

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

TD
QP981
.K37
V4
C.1



1080084926

13397

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
MA. DEL ROBLE VELAZCO CAMPOS

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

Enero 1999

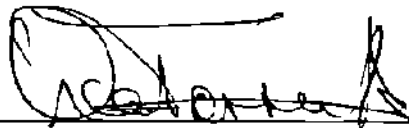


TD
9 P 981
K37
V4



"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

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

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,

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.

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.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo	Página
1 INTRODUCCION	
1.1 Generalidades	1
1.2 Carcinogénesis Química	4
1.3 Productos Naturales en el Tratamiento del Cáncer	6
2 DERIVADOS ANTRAQUINONICOS Y ANTRACENONICOS	
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
3 EL CULTIVO DE LINFOCITOS HUMANOS	
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
4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	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 Lamnínillas	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	
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	
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	
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
8	CONCLUSIONES , RECOMENDACIONES Y CONTRIBUCIONES	80
	REFERENCIAS	82

LISTA DE TABLAS

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

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 Agliconas Antraquinónicas	13
4 Estructuras Químicas de Algunos Compuestos Antracenónicos 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

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

NOMENCLATURA

AC	Aberraciones Cromosómicas
Ac.PC	Acido Pterolónico
9-AAC	9-Aminoacridina
2-AA	2-Aminoantraceno
BrdU	Bromodesoxiuridina
Conc.	Concentración
CP	Ciclofosfamida
CPC	Cinética de Proliferación Celular
DNA	Acido Desoxirribonucleico
hrs	Horas
ICH	Intercambio de Cromátidas Hermanas
IM	Indice Mitótico
IR	Indice de Replicación
µM	micro Molar
mM	milli Molar
MM-C	Mitomicina-C
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Reducido
p	probabilidad
PHA	Fitohemaglutinina
rpm	Revoluciones por Minuto
S9	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 *Ramniaceae*, se ha evaluado en numerosos estudios. De esta planta se han aislado cuatro antracenos diméricas, 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:

