosomas bien definidas con un número mayor de 30 cromosomas:

$$IM = \frac{\text{Número total de metafases}}{\text{Número total de células evaluadas}}$$

La inhibición del índice mitótico (IIM) producido por la toxina se calculó como:

$$IIM = 100 - \frac{IM \text{ del tratamiento} \times 100}{IM \text{ del control}}$$

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**5.1.5.2. Cinética de Proliferación Celular.** Cien metafases consecutivas con 44-46 cromosomas se observaron al microscopio de campo claro, clasificándolas como primera división (M1) aquéllas cuyos cromosomas se encontraron teñidos de oscuro, segunda división (M2) aquéllas metafases en las cuales todos sus cromosomas estaban conformados por una cromátida oscura y una clara, y tercera división (M3) a las que contenían metafases con los dos patrones anteriormente mencionados. La proporción obtenida se usó para calcular el índice de replicación de acuerdo con la fórmula:

$$IR = \frac{1(\# M1) + 2(\# M2) + 3(\# M3)}{\text{Número de metafases observadas}}$$

**5.1.5.3. Intercambios de Cromátidas Hermanas.** Estos fueron establecidos por el análisis de 25 metafases en segunda división. La frecuencia por célula se obtuvo por la suma de los intercambios presentes en cada cromosoma de la metafase con 44-46 cromosomas. Para cada cromosoma se sumaron los intercambios terminales, aquellos que se localizaron en los extremos con valor de uno, y los intercambios intersticiales, situados en la zona intermedia, con valor de 2 debido a que su formación requiere el doble de eventos que los terminales (Figura 10) (Latt, 1981);

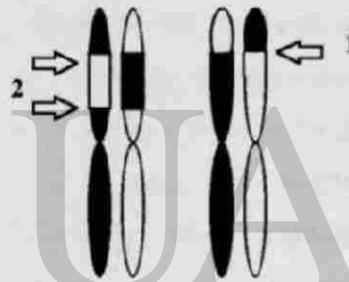
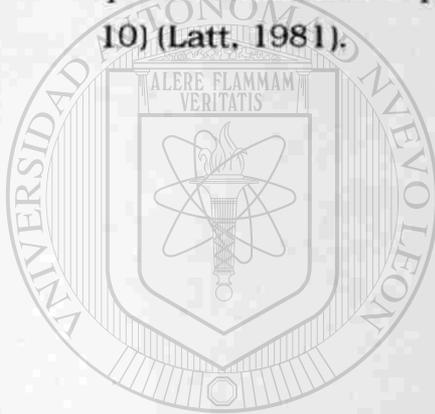


Figura 10. Esquema de los intercambios y su valor.

**5.1.5.4. Aberraciones Cromosómicas.**

El análisis de aberraciones cromosómicas se realizó en 100 metafases consecutivas de primera división (M1). Todas con 45 o más centrómeros. El daño cromosómico (Ostrosky, 1991) se clasificó como: **brechas** (discontinuidades de DNA cuya distancia es menor al ancho de la cromátida.) cromatídicas o cromosómicas.

**rompimientos:** (discontinuidades del DNA cuya distancia es más ancha que la cromátida) cromatídicos o cromosómicos.

**intercambios** (rearrreglos anormales entre los brazos de uno o más cromosomas) cromatídicos: como cuadrirradiales o trirradiales o cromosómicos (dicéntricos, anillos, translocaciones).

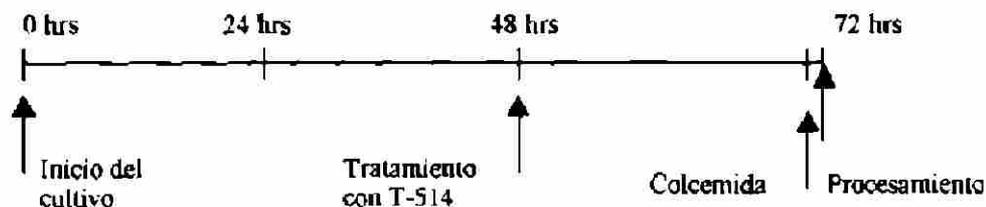
#### **5.1.6. Activación metabólica**

El homogenado hepático que contiene las enzimas microsomales o fracción "S9" (sobrenadante producto de la centrifugación a 9 000 g) se obtuvo de la casa Moltox Inc. (USA) y cumplía con las siguientes características: especie: rata; cepa: Sprague-Dawley; sexo: macho; buffer: KCl 0.15 M volumen: 2.1 ml, pH 7.4; agente inductor: Aroclor 1254. Cuando la fracción "S9" se combina con los siguientes cofactores y soluciones se forma la **mezcla S9**, la cual se preparó inmediatamente antes de cada experimento: 20% de la fracción S9, MgCl<sub>2</sub> 8 mM, nicotinadenina-difosfato (NADP) 4 mM, glucosa-6-fosfato (G-6-P) 5 mM y de solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4 . La solución de los cofactores se filtró utilizando una unidad swinex (Millipore Corp.) equipada con una membrana de 0.2  $\mu$ m de poro y por último se le agregó la fracción S9 (White y Hesketh, 1980).

#### **5.1.7. Tratamientos**

**Sin activación metabólica** . La T-514 se disolvió en etanol 80% y se agregó a los cultivos (50  $\mu$ L) después de 48 hrs de incubación cuando una gran proporción de células están en la fase de síntesis del ciclo celular y pueden ser más sensibles al daño químico. Se utilizaron las siguientes concentraciones: 1  $\mu$ M, 5  $\mu$ M y 10  $\mu$ M; incubando por 24 hrs

más, hasta completar el tiempo de incubación de 72 hrs (Esquema 1).



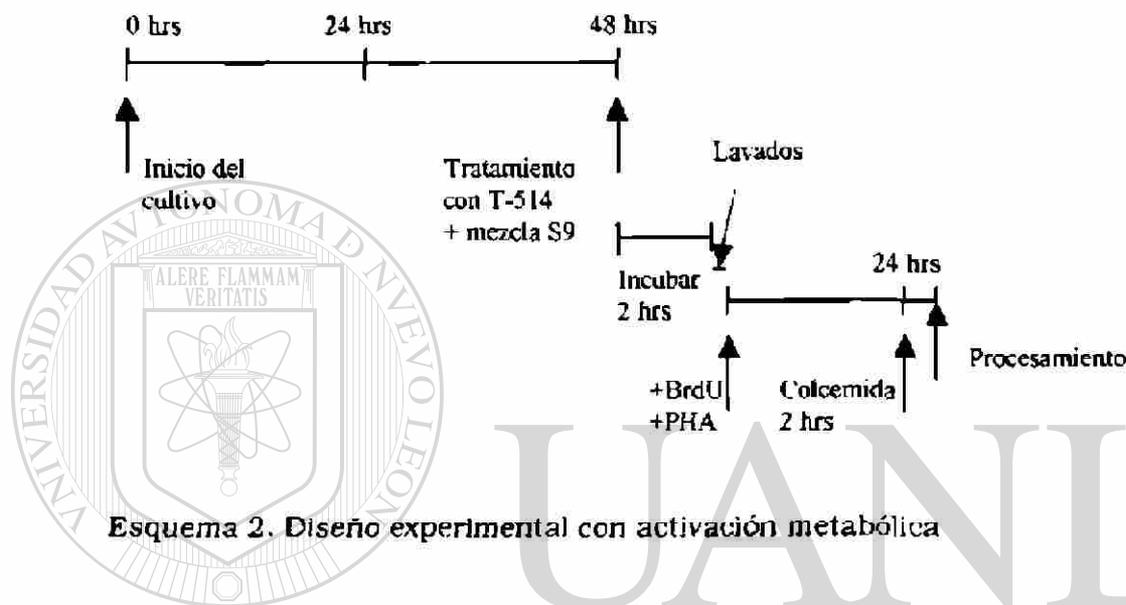
Esquema 1. Diseño experimental sin activación metabólica

Como control positivo se empleó la Mitomicina-C (MM-C), en un volumen de 50  $\mu$ L, a la concentración final en el cultivo de 1  $\mu$ M. La MM-C es un agente alquilante bifuncional el cual produce aberraciones cromosómicas e inhibición mitótica. Este compuesto fue seleccionado porque ha demostrado su acción genotóxica y citostática tanto en animales como en humanos (Crooke y Bradner, 1976; Ostrosky y cols., 1988; Rojas y cols., 1992). El control negativo contenía solvente, etanol al 80% (50  $\mu$ L). Al cultivo testigo no se le adicionó algún compuesto. El volumen final en cada tubo fue de 7 ml.

**Con activación metabólica.** Después de 48 hrs de incubación, se agregó a los cultivos 0.5 ml de la mezcla S9 junto con las mismas concentraciones de T-514 usadas en los tratamientos sin activación metabólica, en un volumen final de 5 ml. La incubación continuó por 2 hrs y las muestras se lavaron dos veces con medio de cultivo. Posteriormente al sobrenadante se agregó medio fresco conteniendo PHA y BrdU, y las células se volvieron a incubar por 24 hrs (Esquema 2).

Se utilizó Ciclofosfamida (CP) como control positivo a la concentración de 40  $\mu$ M, diluida en agua estéril. La CP es una mostaza nitrogenada que fue sintetizada para ser específicamente activada por las células tumorales que contenían una enzima capaz de romper la

unión Nitrógeno-Fósforo en la molécula. Por lo tanto el compuesto es relativamente inerte hasta que se activa por el sistema P-450 en el hígado, así como en los tumores (Smith y Reynard, 1993). El primer metabolito es la 4-hidroxi-ciclofosfamida, responsable de la acción mutagénica. A los controles negativos se les agregó mezcla S9 (0.5 ml) y etanol 80% como solvente (50  $\mu$ L).



### 5.1.8. Análisis Estadístico

La prueba estadística de  $\chi^2$  se utilizó para el análisis de aberraciones cromosómicas (Richardson y cols., 1989).

La prueba de t de Student se empleó para comparar las diferencias de cada tratamiento con respecto al control, para el índice mitótico, el índice de replicación y para las frecuencias de intercambios de cromátidas hermanas (Mehnert y cols., 1984; Richardson y cols., 1989; Hartman y Speit, 1994).

### 5.1.9. Citometría de Flujo

Para la medición del contenido del DNA por citometría de flujo, las poblaciones celulares se dispersan en una suspensión celular y se tiñen con un colorante fluorescente, p.e. Ioduro de Propidio, el cual se une al DNA en todas las fases del ciclo celular. Las células luego pasan de una en una (a través de una región sensora por el frente de un detector) donde su fluorescencia se mide y se asume que es proporcional al contenido de DNA celular (Dean y cols., 1982).

Cuando las células normales son teñidas y evaluadas por citometría de flujo, la mayoría de ellas estarán en la fase  $G_0/G_1$ , y emitirán luz en una frecuencia uniforme. Las células que tienen casi el doble de su DNA están en la fase  $G_2+M$ , emitirán luz con el doble de intensidad de las células  $G_0/G_1$ . Si el número de células se grafica contra la intensidad de luz emitida, y si se usa una escala lineal, se obtiene el histograma de la Figura 11A. Las células que entran al ciclo celular y pasan por la fase S sintetizarán DNA. La cantidad de DNA durante la fase S variará entre  $1x$  y  $2x$  (donde  $x$  es la cantidad normal de DNA de una célula diploide). Entonces, emitirán luz que estará en su rango de intensidad entre los picos de  $G_0/G_1$  y  $G_2+M$  (Figura 11B).

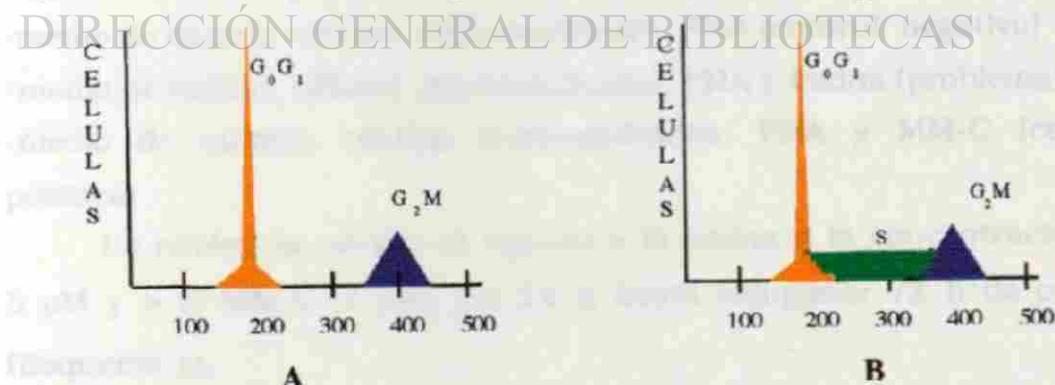


Figura 11. Intensidad de fluorescencia relativa. A. En células somáticas que no están dividiéndose. B. En células que están dividiéndose.

**5.1.9.1. Obtención de células mononucleadas.** Las muestras de sangre venosa se obtuvieron de dos donadores sanos de sexo masculino (donador 11 y donador 12) siguiendo los mismos criterios de exclusión. Se separaron las células mononucleadas de 60 ml de sangre, mediante centrifugación con gradiente de Fycoll-Hypaque (Sigma,Co.), durante 30 min a 1600 rpm. Se recuperó el plasma en tubos estériles; luego se recuperó la capa de células blancas, la cual se resuspendió en medio de cultivo RPMI 1640 complementado con aminoácidos no esenciales 10 mM y L-glutamina 200mM, y se centrifugó a 1200 rpm para lavar los restos del Fycoll-Hypaque.

Se eliminó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 2 ml de medio RPMI-1640 complementado. Se tomó una muestra de 50 µl de esta suspensión y se diluyó en una proporción 1:250 con diluyente (Abbot Company) del contador de células (Cell-Dyn-900) para posteriormente realizar el conteo en este aparato.

La densidad celular se ajustó a  $5 \times 10^5$  células en 5 ml de volumen total. Se distribuyeron las células en tubos 12 x 75 mm estériles, por duplicado de la siguiente manera:

- medio de cultivo y células mononucleadas (testigo) ®
- medio de cultivo, células mononucleadas, PHA (control negativo)
- medio de cultivo, células mononucleadas, PHA y toxina (problema)
- medio de cultivo, células mononucleadas, PHA y MM-C (control positivo)

La población celular se expuso a la toxina a la concentración de 5 µM y a la MM-C (1 µM) por 24 h hasta completar 72 h de cultivo (Esquema 1).

### 5.1.9.2. Tinción.

Las células se fijaron con solución amortiguadora de sacarosa y citrato de sodio en DMSO. Las suspensiones celulares se llevaron a centrifugación a 1600 rpm por 5 min a temperatura ambiente. Se decantó cuidadosamente. Se agregó un volumen de 250  $\mu$ l de solución amortiguadora de tripsina a cada tubo y suavemente se mezcló, y se mantuvieron en reposo por 10 min para que se llevara a cabo la reacción de digestión de membranas celulares y citoesqueleto. Se agregó un volumen de 200  $\mu$ l de una solución amortiguadora que contiene inhibidor de tripsina y ribonucleasa A (para digerir el RNA), se mezcló suavemente y por 10 min se incubó. No se removieron ambas soluciones. Posteriormente, se adicionó un volumen de 200  $\mu$ l de la solución de Ioduro de Propidio (2°-8°C), se mezcló suavemente y se incubó por 10 min en la oscuridad y en el refrigerador. Las muestras se filtraron a través de una malla de nylon de 50  $\mu$ m a tubos 12 x 75 mm.

Los tubos se mantuvieron almacenados a 2°-8° C en la oscuridad hasta su análisis citométrico. Las muestras se analizaron en el citómetro de flujo FACSsort (Beckton Dickinson) equipado con el software CellFIT, del Departamento de Inmunología de la Facultad de Medicina, U.A.N.L.. Se empleó el modelo SOBR (Suma de la Amplitud de los Rectángulos) para estimar el porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.

## 5.2. Cultivos de *Salmonella typhimurium* (Prueba de Ames)

Se emplearon tres cepas de *Salmonella typhimurium*, la TA98, TA100 y TA1537. Se siguió el método de incorporación en agar descrito por Maron y Ames (1983) de la siguiente manera: a un tubo que contenía 2 ml de agar de superficie (líquido a 45°C) se le agregó 0.1 ml de cultivo de bacterias, mantenidas la noche anterior en agitación y en medio nutriente, y 0.1 ml de T-514 a varias concentraciones, disuelta en dimetilsulfóxido (DMSO). Después de agitar la mezcla, se vertió sobre las cajas de Petri que contenían agar mínimo Vogel-Bonner. Se dispersó el material de forma homogénea y se llevaron a incubar por 48 h a 37 °C (Figura 10).

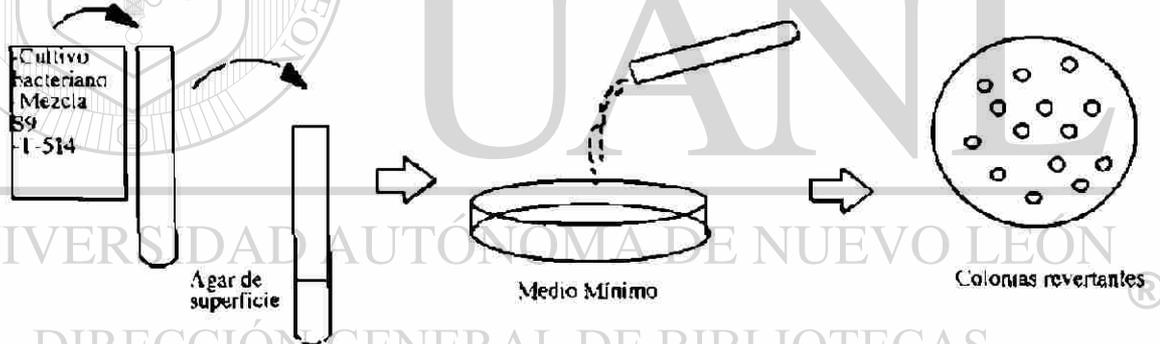
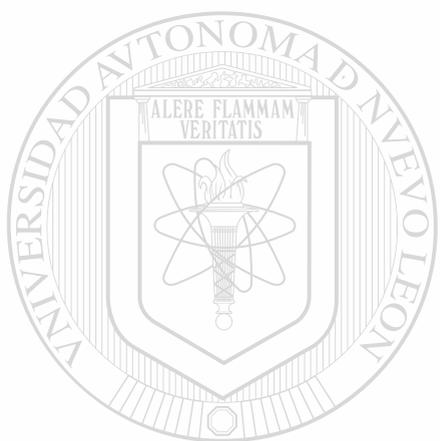


Figura 10. Esquema del procedimiento para la detección de mutágenos en *Salmonella typhimurium*

Los controles positivos empleados fueron 9-aminoacridina (9-AAC) y ácido Pricolónico (Ac.PC) disueltos en DMSO. Los testigos contenían medio de cultivo y bacterias, a los controles negativos se les adicionó el solvente DMSO.

Para los ensayos con activación metabólica, se siguió el método de preincubación por 20 minutos (Yahagi y cols. 1975). Se agregó 0.5 ml de la mezcla S9 (30% de la fracción S9,  $MgCl_2$  8 mM, KCl 33 mM, NADP 4 mM, G-6-P 5 mM y de solución amortiguadora de fosfato de sodio 100 mM, pH 7.4), la toxina y el cultivo de la cepa en el agar de superficie. El control positivo fue 2-aminoantraceno (2-AA) disuelto en DMSO, los controles negativos contenían solvente (DMSO) y mezcla S9.



# UANL

---

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPITULO 6

### RESULTADOS

#### 6.1 Cultivo de Linfocitos Humanos

##### 6.1.1. Aberraciones cromosómicas

**6.1.1.1. Sin Activación Metabólica.** En la Tabla 1 se muestran las observaciones para cada concentración de la T-514 y para cada uno de los tipos de aberraciones evaluadas. En el extremo derecho se indica la suma de las aberraciones sin considerar las brechas (B). Se considera que la identificación de las brechas es subjetiva y que no constituyen aberraciones reales. Se ha sugerido que las brechas sean contabilizadas y reportadas, pero no se usan en la evaluación del estudio.

Se observa que para los donadores 1, 2 y 4 la concentración de T-514 de 10  $\mu\text{M}$  resultó tóxica ya que el número de metafases en primera división (100) no fue suficiente para este análisis. No se encontraron diferencias con respecto a las aberraciones complejas (RC). Se analizó una concentración de MM-C (10  $\mu\text{M}$ ), a la cual produjo aberraciones estructurales, principalmente rompimientos cromatídicos.

**TABLA 1. FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES EN LINFOCITOS**

	Conc. $\mu\text{M}$	Aberraciones / 100 células						Total sin brechas
		B'	B''	R'	R''	RC	D	
donador 1	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	1	0	0	0	1
	5	0	0	0	0	0	0	0
	10	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
donador 2	0	2	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0
	5	5	1	0	0	0	0	0
	10	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
donador 3	0	0	0	1	0	0	0	1
	1	0	2	0	0	0	0	0
	5	3	0	1	0	0	0	1
	10	0	0	1	0	0	0	1
donador 4	0	2	1	0	0	0	0	0
	1	0	0	1	1	1	0	3
	5	0	0	1	0	0	2	3
	10	0	0	nm	nm	nm	nm	nm
MM-C <sup>a</sup>	10	0	2	8	6	0	1	15

B: brecha.

R: rompimiento

RC: rearrreglo complejo

<sup>a</sup>: valor de un solo donador

Donadores 1 y 3 sexo femenino

Donadores 2 y 4 sexo masculino

\*cromatídico.

\*\*cromosómico

nm: no se encontraron metafases

D: dicéntricos

Con respecto a los rompimientos totales (R' y R''), sin considerar las brechas (B) no fueron evidentes diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) para cada concentración (Figura 13).

El donador 4 mostró el mismo número de rompimientos totales, en las concentraciones de 1 y 5  $\mu\text{M}$ , sin embargo, es importante señalar que a la concentración de 5  $\mu\text{M}$ , presentó dos cromosomas dicéntricos en 100 metafases analizadas, frecuencia alta, ya que la frecuencia

espontánea de este tipo de aberraciones es del orden de 1 en 1000 metafases observadas.

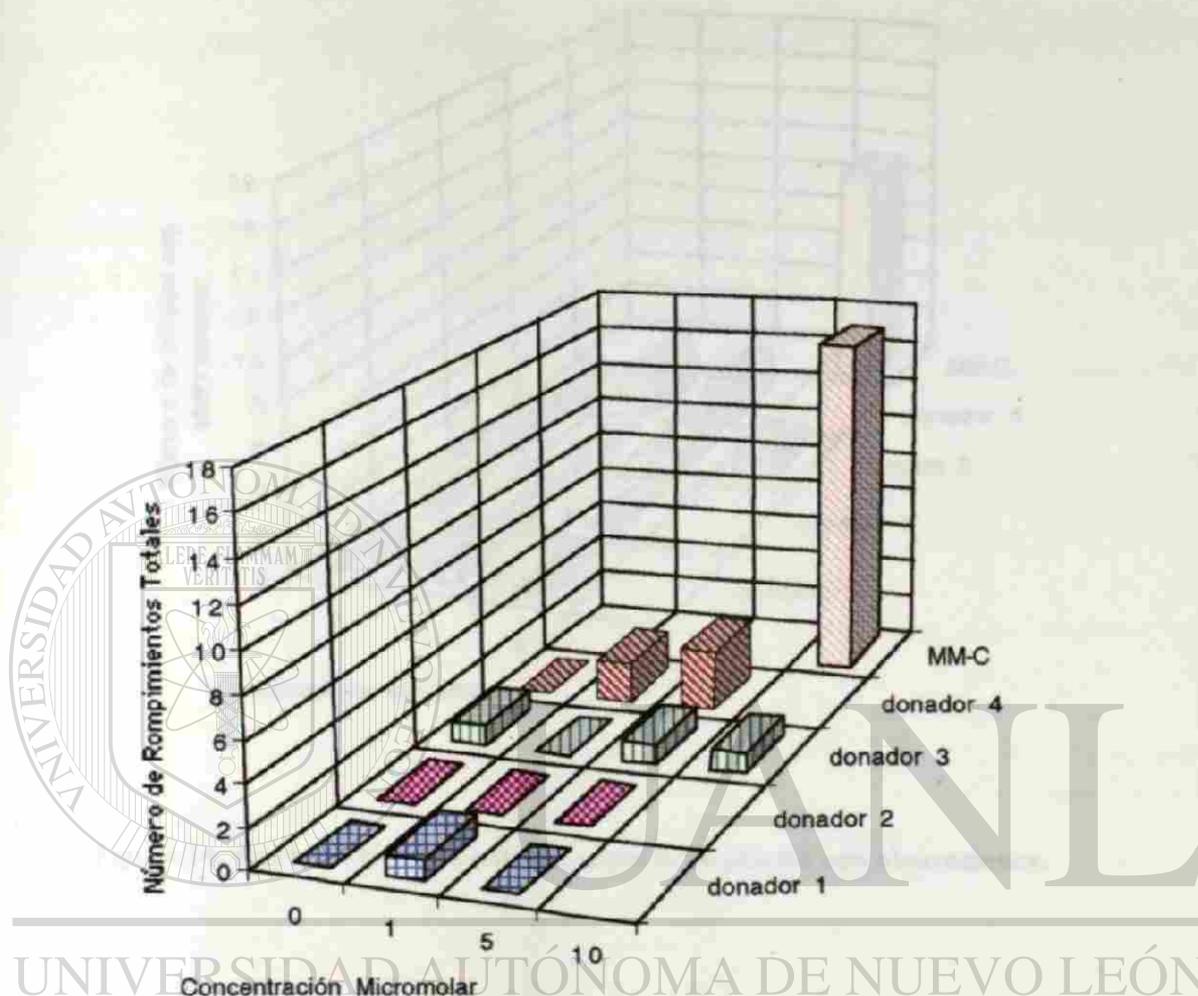


Figura 13. Efecto de la T-514 sobre el número de rompimientos totales .

El número de células aberrantes, es decir, el número de metafases que tuvieron por lo menos una aberración por donador, no se incrementó significativamente. La MM-C, en cambio, incrementó significativamente el número de células con aberraciones (Figura 14).

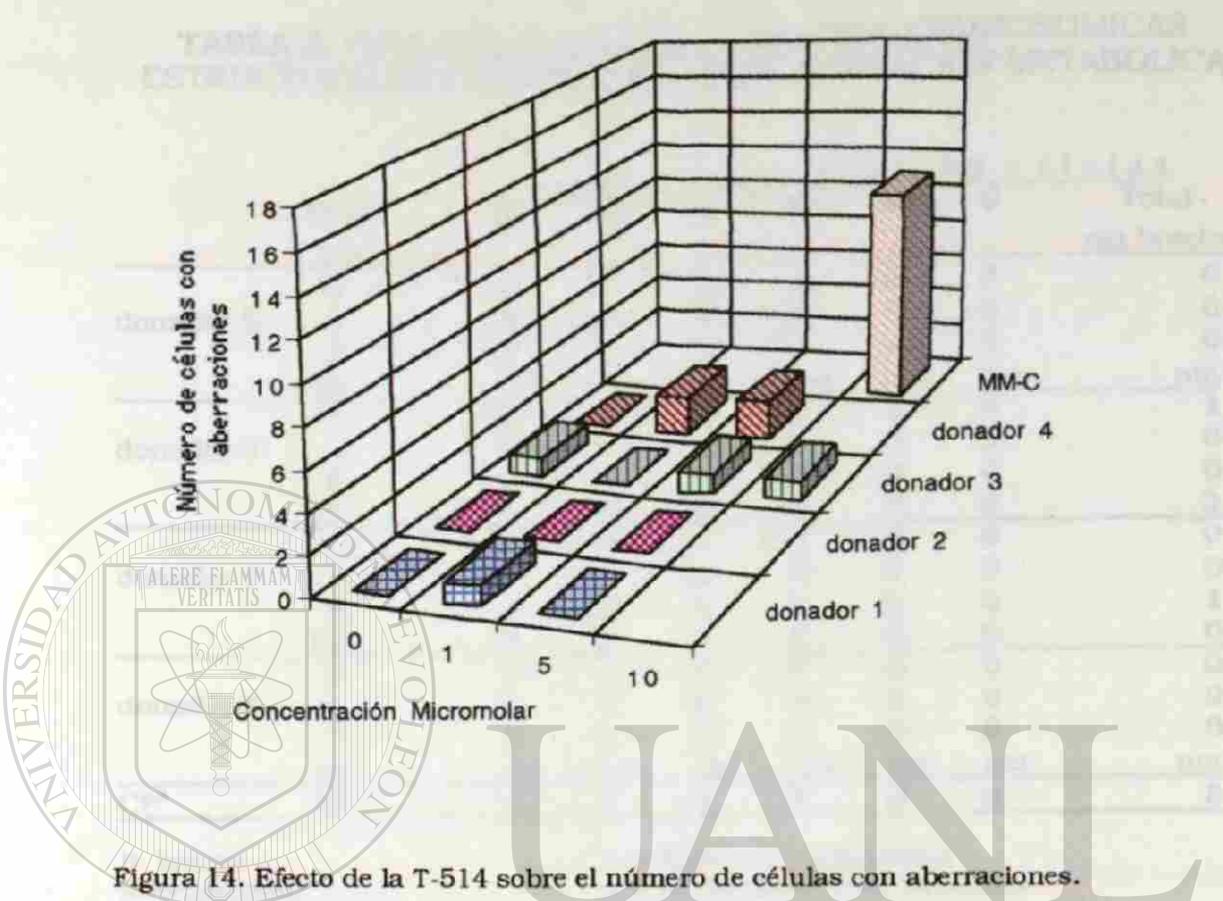


Figura 14. Efecto de la T-514 sobre el número de células con aberraciones.

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**6.1.1.2. Con Activación Metabólica.** De manera similar a los resultados sin activación metabólica, el análisis de aberraciones no mostró diferencias significativas para cada concentración con respecto al cultivo control. Es importante señalar que en general, la ocurrencia de aberraciones fue menor en presencia de enzimas microsomales

Se observó de nuevo la susceptibilidad individual de los donadores, a la concentración de 10  $\mu$ M. de T-514, el donador 5 y el donador 8 no presentaron suficientes metafases para el análisis. (Tabla 2).

**TABLA 2. FRECUENCIA DE ABERRACIONES CROMOSOMICAS ESTRUCTURALES EN LINFOCITOS CON ACTIVACION METABOLICA**

	Conc. $\mu\text{M}$	Aberraciones / 100 células						Total sin brechas
		B'	B''	R'	R''	RC	D	
donador 5	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	10	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
donador 6	0	0	0	1	0	0	0	1
	1	0	0	0	0	0	0	0
	5	1	1	0	0	0	0	0
	10	0	0	2	0	0	0	2
donador 7	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	0	2	0	0	0	0	0
	5	0	0	1	0	0	0	1
	10	0	2	0	0	0	0	0
donador 8	0	0	1	0	0	0	0	0
	1	0	1	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	0	0	0
	10	nm	nm	nm	nm	nm	nm	nm
CP <sup>a</sup>	40	0	3	5	3	0	0	8

B: brecha

R: rompimiento

RC: rearrreglo complejo

<sup>a</sup> : valor de un solo donador

Donadores 5 y 7 sexo Femenino

Donadores 6 y 8 sexo Masculino.

'cromatídico, "cromosómico

nm: no se encontraron metafases.

D: dicéntricos.

## DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los rompimientos totales se graficaron contra las concentraciones empleadas y no se observó algún efecto dependiente de la dosis. Los donadores 6 y 7 elevaron la frecuencia de rompimientos en las concentraciones de 1  $\mu\text{M}$  y 5  $\mu\text{M}$  respectivamente, sin embargo este aumento no fue significativo (Figura 15).

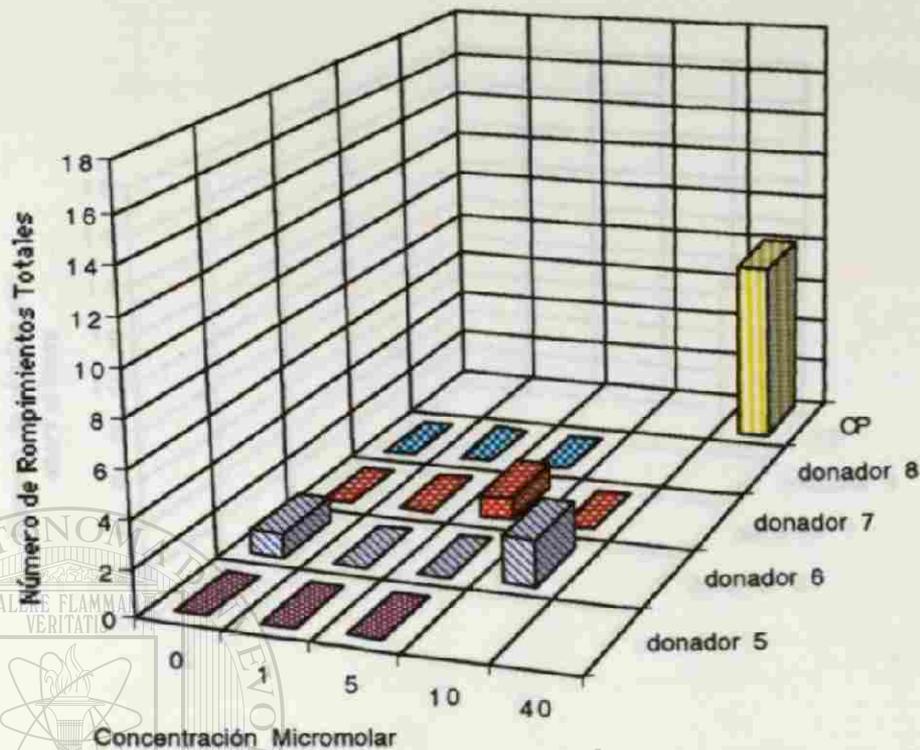


Figura 15. Efecto de la T-514 sobre el número de rompimientos totales en presencia de activación metabólica.

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

La T-514 no modificó la frecuencia de células aberrantes a las concentraciones usadas, el donador 6 presentó una célula con aberraciones en el cultivo control y de igual manera para la concentración de 10  $\mu\text{M}$ . El donador 6 presentó una célula aberrante con 5  $\mu\text{M}$ , en cambio, la CP elevó la frecuencia a 8 células que presentaron aberraciones (Figura 16).

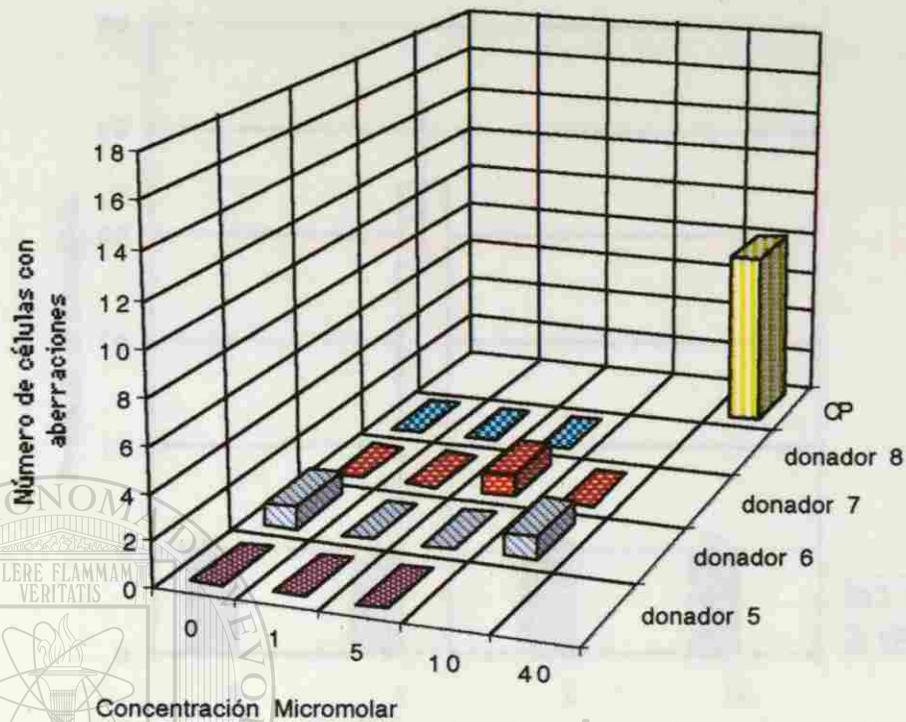


Figura 16. Efecto de la T-514 sobre el número de células con aberraciones en presencia de activación metabólica.

### 6.1.2. Intercambios de Cromátidas Hermanas

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**6.1.2.1. Sin Activación Metabólica.** El promedio de Intercambios de Cromátidas Hermanas en los cultivos controles fue de  $4.8 \pm 0.5$ . La inducción de ICH no se incrementó significativamente en los linfocitos expuestos a las tres concentraciones de toxina T-514. La MM-C fue un potente inductor a la concentración de  $1 \mu\text{M}$ , el promedio de ICH por célula fue de 23 (Figura 17).

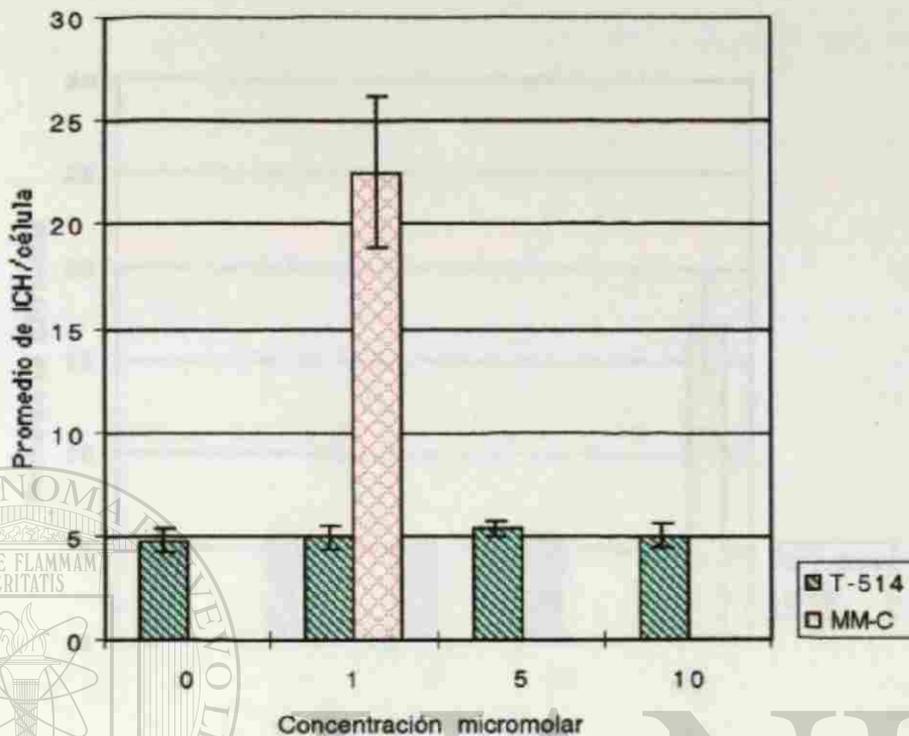


Figura 17. Efecto de la T-514 sobre la frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

**6.1.2.2. Con Activación Metabólica.** No se encontraron diferencias significativas cuando se agregó a los cultivos la mezcla S9 por 2 hrs y se expusieron a la T-514 por el mismo intervalo, El valor promedio de ICH para la Ciclofosfamida fue casi tres veces mayor del valor promedio para el cultivo control y los cultivos expuestos a la T-514 (4-6) (Figura 18).

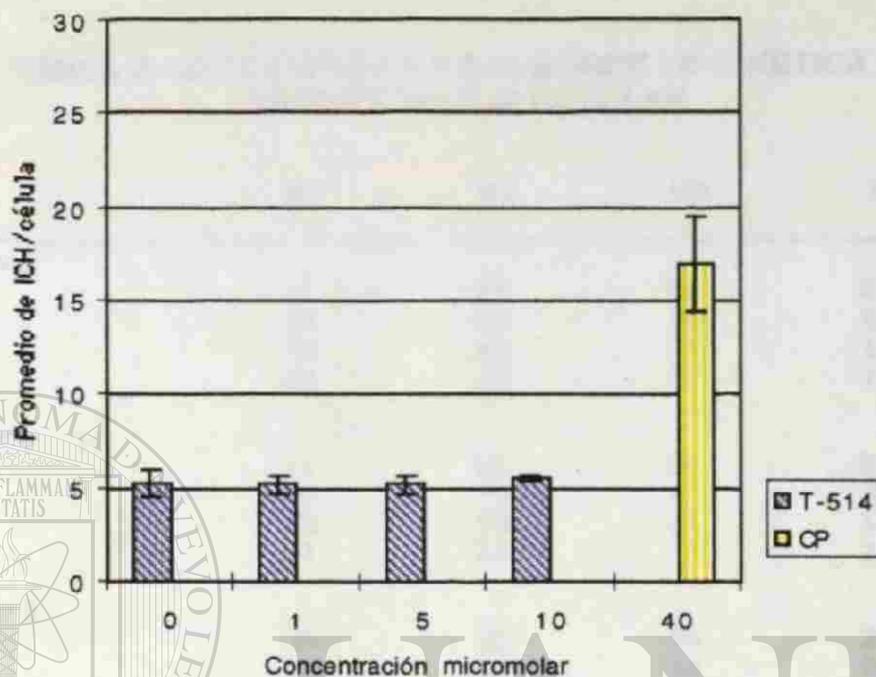


Figura 18. Efecto de la T-514 sobre la frecuencia de Intercambios de Cromátidas Hermanas en presencia de activación metabólica.

## UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

### 6.1.3. Cinética de Proliferación Celular e Índice Mitótico. <sup>®</sup>

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**6.1.3.1. Sin Activación Metabólica.** En la Tabla 3 se muestran las proporciones de metafases en cada división. La T-514 produjo un aumento en la proporción de células que se dividieron una vez durante el tiempo de cultivo (72 hrs), cerca de un 35 %, a partir de la concentración de 5  $\mu\text{M}$  y este efecto se incrementó más con la concentración de 10  $\mu\text{M}$ , el 50% de las metafases observadas estaban en primera división, con la consecuente disminución de segundas y terceras divisiones. La MM-C aumentó la proporción de primeras

divisiones a la concentración de 5  $\mu$ M, 45% y sólo el 20% correspondían a terceras divisiones (Figura 19).

**TABLA 3. EFECTO DE LA T-514 SOBRE LA CINÉTICA DE PROLIFERACIÓN CELULAR**

T-514 ( $\mu$ M)	M1	M2	M3	IR
<b>Donador 1</b>				
0	11	26	63	<b>2.54</b>
1	16	30	54	<b>2.38</b>
5	45	24	31	<b>1.86</b>
10	53	20	27	<b>1.74*</b>
<b>Donador 2</b>				
0	11	24	65	<b>2.54</b>
1	25	30	45	<b>2.20</b>
5	40	29	31	<b>1.91</b>
10	61	24	15	<b>1.54*</b>
<b>Donador 3</b>				
0	20	25	55	<b>2.31</b>
1	26	29	45	<b>2.19</b>
5	40	23	37	<b>1.97</b>
10	42	26	32	<b>1.87*</b>
<b>Donador 4</b>				
0	14	21	65	<b>2.49</b>
1	16	19	65	<b>2.46</b>
5	28	27	64	<b>2.15</b>
10	47	19	34	<b>1.87*</b>

\*  $p < 0.05$

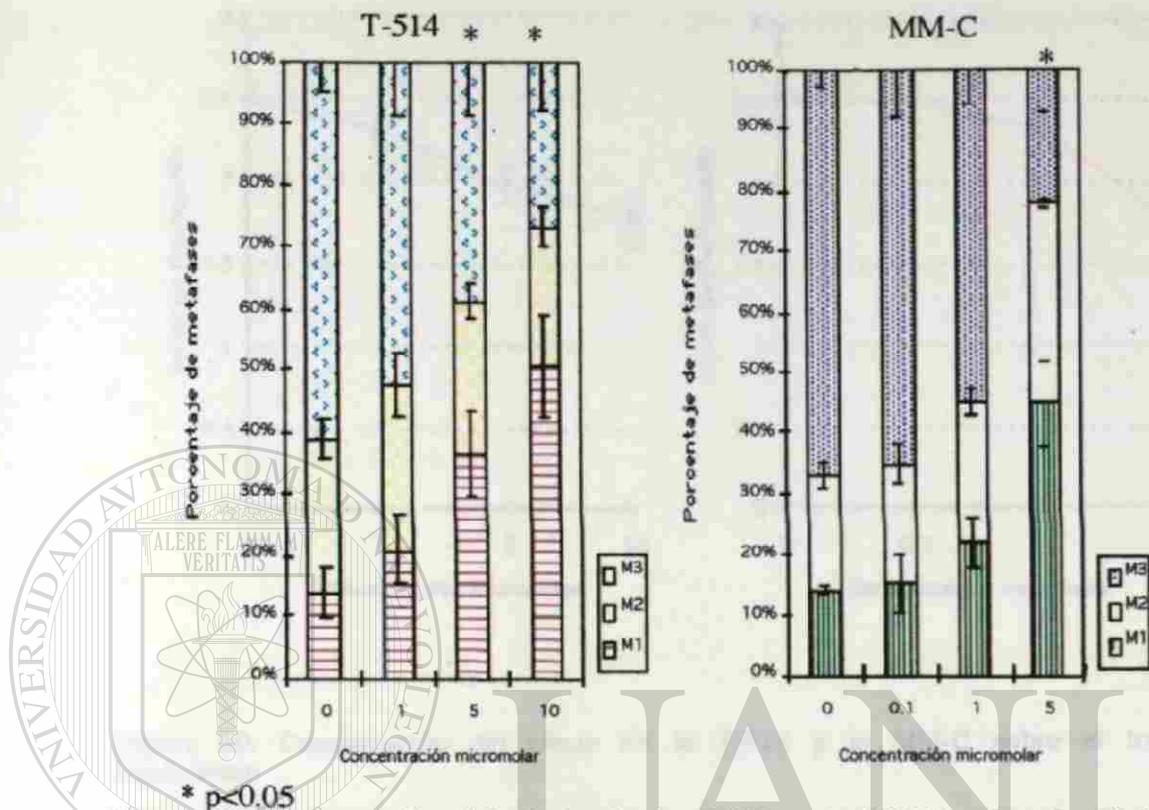


Figura 19. Comparación del efecto de la T-514 y la MM-C sobre la Cinética de Proliferación Celular. Valores promedio de todos los donadores.

El Índice de Replicación (IR), es un parámetro que combina en un solo número las proporciones de primera, segunda y tercera división en este tiempo de cultivo (72 hrs), como se apreció en la figura anterior. La Figura 20 muestra la disminución del IR conforme aumenta la concentración, lo cual puede indicar una inhibición o un retraso en la proliferación celular. Con 5  $\mu$ moles la MM-C tuvo un efecto sobre la proliferación celular, comparable al efecto de la T-514 a las concentración de 10  $\mu$ M.

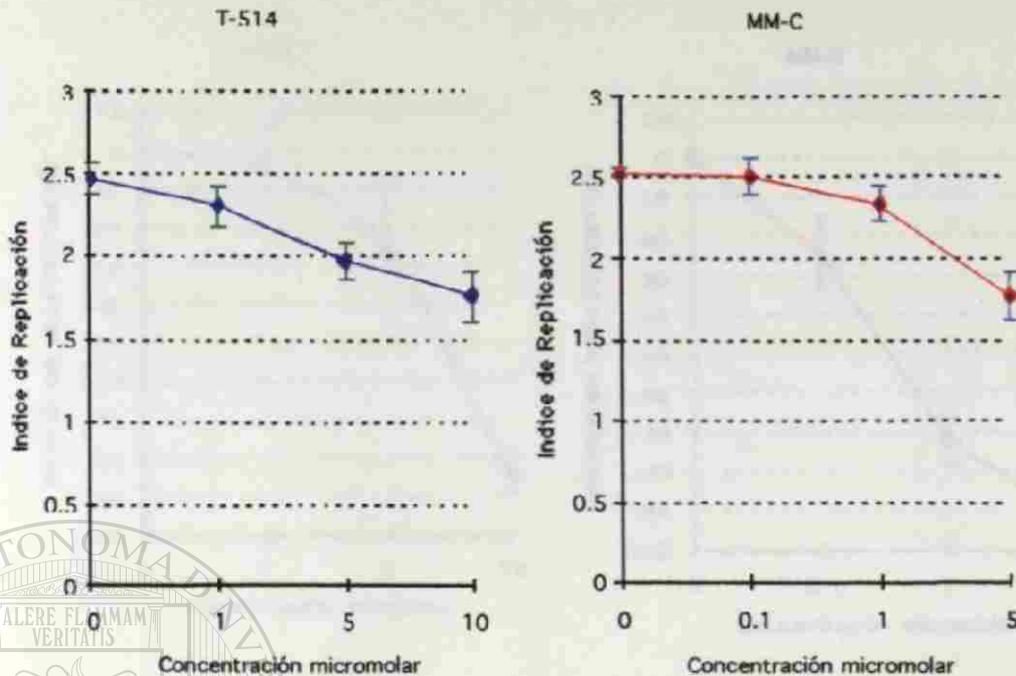


Figura 20. Comparación del efecto de la T-514 y la MM-C sobre el Índice de Replicación

La exposición a la toxina por 24 h afectó la capacidad proliferativa de los linfocitos, medida como la Inhibición del Índice Mitótico. En la Figura 21 se compara este parámetro para la T-514 y la MM-C, el control positivo.

Ambos compuestos muestran respuestas similares, aunque la MM-C es más potente para inhibirlo, puesto que la curva alcanza casi la inhibición máxima a la concentración de 5  $\mu\text{M}$ , en tanto la T-514 llega a este punto con 10  $\mu\text{M}$ . Aunque los dos agentes producen inhibición del IM que aumenta con la dosis, el tipo de curva de la T-514 es diferente, no lineal, en tanto que la MM-C presenta una curva lineal, con menor dispersión entre los donadores.

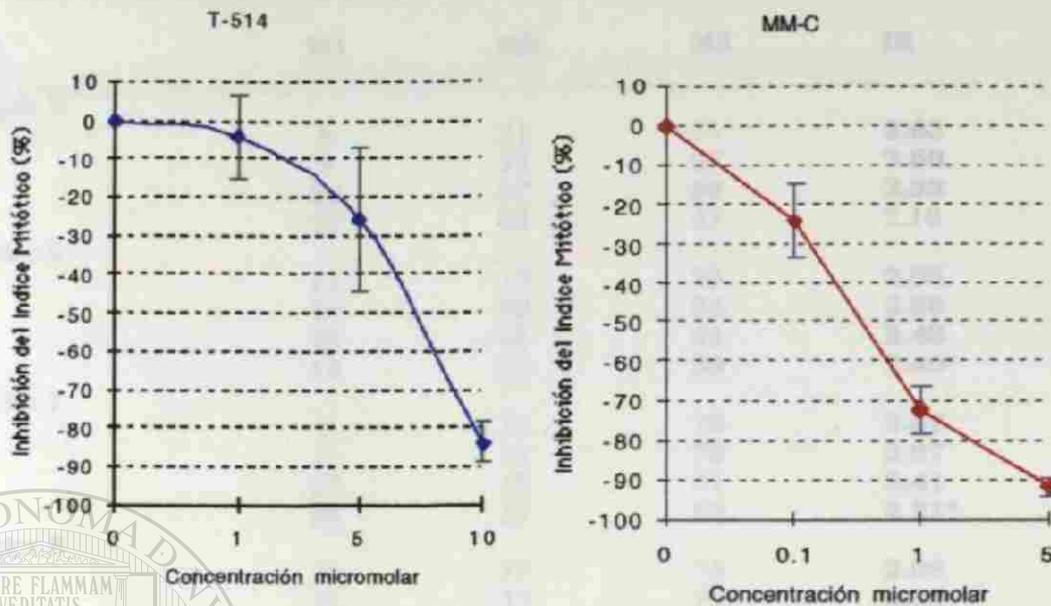


Figura 21. Comparación del efecto de la T-514 y la MM-C sobre el % de Inhibición del Índice Mitótico.

**6.1.3.2. Con Activación Metabólica.** Cuando se agregó el sistema microsomal a los cultivos, el tratamiento fue de 2 h debido a que la mezcla S9 es tóxica por períodos mayores.

El efecto sobre las proporciones de células en primera, segunda, o tercera división fue menor con la activación metabólica, aunque aún se registró un incremento de células en primera división relacionado con la concentración, siendo significativo en las concentraciones de 5 y 10  $\mu\text{M}$  (Tabla 4).

La Ciclofosfamida (CP) no alteró la proliferación de las células en cultivo, a la concentración usada (Figura 22).

**TABLA 4. EFECTO DE LA T-514 SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR CON ACTIVACION METABOLICA**

T-514 (mM)	M1	M2	M3	IR
<b>Donador 5</b>				
0	8	21	71	<b>2.63</b>
1	9	24	67	<b>2.58</b>
5	20	27	53	<b>2.33</b>
10	29	24	47	2.18
<b>Donador 6</b>				
0	11	13	76	<b>2.65</b>
1	10	22	68	<b>2.58</b>
5	16	22	62	<b>2.46</b>
10	19	22	59	<b>2.40*</b>
<b>Donador 7</b>				
0	9	13	78	<b>2.67</b>
1	11	11	78	<b>2.67</b>
5	20	19	61	<b>2.41</b>
10	29	21	50	<b>2.21*</b>
<b>Donador 8</b>				
0	9	13	78	<b>2.68</b>
1	11	13	76	<b>2.65</b>
5	25	26	55	<b>2.42</b>
10	30	17	53	<b>2.23*</b>

\*p < 0.05

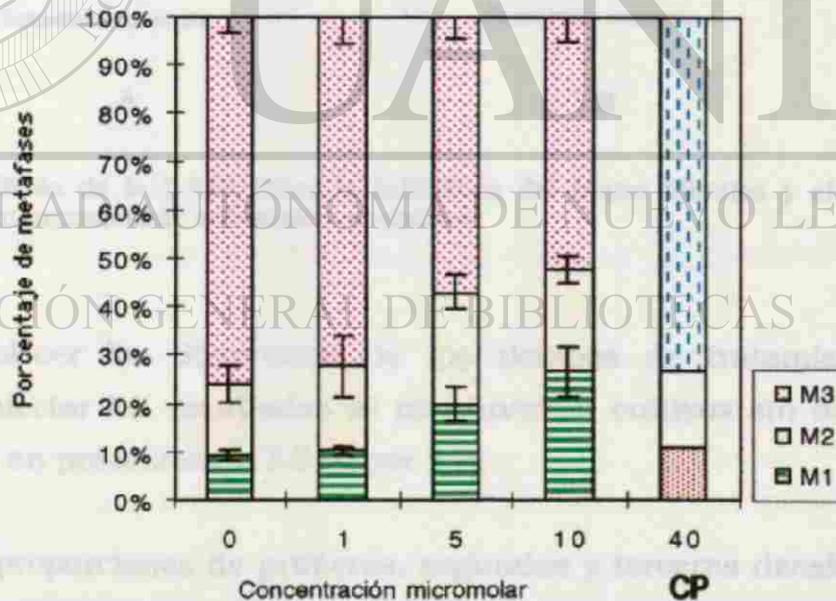


Figura 22. Efecto de la T-514 sobre la Cinética de Proliferación Celular en presencia de activación metabólica. (CP: Ciclofosfamida).

Con respecto al IR, no disminuye significativamente con una  $p < 0.05$  del valor control (Figura 23 B). La IIM se calculó para cada concentración, y con 10  $\mu\text{moles}$  se obtuvo la máxima inhibición (70%) (Figura 23 A).

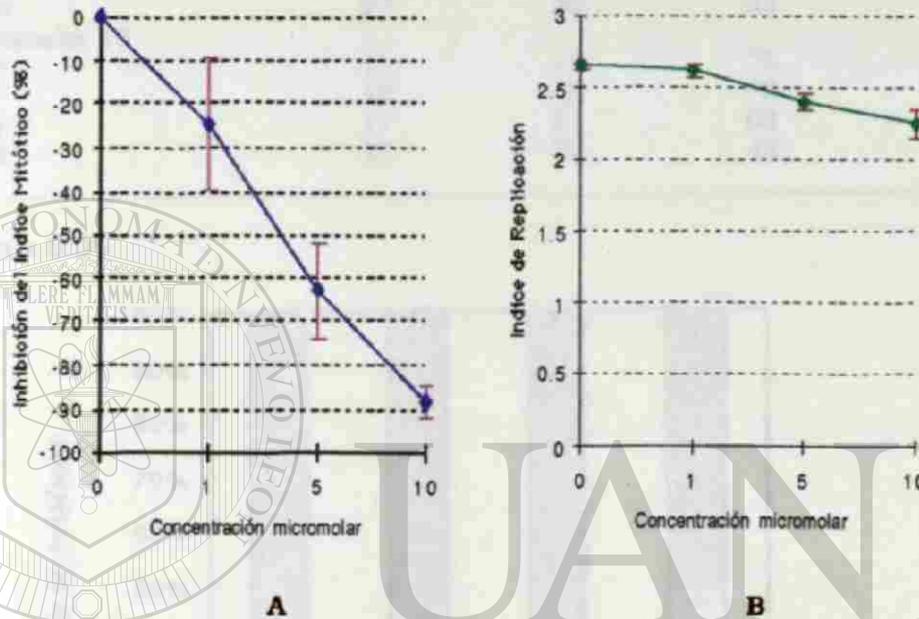


Figura 23. Efecto de la T-514 sobre la Inhibición del Índice Mitótico y el Índice de Replicación en presencia de activación metabólica.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
 Para establecer las diferencias de los tiempos de tratamiento que pudieron afectar los resultados se mantuvieron cultivos sin activación metabólica en presencia de T-514 por 2 h;

Las proporciones de primeras, segundas y terceras divisiones, no difieren importantemente de las obtenidas con activación metabólica de la Figura 19. Es constante el efecto de la toxina a la concentración de 10  $\mu\text{M}$  sobre las primeras divisiones (Figura 24).

**TABLA 5. EFECTO DE LA T-514 SOBRE LA CINETICA DE PROLIFERACION CELULAR POR 2 Hrs SIN ACTIVACION METABOLICA**

T-514 ( $\mu$ M)	M1	M2	M3	IR
<b>Donador 9</b>				
0	11	18	71	<b>2.60</b>
1	11	14	75	<b>2.64</b>
5	14	18	68	<b>2.54</b>
10	27	20	53	<b>2.26</b>
<b>Donador 10</b>				
0	11	14	75	<b>2.64</b>
1	12	15	73	<b>2.61</b>
5	17	21	62	<b>2.45</b>
10	27	25	48	<b>2.21*</b>

\*p < 0.05

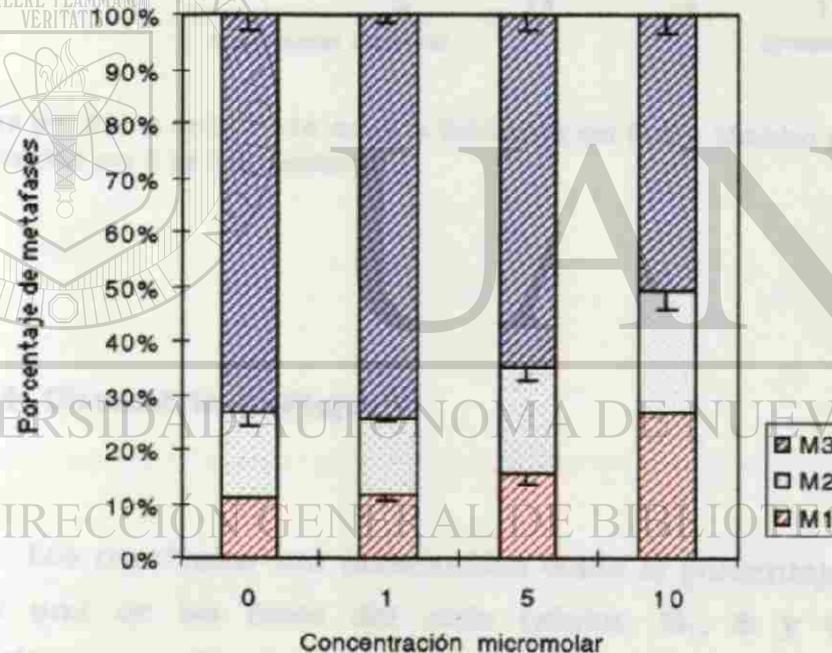


Figura 24. Efecto de la T-514 sobre la Cinética de Proliferación Celular por 2 hrs.

La inhibición del Índice Mitótico presentó una marcada relación dosis respuesta (Figura 22). La proliferación celular, medida como IR, fué muy similar a la observada en el tratamiento con activación metabólica (Figura 25).

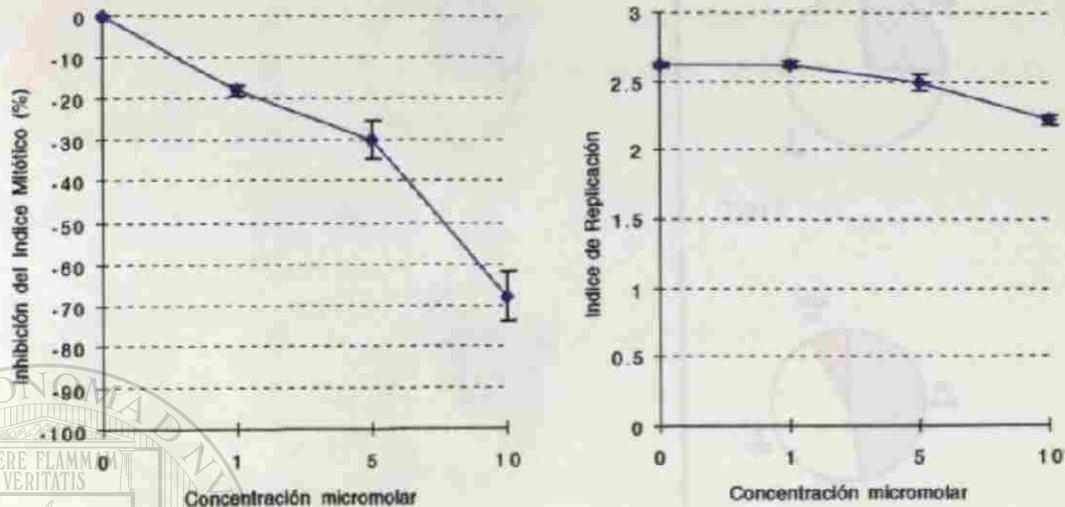


Figura 25. Efecto de la T-514 sobre la Inhibición del Índice Mitótico y sobre el Índice de Replicación por 2 hr de exposición.

#### 6.1.4. Citometría de Flujo

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Los resultados son presentados como el porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular,  $G_1$ , S y  $G_2/M$ , de tres experimentos realizados (Figura 25). Se realizaron lecturas basales, sin tratamiento, desde el inicio, a las 24 h, 48 h y 72 h de cultivo para corroborar que las células estaban proliferando después del estímulo con la PHA.

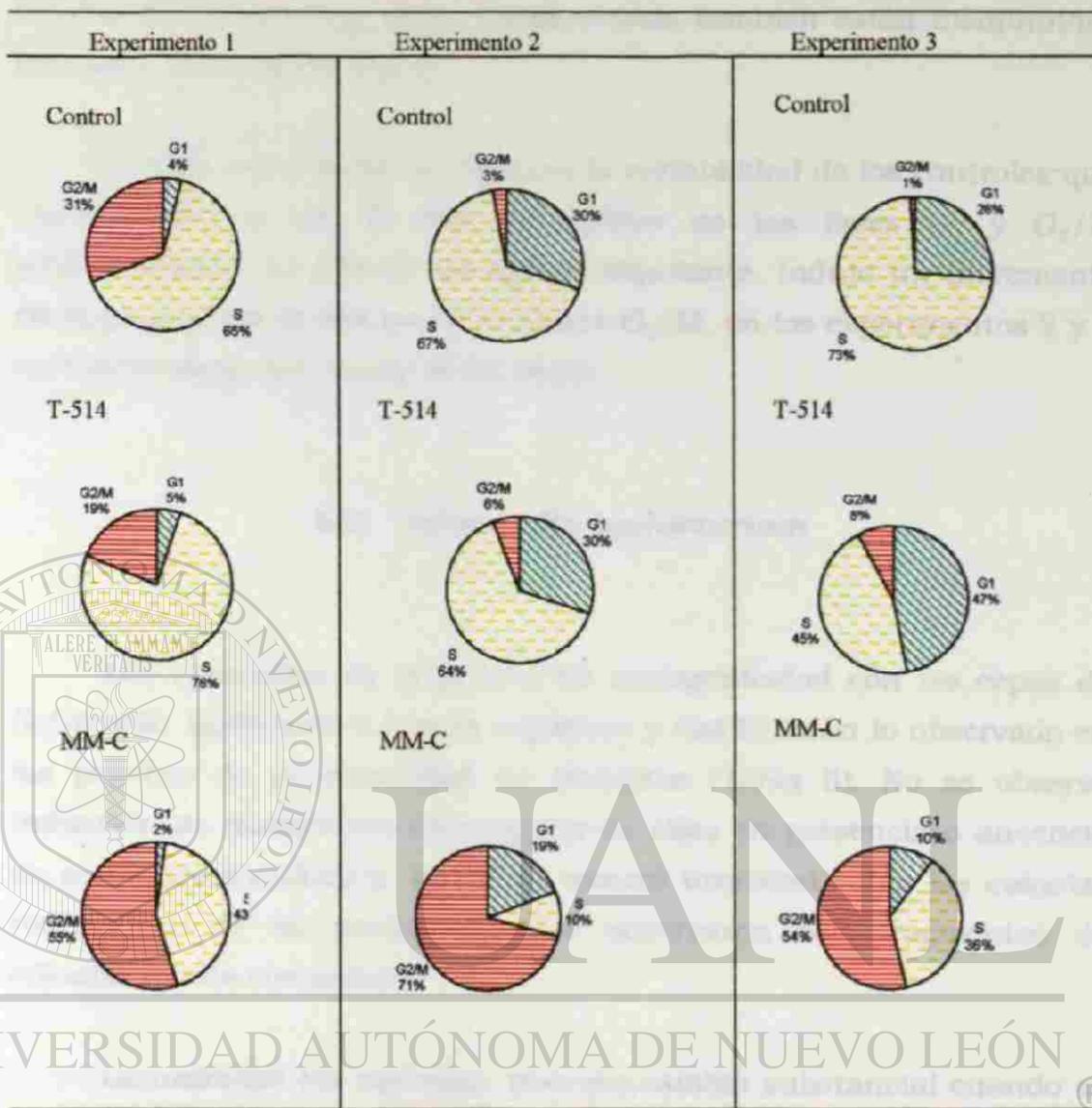


Figura 26. Pcentajes de las fases del ciclo celular en cultivos de 48 hrs tratados con T-514 (5  $\mu$ M) y MM-C (1  $\mu$ M) por 24 hrs. Donador 11: experimentos 1 y 2 . Donador 12: experimento 3.

No se observaron cambios de las proporciones de las fases producidos por la T-514 a la concentración de 5  $\mu$ M por 24 h de exposición en los experimentos 1 y 2. Sin embargo en el experimento 3 se observa un incremento dos veces del control, en el porcentaje de

células en la fase  $G_1$  y como consecuencia también están disminuidos los porcentajes de S y  $G_2/M$ .

En cada experimento se observa la variabilidad de los controles que corresponden a las 48 hrs de cultivo en las fases  $G_1$  y  $G_2/M$  principalmente. La MM-C, un agente alquilante, indujo un incremento en la proporción de células en las fases  $G_2/M$ , en los experimentos 2 y 3 este incremento fue mayor de 50 veces.

## 6.2. *Salmonella typhimurium*

Los resultados de la prueba de mutagenicidad con las cepas de *Salmonella typhimurium* fueron negativos y confirmaron lo observado en las pruebas de genotoxicidad en linfocitos (Tabla 6). No se observó inducción de mutaciones en ninguna de ellas en presencia o ausencia de activación metabólica. La T-514 mostró toxicidad sobre las colonias revertantes, de tal manera que se observaron solo fragmentos de colonias o nulo crecimiento

La toxicidad sin embargo, tuvo un cambio substancial cuando se agregó la mezcla S9 en la cepa TA1537; aquella disminuyó aun en las concentraciones más altas probadas, mientras que en las pruebas sin activación metabólica, 2500 veces más pequeñas, fue tóxica.

Las cepas TA100 y TA98 no fueron sensibles a los efectos de la T-514 ni aun en concentraciones mayores que las utilizadas con los controles positivos, con y sin activación metabólica. A estas concentraciones la T-514 tampoco fue tóxica para estas cepas (Tabla 7).

**TABLA 6. EFECTO DE LA T-514 SOBRE LA CEPA TA1537 DE *Salmonella typhimurium***

Concentración µM	Nº de revertantes/caja - S9		Nº de revertantes/caja + S9	
<b>TA 1537</b>				
0	16	± 2.5	-	-
46	20	± 2.51	-	-
92	18	± 2.08	-	-
Ac.PC				
180	57	± 8.08	-	-
0	35.5	± 3.5	-	-
92	35	± 0.5	-	-
232	38	± 4.2	-	-
464	23.5	± 3.5	-	-
9-AAC				
735	210	± 11.9	-	-
0	10	± 2.75	-	-
9	t		-	-
23	t		-	-
46	t		-	-
9-AAC				
735	230	± 26.4	-	-
0	8	± 0.3	10	± 5.56
46	t		5	± 3.7
92	t		4	± 1.5
185	t		7	± 1.52
232	t		20	± 2.2
464	t		11	± 1.6
9-AAC				
735	323	± 112	-	-
2-AA				
24	-		123	± 35

t: toxicidad; Ac.PC: Acido picrotóxico; 9-AAC: 9-Aminoacridina; 2-AA: 2-Aminoantraceno. Los resultados son el valor promedio ± la desviación estándar de tres cajas de Petri por concentración.

**TABLA 7. EFECTO DE LA T-514 SOBRE LAS CEPAS TA98 Y TA100 DE *Salmonella typhimurium***

Concentración $\mu\text{M}$	N° de revertantes/caja - S9		N° de revertantes/caja + S9	
<b>TA 98</b>				
0	16	$\pm$ 1.52	-	-
46	20	$\pm$ 0.57	-	-
92	18	$\pm$ 0.7	-	-
Ac. PC 180	57	$\pm$ 16.3	-	-
0	35	$\pm$ 2.6	31	$\pm$ 2.82
92	35.5	$\pm$ 3.5	30.5	$\pm$ 0.7
232	38	$\pm$ 0.5	32.5	$\pm$ 0.7
464	23.5	$\pm$ 4.2	26	-
Ac. PC 180	68	$\pm$ 11.9	-	-
2-AA 24	-	-	401	$\pm$ 81.75
<b>TA 100</b>				
0	144	$\pm$ 7	170	$\pm$ 45
46	170	$\pm$ 8.1	193	$\pm$ 18.7
92	165	$\pm$ 10	182	$\pm$ 11
185	129	$\pm$ 10	160	$\pm$ 5.6
Ac. PC 180	340	$\pm$ 31	-	-
2-AA 24	-	-	395	$\pm$ 22

Ac. PC: Acido pterolónico; 2-AA: 2-Aminoantraceno. Los resultados son el valor promedio  $\pm$  la desviación estándar de tres cajas de Petri por concentración.

## CAPITULO 7

### DISCUSION

#### 7.1 Cultivo de Linfocitos

##### 7.1.1. Aberraciones cromosómicas

La toxina T-514 extraída de *Karwinskia humboldtiana* no produjo aberraciones cromosómicas en cultivos de linfocitos de sangre periférica de donadores sanos. Los resultados indicaron que a las diferentes concentraciones empleadas y al tiempo de exposición de 24 h, no aumentó la incidencia de estos eventos en los linfocitos estimulados con fitohemaglutinina. La MM-C es un agente alquilante bifuncional que produjo aberraciones cromosómicas e inhibición mitótica en todas las células en las que se ha estudiado; mientras que estos fenómenos ocurren cuando el compuesto se adiciona en cualquier tiempo durante el ciclo celular, la síntesis y la mitosis son más afectadas cuando se administra durante la fase G<sub>1</sub> tardía o la fase S temprana (Crooke y Bradner, 1976).

Existen escasos estudios sobre aberraciones cromosómicas estructurales inducidas por compuestos antracénicos o antraquinónicos en sistemas de mamíferos; uno de ellos reportó que la hidroxiantraquinona luteosktrina, molécula dimérica polihidroxlada y metilada, indujo aberraciones cromosómicas estructurales e

hiperploidías en células tumorales de ascitis de Ehrlich. Sin embargo, este daño se indujo en células resistentes que ya habían sobrevivido al tratamiento tóxico, el cual se prolongó por meses en presencia del compuesto y aparentemente la selección con él indujo un proceso mayor de transformación: si el daño se produjo por el tratamiento o por la inestabilidad genómica de las células o por las dos causas, fue una cuestión que no evaluaron adecuadamente los autores ya que no se realizaron controles de células resistentes mantenidas sin la luteoskрина (Schachtschabel y cols., 1969).

### **7.1.2. Intercambios de Cromátidas Hermanas**

La inducción de ICH es uno de los parámetros ampliamente aceptados para probar el potencial genotóxico de compuestos químicos (WHO, 1985). Los resultados no mostraron diferencias en la frecuencia de ICH para cada concentración, en ausencia o en presencia de activación metabólica; estos resultados coinciden con lo que reportan Bruggeman y Van der Hoeven (1984) en relación con la antraquinona monomérica emodina. Este compuesto en cultivo de células de cobayo chino V79 no indujo incrementos de ICH. Sin embargo, el compuesto 1,4-hidroxiantraquinona mostró ser un inductor débil de ICH en el mismo sistema utilizado (Westendorf y cols., 1990). De manera similar, las hidroxiantraquinonas y carboxiantraquinonas estudiadas por Mian y cols. (1991), incluyendo a la 1,4-hidroxiantraquinona, mostraron una débil inducción de ICH sobre la línea celular V79/AP4, la cual carece de la actividad monooxigenasa dependiente del citocromo P-450.

La inducción de ICH es un evento genotóxico, pero no necesariamente mutagénico, que ha sido utilizado ampliamente como un indicador de actividad genotóxica de compuestos químicos. En general, los compuestos que inducen mutaciones cromosómicas y/o génicas

también producen una elevación en la frecuencia de ICH (Perry y Evans, 1975; Latt y cols., 1980; Lambert y cols., 1982) por lo que los datos obtenidos permiten sugerir que la T-514 no es mutagénica a las concentraciones probadas. No se han reportado estudios de mutaciones génicas en linfocitos o líneas celulares por compuestos antraquinónicos o antracenónicos.

### 7.1.3. Cinética de Proliferación Celular e Índice Mitótico

Existen varios estudios en los que medicamentos antineoplásicos han sido evaluados por su capacidad de interferir con la Cinética de Proliferación Celular (CPC) *in vitro*. En general, antineoplásicos que afectan la estructura del DNA también son capaces de inhibir la progresión del ciclo celular. El cis-platino (complejo de coordinación) y el Melfalan (mostaza nitrogenada) retrasaron la CPC pero no los antimetabolitos 5-Fluorouracilo, Metotrexate y 6-Mercaptopurina en cultivos de linfocitos de sangre periférica estimulados con mitógeno (Rojas y cols., 1993).

La T-514 modificó la respuesta de proliferación en los linfocitos humanos en ausencia de activación metabólica. Se observó un retraso en la CPC, es decir, aumentó la proporción de células que sólo efectuaron un ciclo celular en 72 hrs de cultivo, resultados similares a los de la MM-C cuya acción fue similar en concentraciones menores. La MM-C es un potente agente alquilante que interfiere con la síntesis de DNA, y se ha demostrado que retrasa la CPC de los linfocitos (Ostrosky y cols, 1988)

La CPC se modificó ligeramente, en los linfocitos expuestos a la toxina por dos horas en presencia y ausencia de la mezcla S9; este efecto no fué tan evidente como con el tratamiento por 24 horas sin la mezcla S9. La Ciclofosfamida (CP), mutágeno indirecto el cual requiere

activación metabólica para convertirse en mutágeno, no modificó la CPC en la concentración usada en este estudio. Sin embargo, Madle (1981) reportó una inhibición de la CPC relacionada con la concentración en cultivos de linfocitos .

No se puede afirmar que el sistema microsomal hepático afectó la toxicidad de la T-514, lo cual pudiera explicarse por una posible unión inespecífica entre aquella y las proteínas presentes en la fracción S9, interacción que se demostró entre la toxina y la albúmina sérica humana y bovina *in vitro* (Caballero,1995). Sin embargo, se ha reportado que algunas antraquinonas, mismas que dieron resultados positivos en la prueba de mutagenicidad en *Salmonella*, no mostraron ser mutagénicas tanto en presencia o en ausencia de activación metabólica (Westendorf y cols.,1990). El sistema de monooxigenasa dependiente del citocromo P-450, presente en varios tejidos hepáticos o extrahepáticos, parece jugar un papel fundamental en la bioactivación de antraquinonas a través de la oxidación de la parte benzénica o fenólica. La emodina se reportó que era activada por el sistema P-450 reconstituido (Tanaka y cols., 1987). No obstante, podría también ser importante la vía de bioactivación reductiva. Se conoce que los compuestos quinónicos como la menadiona (Chesis y cols., 1984) o las antraciclina (Gervasi y cols., 1986) son activados por flavoproteínas a través de la vía reductiva que involucra la porción quinona, la cual forma un radical semiquinona y, en la presencia de oxígeno, forma anión superóxido y otras especies reactivas (Kappus H., 1986).

Mian y cols. (1987) reportaron que la 1,4 hidroxiantraquinona mostró efectos citotóxicos en células V79 en ausencia de activación metabólica. toxicidad que también se presentó con otras antraquinonas probadas en presencia de fracción microsomal; los autores explican estos hallazgos como una consecuencia del «estrés oxidativo» inducido por la 1,4 hidroxiantraquinona a través de la depleción del glutatión y la formación del peróxido de hidrógeno.

Hipótesis que coincide con lo reportado por Garza Ocañas y cols (1997) quienes encontraron que la T-514 producía radicales libres en cultivo de hepatocitos primarios, los cuales fueron detectados por fluoresceína desde la primera hora de exposición; ellos proponen que el « estrés celular oxidativo » es uno de los mecanismos mediante el cual la toxina produce su toxicidad. Por otro lado, la toxina a la concentración de 9.7 mM, mostró tener un efecto inhibitorio sobre la lípido peroxidación microsomal hepática *in vitro*, lo cual indicaba que ese no era el mecanismo de acción hepatotóxica (Garza-ocañas y cols., 1990). Sin embargo, la T-514 sufre autooxidación con la subsecuente generación de radicales libres dosis dependiente a partir de la hora de exposición *in vitro* (Zanatta y cols., 1992).

Los compuestos químicos, como las quinonas, pueden activarse a radicales intermedios por mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. Por virtud de su estructura química, algunos compuestos pueden autooxidarse a un intermediario radicalario, como un radical semiquinona. Coincidente con este proceso de autooxidación está la generación de metabolitos reactivos de oxígeno (Trush y cols., 1982); como es el caso del agente antineoplásico Adriamicina, del cual está demostrado que su actividad antitumoral se debe a la formación de radicales de oxígeno durante el ciclo redox de las células tumorales, y estos radicales dañan al DNA, proceso que ocurre cerca del DNA celular (Kappus, 1986). Sin embargo, se ha sugerido la existencia de lesiones primarias al DNA como el daño a una base y el daño provocado por radicales libres pero que no necesariamente involucran rompimientos del DNA (Bryant and Slijepcevic, 1993). Esto explicaría el por qué no se encontraron rompimientos cromosómicos.

El IM de los cultivos de linfocitos es un indicador de la capacidad proliferativa de las células. Fue en este caso el parámetro más sensible para evaluar el daño celular de la T-514 en tratamientos cortos. Los resultados sobre la inhibición de la proliferación por la T-514 coinciden

con los de Garza-Ocañas y cols.(1992) quienes probaron la T-514 en cultivos primarios de hepatocitos de rata para evaluar la capacidad de afectar la integridad de la membrana, la función lisosomal y la actividad metabólica mitocondrial; estos autores encontraron que a las 2 hrs de cultivo a las concentraciones de 6-50  $\mu\text{M}$  (3-25  $\mu\text{g/ml}$ ) no se observó daño en la membrana celular; sin embargo, este se presentó en todas las concentraciones probadas a las 6 y 24 hrs de tratamiento. Además, en los hepatocitos se inhibió la función mitocondrial y la función lisosomal en todas las concentraciones probadas después de 4 h de exposición a la toxina.

En el presente estudio se pudo detectar una inhibición casi completa del IM, con sólo 2 hrs de tratamiento con y sin activación metabólica, el S9 no produjo ninguna diferencia. El efecto citotóxico producido por la T-514 se presenta por la autoxidación y producir radicales libres tempranamente y de este modo impedir que los linfocitos estimulados sigan proliferando.

El DNA se daña permanentemente por agentes genotóxicos ambientales y por productos endógenos de reacciones celulares. Los rompimientos del DNA activan a la poli(ADP-ribosa)polimerasa, la activación de esta enzima causa disminución del NAD (dinucleótido nicotin amida), una enzima que cataliza las modificaciones covalentes de las proteínas con la poli(ADP-ribosa). Entre las proteínas aceptoras están las histonas y posiblemente otras proteínas de la cromatina. Los polímeros modifican a las proteínas al inhibir su actividad y así evitan un daño mayor antes de que se liberen las endonucleasas.

La ribosilación del ADP está involucrada en la disminución de la actividad enzimática total lo cual pudiera causar una detención temporal de la replicación semi-conservativa mientras que el DNA se repara, y se ha sugerido que este evento de control sucede en la fase  $G_2$  del ciclo

celular (Caria y cols., 1997). Además, se ha demostrado la capacidad de reparación de las lesiones inducidas por compuestos químicos durante el primer ciclo celular en linfocitos humanos de sangre periférica (Ponzanelli y cols., 1995). Por otra parte, Furukawa y cols. (1990) mencionan que la inducción del gen *cdc 2*, que produce una proteína cinasa (p34), controla el paso de  $G_1$  a S en linfocitos T humanos.

El retraso del ciclo celular producido por la T-514 pudiera explicarse de dos maneras: si hubiese daño al DNA no visible con los parámetros evaluados en este estudio, este se repararía y modificaría la velocidad el ciclo celular o, se puede deber a que la T-514 interactúa directa o indirectamente con las proteínas reguladoras del ciclo celular.

#### **7.1.4. Citometría de flujo**

El análisis citométrico de flujo demostró que la concentración de 5 mM de T-514 por 24 hr, no incrementó las proporciones de  $G_1$ , S o  $G_2/M$ . Concentración a la cual no se incrementó la frecuencia de aberraciones cromosómicas ni la de ICH, aunque se presentó inhibición de la proliferación medida por la disminución en el IR. Morris y cols (1989) mencionan que la citometría de flujo mide fácilmente las alteraciones en la cinética de proliferación de poblaciones celulares después de la exposición a un tóxico. Agregan que la sensibilidad del análisis es suficiente y las diferencias estadísticas en el efecto pueden ser detectadas a concentraciones a las cuales la inducción de otras respuestas biológicas puede medirse.

Los datos no permitieron observar diferencias en las proporciones de células en cada fase y poder corroborar de esta manera la inhibición de la proliferación celular; esto posiblemente se debe a que la evaluación de los parámetros de proliferación, se realizó en cultivos de sangre

completa, con eritrocitos presentes, y se conoce que el metabolismo de los eritrocitos tienen influencia sobre los resultados (Norppa y cols, 1983) y el análisis citométrico se llevó a cabo en cultivos de linfocitos purificados. Mehnert y cols (1984) encontraron inducción de ICH por el selenito de sodio y el peróxido de hidrógeno en cultivos de sangre completa, mientras que este efecto no se observó en cultivos de linfocitos purificados.

## 7.2. *Salmonella typhimurium*

La T-514 mostró resultados negativos en la prueba de mutagenicidad en la cepa TA1537, de *Salmonella typhimurium*. Krivobok y cols. (1992) no encontraron un efecto mutagénico con antraquinonas dimericas en las cepas TA98 y TA100 y encontraron efecto en antraquinonas monoméricas como fisición, dantrón y emodina en la cepa TA1537 con activación metabólica. Se han reportado evidencias de la mutagenicidad de los derivados antracénicos, aunque las diferencias estructurales parecen ser cruciales para la actividad de cada molécula.

Tikkanen y cols (1983) sugirieron, con base en sus resultados en *Salmonella*, que las hidroxiantraquinonas con uno a tres grupos hidroxilos eran mutagénicas, mientras que compuestos con más de tres grupos hidroxilos carecían de esta actividad. Asimismo, Lieberman y cols. (1982) demostraron que la substitución de grupos hidroxilos o metilos en la posición 1 o en la posición 8, juegan un papel en la mutagenicidad de estos compuestos. La T-514 es una antracena dimerica hidroxilada (seis grupos hidroxilo) metilada a la cual no se le detectó actividad mutagénica, características y resultados que concuerdan con lo propuesto por los autores antes mencionados.

Se ha demostrado que la T-514 es tóxica en humanos, animales y células. Esto se ha detectado en diferentes sistemas celulares (levaduras, cultivo de líneas celulares, cultivo primario de hepatocitos, linfocitos humanos) a concentraciones mayores de 50 µg/ml (100 µM). Estudios citados anteriormente proponen al peroxisoma como el organelo blanco de la toxina en levaduras a la concentración de 0.5 µg/ml (1 µM). Los efectos de la T-514 sobre la proliferación celular en los linfocitos humanos (2.5-5 µM) pudieran indicar además otro mecanismo de acción al propuesto, en el cual participen elementos o eventos que intervienen en los mecanismos de división celular, como estructuras mitóticas, proteínas reguladoras del ciclo celular o apoptosis.

Estos resultados señalan que la T-514 no tiene actividad genotóxica que afecte la estructura de los cromosomas o cause mutación a nivel génico directa o indirectamente. Aún faltaría analizar estos efectos *in vivo*. La información obtenida de este trabajo ayuda a integrar los posibles mecanismos de acción de la toxina y subraya la importancia de analizar los parámetros de genotoxicidad y citotoxicidad de un compuesto novel para una completa información toxicológica.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## CAPITULO 8

### CONCLUSIONES, RECOMENDACIONES Y CONTRIBUCIONES

#### CONCLUSIONES

Se rechaza la hipótesis de trabajo. La T-514 no muestra actividad clastogénica al evaluar las Aberraciones Cromosómicas Estructurales y no produce daño específico en el DNA (síntesis) al analizar los Intercambios de Cromátidas Hermanas.

Se ve afectada la proliferación celular, medida como la Inhibición del Índice de Replicación y la Inhibición del Índice Mitótico en linfocitos expuestos a la toxina T-514 en presencia y ausencia de activación metabólica.

#### DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Se demostró la utilidad de estos parámetros de citotoxicidad para detectar los efectos tempranos en linfocitos estimulados en cultivo.

La T-514 no presentó actividad mutagénica, pero si mostró toxicidad en la cepa TA1537 del sistema de Ames en *Salmonella typhimurium*.

## RECOMENDACIONES

Los datos obtenidos en el presente trabajo determinaron la toxicidad aguda *in vitro* de la T-514 en cultivos de linfocitos estimulados con PHA, investigación que podría continuarse con diseños *in vivo* y de exposición crónica.

Investigar a nivel molecular y bioquímico si la T-514 puede alterar la regulación génica en linfocitos humanos.

Analizar los parámetros de genotoxicidad y citotoxicidad de otros compuestos antraquinónicos y antracénicos en linfocitos humanos *in vitro*.

## CONTRIBUCIONES

Parte de este trabajo se publicó en:

Anti-Cancer Drugs 1996, 7: pp. 710-715.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS  
"GENOTOXIC EFFECTS OF *Karwinskia humboldtiana* TOXIN T-514 IN PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES"

Ma. del Roble Velazco, Regina Montero, Emilio Rojas, Ma. Eugenia Gonsebatt, Montserrat Sordo, Alfredo Piñeyro and Patricia Ostrosky-Wegman.

## REFERENCIAS

Ames B., McCann J. and E. Yamasaki (1975) Methods for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/mammalian-microsome mutagenicity test. *Mutation Res.* 31:347-364.

Akuzawa S., Yamaguchi H., Masuda T. and Y. Ueno (1992) Radical-mediated modification of deoxyguanine and deoxyribose by luteoskyrin and related anthraquinones. *Mutation Res.* 266: 63-69.

Arlin Z., Case D.C., Moore J., Wiernik P.H., Feldman E., Saletan S., Desai P., Sia L and K. Cartwright. (1990) Randomized multicenter trial of cytosine arabinoside with mitoxantrone or daunorubicin in previously untreated adult patients with acute nonlymphocytic leukemia (ANLL) *Leukemia* 4: 177-183.

Bhakuni D.S., Bittner M. and M. Silva (1974) Anticancer agents from chilean plants, *Cassia obtusa*. *Rev. Latinoam. de Química* 4 (1)

Bermudez M.V., Gonzalez-Spencer D., Guerrero M., Waksman N. and A. Piñeyro. (1986) Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) *Toxicology*, 24, 1091-1097.

Bermúdez M.V., Martínez F.J., Salazar M.E., Waksman N. and A. Piñeyro. (1992) Experimental acute intoxication with ripe fruit of *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora) in rat, guinea-pig, hamster and dog. *Toxicol.* 30(11), 1493-1496.

Bösch R., Friederich U., Lutz W.K., Brocker E., Bachman M. and C. Schlatter. (1987) Investigations on DNA binding in rat liver and in *Salmonella* and on mutagenicity in the Ames test by emodin, a natural anthraquinone. *Mutation Res.*, 188, 161-168.

Brown J.P. (1980) A review of the genetics effects of naturally occurring flavonoids, anthraquinones and related compounds. *Mutation Res.* 75: 243-277.

Brown J.P. and R.J. Brown (1976) Mutagenesis by 9,10-Anthraquinone derivatives and related compounds in *Salmonella typhimurium*. *Mutation Res.* 40: 203-224.

Brown J.P. and P.S. Dietrich. (1979) Mutagenicity of anthraquinone and benzanthrone derivatives in the *Salmonella*/microsome test: activation of anthraquinones glycoside by enzymic extracts of rat cecal bacteria. *Mutation Res.*, 66, 9-24.

Bruggeman I.M. and J.C.M. van der Hoeven. (1984) Lack of activity of the bacterial mutagen emodin in HGPRT and SCE assay with V79 Chinese hamster cells. *Mutation Res.*, 137, 219-224.

Brusick D. (1987). Principles of Genetic Toxicology, 2nd ed. Plenum Press N.Y. p.p.53-76.

Bryant P. and P. Slijepcevic. (1993) G2 Chromatid aberrations: kinetics and possible mechanisms. *Environ. Mutagen.*, 22: 250-256.

Caballero A. (1995) Estudio *in vitro* de las interacciones de la peroxisomicina A1 con la albúmina sérica bovina y con la albúmina sérica humana. Tesis de Maestría, especialidad Química Analítica Biomédica. U.A.N.L.

Caria H., Quintas A., Chaveca T. and J. Rueff. (1997) The role of poly(ADP-ribose)polimerase in the induction of sister chromatid exchange and micronuclei by mitomycin C in Down's syndrome cells as compared to euploid cells. *Mutation Res.* 377: 269-277.

Carrano, A.V., Thompson L.H., Linde P.A. and J.L. Minkle (1978) Sister Chromatid Exchanges as indicator of mutagens. *Nature*, 271, 551-553..

Cattanach B.M.(1966) Chemically induced mutations in mice. *Mutation Res.* 114:117-177

Chesis P.L., Leu P.E., smith M.T., Ernster L. and B.N. Ames (1984) Mutagenicity of quinones pathways of metabolic activation and detoxification. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81: 1696-1700.

Cohen M.N. and Shaw M.W. (1964) Effects of mitomycin C on human chromosomes. *J. Cell. Biol.* 23: 386-395.

Crooke S.T. and W. Brander (1978) Mitomycin C : a review. *Cancer Treat. Rev.*, 3: 121-139.

Darnell J., Lodish H. and D. Baltimore. (1990) Molecular Cell Biology. 2nd ed. Scientific American Books. distributed by W.H. Freeman and Co., N.Y. pp 980-982.

Dean P.N., Gray J.W. and F.A. Dolbeare (1982) The analysis and interpretation of DNA distributions measured by Flow Cytometry. *Cytometry* 3(3) 188-195.

Dean B.J. and N. Danford. (1984) "Assays for detection of chemically-induced chromosome damage in cultured mammalian cells" in Mutagenicity testing a practical approach. Edited by S Venitt and JM Parry, IRL Press, Washington, p.p. 193-195.

Dewan M.L., Henson V.B., Dollahite J.W. and C.H. Bridges (1965) Toxic myodegeneration in goats produced by feeding mature fruits from the Coyotillo plant (*Karwinskia humboldtiana*) *Am. J. Pathol.*, 46, 215-226.

Dreyer D., Arai I., Bachman C., Anderson W., Smith R. and D. Daves (1975) Toxins causing noninflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation, *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 4986-4990.

Escobar A. y D. Nieto (1965) Aspectos neuropatológicos de la intoxicación con *Karwinskia humboldtiana*. Estudio experimental, *Gac. Med. Mex.* 95, 163-177.

Feldman E.J., Alberts D.S., Arlin Z., Ahmed T., Mittelman A., Baskind P., Peng Y.M., Baier M., and P. Plezia. (1993) Phase I clinical and pharmacokinetic evaluation of high-dose mitoxantrone in combination with cytarabine in patients with acute leukemia. *J. Clin. Oncol.* 11: 2002-2009.

Furukawa Y., Piwnica-Worms H., Ernst T.J., Kanakura Y and J.D. Griffin. (1990) *cdc 2* gene expression at the G<sub>1</sub> to S transition in human T lymphocytes. *Science*, 250: 805-808.

Garza-Ocañas L, Torres-Alanis O. and A. Piñeyro López (1990) Effect of toxin 514 of *Karwinskia humboldtiana* on liver microsomal lipid peroxidation stimulated by Fe<sup>2+</sup>-ADP complexes and NADPH *in vitro*. European Journal of Pharmacology. Brief communications XIth International Congress of Pharmacology, Amsterdam, The Netherlands. 183(4) 1550.

Garza-Ocañas L., Hsieh G.C., Acosta D., Torres-Alanis O. and A. Piñeyro López (1992) Toxicity assessment of toxins T-514 and T-544 of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*) in primary skin and liver cell cultures. *Toxicology*, 73, 191-201.

Garza-Ocañas L., Torres-Alanis O. y A. Piñeyro López. (1997) Evaluación de la posible producción de "stress celular oxidativo" por la T-514 del genero *Karwinskia* en cultivo primario de hepatocitos. XV Congreso Nacional de Investigación Biomédica, Facultad de Medicina, U.A.N.L., Monterrey, N.L., p.p. 205

Gebhart E.J (1981) Sister Chromatid exchange and structural chromosome aberration in mutagenicity testing. *Human Genetics* 58: 235-254.

Gervasi P.G., Agrillo M.R., Litt L., Danesi R. and M. del Tacca (1986) Superoxide anion production by Adriamicinol from cardiac sarcomes and by mitochondrial NADH dehydrogenase. *AntiCancer Res.*, 6:1231-1236.

Goodman & Gilman (1996) Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 9a. Edición. McGraw-Hill Interamericana, México.p.p. 1336-1340.

Gosden C.M, Davidson C. and M. Robertson. (1992) "Lymphocyte Culture" in Human Cytogenetics A practical Approach. Vol. 1. 2nd ed. Edited by D.E. Rooney and B.H. Czepulkowski. 2nd. ed. Irl Press, N.Y. 31-36

Gonsebatt M.E. and Mutchinick O. (1990) Human lymphocyte proliferation kinetics in Hank's BSS supplemented with autologous plasma and synthetic medium. *Mutation Res.*, 243, 255-258.

Guerrero M., Piñeyro A. and N. Waksman (1987) Extraction and quantification of toxins from *Karwinskia humboldtiana* (Tullidora). *Toxicon*, 25, 565-568.

Guerrero-Olazarán M. y J.M. Viader-Salvadó. (1996) Natural anthracenone subcellular distribution and effects on NADPH-cytochrome P450 reductase microsomal activity. *Drug and Chemical Toxicology*, 19(4), 301-312.

Hata T., Sano Y., Sugarawa R., Matsumae A., Kanamori K., Shima T. and T. Hoshi. (1956) Mitomycin, a new antibiotic from *Streptomyces*. *J. Antibiot (Tokyo)* Ser A-9. 141-146 in Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology. J.N. Davidson y W.E. Cohn editors. Academic Press, N.Y. 1965, pp 1-50.

Hartman A. and G.Speit (1994) Comparative investigations of the genotoxic effects of metals in the Single Cell Gel (SCG) assay and the sister chromatid exchange (SCE) test. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 23: 299-305.

Holden H., Barrett J.F., Huntington C.M., Muehlbauer P.A. and M.G. Wahrenburg. (1989) Genetic profile of a Nalidixic Acid analog: a model for the mechanism of Sister Chromatid Exchange Induction. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 13: 238-252.

Holmes A. (1997) Ringing the changes (anticancer drugs). *Nature*. 390 (11) 560-561.

Howard A. and S.R. Pelc (1953) Synthesis of desoxyribonucleic acid in normal and irradiated cells and its relation to chromosome breakage. *Heredity*, London (suppl) 6: 261-273

Johnson I.S., Armstrong J.G, Gorman M. y J.P. Burnett (1963) The *Vinca* alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res.*, 23:1390.

Kappus H. (1986) Overview of enzyme systems involved in bio-reduction of drugs and in redox cycling. *Biochemical Pharmacology*, 35 (1) 1-6.

Kersten H. (1975) Antineoplastic and immunosuppressive agents. Part II. A.C. Sortelli y D.G. Johns Editors. Springer-Verlag. pp 47-64.

Kodama M., Kamioka Y., Nakayama T., Nagata C., Morooka N., and Y. Ueno (1987) Generation of free radical and hydrogen peroxide from 2-hydroxyemodin, a direct mutagen, and DNA strand breaks by active oxygen. *Toxicology Letters*, 37: 149-156.

Krivobok S.F., Seigle-Murandi F., Steiman R., Marzin D.R. and V. Betina (1992) Mutagenicity of substituted anthraquinones in the Ames/Salmonella microsome system. *Mutation Res.*, 279: 1-8.

Lambert B., Lindbald A., Holmberg L. and D. Francesconi (1982) The use of Sister-chromatid exchange to monitor human populations for exposure to toxicologically harmful agents. En: Sister-chromatid exchanges, edited by Wolff S. John Wiley and Sons, N.Y. 149-182.

Latt S.A. (1981) Sister-chromatid exchange formation. *Ann. Rev. Genet.* 15: 11-55.

Latt S.A., Allen J., Bloom S.E., Carrano A., Falke E., Kram D., Schneider E., Schreck R., Tice R., Whitfield B. S. Wolff. (1981) Sister-chromatid exchanges: a report of the Gene-Tox program. *Mutation Res.* 87: 17-62.

Liberman D.F., Fink R.C., Shaefer F.L., Mulcahy R.J. and A.A. Stark (1982) Mutagenicity of anthraquinone and hydroxylated anthraquinones in the Ames /Salmonella microsome system. *Appl. Environ. Microbiol.*, 43: 1354-1359.

Madle S. (1981) Evaluation of experimental parameters in an S9/human leukocyte SCE test with cyclophosphamide. *Mutation Research.* 85: 347-356.

Maron D.M. and B. Ames (1983) Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. *Mutation Res.*, 113: 173-215.

Martínez F.J., Ramírez R., Waksman de Torres N. and A. Piñeyro López. (1997) Experimental evidence for toxic damage induced by a dimeric anthracenone: diast T-514 (peroxisomicine A<sub>2</sub>) *Toxicology Letters* 90: 155-162.

Masuda T. and Y. Ueno (1984) Microsomal transformation of emodin into a direct mutagen. *Mutation Res.*, 125: 135-144.

Masuda T., Hataikawa K., Morooka N. Nakano S. and Y. Ueno. (1985) 2-Hidroxiemodin, an active metabolite of emodin in the hepatic microsomes of rats. *Mutation Res.*, 149: 327-332.

McCarthy M.A., Michalski J.P., Sears E.S. and C.C. McCombs (1990) Inhibition of polyamine synthesis suppresses human lymphocyte proliferation without decreasing cytokine production or interleukine 2 receptor expression. *Immunopharmacol.*, 20:11-20.

Menhert K, During R., Vogel W. and G. Speit. (1984) Differences in the induction of SCEs between human whole blood cultures and purified lymphocyte cultures and the effect of an S9 mix. *Mutation Res.*, 130: 403-410.

Mian M., Fratta D., Rainaldi G., Simi S., Mariani T., Benetti D. and P.G. Gervasi (1991) Superoxide anion production and toxicity in V79 cells of six hidroxy-anthraquinones. *Anticancer Research*, 11: 1071-1076.

Montero R., M.E. Gonsebatt, R. Gerson, L.A. Herrera and P. Ostrosky-Wegman (1993) As-101: a modulator of in vivo T-cell proliferation. *Anticancer Drugs*, 4: 351-354.

Moorhead P., Nowell P., Mellman W., Battips D. y Hungerford D. (1960) Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp. Cell. Res.*, 20 :613-616.

Moreno Sepúlveda M., Vargas Zapata R., Esquivel Escobedo D., Waksman de T. N. and A. Piñeyro López. (1995) Effect of peroxisomicine and related anthracenones on catalase activity. *Planta Médica*, 61 (4) 297-392.

Moreno Sepúlveda M., Vargas Zapata R., Ballesteros Elizondo R., PiñeyroLópez A. and J. Sepúlveda Saavedra. (1997) Studies on the effect of peroxisomicine on catalase activity in albino mice. *Toxicol*, 35 (5) 777-783.

Morimoto K. and S. Wolf (1980) Increase of sister chromatid exchanges and perturbations of cell division kinetics in human lymphocytes by benzene metabolites. *Cancer Research*, 40: 1189-1193.

Morita H., Umeda M., Masuda T. and Y. Ueno. (1988) Cytotoxic and mutagenic effects of emodin on cultured mouse carcinoma FM3A cells. *Mutation Res.*, 204: 329-332.

Morris S.M., McGarrity L., Domon O.E., Hinson W. and R. Kodell (1989) Flow Cytometric analysis of bromodeoxyuridine-induced inhibition of cell proliferation in the human teratocarcinoma-derived cell line P3. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 14:107-114.

Murakami M.S., Strobel M.C. Vande Woude G.F. (1995) "Cell cycle regulation, oncogenes and antineoplastic drugs" in The Molecular Basis of Cancer. J. Mendelshon, P. Howley, M. Israel and L. Liotta. W.B. Saunders Co., Philadelphia. p.p.3-5.

Mutchnik O., L.Ruz and L.Casa (1980) Time of first generation metaphases. I. The effect of various cultures media and fetal calf serum in human lymphocyte cultures. *Mutation Res.*, 72: 124-134.

Noble R.L. Beer C.T. y J.H. Cutts (1958) Further biological activities of vincalukoblastine- an alkaloid isolated from *Vinca rosea*. *Biochem Pharmacol.* 1:347

Norppa H., Vainio H., and M. Sorsa (1983) Metabolic activation of styrene by erythrocytes detected as increased sister chromatid exchanges in cultured human lymphocytes. *Cancer Res.*, 43: 3579-3582.

Nowell P.C. (1964) Mitotic inhibition and chromosome damage by mitomycin in human leukocyte cultures. *Exp. Cell. Res.* 33: 445-449.

Obe G., Beek B., y G. Dudin (1975) The human leukocyte test system, *Humangenetik* , 28: 205-302.

Ortiz R. osu M. Betancourt (1990) Lenght of cell cycle *in vitro* and sister chromatid exchange frequency in bone marrow cells from severely malnourished rats. *Mutation Res.*, 232: 71-76.

Ostrosky-Wegman P., Montero R. and R. Hernández (1988) Lymphocyte Proliferation Kinetics as a cytostatic screening system, *Env. Mol. Mutagen*, 11, Suppl., 11, 80.

Ostrosky-Wegman P., Gonsebatt M.E., Montero R., Vega L., Barba H., Espinosa J., Palao A., Cortinas C., Garcia-Vargas G., del Razo L.M., y M. Cebrián (1991) Lymphocyte proliferation kinetics and genotoxic findings in a pilot study on individuals chronically exposed to arsenic in Mexico. *Mutation Res.*, 250: 477-482.

Painter R.B. (1980) A replication model for sister-chromatid exchange. *Mutation Res.*, 70: 337-341.

Parshad R., Gantt R., Sanford K., Jones G. and R. Tarone (1982) Repair of chromosome damage induced by X-irradiation during G2 phase in a line of normal human fibroblasts and H5 malignant derivative. *Journal of National Cancer Institute*, 69(2): 409-414.

Perry P., H. Evans (1975) Cytological detection of mutagen -carcinogen exposure by sister chromatid exchange. *Nature* 258: 121-125.

Perry P., y Wolff S. (1974) New Giemsa method for differential staining of sister chromatid., *Nature*. 261:156-158.

Piñeyro-López A., Martínez de Villarreal L. and R. Gonzalez (1994) *In vitro* selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines, *Toxicology*, 92: 217-227.

Poginsky B., Westendorf J., Blömeke B., Marquardt H., Hewer A., Grover P. and D. Phillips (1991) Evaluation of DNA-binding activity of hidroxyanthraquinones occurring in *Rubia tinctorum*. *Carcinogenesis*, 12(7): 265-271.

Ponzanelli I., Landi S., and R. Barale (1995) Use of three-way differential staining and liquid holding for the assesment of individual repair capacity. *Mutation Res.* 346: 93-97.

Preston R.J., Bender M.A., Brewen J.G., Carrano A.V., Headle J.A., McFee A.F., Wolff S. and J.S. Wassom (1981) Mammalian *in vivo* and *in vitro* cytogenetic assay. *Mutation Res.*, 87: 143-188.

Preston R.J. and P.C. Gooch (1981) The induction of chromosome-type aberration in G by methyl methanesulfonate and 4-nitroquinoline-N-oxide and the non-requirement of an S-phase for their production. *Mutation Research*, 83, 395-402.

Richardson C., Williams D.A., Amphlett G., Phillips B., Allen J.A., Canter D.O. (1989) "Analysis of data from *in vitro* cytogenetic assays" in Statistical evaluation of mutagenicity test data, UKEMS sub-committee on guidelines for mutagenicity testing. report. Part III. Editor D. J. Kirkland. Cambridge University Press, N.Y. p.p.141-166.

Rivas V., Torres R., Waksman N. (1990) Dimeric anthracenones from *Karwinskia* species. *Planta Medica* . 56: 562-563.

Rodi S., Fuchs G., Khoshsorur G., Iberer F., and K.H. Tscheliessnigg (1990) Lipoprotein-induced modulation of cyclosporine-a-mediated immunosuppression. *Eur. J. Clin. Invest.*, 20: 248-252.

Roitt I.M., Brostoff J. D. y K. Male. (1991) *Inmunología*. 2a. edición. Salvat editores, S.A., México., p.p. 2.9-2.10.

Rojas, E., Montero R., Herrera L.A., Sordo M., Gonsebatt M.E., Rodríguez R. and P. Ostrosky-Wegman (1992) Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing. *Mutation Research*, 282: 283-286.

Rojas, E., Herrera L.A., Sordo M., Gonsebatt M.E., Montero R., Rodríguez R. and P. Ostrosky-Wegman (1993) Mitotic index and cell proliferation kinetics for identification of antineoplastic activity. *Mutation Res.* 282: 283-28.

Rubin E. y J.L. Farber. (1990) *Patología*. Editorial Médica Panamericana, México. pp 148-152.

Salamanca F. (1990) *Citogenética Humana*. 1a. Edición. Editorial Médica Panamericana, México. p.p. 58-59.

Schachtschabel D.O., Zilliken F., Saito N.M. and G.E. Foley (1969) Inhibition of DNA synthesis and chromosome aberrations in cultured Erlich ascites tumor cell following treatment with luteoskyrin. *Expex. Cell Res.* 57: 19-28.

Schiff P.H. and S.B. Horwitz (1979) Promotion of microtubule assembly *in vitro* by taxol. *Nature* (Lond). 277: 665-667.

Sendelbach L.E. (1989) A review of the toxicity and carcinogenicity of Anthraquinones derivatives. *Toxicology*, 57: 227-240.

Sepulveda-Saavedra J., van der Klei I., Keizer I., Piñeyro-López A., Harder W. and M. Veenhuis (1992). Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *FEMS Microbiol. Let.* 91: 207-212.

Sherr C.J. (1993) Mammalian G<sub>1</sub> Cyclins. *Cell*, 73:1059-1065.

Smith C. y A. Reynard (1993) *Farmacología*. Ed. Médica Panamericana, México.p.p.897.

Sobell H.M. (1973) The stereochemistry of actinomycin binding to DNA and its implications in molecular biology. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 13:153-190.

Swanbeck G. (1966) Interaction between deoxyribonucleic acid and some anthracene and anthraquinone derivatives. *Biochem. Biophys. Acta.*, 123: 630-633.

Sybalski W. and V.N. Iyer (1967) The mitomycins and porfirimycins. En: *Antibiotics. Vol 1 Mechanism of action.* . D. Gottlieb y P.D. Shaw . Springer-Verlag N.Y. pp 211-245.

Takahashi S., Kitamaka S.K., Takida M., Sankawa U. and S. Shibata. (1977). Phlegmacins and anhydrophlegmacinquinones: dimeric hydroanthracenes from seedlings of *Cassia torosa*. *Phytochemistry*, 16: 999-1002.

Tanaka H., Morooka N., Haraikawa K and Y. Ueno (1987) Metabolic activation of errodin in the reconstituted cytochrome P-450 system of the hepatic microsome of rats. *Mutation Res.*, 176:165-170.

Taylor J.H., Woods P.S. and W.L. Hughes (1957) The organization and duplication of chromosomes as revealed by autoradiographic studies using tritium-labeled thymidine. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 43: 122-138.

Tewey K.M., Chen G.L., Nelson E.M. and L.F. Liu. (1984) Intercalative anticancer drugs interfere with the breakage-reunion reaction of mammalian DNA topoisomerase II. *J. Biol. Chem.* 259: 9182-9187.

Tikkanen L and T. Matsushima (1983) Mutagenicity of anthraquinones in the Salmonella preincubation test. *Mutation Res.*, 116: 297-304.

Traganos F. (1983) Dihydroxyanthraquinones and related Bis(substituted) aminoanthraquinones: a novel class of antitumor agents. *Pharmac. Ther.*, 22:199-214.

Trush M.A., Mimnaugh E.G. and T. E. Gram. (1982) Activation of Pharmacologic agents to radical intermediates. *Biochemical Pharmacology*. 31 (21),. 3335-3346.

Twentyman P.R. (1983) Bleomycin-mode of action with particular reference to the cell cycle. *Pharmacol. Ther.* 23: 417-441.

Umezawa H. (1973) Studies on bleomycin: chemistry and biological action. *Biomedicine* 18: 459-475.

Verweij J. Funke-Kupper A.J., Teule G. and H.M. Pinedo. (1988) A prospective study on the dose dependency of cardiotoxicity induced by mitomycin C. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother.* 5: 159-163.

Wakaki S.H., Marumo K, Tomioka G., Shimizu E., Kato H., Kamada S., Kudo S., and Y. Fujimoto. (1958) Isolation of new fractions of antitumor mitomycins. *Antibiot. Chemother.* 8: 228-240.

Waksman S.A. y H.F. Woodruff (1940) bacteriostatic and bacteriocidal substances produced by a soil actinomycetes. *Proc. Soc. Expl. Biol. Med.* 45: 609-614.

Waksman N. and R. Ramirez (1992) Isolation of a new anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. *Rev. Latinoam. de Quimica*, 23(1) p.p. 25.

Wen W.N. and T.L. Liew (1983) The effect of age and cell proliferation on the frequency of sister chromatid exchange in human lymphocytes cultured *in vitro*. *Mech Ageing Dev.* 21: 377.

Westendorf J., Marquardt H., Poginsky B., Dominiak M., Schmidt J. and H. Marquardt. (1990) Genotoxicity of naturally occurring hydroxyanthraquinones. *Mutation Res.* 240: 1-12

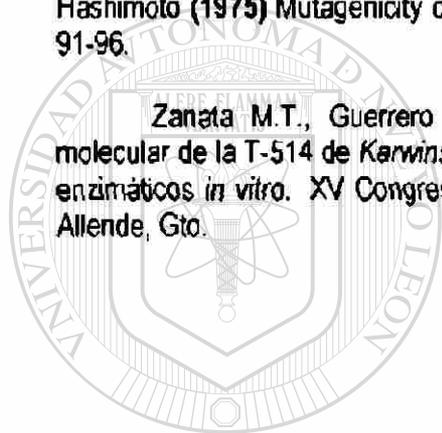
White A.D. and L.C. Hesketh (1980) A method utilizing human lymphocytes with *in vitro* metabolic activation for assessing chemical mutagenicity by sister chromatid exchange analysis. *Mutation Res.* 69: 283-291.

Wölflle D., Schmutz C., Westendorf J. and H. Marquardt. (1990) Hydroxyanthraquinones as tumor promoters: enhancement of malignant transformation of C3H mouse fibroblasts and growth stimulation of primary rat hepatocytes. *Cancer Research* 50: 6540-6544.

World Health Organization (1985) Guide to Short-term Tests for Detecting Mutagenic and Carcinogenic Chemicals. Environmental Health Criteria 51, Geneva: WHO.

Yagahi T., Degawa M., Seino Y., Matsushima T., Nagao M., Sugimura T. and Y. Hashimoto (1975) Mutagenicity of carcinogenic azo-dyes and their derivatives. *Cancer Letters*, 1: 91-96.

Zanata M.T., Guerrero M., Viader J.M. y A. Piñeyro López. (1992). Farmacología molecular de la T-514 de *Karwinskia humboldtiana*. Generación de anión superóxido en sistemas enzimáticos *in vitro*. XV Congreso Nacional de Farmacología, 12 de Noviembre, San Miguel de Allende, Gto.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

## RESUMEN AUTOBIOGRAFICO

Ma. del Roble Velazco Campos

Candidato para el grado de  
Doctor en Ciencias con Especialidad en Farmacología y Toxicología

Tesis : EFECTO GENOTOXICO DE LA T-514 OBTENIDA DE *Karwinskia humboldtiana* SOBRE LINFOCITOS HUMANOS *in vitro*

Area de Estudio: Ciencias de la Salud

**Biografía:**

Datos Personales: Nacida en Monterrey, N.L., el 16 de Septiembre de 1964, hija de Ma. Elena Campos Ortiz y Mario Velazco Ruiz.

**Escolaridad:** Egresada de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, con el grado de Biólogo en 1986.

---

**Experiencia Profesional:** Personal Profesional Investigador no Docente de Tiempo Completo de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León desde 1987, maestro de prácticas de Farmacología y Toxicología de la carrera de Médico Cirujano y Partero desde 1987. Once trabajos presentados en Congresos Nacionales. Realización parcial de la tesis en el Laboratorio de Genética y Toxicología Ambiental del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Aceptada en julio de 1998 como Candidato a Investigador Nacional por el Sistema Nacional de Investigadores. Estudiante distinguido del Doctorado en Ciencias con especialidad en Farmacología y Toxicología durante el ciclo escolar 1997-1998.

