

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE MEDICINA



INTERACCION DE LA PEROXISOMICINA A1
CON EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA
IN VITRO

Por

Q.F.B. MARIA SACHIKO LEO WONG

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

Marzo de 2004

Q.F.B. MARIA SACHIKO LEO WONG

TD
QK495
.R45
L4
2004
c.1



1080125646

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE MEDICINA



**INTERACCIÓN DE LA PEROXISOMICINA A1
CON EL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA
IN VITRO**

POR
Q.F.B. MARÍA SACHIKO LEO WONG

**Como requisito parcial para obtener el grado de
DOCTOR en CIENCIAS con especialidad en
Farmacología y Toxicología**

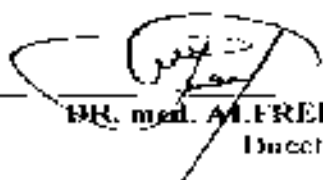
Marzo del 2004

L 4



**INTERACCION DE LA PEROXISOMICINA A1 CON EL FACTOR DE
NECROSIS TUMORAL ALFA *in vitro***

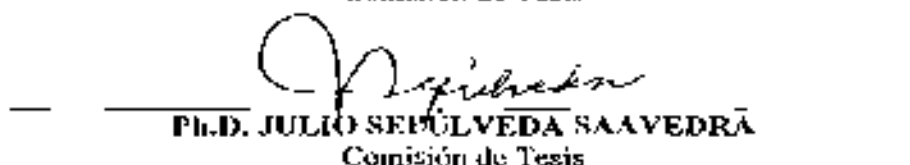
Aprobación de la Tesis:



DR. med. ALFREDO PINEYRO LOPEZ
Director de Tesis



DRA. med. LOURDES GARZA OCAÑAS
Comisión de Tesis



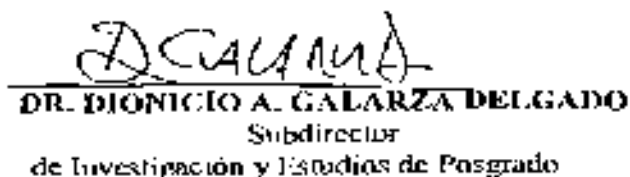
Ph.D. JULIO SEPÚLVEDA SAAVEDRA
Comisión de Tesis



DR. en C. MARIO CESAR SALINAS CARMONA
Comisión de Tesis



DR. med. OSCAR TORRES ALANIS
Comisión de Tesis



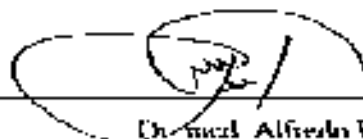
DR. DIONICIO A. GALARZA DELGADO
Subdirector
de Investigación y Estudios de Posgrado

**INTERACCIÓN DE LA PEROXISOMICINA A1 CON EL
FACTOR DE NECROSIS TUMORAL ALFA IN VITRO**

Presentado por:

Q.F.B. María Sachiko Leo Wong

Este trabajo fue realizado en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la
Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la
dirección del Dr. med. Alfredo Piñeyro López.



Dr. med. Alfredo Piñeyro López.

María Sachiko Leo Wong

Fecha de graduación: Marzo del 2004

**Universidad Autónoma de Nuevo León
Facultad de Medicina**

Título del Estudio:

**INTERACCIÓN DE LA
PEROXISOMICINA A1 CON EL FACTOR
DE NECROSIS TUMORAL ALFA *IN VITRO*.**

Número de páginas: III

**Candidato para la obtención del
grado de Doctor en Ciencias con
especialidad en Farmacología y
Toxicología.**

Área de Estudio:

Farmacología y Toxicología

Propósito y Método de Estudio: La búsqueda de esquemas de tratamiento exitosos en la lucha contra el cáncer, ha conducido al estudio de interacciones entre agentes antineoplásicos, en donde las interacciones positivas también conocidas como potenciación permiten disminuir las dosis de los agentes, la toxicidad hacia tejido normal y los efectos indeseables.

Este trabajo surge como resultado del interés de determinar la existencia y tipo de interacción entre la Peroxisomicina A1 (PA1) y el Factor de necrosis tumoral (TNF) ya que ambos compuestos han demostrado efectos en común, tales como: toxicidad hacia ciertas células neoplásicas, disminución de la actividad de la catalasa, decremento del número y tamaño de peroxisomas, trombocitopenia y leucopenia en pacientes. Además se estudió el efecto sensibilizador de la Actinomicina D (Act-D) sobre el TNF presente en la combinación PA1+TNF y el efecto tóxico de las combinaciones PA1+Mitomicina y PA1+5-fluorouracilo en varias líneas celulares.

Para medir la citotoxicidad de estas sustancias se emplearon los métodos de azul de tripano, morfológico, MTT y SRB, la determinación del tipo de interacción se realizó mediante el criterio de multiplicación e índices de combinación deponentes por Eberhart.

Contribuciones y Conclusiones: Con base en los resultados se concluyó que la PA1 interactuó de manera positiva con el TNF en las líneas celulares de hepatoma (FLO/PRF/5), hepatoblastoma (HepG2), adenoc. de mama (BF-20) y Ca. de cérvix (SIIIA).

El pretratamiento con la Act D aumentó la sensibilidad a la citólisis del TNF presente en la combinación PA1+TNF, sin embargo el dato se observó en todas las líneas celulares, es decir no se mantuvo la selectividad, este hecho permite rechazar el pretratamiento con la Act D para esta combinación. Para el caso de la combinación PA1+Mitomicina se observó potenciación en las células benignas de colon, adenoc. de colon (Lovo) y hepatoblastoma (HepG2), por el contrario en la combinación PA1+5-fluorouracilo se observó interacción de naturaleza antagónica.

Las interacciones positivas de las combinaciones PA1+TNF y PA1+Mitomicina en las líneas celulares antes mencionadas aportan nuevas oportunidades terapéuticas a pacientes con estas entidades patológicas, ya que dichos resultados no habían sido reportados hasta ahora.

FIRMA DEL DIRECTOR DE TESIS

Dr. med. Alfredo Pineyro López

**Dedico esta tesis a mi querida madre, María Guadalupe
quien con su ejemplo me invita a disfrutar intensamente cada momento de la vida.
A mi maravilloso esposo Juan Ildelfonso, mi gran maestro de impermanencia,
leal amigo y compañero y a nuestra joya Mateo Ekbalam.**

AGRADECIMIENTOS

Gracias al Gran Espíritu por el regalo de la vida, la salud y las bendiciones recibidas para concluir este trabajo.

A mi padre, José Abraham, por transmírmeme el amor a la lectura, sus enseñanzas y sabios consejos siempre estarán en mi mente y corazón.

A Tashiro por su cariño y apoyo

Al Dr. med. Alfredo Piñeyro López, por ser parte de mi historia, por compartir el proyecto *Karwinskia*, por su constante apoyo, trabajar con él fue un gran deleite.

A la Dra. Laura E. Martínez de Villarreal, sin su guía, experiencia y paciencia este trabajo no habría sido posible.

A los Miembros de la Comisión de tesis: Dra. med. Lourdes Garza O., Dr. C. Mario César Salinas C., Ph. D. Julio Sepúlveda S. y Dr. med. Oscar Torres A.
Por su tiempo, acertada crítica y valiosas sugerencias.

A la Dra. Victoria Bernsúdez de Rocha por sus constantes palabras de ánimo.

Al Ph. D. Salvador Borrego A. Por su ayuda en el análisis estadístico.

A la Q.C.B. Mayté Contreras G. Tus grandes habilidades hicieron este trabajo visualmente mucho mejor, gracias por tu amistad!

A los Doctores Martha Salazar y Marco Flores por su continua y desinteresada ayuda.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca proporcionada.

Al Sr. Roger González A., Q.C.B. René García M., Blauquita González, a mis compañeros de doctorado y trabajo y a todos aquellos quienes no he nombrado aquí pero que me ayudaron para concluir hoy este trabajo.

TABLA DE CONTENIDO

Capítulo		Página
1	INTRODUCCIÓN	1
2	MATERIAL Y MÉTODOS	17
2.1	Material	17
2.1.1	Líneas celulares	18
2.1.2	Material plástico	18
2.1.3	Material de vidrio	18
2.1.4	Agentes antineoplásicos	18
2.1.4.1	Peroxisomicina A1	18
2.1.4.2	Factor de necrosis tumoral α (TNF) recombinante humano	18
2.1.4.3	Actinomicina D	19
2.1.4.4	Mitomicina C	19
2.1.4.5	5-Fluorouracilo	19
2.1.5	Reactivos	19
2.1.6	Equipo general	19
2.2	Métodos	20
2.2.1	Líneas celulares	20
2.2.1.1	Criterios de selección	20
2.2.1.2	Mantenimiento de las líneas celulares	21
2.2.1.3	Preparación e inoculación	22
2.2.2	Antineoplásicos (solubilización y dilución)	23
2.2.2.1	Peroxisomicina A1	23
2.2.2.2	Factor de necrosis tumoral α	23
2.2.2.3	Actinomicina D, Mitomicina C y 5- Fluorouracilo	23

Capítulo		Página
	2.2.2.4 Exposición concurrente de PA1+TNF	24
	2.2.2.5 Pretratamiento con Actinomicina D	24
	2.2.2.6 Exposición concurrente PA1+Mit y PA1+5FU	25
	2.2.3 Incubación	25
	2.2.4 Evaluación de la Citotoxicidad	26
	2.2.4.1 Evaluación morfológica	26
	2.2.4.2 Prueba de exclusión de colorante Azul de Tripano	26
	2.2.4.3 Prueba de MTT	27
	2.2.4.4 Prueba de sulfurodamina B	28
	2.2.5 Evaluación de los datos	29
	2.2.5.1 Morfológica	29
	2.2.5.2 Exclusión de colorante AT	29
	2.2.5.3 Prueba de MTT	29
	2.2.5.4 Prueba de Sulfurodamina B	30
	2.2.5.5 Prueba de ANOVA	31
	2.2.6 Definición de la interacción	32
3	RESULTADOS	34
	3.1 Evaluación morfológica	34
	3.1.1 Exposición a Peroxisomicina A1 por 48h	34
	3.1.2 Exposición a TNF	36
	3.1.3 Exposición a PA1+TNF	36
	3.1.4 Pretratamiento con Actinomicina D	42
	3.1.5 Efecto de la PA1 con otros antineoplásicos	43
	3.1.5.1 Efecto de la administración combinada de PA1+ Mitomicina	43

Capítulo	Página
3.1.5.2 Efecto de la administración combinada de PA1+5Fluorouracilo	44
3.2 Evaluación con Azul de tripano	45
3.2.1 Exposición a PA1	45
3.2.2 Efecto a la exposición a TNF	48
3.2.3 Efecto de la administración combinada a PA1+TNF	48
3.2.4 Pretratamiento con Actinomicina D	50
3.2.5 Efecto de la exposición de la PA1 con otros antineoplásicos	51
3.2.5.1 Exposición a la PA1+Mitomicina C	51
3.2.5.2 Exposición a la PA1+5-Fluorouracilo	52
3.3 Evaluación con MTT	52
3.3.1 Efecto de la exposición a PA1	53
3.3.2 Efecto a la exposición a TNF	58
3.3.3 Efecto de la administración combinada a PA1+TNF	59
3.3.4 Sobrevida celular ulterior a exposición de PA1 y PA1+TNF	64
3.3.5 Efecto del pretratamiento con Actinomicina D	65
3.3.5.1 Sensibilización por 1h.	65
3.3.5.2 Sensibilización por 24h.	66
3.3.6 Efecto de la exposición de la PA1 con otros antineoplásicos	69
3.3.6.1 Exposición a la PA1+Mitomicina C	69
3.3.6.2 Exposición a la PA1+5-Fluorouracilo	71

Capítulo	Página
3.4 Evaluación con SRB	72
3.4.1 Efecto de la exposición a PA1	72
3.4.2 Efecto a la exposición a TNF	75
3.4.3 Efecto de la administración combinada a PA1+TNF	76
3.4.4 Efecto del pretratamiento con Actinomicina D	80
3.4.4.1 Sensibilización por 1h	80
3.4.4.2 Sensibilización por 24h.	80
3.4.5 Efecto de la exposición de la PA1 con otros antineoplásicos	83
3.4.5.1 Exposición a la PA1+Mitomicina C	83
3.4.5.2 Exposición a la PA1+5-Fluorouracilo	84
3.5 Análisis de la interacción	85
3.5.1 Combinación PA1+TNF	85
3.5.2 Exposición a PA1	88
3.5.2.1 Sensibilización previa con Act-D por 1h	88
3.5.2.2 Sensibilización previa con Act-D por 24h	89
3.5.3 Exposición a PA1+TNF	90
3.5.3.1 Sensibilización previa con Act-D por 1h	90
3.5.3.2 Sensibilización previa con Act-D por 24h	91
3.5.4 Exposición a PA1+Mit	92
3.5.5 Exposición a PA1+5FU	93

Capítulo		Página
4	DISCUSIÓN	94
	4.1 Toxicidad selectiva de la PA1	95
	4.2 Efecto del TNF sobre distintas líneas celulares	96
	4.3 Combinación PA1+TNF	96
	4.4 Sensibilización con Act-D	100
	4.5 Combinación PA1+Mit	101
	4.6 Combinación PA1+SPU	102
	4.7 Comparación de los métodos de evaluación	102
5	CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES	103
	5.1 Conclusiones	104
	5.2 Perspectivas	104
	5.3 Contribuciones	105
Referencias		106

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1a	Distintos tipos de curvas de interacción de medicamentos	3
1b	Ejemplo de antagonismo competitivo entre el Kò-592 y el propranolol	4
2	<u>Karwinskia humboldtiana</u> con fruto verde y maduro	6
3	Toxinas aisladas del fruto de <u>K. humboldtiana</u> y sus efectos	7
4	Esquema computarizado del TNF alfa	11
5	Secuencia de aminoácidos del Factor de necrosis tumoral alfa	11
6	Ejemplo de distribución de una placa de 96 pozos	25
7A	Líneas celulares expuestas a PA1+TNF y controles	39
7B	Líneas celulares expuestas a PA1+TNF y controles	40
7C	Líneas celulares expuestas a PA1+TNF y controles	41
8	Viabilidad de líneas celulares expuestas a PA1 por 48h. Prueba de azul de tripano	45
9	Células de melanoma teñidas con Azul de tripano	49
10a	Curvas dosis-respuesta de líneas celulares expuestas a Peroxisomicina A1 por 48h.	53
10b	Curvas dosis respuesta de células de Chang, hepatoma y hepatoblastoma expuestas a PA1 por 48 h, con sus respectivas líneas de correlación obtenida por modelo matemático	55
10c	Curvas dosis respuesta de células de colon, adenoCa. de colon y adenoCa. de mama expuestas a PA1 por 48 h, con sus respectivas líneas de correlación obtenida por modelo matemático	56
10d	Curvas dosis respuesta de fibroblastos, células de melanoma y Ca. de cérvix expuestas a PA1 por 48 h, con sus respectivas líneas de correlación obtenida por modelo matemático	57

Figura		Página
18b	Crecimiento de células de Colon, AdenoCa. de colon y AdenoCa. de mama expuestas a PA1, TNF y PA1+TNF por 48h. Prueba de SRB	78
18c	Crecimiento de fibroblastos, células de melanoma y Ca. de cérvix expuestas a PA1, TNF y PA1+TNF por 48h. Prueba de SRB	79
19a	Crecimiento de células de hígado de Chang, hepatoblastoma, colon y adenoCa. de colon expuestas a PA1 y PA1+TNF por 48h. Sensibilización previa con Act-D (1µg/ml.) por 1h y 24h. Prueba de SRB	81
19b	Crecimiento de fibroblastos, células de adenoCa. de mama, melanoma y adenoCa. de cérvix expuestas a PA1 y PA1+TNF por 48h. Sensibilización previa con Act-D (1µg/ml.) por 1h y 24h. Prueba de SRB	82
20	Líneas celulares expuestas a PA1, Mit y PA1+Mit (µg/ml.) por 48h. Prueba de SRB	83
21	Líneas celulares expuestas a PA1, SFU y PA1+SFU (µg/ml.) por 48h. Prueba de SRB	84
22	Comparación entre la viabilidad observada versus la viabilidad esperada de líneas celulares expuestas a PA1+TNF (Prueba de MTT)	86
23a	Comparación entre la viabilidad observada versus la viabilidad esperada de líneas celulares expuestas a PA1 previamente sensibilizadas con Act-D por 1h	88
23b	Comparación entre la viabilidad observada versus la viabilidad esperada de líneas celulares expuestas a PA1 previamente sensibilizadas con Act-D por 24h	89
24a	Comparación entre la viabilidad observada versus la viabilidad esperada de líneas celulares expuestas a PA1+TNF previamente sensibilizadas con Act-D por 1h	90

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Acciones de TNF en algunas células blanco	12
2a	Evaluación morfológica de líneas celulares expuestas a PA1 por 48h	35
2b	Concentraciones máximas, cincuenta y mínimas de PA1 en líneas celulares expuestas al compuesto por 48h	35
3	Evaluación morfológica de líneas celulares expuestas a TNF por 48h	36
4	Evaluación morfológica de líneas celulares expuestas a dos dosis de PA1 en combinación con 1, 5, 10 y 160 ng/ml. de TNF por 48h	37
5	Evaluación morfológica de líneas celulares expuestas a PA1 y PA1+TNF por 48h presensibilizadas con 1µg/mL. de Actinomicina D por 1h y 24h	42
6	Evaluación morfológica de líneas celulares expuestas a PA1, Mit y PA1+Mit por 48h	44
7	Evaluación morfológica de líneas celulares expuestas a PA1, 5FU y PA1+5FU por 48h	44
8a	Viabilidad de líneas celulares expuestas a Peroxisomicina A1 por 48h. Prueba de azul de tripano	47
8b	Concentraciones máximas, cincuenta y mínimas de PA1 en líneas celulares expuestas al compuesto por 48h. Azul de tripano	47
9	Viabilidad de líneas celulares expuestas a dos dosis de PA1 y ocho combinaciones de PA1+TNF por 48h. Prueba de Azul de tripano	48
10	Viabilidad de líneas celulares expuestas a PA1, PA1+TNF por 48h y no sensibilizadas y sensibilizadas con 1µg/mL de Actinomicina D por 1h y 24h. Prueba de Azul de tripano.	50

Tabla		Página
11	Viabilidad de líneas celulares expuestas a PA1, Mit y PA1+Mit por 48h. Prueba de Azul de tripano	52
12	Viabilidad de líneas celulares expuestas a PA1, 5FU y a la combinación de PA1+5FU por 48h. Prueba de Azul de tripano	52
13	Concentraciones inhibitorias 50% (CI50) de PA1 y TNF en líneas celulares expuestas a los compuestos por 48h. Prueba de MTT	59
14	Sobrevida de líneas celulares expuestas a PA1 y PA1+TNF por 48h. Cultivo prolongado en ausencia de los compuestos por 72h. Prueba de MTT	64
15	Concentraciones inhibitorias 50% (CI50) de Mitomicina y 5 Fluorouracilo en diferentes líneas celulares de acuerdo a la prueba de MTT	69
16	Inhibición total del crecimiento (TGI), inhibición del crecimiento 50% (GI50) y concentración letal 50% (LC50) de líneas celulares expuestas a Peroxisomicina A1 por 48h.	74
17	Índices de combinación de líneas celulares expuestas a PA1+TNF	87

ABREVIATURAS

Act-D	Actinomicina D
AdenoCa.	Adenocarcinoma
ANOVA	Análisis de varianza entre grupos
ATC	Acido tricloroacético
Ca.	Carcinoma
CI50	Concentración inhibitoria 50%
CO ₂	Bióxido de carbono
CT50	Concentración tóxica 50%
CTmax	Concentración tóxica máxima
CTmin	Concentración tóxica mínima
°C	Grados celsius
DMSO	Dimetil sulfóxido
GI50	Inhibición del crecimiento 50%
ITT	Inhibición total del crecimiento
Fig.	Figura
5FU	5-Fluorouracilo
h	hora
IC	Índice de combinación
LC50	Concentración letal 50%
M	Molar
MEM	Medio mínimo esencial
Mit	Mitomomicina C
ml.	Mililitro
µL	Microlitro
MIT	3(4,5)dimetiltrazol-2, 2,5 bromuro de difenil tetrazolio
PAI	Peroxisomicina A I

CAPÍTULO UNO

INTRODUCCIÓN

El cáncer, enfermedad que puede afectar a distintos órganos y tejidos, es caracterizada por la proliferación desordenada de las células, lo que provoca graves alteraciones en la forma y en la función de los tejidos afectados. En la mayoría de los cánceres, las células enfermas se agrupan en masas denominadas tumores malignos, en la actualidad es un problema de salud mundial. Desde hace años, se han llevado a cabo innumerables esfuerzos para proveer de nuevas opciones terapéuticas. Así, se ha observado que el tratamiento con sólo un medicamento presenta limitaciones claras; ya que sólo es efectivo si el tumor se encuentra en un estado de localización temprana. Además, la toxicidad hacia el tejido normal y los efectos indeseables han sido sistemáticamente motivo de estudio. Por ello, la búsqueda de esquemas de tratamiento exitosos ha conducido a la combinación entre diversos agentes antineoplásicos, radiación y cirugía.

Por lo tanto, la administración conjunta de dos o varios compuestos ha permitido mejorar los resultados y reducir las limitaciones mencionadas.

En el tratamiento con más de un medicamento o procedimiento, se requiere definir si ocurre **interacción** entre ellos; es decir si la influencia que una sustancia activa tuviera sobre la respuesta de otro agente, pudiera estar notoriamente incrementada o debilitada hasta ser de mayor utilidad o ser ineficaz.

Las interacciones farmacológicas pueden llevarse a cabo en dos sentidos, ya sea positivo o negativo, mismas que no son definidas de manera uniforme, por lo que han generado controversias y ambigüedades. Esto se ha debido a la existencia de diferentes objetivos entre los investigadores. Por esto se ha considerado definir para los fines del presente estudio:

Interacción positiva: dícese de la magnitud de los efectos de dos fármacos que administrados de manera conjunta son mayores de lo previsto para la administración individual de ellos. La interacción positiva, también es conocida con el nombre de potenciación (1,2)

Uno de los fines de las interacciones positivas es mejorar los resultados de la quimioterapia clínica. Actualmente, existe la base teórica y experimental para demostrar la existencia de potenciación a través de sus mecanismos de acción o por sus efectos complementarios en la cinética celular (3).

La ventaja principal de estas combinaciones reside en la aplicación de dosis menores de cada uno de los fármacos, con lo cual si los efectos tóxicos fueran de distinta naturaleza, la tolerancia global a los medicamentos mejoraría considerablemente. En la fig. 1a se muestran distintos tipos de interacción de medicamentos.

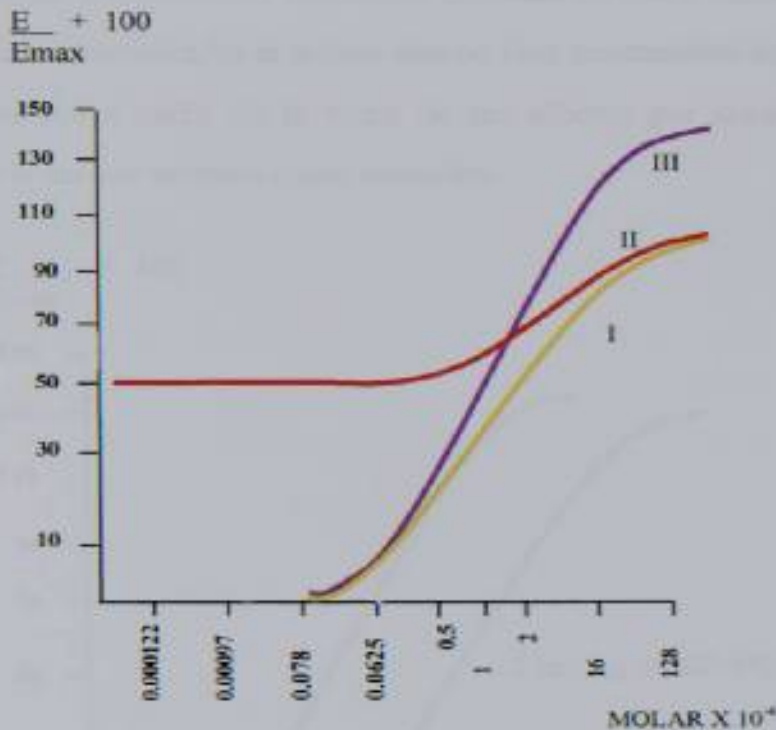


Figura 1a

Distintos tipos de curvas de interacción de medicamentos:

- I. Curva de relación dosis-efecto. II. Curva de asociación (sumación) de dos agentes agonistas y III. Curva de potenciación.

Interacción negativa: dice de la magnitud de los efectos de dos fármacos que administrados de manera conjunta, son menores de lo previsto para la administración individual de ellos. La interacción negativa, también es conocida con el nombre de antagonismo. Ariès y Simonis (4,5) han clasificado este concepto de acuerdo a la afinidad hacia los receptores en antagonismo competitivo y antagonismo no competitivo. En la fig. 1b se muestra un ejemplo de antagonismo competitivo (6):

Por otra parte, no se considerará interacción (interacción cero): cuando los efectos de los fármacos administrados al mismo tiempo sean exactamente aquellos que se hubiesen previsto a partir de la suma de sus efectos por separado. A este fenómeno se le conoce también como sumación.

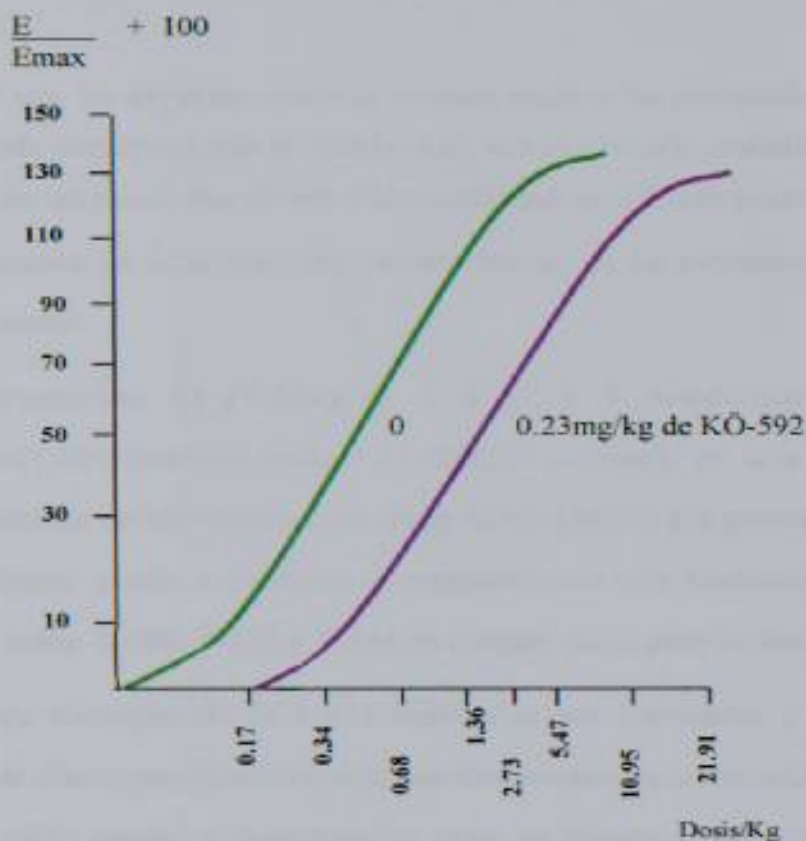


Figura 1b

Ejemplo de antagonismo competitivo entre el Kō-592 y el proterenol.

Por otra parte, por miles de años el hombre ha mantenido interés constante en los principios terapéuticos de naturaleza vegetal. El Papiro de Ebers (1.502 a.c.) en Egipto, es el primer documento escrito sobre los usos de vegetales en la terapéutica.

En China el emperador Shen Nung, describió un conjunto de mil plantas medicinales.

El avance que ha experimentado la ciencia médica ha permitido estudiar las plantas desde una óptica más profunda. Así, se han extraído, aislado, identificado y establecido las relaciones de estructura-actividad de miles de principios activos.

A continuación se describen las características de la sustancia objeto del presente estudio.

La Peroxisomicina A1 (T-514), (3, 3', 8, 8', 9, 9'-hexahidroxi-3, 3',4, 4'-tetrahidro-(7,10')-biantraceno-1,1'-(2H,2H')-diona), es una antracenoa dimérica aislada de las semillas del fruto de las plantas del género *Karwinskia*, (fig. 2). Dreyer y cols. (7) aislaron y caracterizaron esta sustancia y otras tres conocidas como T-496, T-516 y T-544 en función de su peso molecular.

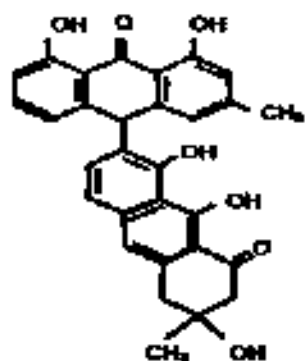
Estudios de toxicidad de la T-514 realizados por Bermudez y cols (8,9) con animales de diferentes especies mostraron alteraciones caracterizadas por necrosis centrolobulillar masiva y degeneración grasa en hígado, lesión en los capilares pulmonares y degeneración hidrópica del riñón. La estructura molecular de las toxinas y sus efectos se muestran en la fig. 3.

La selectividad para hígado y pulmón llevaron a los autores a la determinación de la dosis letal 50% (DL50) en distintas especies animales.

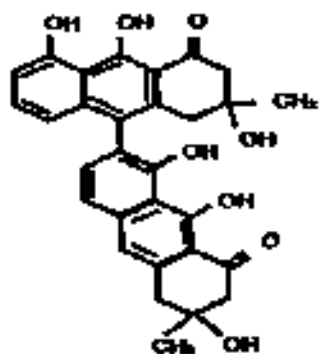


Figura 2

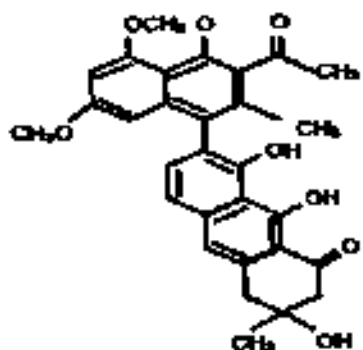
Karwinskia humboldtiana con fruto verde y maduro.



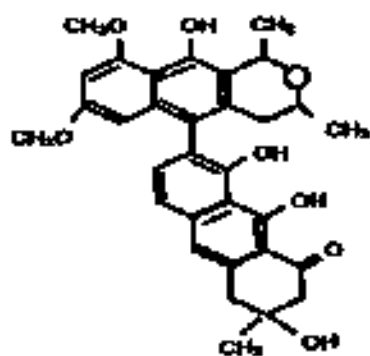
T-496
diarrea



T-514
daño a pulmón
hígado y colon



T-516
no estudiado



T-544
parálisis flácida

Figura 3

Toxinas aisladas del fruto de *K. humboldtiana* y sus efectos.

La gráfica de letalidad que se encontró en los estudios antes mencionados mostró una pendiente muy empinada, pendiente que no se presenta con frecuencia y nos habla de una variación biológica estrecha (10), este resultado llevó a que se analizara el efecto de la T-514 sobre líneas celulares neoplásicas y benignas.

Con el propósito de investigar la toxicidad del compuesto, Piñeyro y cols. (11,12) realizaron estudios *in vitro* con distintas líneas celulares, donde demostraron que algunas células neoplásicas poseen una marcada sensibilidad a la T-514 al ser comparadas con las líneas celulares benignas, de esta manera se demostró su toxicidad selectiva. Las células más sensibles expuestas a la T-514 fueron hepatoma (PLC/PRF/5), Adenocarcinoma de Colon (Lovo) y carcinoma pulmonar de células pequeñas (NCI-H69) (12).

Esto fue corroborado por Fiebig (comunicación personal) en la Universidad de Friburgo en Alemania, quien encontró un 63% de sensibilidad de las líneas celulares estudiadas; principalmente melanoma, hepatoma, adenocarcinoma de pulmón, así como también en carcinomas de ovario y colon. Otros estudios realizados en el Instituto Nacional de Cáncer en los Estados Unidos en líneas celulares de melanoma, mama, riñón, colon y SNC, indicaron su potencial uso como antineoplásico.

En el departamento de Farmacología y Toxicología de esta facultad, se han realizado estudios para determinar el probable mecanismo de acción de la T-514, los cuales han permitido identificar:

Un efecto depresor sobre el número de peroxisomas hepáticos de ratas y Macaca fascicularis (13) y una inhibición de la enzima catalasa bovina in vitro (14), sin embargo, al investigarse el efecto de la T-514 sobre la actividad de la catalasa hepática del ratón albino en cortes de tejido y homogenizados, no se demostró la inhibición de la enzima, tanto en procesos histoquímicos como bioquímicos. Esto indicó que cuando se utiliza la enzima purificada, la T-514 solamente disminuye la actividad de la catalasa in vitro y no cuando la enzima está en los peroxisomas; ya sea en fragmento de tejido o en animales completos (14). El decremento en la actividad de la enzima in vitro se emplea en nuestro laboratorio con fines de control de calidad.

Otros estudios demostraron que T-514 produce una interrupción de la continuidad de la membrana peroxisomal en células de levaduras intactas, específicamente Hansenula polymorpha y Candida boidinii (15). Este efecto llevó a denominar a la T-514 como "Peroxisomicina". De acuerdo con la Comisión internacional de nomenclaturas (IUPAC) se le asignó a todos los compuestos de K. humboldtiana con sitio de unión 7, 10': Peroxisomicina A (16) y Peroxisomicina B a los isómeros posicionales con unión 7, 7'.

Por otro lado, el Factor de necrosis tumoral (TNF), es una proteína metabólicamente activa, de la cual se han descrito dos tipos α y β .

La historia del descubrimiento del TNF α comenzó el siglo XIX, cuando un cirujano de Nueva York, llamado William Coley (17) notó que infecciones crisipelatosas intercurrentes podían dar lugar a la resolución parcial de neoplasias, además observó que la administración de preparaciones derivadas de cultivos de bacterias (*estreptococo* y *serratia*) inducían necrosis hemorrágica en varios tumores, más tarde se descubrió de manera independiente un mediador circulante de la eranciación durante la enfermedad infecciosa al que se le llamó caquectina (18), y resultó ser el TNF α .

El TNF α es producido principalmente por macrófagos y otras células, como monocitos, células B, células NK, astrocitos y células de Kupffer, en respuesta a estimulación con productos bacterianos conocidos como endotoxinas (19,20). Adicionalmente al TNF, se produce en los linfocitos T el cual se conoce como TNF β ó linfoxina (21).

El grado de homología entre TNF α y TNF β es del 46% en los nucleótidos y del 28% en los aminoácidos (aa). La forma precursora de TNF α consiste de 236 aa, en tanto que para el TNF β es de 204 aa, antes o durante la secreción se eliminan por acción enzimática aminoácidos N-terminales de las formas precursoras para dar como resultado TNF α soluble, de peso molecular de 17 kDa y TNF β de peso molecular de 20 kDa. Los TNF α y β se unen en el mismo receptor de las células blanco. En las figuras 4 y 5 se muestra un esquema computarizado del TNF alfa y la secuencia de aminoácidos.

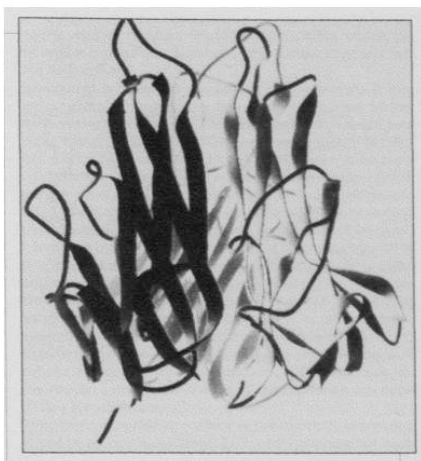


Figura 4
Esquema computarizado del TNF alfa.

-70			
Met	SerThrGluSerMet	IleArgAspValGlu	LeuAlaGluGluAla
-60		-50	
LeuProLysLysThr	GlyGlyProGlnGly	SerArgArgCysLeu	PheLeuSerLeuPhe
-40		-30	
SerPheLeuIleVal	AlaGlyAlaThrThr	LeuPheCysLeuLeu	HisPheGlyValIle
-20		-10	
GlyProGlnArgGlu	GluPheProArgAsp	LeuSerLeuIleSer	ProLeuAlaGlnAla
1		11	
ValArgSerSerSer	ArgThrProSerAsp	LysProValAlaHis	ValValAlaAsnPro
21		31	
GlnAlaGluGlyGln	LeuGlnTrpLeuAsn	ArgArgAlaAsnAla	LeuLeuAlaAsnGly
41		51	
ValGluLeuArgAsp	AsnGlnLeuValVal	ProSerGluGlyLeu	TyrLeuIleTyrSer
61		71	
GlnValLeuPheLys	GlyGlnGlyCysPro	SerThrHisValLeu	LeuThrHisThrIle
81		91	
SerArgIleAlaVal	SerTyrGlnThrLys	ValAsnLeuLeuSer	AlaIleLysSerPro
101		111	
CysGlnArgGluThr	ProGluGlyAlaGlu	AlaLysProTrpTyr	GluProIleTyrLeu
121		131	
GlyGlyValPheGln	LeuGluLysGlyAsp	ArgLeuSerAlaGlu	IleAsnArgProAsp
141		151	
TyrLeuAspPheAla	GluSerGlyGlnVal	TyrPheGlyIleIle	Alaleu

Figura 5
Secuencia de aminoácidos del Factor de necrosis tumoral alfa

Durante los últimos años se han descrito una amplia gama de actividades biológicas del TNF (22,23,24,25), que influyen en diferentes procesos, entre los que se encuentran mitogénesis, diferenciación e inmunorregulación; sus acciones en algunas células blanco se indican en la tabla 1.

Células o tejido blanco	Efecto
Linfocitos T	Incrementa la expresión para receptores de IL-2 induce la producción de linfocinas
Linfocitos B	Incrementa la producción de anticuerpos
Monocitos y macrófagos	Cosmotiva el estado estocida
Células endoteliales y músculo liso vascular	Induce actividad procoaguladora, inhibidor de prostaglandinas, agente mitógeno y angiogénico
Hepatócito	Disminución de CxP-450, e incremento de C1
Adipocito	Disminuye lipoproteína lipasa, favorece la lipólisis
Neoplásicas Carcinoma de cérvix: ME-180, HeLa-H21 Carcinoma de mama: BT-20, MCF-7 Hepatoma: McG (30-80)6 Adenocarcinoma de colon: HT-29 Melanoma: RPMI-7951	Citotoxicidad
Infectadas por virus Carcinoma renal: 7850 (Glicoblastoma: U87MG) Mieloma: RPMI-8276 Adenocarcinoma de colon: HT-29 Carcinoma de cérvix: HeLa Carcinoma laríngeo: HEP-2	Proteínas virales

Tabla 1
Acciones del TNF en algunas células blanco

Estudios *in vitro* han demostrado el efecto citotóxico del TNF en ciertas líneas celulares tales como Me-180 y HeLa-H21 (Ca. Cérvix), BT-20, MCF-7 (Ca. de mama) y McG (30-80)6 (Hepatoma), no así para las células normales; este hecho sugiere que participa de forma importante en la resolución de algunas neoplasias (26,27,28).

Aunque el mecanismo de esa citotoxicidad selectiva aún no se ha aclarado, no parece deberse a diferencias en el número o tipo de receptores de superficie para el TNF. Por otra parte, Yasmineh y cols. (29) han demostrado en hepatocitos de rata que el TNF produce una disminución de la actividad de la catalasa además de un significativo decremento en el número y tamaño de peroxisomas.

Los resultados obtenidos de los estudios de fase clínica I y II no han sido alentadores, debido a la presencia de toxicidad cardiovascular (30), la cual es la limitante más importante, además de alteración en el metabolismo de los lípidos (31), trombocitopenia y leucopenia (32).

Por otro lado, al examinar el TNF en adición a otros agentes, tales como interferon γ , se observó que dicha combinación aumentó aproximadamente 10 veces la citotoxicidad en los siguientes tumores: biliar, prostático y sarcoma (33,34,35,36,37). Esto ha sugerido que la administración combinada de estos compuestos pudiera emplearse en la terapia de estas neoplasias.

La PA1 y el TNF presentan algunos efectos en común, lo cual establece la posibilidad de que su asociación resulte en un efecto sinérgico sobre las células neoplásicas.

Relación de los Efectos comunes de la PA1 y TNF:

Disminución de la actividad de la catalasa: PA1 in vivo e in vitro, TNF in vivo

Decremento del número y tamaño de peroxisomas in vivo

Trombocitopenia y leucopenia en pacientes

El interés de observar el efecto de la PAI en combinación con otros agentes antineoplásicos condujo a estudiar a la toxina en conjunto con Mitomicina C, 5-fluorouracilo y Actinomicina-D, esta última es un inhibidor de la síntesis de proteínas, del cual se ha evidenciado que sensibiliza al efecto tóxico del TNF en líneas celulares que no presentan efecto a la exposición con el TNF (20).

La mitomicina C es un antineoplásico generador de radicales libres y el 5-fluorouracilo un antimetabolito.

El presente estudio pretende demostrar in vitro la interacción de estos agentes. Para ello, se ha planteado la siguiente hipótesis y objetivo general.

HIPÓTESIS

El Factor de necrosis tumoral alfa actúa, in vitro, de manera sinérgica con la Peroxisomicina A1 sobre células neoplásicas.

OBJETIVO GENERAL.

Analizar la posible interacción de la Peroxisomicina A1 y el Factor de necrosis tumoral alfa in vitro.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1. Proliferar y estandarizar las líneas celulares benignas y malignas requeridas para el estudio.**
- 2. Determinar las concentraciones tóxicas máximas (CTmax), mínimas (CTmin) y 50% (CT50) con los métodos morfológico y azul de tripano, las concentraciones inhibitorias 50% (CI50) con el método de MTT y la inhibición del crecimiento 50% (GI50) con el método de SRB, en las líneas celulares expuestas a Peroxisomicina A1.**
- 3. Determinar las concentraciones tóxicas máximas (CTmax), mínimas (CTmin) y 50% (CT50) con el método morfológico, las concentraciones inhibitorias 50% (CI50), con el método de MTT y la inhibición del crecimiento 50% (GI50) con el método de SRB, en las líneas celulares expuestas a TNF.**
- 4. Determinar la combinación de PA1+TNF que produzca en cada una de las líneas celulares una concentración inhibitoria del 50% (combinación isoeffecto), posterior a una exposición de los compuestos de 48h.**
- 5. Determinar la existencia y tipo de interacción en las líneas celulares expuestas a la combinación isoeffecto de PA1+TNF por 48h.**

CAPÍTULO DOS

MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 MATERIAL

2.1.1 Líneas celulares

Las líneas celulares utilizadas para el estudio fueron obtenidas de American type culture collection (ATCC) y son las siguientes:

Células hepáticas de Chang	Chang liver
Hepatoma	PLC/PRF/5
Hepatoblastoma	HepG2
Células benignas de colon	CCD 33-Co
Adenocarcinoma de colon	Lovo
Adenocarcinoma de mama	BT-20
Melanoma	SK-MEL2
Carcinoma escamoso de cérvix	SIHA
Fibroblastos murinos	L-929

2.1.2 Material plástico

Placas para cultivo celular de 96 pozos de superficie plana Sigma

Frascos de cultivo T25 Costar 3055

Pipetas automáticas de volumen graduable Eppendorf

Puntillas para pipetas Eppendorf de diversas capacidades

2.1.3 Material de vidrio

Frascos para medio de cultivo de 1L

Matraces Erlenmeyer de diversas capacidades

Vasos de precipitado de diversas capacidades

Pipetas lineales de 5, 10 y 25mL

2.1.4 Agentes antineoplásicos

2.1.4.1 Peroxisomicina A1

PA1 del lote de producción no. 80 fue aislada y purificada en el Departamento de Farmacología y Toxicología de esta facultad, la cual fue sometida a un estricto control de calidad que incluyó pruebas fisicoquímicas, cromatográficas y biológicas como inhibición de la catalasa y actividad celular.

2.1.4.2 Factor de necrosis tumoral α (TNF) recombinante humano

Se obtuvo de la Compañía Sigma Chem. Co. (T-0157)

Expresado en levaduras, presentación de 10 μ g/mL en PBS, 95% puro (SDS page y HPLC); probado para endotoxinas y cultivo celular. Con actividad mayor de 2×10^7 Unidades/mg.

2.1.4.3 Actinomicina D (Cosmegen®) Merck & Co., Inc.

2.1.4.4 Mitomicina (Mitocin-C®) Bristol.

2.1.4.5 5-Fluorouracilo (Rbonuracil-L.F.®) Rhône-Poulenc Rorer.

2.1.5 Reactivos

<i>Reactivos</i>	<i>Nº de catálogo</i>
Medio de cultivo MEM (Minimum essential medium Eagle)	Sigma M-0643
Suero fetal bovino	Sigma F-2442
Tripsina	Sigma T-2271
Colorante azul de tripano	Sigma T-6146
MTT 3-(4,5 dimetiltiazol-2) 2,5 bromuro de difeniltetrazolio	Sigma M-2128
Dimetilsulfóxido	Sigma D-2650
Sulfuroclamina B	Sigma Tox-6
Etanol absoluto	Merck

2.1.6 Equipo general

Invertoscopio IM 35 Carl Zeiss

Lector de placas HTS-7000 Perkin Elmer

Incubadora con temperatura y humedad controlada Precision

Campana de flujo laminar Vector

Pipeteador automático Sigma P5925

Cámara de Neubauer

2.2 MÉTODOS

2.2.1 Líneas celulares

2.2.1.1 Criterios de selección

- Líneas celulares sensibles a la PA1 (11,12).
- Fibroblastos murinos L-929, por su respuesta proliferativa hacia el TNF.
- La línea celular de adenocarcinoma de mama BT-20 presenta sensibilidad espontánea hacia el TNF.
- Carcinoma de cérvix representa una de las enfermedades más frecuentes en la población femenina en México. Actualmente pacientes con diagnóstico de carcinoma cérvico-uterino recurrente se encuentran en estudio de fase clínica I con PA1.

Estas líneas celulares presentan las siguientes características:

- a) Adaptabilidad para crecer en medio sencillo y común (Minimum essential medium Eagle (MEM) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB)).
- b) Duplicación de masa celular que permite colectar mínimo 2×10^6 células/mL, dos veces por semana.
- c) Adaptabilidad para utilizarse en microcultivos.
- d) Capacidad de todas las líneas celulares de formar monocapa.

Una vez estabilizadas las líneas celulares, se mantiene en número mínimo de pasajes (no superior a diez), con el fin de conservar sus características de crecimiento, morfología y dosis-respuesta.

Las células se fraccionan en alícuotas de 1×10^6 células, y se conservan en nitrógeno líquido hasta su empleo.

2.2.1.2 Mantenimiento de las líneas celulares

En el mantenimiento de las líneas celulares se consideró lo siguiente:

- a) Requerimiento celular continuo de 2×10^6 células dos veces por semana.
- b) Cambio de medio de cultivo, según la densidad celular.
- c) Posibilidad de contaminación microbiana; para ello se monitorearon continuamente las líneas celulares para observar su comportamiento de crecimiento y apariencia microscópica.
- d) Además se mantuvo un número limitado de pasajes (no superior a diez) para evitar envejecimiento celular.

Las células se cultivaron rutinariamente en monocapa en frascos de cultivo T25, con MEM y SFB (9:1), sin antibiótico a 37°C con una atmósfera de CO_2 al 5% y 100% de humedad relativa.

Para prevenir la contaminación de todo el cultivo, a la mitad de los frascos se le realizó el cambio de medio de cultivo los lunes y los jueves; y a la otra mitad los martes y viernes.

A cada línea celular se le midió la densidad de siembra, la cual debe ser superior a 2×10^6 células, lo cual proporciona un 70–90% de confluencia después de 7 días de mantenimiento o después de 4 ó 5 días del ensayo; esta densidad se utilizó dos veces a la semana para mantener las células en cultivo rutinario y para evaluar la actividad de los medicamentos.

2.2.1.3 Preparación e inoculación de las células

Todas las células en monocapa se separaron de los frascos de cultivo adicionando 1 mL de tripsina al 0.25% y manteniéndolas a 37°C por no más de 15 minutos, la tripsina se inactivó con el SFB previamente añadido al medio de cultivo MFEM.

Las células se separaron entre sí, mediante un suave y repetido pipeteo y posteriormente se contaron en la cámara de Neubauer.

Ulterior al conteo se realizaron las diluciones necesarias para obtener una suspensión celular de 5×10^4 células/mL, las células se inocularon en una placa de 96 pozos en un volumen de 100 μ L /pozo, es decir 5,000 células.

De diez a doce pozos con células no se expusieron a los medicamentos ya que se utilizaron de control, a otros cuatro pozos se les adicionó una alícuota de 100 μ L de medio, los cuales se consideraron como blanco sin medicamento y finalmente se sembraron dos pozos con medio de cultivo y las diferentes dosis de o los agentes en estudio, estos pozos se consideraron como blancos con medicamento.

Las placas se preincubaron por 24h, a las condiciones de temperatura y presión mencionadas, para permitir su estabilización antes de adicionar los medicamentos.

2.2.2 Antineoplásicos (Solubilización y dilución)

2.2.2.1 Peroxisomicina A1

Para la evaluación de la PA1, se probaron 10 diluciones seriadas; se empleó una escala geométrica base dos (11), se utilizó como concentración máxima de 40µg/mL (7.78×10^{-5} M) y como concentración mínima de 0.07µg/mL (1.36×10^{-7} M).

La PA1 se disolvió en etanol absoluto; estudios preliminares mostraron que la cantidad de solvente utilizada (<1% del volumen total) no altera la viabilidad celular (11). Las diluciones se prepararon con medio de cultivo MEM.

2.2.2.2 Factor de necrosis tumoral alfa

Al TNF, se le fraccionó y conservó en congelación a -20°C , hasta su requerimiento. Posteriormente, cada alícuota se aforó con medio de cultivo a 1 mL, para preparar las diluciones. Las concentraciones empleadas para evaluar el daño celular fueron las siguientes: 1, 5, 10, y 160 ng/mL, estas concentraciones se seleccionaron con base en la respuesta de algunas líneas celulares reportada por Fransen y cols. (26) y Ruid y cols. (27).

2.2.2.3 Actinomicina D, Mitomicina C y 5-Fluorouracilo

La Act-D, Mit y 5FU son solubles en medio acuoso, se añadieron al medio de cultivo y se prepararon justo antes de cada experimento.

Una solución de Act-D de 1 µg/mL se preparó para la sensibilización de las líneas celulares en estudio.

Para la Mit se prepararon ocho soluciones seriadas en escala geométrica base dos, se utilizó como concentración máxima 100µg/mL y como concentración mínima de 0.78µg/mL.

Para el SFU se prepararon ocho soluciones seriadas en escala geométrica base dos, como concentración máxima se emplearon 500µg/ml. y una concentración mínima de 3.90µg/mL.

Con la finalidad de establecer las concentraciones inhibitorias 50% con el método de MTT, las líneas celulares se expusieron a las concentraciones de Mit y SFU ya mencionadas por un periodo de 48h.

2.2.2.4 Exposición concurrente de PAI+TNF

Para buscar el efecto de la interacción de los compuestos en las distintas líneas celulares, se seleccionó la concentración de PAI que produjo el 50% de daño y la concentración inmediata inferior para cada línea celular, las cuales se mezclaron con 1, 5, 10 y 160 ng/mL de TNF, se sembraron cuatro pozos de cada combinación, cada ensayo se realizó por triplicado en cada una de las pruebas de citotoxicidad.

2.2.2.5 Pretratamiento con Actinomicina D

Adicionalmente las líneas celulares se sensibilizaron utilizando el inhibidor de síntesis de proteínas; Actinomicina D. La previa exposición a este compuesto a una concentración de 1µg/mL permite que células normales y neoplásicas respondan al TNF (26). La exposición se llevó a cabo en dos periodos, uno corto de 1h y otro prolongado de 24h. El medio de cultivo se retiró al terminar el tiempo de exposición y se añadió la PAI y la combinación PAI+TNF.

2.2.2.6 Exposición concurrente PA1+Mit y PA1+5FU

La finalidad de este experimento fue determinar la posible interacción entre la PA1 y los antineoplásicos Mit y 5FU, para ello se determinaron las CI50 de ambos compuestos en cinco líneas celulares.

La CI50 de la Mit y la CI50 de la PA1 de cada una de las líneas celulares en estudio fueron combinadas para evaluar el efecto de los compuestos. De la misma manera se realizó para la PA1+5FU.

Se sembraron cuatro pozos de cada combinación y cada ensayo se realizó por triplicado para cada una de las pruebas de citotoxicidad.

2.2.3 Incubación

Inmediatamente después de la preparación de las diluciones se añadieron al cultivo, alícuotas de 100 μ L de cada dilución en cada pozo de la placa, la distribución de ésta se ajustó de acuerdo al o los agentes a evaluar, en la figura 6 se muestra un ejemplo.

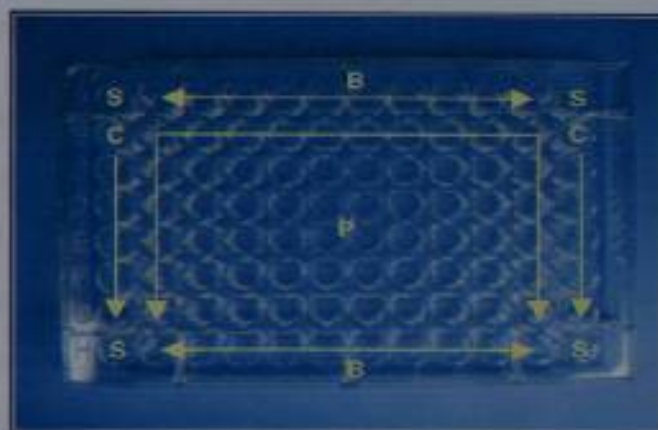


Figura 6

Ejemplo de la distribución de una placa de 96 pozos.
Controles = C, Blanco con medicamento = B, Blanco sin medicamento = S y Probando = P

Como los pozos ya contenían las células en 100 μ L de medio de cultivo, la concentración final, fue la mitad de la dilución.

El tiempo de incubación con el medicamento fue de 48h a 37°C con una atmósfera de CO₂ al 5% y 100% de humedad relativa.

Al finalizar el periodo de incubación, las placas se observaron en el invertoscopio para evaluar la morfología celular, la corroboración de los efectos citotóxicos se realizó con las pruebas de Azul de tripano, MTT y SRB; para lo cual se sembraron 3 placas idénticas para cada una de las pruebas a las condiciones anteriormente mencionadas.

2.2.4 Evaluación de la citotoxicidad

2.2.4.1 Evaluación morfológica

La viabilidad celular se determinó 48h después de la adición del o los compuestos, mediante revisión en el invertoscopio. Como criterio de citotoxicidad se empleó el desprendimiento, encogimiento celular y condensación del citoplasma.

2.2.4.2 Prueba de exclusión de colorante (Azul de Tripano)

El Azul de Tripano es uno de los colorantes más empleados para evaluar la viabilidad celular, el fundamento del método descrito por Tolnai (39), se basa en que ciertos colorantes no penetran en células vivas, mientras que las células muertas si los captan, por tanto la visualización de la morfología celular se facilita considerablemente.

Para ello, se transfirió con una pipeta Pasteur una pequeña cantidad de la suspensión celular mezclada con el colorante azul de tripano, a la cámara de Neubauer con el cubreobjetos previamente colocado, luego se llenaron ambas cámaras por capilaridad.

Se contaron todas las células del cuadro central, y las ubicadas en los 4 cuadros laterales de 1 mm^2 . Las células no viables, se tiñen de azul y las viables no lo hacen. Se contaron por separado las células viables y las no viables; posteriormente se repitió lo mencionado para la segunda cámara. Cuando más del 10% de las células se encontró en grumos se repitió el procedimiento, las células fueron dispersadas mediante un pipeteo suave y repetido.

2.2.4.3 Prueba de MTT

3-(4,5 Dimetil-tiazol-2) 2, 5 bromuro de difeniltetrazolio)

La prueba de MTT descrita por Mosmann (39) está basada en la reducción del bromuro de 2,5 difeniltetrazolio. Este compuesto es una sal hidrosoluble, que da color amarillo en el medio de cultivo o en soluciones salinas que no contengan rojo fenol. El MTT disuelto es convertido a un formazan de color púrpura insoluble por división del anillo tetrazólico; por las deshidrogenasas mitocondriales. La producción de formazan es directamente proporcional a la viabilidad y sobrevida celular; el compuesto se solubiliza con isopropanol, dimetil sulfóxido (DMSO) u otros solventes. La cantidad del material disuelto se mide en el espectrofotómetro, con la absorbancia en función de la concentración del colorante convertido (39,40).

En este trabajo se realizó una modificación del ensayo colorimétrico original (41); se añadió directamente una alícuota de 50 μ L de MTT (1 mg/ml) en medio de cultivo sin suero fetal bovino o glutamina a todos los pozos (probandos, controles y blancos); el cultivo se incubó por 4 horas para que el MTT se metabolizara a formazan, posteriormente el sobrenadante se aspiró y se le añadieron 150 μ L de DMSO para disolver el formazan; las placas se agitaron lenta y cuidadosamente finalmente, se leyó la absorbancia en el lector de placas a una longitud de onda de 540 nm.

2.2.4.4 Prueba de Sulfurodamina B

La determinación del crecimiento celular se realizó mediante la tinción con Sulfurodamina B, el cual se une a los aminoácidos básicos de las macromoléculas celulares, el compuesto se solubilizó y se leyó espectrofotométricamente para obtener la concentración total de las proteínas presentes (42).

Los cultivos de células adheridas (5000 células/pozo) se fijaron *in situ* con 50 μ L de ácido tricloroacético (ATC) frío al 50% y se incubaron durante 60 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó y las placas se lavaron con agua desionizada y se secaron a temperatura del cuarto. Posteriormente se añadió a cada pozo 100 μ L de sulfurodamina B al 0.4% en ácido acético al 1%, se incubaron por 10 minutos a 25°C; la SRB libre se removió mediante 5 lavados con ácido acético al 1%, después las placas se secaron al aire; el colorante fijado se disolvió con buffer tris, y se leyó la absorbancia a una longitud de onda de 570 nm.

2.2.5 EVALUACIÓN DE LOS DATOS

2.2.5.1 Morfológica

La escala de evaluación visual empleada en este método fue la siguiente: (1) indica 25% de daño celular, (++) 50% de daño, (+++) 75% de daño y (++++) 100% de daño celular, se consideró como daño celular el desprendimiento, encogimiento celular y condensación del citoplasma.

La concentración de los pozos que mostró daño celular total se consideró como la *Concentración tóxica máxima (C_{max})*, mientras que la concentración donde las células formaron monocapa parecida al control se consideró como la *Concentración tóxica mínima (C_{min})*.

La concentración tóxica 50% (CTS₅₀) de las células normales y malignas se calculó de acuerdo al Método de Ekwall (43), que consiste en la media geométrica de la concentración citotóxica total y la concentración máxima no tóxica probada.

2.2.5.2 Exclusión de colorante (Azul de tripano)

Para obtener los valores de viabilidad se empleó el siguiente cociente:

$$\text{Viabilidad celular (\%)} = \frac{\text{total de las células viables (no teñidas)}}{\text{total de las células (teñidas o no)}} \times 100$$

2.2.5.3 Prueba de MTT

Los valores de absorbancia de cada placa se registraron para obtener el siguiente cociente: la absorbancia de fondo medida (medio de cultivo), se restó del valor control (medio + células) y las mediciones del medicamento blanco (medio de cultivo + agente (s) - células) se sustrajeron de los valores de prueba (medio + células + agente (s)), finalmente se calcularon

los valores promedio y su desviación estándar, los datos se expresan como % de P/C (Probando/Control) (40).

$$\frac{\text{Absorbancia de células probadas}}{\text{Absorbancia de células control}} \times 100$$

Lo que expresó la viabilidad celular y la sobrevida en presencia de los medicamentos.

También se realizaron los cálculos para la concentración del agente probado que da un valor de P/C del 50% y 48h después en ausencia de los compuestos para evaluar sobrevida.

Adicionalmente se calcularon las líneas de correlación para cada una de las líneas celulares expuestas a la PA1 por 48h, esta línea de bondad y ajuste responde al modelo matemático de la recta de mínimos cuadrados y se calculó en el rango de viabilidad entre 90 y 10%.

2.2.5.4 Prueba de Sulforodamina B

Con el ensayo de la sulforodamina B (42), se midió la absorbancia de la población celular (5000 células/pozo) al tiempo 0 (momento en el que se añadió el medicamento), adicionalmente se obtuvieron los valores de 2 placas de referencia de células inoculadas y fijadas con ácido tricloroacético, antes de agregar el medicamento.

Así se obtuvieron tres medidas: absorbancia del control (C), absorbancia del probando (P) y absorbancia en el tiempo cero (T0).

El efecto medido de los compuestos sobre una línea celular se calculó de acuerdo a las siguientes expresiones:

Si P es mayor o igual que T0, el cálculo es:

$$100 \times [(P - T_0)/(C - T_0)]$$

Si P es menor que T₀, indica muerte celular y puede calcularse:

$$100 \times [(P - T_0)/T_0]$$

Así para cada combinación medicamento-línea celular, se produce una curva dosis-respuesta y es posible calcular tres niveles de efecto.

La inhibición de crecimiento 50 (GI50) se calculó a partir de:

$100 \times [(P - T_0)/(C - T_0)] - 50$, donde la concentración del medicamento produjo una reducción del 50% en el incremento proteico neto en las células control durante la incubación del medicamento.

El cálculo de la inhibición del crecimiento por efecto del medicamento, se calculó de $P = T_0$, donde la cantidad de proteína al final de la incubación del medicamento fue igual a la cantidad presente al inicio.

El cálculo para concentración letal 50% (LC50) que es la concentración de medicamento que produjo una reducción del 50% en las proteínas medidas al final de la incubación del medicamento, comparándolo con el valor del inicio de la inoculación, e indicó pérdida neta de las células seguidas en el ensayo.

La LC50 se calcula de:

$$100 \times [(P - T_0)/T_0] = -50$$

2.2.5.5 Prueba de ANOVA

Se utilizó una prueba de ANOVA para evaluar los resultados obtenidos con los métodos de azul de tripano, MTT y SRB y determinar similitudes

entre los pozos con células tratadas con iguales concentraciones de los agentes tanto en la misma placa como en las placas similares.

2.2.6 Definición de la interacción

Para este fin se empleó el método descrito por Morris Bermanbaum (3), el cual permite analizar las relaciones dosis-efecto entre los agentes probados en una combinación; dicha combinación es aquella que produce una inhibición del crecimiento en el 50% de la población celular. Este método también examina la cuantificación de los efectos y permite definir la existencia y clase de interacción de los compuestos en estudio.

El autor propone la existencia de un punto de referencia contra el cual el efecto observado puede ser juzgado, a este punto de referencia se le conoce con el nombre de efecto esperado o efecto calculado, el cual se determina mediante el *criterio multiplicativo*, éste se obtiene del producto de la multiplicación del efecto de dos agentes probados de manera independiente a una dosis determinada. Este criterio se basa en modelos biológicos y se emplea extensamente en la investigación del cáncer.

Una vez obtenidos el efecto esperado y el efecto observado, los datos fueron analizados mediante las siguientes herramientas estadísticas: para verificar la condición de normalidad la prueba Kolmogorov-Smirnov (44), una prueba de Cochran para comparar las varianzas y aplicación de la prueba de comparaciones múltiples LSD (mínima diferencia estadísticamente significativa). El nivel de significancia o valor de p requerido para establecer que no hay diferencias fue de 0.05.

Otro criterio empleado en la determinación del tipo de interacción entre los compuestos fue el *Índice de combinación* (1,46), el cual expresa la relación entre las dosis de los agentes que producen un efecto específico, para este estudio se empleó la concentración inhibitoria 50 (CI50) obtenidas para cada una de las líneas celulares estudiadas y las dosis en una combinación que presentaron el 50% de inhibición del crecimiento celular.

Criterios para definir el tipo de interacción:

Un índice de combinación <0.90 se consideró como interacción positiva o potenciación.

Si el resultado del índice de combinación se encontró entre 0.90 y 1.10 se consideró interacción cero o sumación.

Si por el contrario, el resultado fue >1.10 se definió como interacción negativa o antagonismo.

CAPÍTULO TRES

RESULTADOS

3.1 EVALUACIÓN MORFOLÓGICA

3.1.1 Exposición a Peroxisomicina A1 por 48h

Las células de hígado de Chang, colon y fibroblastos no presentaron cambios morfológicos en las primeras cuatro dosis (0.07-0.6 μ g/mL), en tanto que las células de hepatoma, hepatoblastoma, adenoCa. de mama y Ca. de cérvix mostraron encogimiento celular, condensación del citoplasma y desprendimiento del sustrato a partir de 0.15 μ g/mL (dosis 2).

La exposición a 2.5 μ g/mL (dosis 6) produjo en las células neoplásicas de hepatoma, hepatoblastoma, adenoCa. de colon, melanoma y Ca. de cérvix daño mayor o igual al 50%, en cambio las células benignas y la neoplásica de mama únicamente presentaron alteraciones en el 25% de la población.

A la dosis de 10 μ g/mL (dosis 8) todas las células en estudio presentaron daño mayor o igual del 50%. En la tabla 2a se muestra la evaluación de la morfología de las líneas celulares expuestas a PA1 por 48h y en la tabla 2b se aprecian las concentraciones máximas, cincuenta y mínimas.

<i>Línea celular</i>	Dosis ($\mu\text{g/mL}$)									
	0.07	0.15	0.3	0.6	1.25	2.5	5.0	10	20	40
Hígado de Chong	-	-	-	-	-	+	++	++	+++	+++
Hepatoma	-	+	+	++	++	+++	+++	++++	++++	++++
Hepatoblastoma	-	+	++	++	+++	+++	+++	++++	++++	++++
Colon	-	-	-	-	+	+	++	++	+++	+++
AdenoCa. colon	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Fibroblastos	-	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++
AdenoCa. mama	-	+	+	+	+	+	+	++	+++	+++
Melanoma	-	-	-	-	+	++	+++	+++	+++	+++
Ca. de cérvix	-	+	+	+	+	++	++	+++	+++	+++

Tabla 2a

Evaluación morfológica de líneas celulares expuestas a PA1 por 48h.
 Porcentaje de daño: (-) 0%, (+) 25%, (++) 50%, (+++) 75%, (++++) 100%.

<i>Línea Celular</i>	Concentración $\mu\text{g/mL}$		
	CT _{max}	CT ₅₀	CT _{min}
Hígado de Chong	40	7.07	1.25
Hepatoma	10	0.88	0.07
Hepatoblastoma	10	0.88	0.07
Colon	40	4.89	0.6
AdenoCa. de colon	10	0.88	0.15
Fibroblastos	40	7.07	1.25
AdenoCa. de mama	40	14.14	0.07
Melanoma	10	2.44	0.6
Ca. de cérvix	20	1.18	0.07

Tabla 2b

Concentraciones máximas, cincuenta y mínimas de PA1 en líneas celulares expuestas al compuesto por 48h.

3.1.2 Exposición a TNF

Todas las líneas celulares excepto adenoCa. de mama presentaron morfología similar al control, a la dosis de 10 ng/ml. las células neoplásicas de mama mostraron alteraciones en el 50% de la población.

En la tabla 3 se muestran los resultados obtenidos y se indica con rojo el daño observado para las células de adenoCa. de mama.

Línea celular	Dosis ng/ mL.			
	1	5	10	160
Hígado de Chang	-	-	-	-
Hepatoma	-	-	-	-
Hepatoblastoma	-	-	-	-
Colon	-	-	-	-
AdenoCa. de colon	-	-	-	-
Fibroblastos	-	-	-	-
AdenoCa. de mama	-	+	++	+++
Melanoma	-	-	-	-
Ca. de cervix	-	-	-	-

Tabla 3

Evaluación morfológica de líneas celulares expuestas a TNF por 48h.
Porcentaje de daño: (-) 0%, (+) 25%, (++) 50%, (+++) 75%, (++++) 100%.

3.1.3 Exposición a PA1 y TNF

En la tabla 4 se muestran los resultados de dos dosis de PA1 en combinación con 1, 5, 10 y 160 ng/ml. de TNF para cada línea celular expuesta por 48h, en rojo se indican las combinaciones que produjeron 100% de daño, para las células de adenoCa. de mama se observó en las combinaciones de 10µg/mL de PA1+10 y 160 ng/mL de TNF, en tanto que

para Ca. de cérvix en la combinación de 2.5 mg/mL de PAI y 160ng/mL de TNF.

Línea celular	PAI µg/ mL	TNF ng/ mL			
		1	5	10	160
Hígado de Chong	5.0	+	+	++	++
	10.0	++	++	++	++
Hepatoma	0.3	++	++	++	++
	0.6	++	+++	+++	+++
Hepatoblastoma	0.3	+	++	++	++
	0.6	++	++	+++	+++
Colon	5.0	++	++	++	++
	10.0	++	++	++	++
AdenoCa. de colon	0.3	+	++	++	++
	0.6	++	++	++	++
Fibroblasto	2.5	-	-	-	-
	5.0	++	++	++	+++
AdenoCa. de mama	5.0	++	++	++	++
	10.0	+++	+++	++++	++++
Melanocitos	1.25	+	+	+	+
	2.5	++	++	++	+++
Ca. de cervix	1.25	++	++	+++	+++
	2.5	++	+++	+++	+++

Tabla 4

Evaluación morfológica de líneas celulares expuestas a dos dosis de PAI en combinación con 1, 5, 10 y 160 ng/ml. de TNF por 48h.

Porcentaje de daño: (-) 0%, (+) 25%, (++) 50%, (+++) 75%, (++++) 100%.

Las dosis de PAI empleadas fueron aquellas que produjeron el 50% de daño y la dosis inmediata menor, para el TNF se emplearon las cuatro dosis seleccionadas para el estudio.

El tratamiento con la dosis menor de PAI presente en la combinación produjo en las líneas celulares a excepción de Ca. de cérvix encogimiento y desprendimiento del sustrato y menor o igual que los observados con la exposición de PAI.

Las dosis altas de PAI presentes en la combinación produjeron en las células de hígado de Chang, colon y adenoCa. de colon 50% de daño, en tanto que para el resto de las células se observó un incremento gradual del daño dependiente de la cantidad de TNF.

En las figuras 7A, 7B y 7C se muestran micrografías de las líneas celulares expuestas a la combinación PAI+TNF por 48h que produjo isoeffecto y sus respectivos controles, (factor de ampliación 320x).

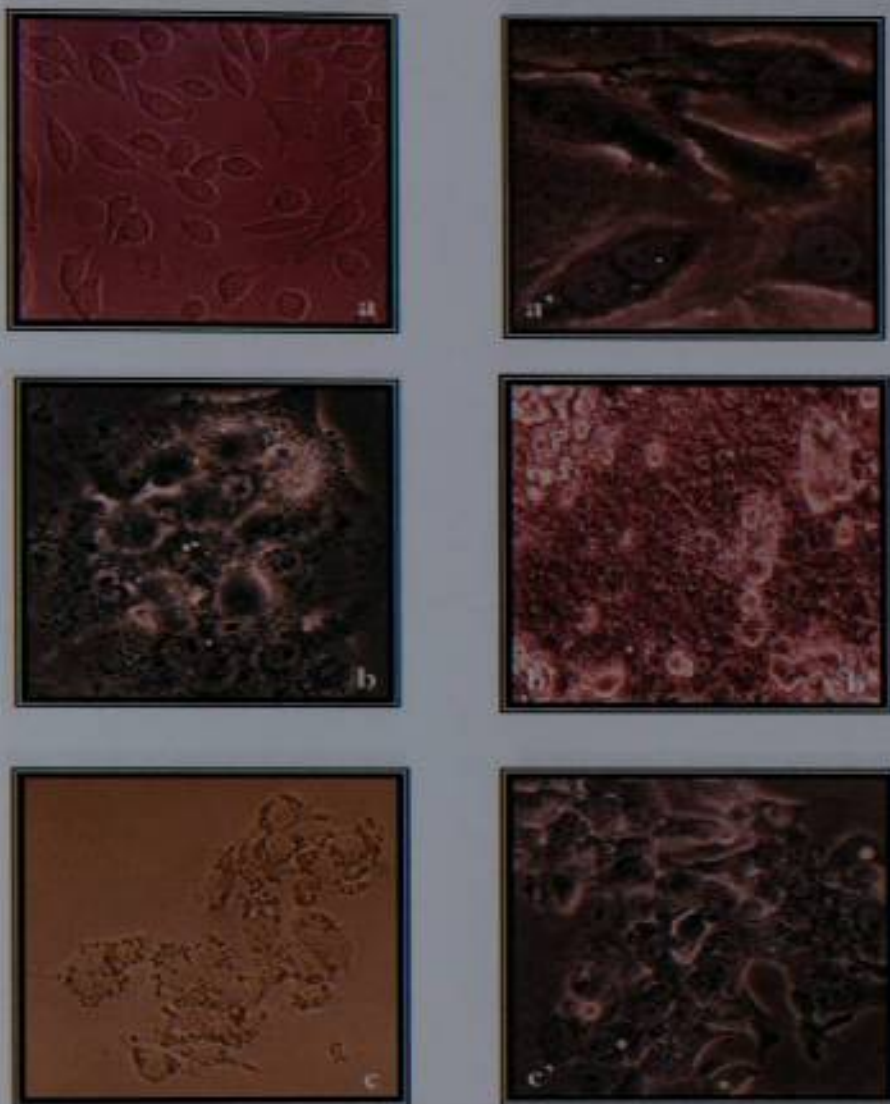


Figura 7A

Líneas celulares de hígado de Chang (a), hepatoma (b) y hepatoblastoma (c) expuestas a PAI + TNF por 48h, presentan disminución del tamaño, encogimiento celular y condensación del citoplasma. En (a' b' c') se muestran sus respectivos controles
 Factor de ampliación 320x

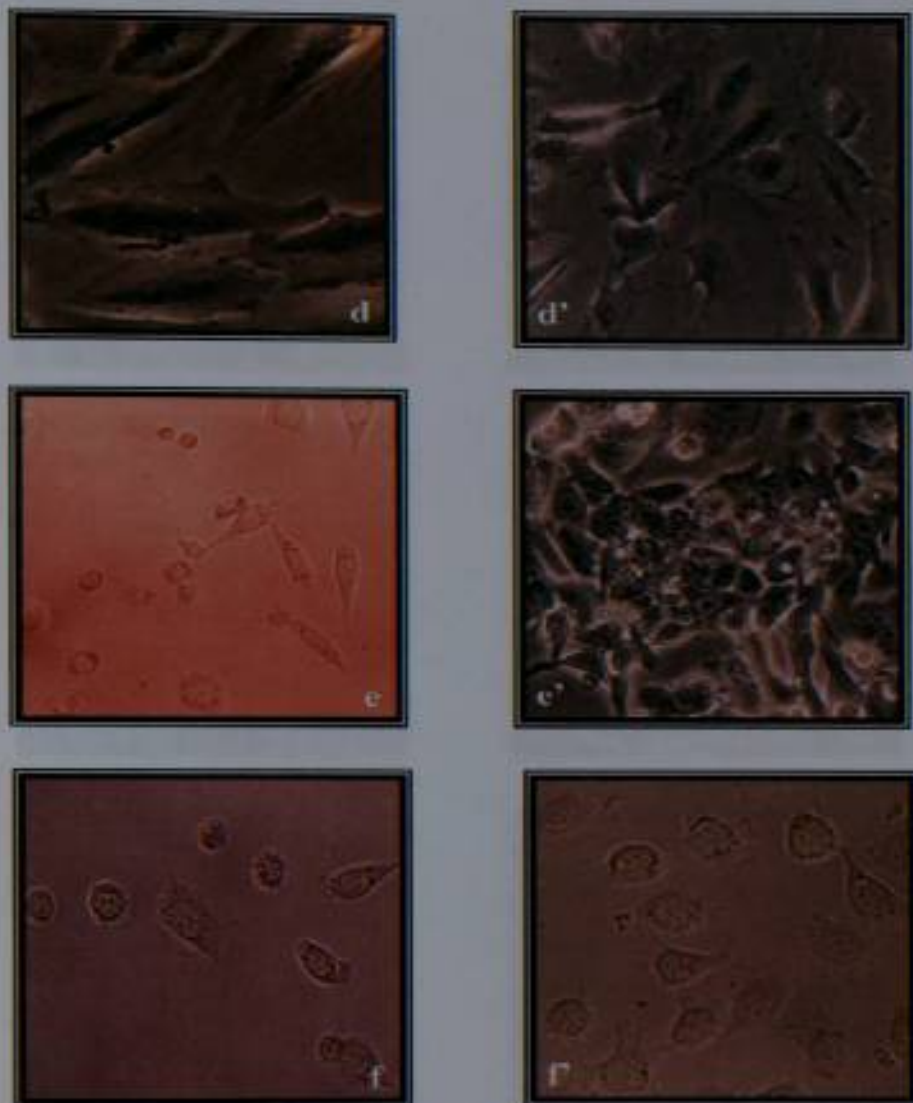


Figura 7B

Líneas celulares de colon (d), adenoCa. de colon (e) y fibroblastos (f) expuestas a PA1 + TNF por 48h, presentan disminución del tamaño, encogimiento celular y condensación del citoplasma. En (d'e'f') se muestran sus respectivos controles
 Factor de ampliación 320x

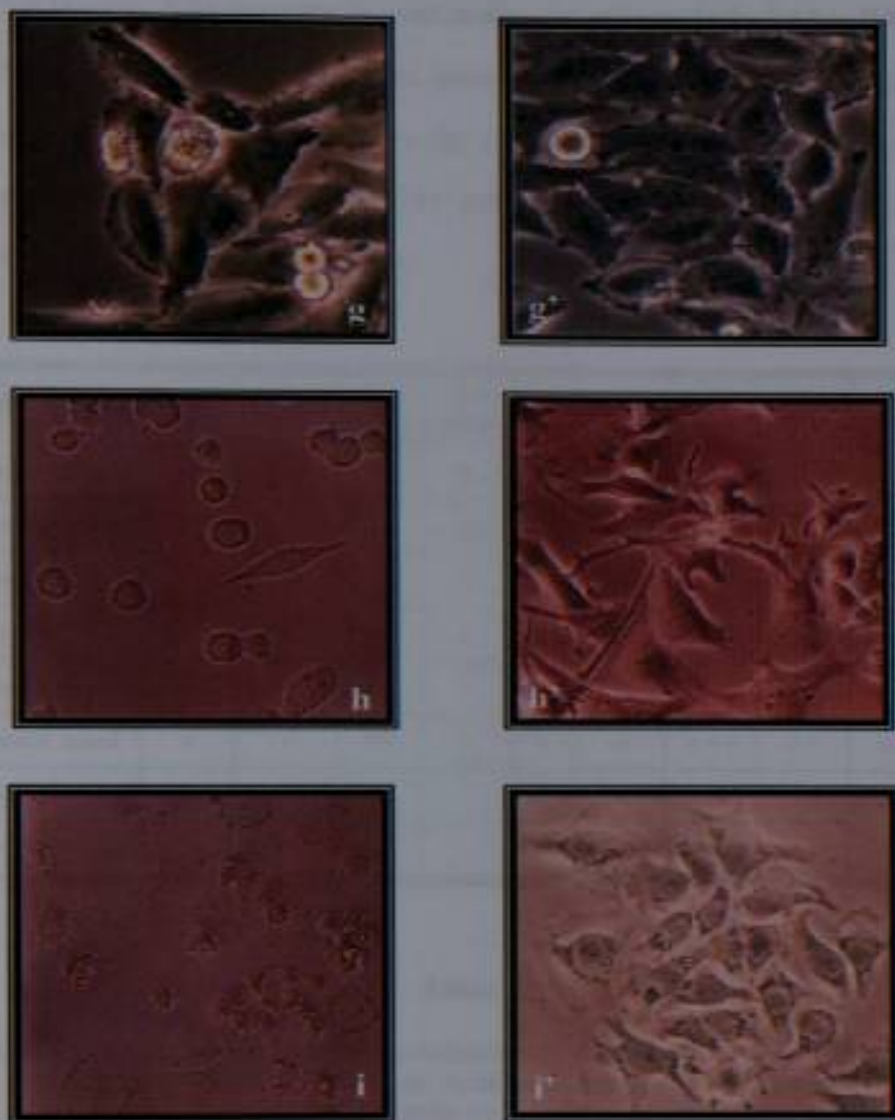


Figura 7C

Líneas celulares de adenoCa. de mama (g), melanoma (h) y Ca. de cérvix (i) expuestas a PAI + TNF por 48h, presentan disminución del tamaño, encogimiento celular y condensación del citoplasma. En (g'h'i') se muestran sus respectivos controles
 Factor de ampliación 320x

3.1.4 Pretratamiento con Actinomicina D

En la tabla 5 se muestra la evaluación del efecto de la PA1 y PA1+TNF en las diferentes líneas celulares previamente sensibilizadas con 1µg/ml. de Actinomicina D por periodos de 1 y 24h, en rojo se indican las células expuestas a PA1 y/o PA1+TNF sensibilizadas con Act-D que presentaron daño en el total de las células.

Línea celular	Act-D ^{1h} 1µg/ml.	Act-D ^{24h} 1µg/ml.	PA1 µg/ml.	TNF ng/ml.	PA1 ^{1h}	PA1 ^{24h}	PA1 ^{24h}	PA1+ TNF ^{1h}	PA1+ TNF ^{24h}	PA1+ TNF ^{24h}
Hígado de Chang	+	+++	10	5	++	++	+++	++	+++	+++
Hepatoblastoma	+	+	0.3	160	+	++	++	++	+++	+++
Colon	+	++	10	5	++	++	+++	++	+++	+++
AdenoCa. colon	++	++	0.6	5	++	+	++	++	+++	+++
Fibroblastos	+	+++	5.0	1	++	+++	+++	++	+++	+++
AdenoCa. mama	+	+	5.0	5	+	++	+++	++	++	+++
Melanomas	++	+++	2.5	1	++	+++	+++	++	+++	+++
Ca. de cérvix	++	+++	1.25	1	+	+++	+++	++	+++	+++

Tabla 5

Evaluación morfológica de líneas celulares expuestas a PA1 y PA1+TNF por 48h presensibilizadas con 1µg/mL de Actinomicina D por 1h (*) y 24h (**).
Porcentaje de daño: (-) 0%, (+) 25%, (++) 50%, (+++) 75%, (++++) 100%.

Todas las líneas celulares fueron sensibles a la Act-D, las células de Ca. de cérvix presentaron toxicidad del 100% con el tratamiento de 24h.

Las células de hígado de Chang, hepatoblastoma, colon y adenoCa. de colon sensibilizadas con 1µg/ml. de Act-D por 1h y expuestas

posteriormente a la PA1 por 48h presentaron el mismo daño que las células no sensibilizadas, sin embargo el tratamiento con Act-D por 24h produjo en las dos líneas benignas daño de hasta un 75%, lo cual no ocurrió en las neoplásicas de hepatoblastoma y adenoCa. de colon.

Para fibroblastos, melanoma, Ca. de cérvix y adenoCa. de mama se observó que el daño celular se incrementó un 50% con la sensibilización de 1h, en cambio con la sensibilización de 24h presentaron 100% de daño las tres primeras líneas mencionadas.

Por otra parte, en las combinaciones de PA1+TNF se observó que la sensibilización con Act-D a una dosis de 1µg/mL, aumentó el daño en todas las líneas celulares. Fibroblastos y melanoma presentaron alteraciones en el 100% de las células con el tratamiento de 1h, en tanto que hígado de Chang, hepatoblastoma, melanoma y Ca. de cérvix lo presentaron con la sensibilización de 24h.

3.1.5 Efecto de la PA1 con otros antineoplásicos

3.1.5.1 Efecto de la administración combinada de PA1 + Mitomicina

La adición combinada de los compuestos produjo en las células de hepatoblastoma, colon y adenoCa. de colon desprendimiento y encogimiento celular en la totalidad de la población, en las células de hígado de Chang y adenoCa. de mama se observó daño sólo en la mitad de las células.

Los resultados de la evaluación de las líneas celulares expuestas a PA1+Mit se observan en la tabla 6.

<u>Línea celular</u>	PA1	Mit	PA1	Mit	PA1 + Mit
	μg/mL				
Hígado de Chang	10.0	10.0	++	++	++
Hepatoblastoma	0.6	1.25	++	++	++++
Colon	10.0	50.0	++	++	++++
AdenoCa. de colon	0.6	5.0	++	++	++++
AdenoCa. de mama	10.0	5.0	++	++	++

Tabla 6

Evaluación morfológica de líneas celulares expuestas a PA1, Mit y PA1+Mit por 48h.

Porcentaje de daño: (-) 0%, (+) 25%, (++) 50%, (+++) 75%, (++++) 100%.

3.1.5.2 Efecto de la administración combinada de PA1 + 5-fluorouracilo

La combinación de PA1+5FU produjo en las líneas celulares estudiadas desprendimiento y encogimiento celular solo en el 50% de la población, lo cual se observó de manera similar en la exposición con solo uno de los compuestos. Tabla 7.

<u>Línea celular</u>	PA1	5FU	PA1	5FU	PA1 + 5FU
	μg/mL				
Hígado de Chang	10.0	100	++	++	++
Hepatoblastoma	0.6	125	++	++	++
Colon	10.0	500	++	++	++
AdenoCa. de colon	0.6	35	++	++	++
AdenoCa. de mama	10.0	500	++	++	++

Tabla 7

Evaluación morfológica de líneas celulares expuestas a PA1, 5FU y PA1+5FU por 48h.

Porcentaje de daño: (-) 0%, (+) 25%, (++) 50%, (+++) 75%, (++++) 100%.

3.2 EVALUACIÓN CON AZUL DE TRIPANO

La prueba de ANOVA realizada para evaluar la similitud entre células expuestas a cada concentración en particular del o los agentes en la misma placa y entre las placas mostró en términos generales valores de p (niveles de significancia) superiores a 0.05, con lo cual se asumió similitud entre los tratamientos.

3.2.1 Exposición a PA1

En la figura 8 se muestran las curvas dosis respuesta de las líneas celulares expuestas a la PA1 por 48h.

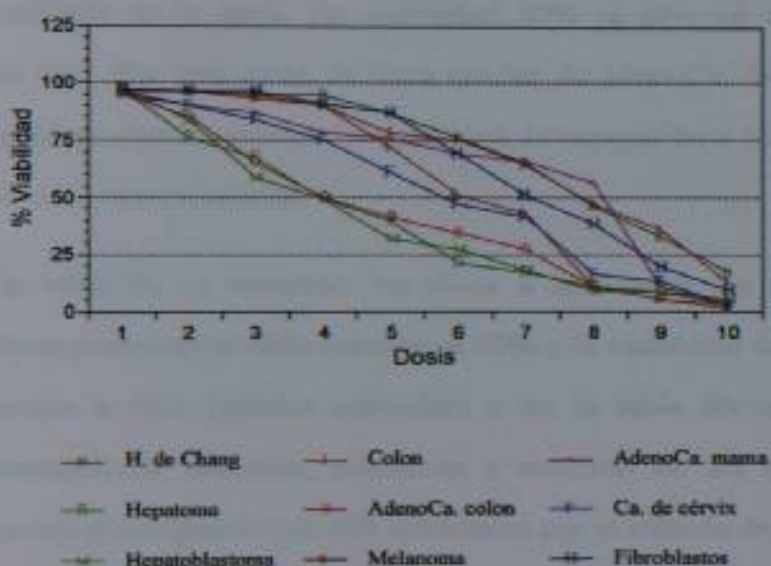


Figura 8
Viabilidad de líneas celulares expuestas a PA1 por 48h.
Prueba de azul de tripano

Las células benignas de hígado de Chang, colon y fibroblastos y la neoplásica de melanoma presentaron valores de viabilidad mayores del 85% en las primeras cuatro dosis (0.07-0.6 $\mu\text{g/mL}$), gradualmente el daño se incrementó encontrándose captación del colorante en el 50% de la población entre 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ (dosis 7 y 8) para el caso de las células benignas y en 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (dosis 6) para melanoma.

Las líneas neoplásicas de origen hepático y de colon presentaron una progresiva y abrupta disminución de la viabilidad celular del 50% con 0.6 $\mu\text{g/mL}$ (dosis 4).

Las células de Ca. de cérvix presentaron una disminución de la viabilidad dependiente de la dosis, [la viabilidad 50% se observó con 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (dosis 6)]. Por otra parte, la línea celular de adenoCa. de mama mostró una gradual disminución de la viabilidad, la exposición a 10 $\mu\text{g/mL}$ produjo un 55% de muerte celular.

En la tabla 8a se muestran las dosis a las cuales las distintas líneas celulares presentaron daño cercano al 50% y la viabilidad de las células no expuestas a PA1 (células controles) y en la tabla 8b se muestran las concentraciones máximas, cincuenta y mínimas de las líneas celulares expuestas al compuesto por 48h calculadas por el método de Ekwall (43).

<i>Línea Celular</i>	<i>Dosis µg/mL</i>	<i>% Viabilidad</i>	<i>% Viabilidad Control*</i>
Hígado de Chang	5.0	53.93	95.64
Colon	5.0	54.46	95.43
Fibroblastos	5.0	50.83	96.88
Hepatoma	0.6	49.67	97.09
Hepatoblastoma	0.6	48.96	96.65
AdenoCa. de colon	0.6	49.45	95.35
AdenoCa. de mama	10.0	55.59	96.03
Melanoma	2.5	51.41	96.63
Ca. de cérvix	2.5	47.20	95.23

Tabla 8a
Viabilidad de líneas celulares expuestas a Peroxisomicina A1 por 48h.
Prueba de azul de tripano

* Células no expuestas a Peroxisomicina A1

<i>Línea Celular</i>	<i>Concentración µg/ml.</i>		
	<i>CTmax</i>	<i>CT50</i>	<i>CTmin</i>
Hígado de Chang	40	7.07	1.25
Hepatoma	10	0.88	0.07
Hepatoblastoma	10	0.88	0.07
Colon	40	4.89	0.6
AdenoCa. de colon	10	0.88	0.15
Fibroblastos	40	7.07	1.25
AdenoCa. de mama	40	14.14	0.07
Melanoma	10	2.44	0.6
Ca. de cérvix	20	1.18	0.07

Tabla 8b
Concentraciones máximas, cincuenta y mínimas de PA1 en líneas celulares expuestas al
compuesto por 48h.
Azul de tripano

3.2.2 Efecto de la exposición a TNF

La viabilidad celular en todas las líneas estudiadas a excepción de adenoCa. de mama fue mayor del 85% con las cuatro dosis probadas, las células de adenoCa. de mama presentaron tras la exposición a 10 y 160 ng/mL, daño en un 54 y 49% de la población respectivamente.

3.2.3 Efecto de la administración combinada PA1 + TNF

En la tabla 9, se muestra la viabilidad de las líneas celulares expuestas a ocho combinaciones PA1+TNF y el de la exposición a PA1, en rojo se indica la combinación que produjo el 50% de viabilidad.

Línea celular	PA1 µg/mL	% V	TNF ng/mL. % V			
			+ 1	+ 5	+ 10	+ 160
Hígado de Cheng	5.0	65	70	77	67	63
	10.0	46	51	50	41	42
Hepatoma	0.3	59	62	49	44	40
	0.6	49	49	35	26	26
Hepatoblastoma	0.3	67	62	60	58	49
	0.6	49	47	45	37	19
Colon	5.0	64	73	70	70	69
	10.0	47	53	49	48	43
AdenoCa. de colon	0.3	65	66	57	56	56
	0.6	50	51	49	46	45
Fibroblastos	2.5	79	80	82	90	90
	5.0	51	50	50	43	38
AdenoCa. de mama	5.0	66	52	49	41	39
	10.0	51	32	25	10	8
Melanoma	1.25	72	75	75	73	69
	2.5	51	49	48	45	32
Ca. de cérvix	1.25	61	48	46	35	18
	2.5	47	43	31	19	5

Tabla 9

Viabilidad de líneas celulares expuestas a dos dosis de PA1 y ocho combinaciones de PA1+TNF por 48h.
Prueba de Azul de tripano

3.2.7 Efectos de PA1+TNF en células benignas y malignas

Las células benignas de hígado de Chang y colon expuestas a PA1+TNF no presentaron diferencias significativas con respecto a las células expuestas a PA1.

La viabilidad de las líneas celulares de hepatoma, hepatoblastoma, adenoCa. de colon y melanoma expuestas a PA1+TNF fue menor o igual que aquellas expuestas a PA1. En cambio, las células de adenoCa. de mama y Ca. de cérvix mostraron en todas las combinaciones valores menores a los observados con la exposición a PA1. La diferencia más marcada se localizó en las combinaciones con las dosis de 10 y 160 ng/mL de TNF.

En la figura 9 se muestra la captación del colorante azul de tripano por las células de melanoma.



Figura 9

Células de melanoma teñidas con azul de tripano, factor de ampliación 320x.

3.2.4 Pretratamiento con Actinomicina D

La viabilidad de las células sensibilizadas con Act-D (1 y 24h) y la ulterior exposición a PA1 y PA1+TNF se muestran en la tabla 10.

Línea celular	Act-D*	Act-D**	PA ₁ µg/ml	%V	PA1*	PA1**	PA ₁ + TNF	%V	PA ₁ + TNF*	PA ₁ + TNF**
	Total									
Hígado de Chang	57	31	10	46	47	18	10 + 5	50	27	31
Hepatoblastoma	63	61	0.3	67	48	45	0.3 + 160	49	35	8
Colon	65	45	10	47	51	24	10 + 5	49	20	17
AdenoCa. colon	48	51	0.6	50	46	41	0.6 + 5	49	24	14
Fibroblastos	62	33	5.0	51	39	12	5 + 1	50	9	5
AdenoCa. mama	60	58	5.0	66	47	26	5 + 5	49	40	18
Melanoma	55	21	2.5	51	27	13	2.5 + 1	49	14	9
Ca. de ovrío	52	20	1.25	61	35	17	1.25 + 5	48	13	6

Tabla 10

Viabilidad de líneas celulares expuestas a PA1, PA1+TNF por 48h y no sensibilizadas y sensibilizadas con 1µg/mL de Actinomicina D por 1h (*) y 24h (**).

Prueba de Anál de t-Student

Todas las líneas celulares respondieron al efecto tóxico de la Act-D.

Las células de hígado de Chang, colon y adenoCa. de colon expuestas a PA1 y presensibilizadas con Act-D por un periodo de 1h no mostraron diferencias con las no pretratadas, sin embargo la sensibilización por 24h disminuyó la viabilidad al 50% en las células benignas en tanto que la línea neoplásica de adenoCa. de colon se mantuvo igual.

Para fibroblastos, adenoCa. de mama, melanoma y Ca. de cérvix la sensibilización con Act-D en los dos periodos estudiados favoreció el efecto tóxico de la PA1.

Las líneas celulares expuestas a las combinaciones PA1+TNF que fueron previamente sensibilizadas con Act-D mostraron valores de viabilidad marcadamente disminuidos a excepción de adenCa. de mama.

Las células pretratadas con Act-D por 1h no mostraron diferencias con las células expuestas a PA1, en tanto que las sensibilizadas por 24h si presentaron una notoria disminución de la viabilidad.

3.2.5 Efecto de la exposición de la PA1 con otros antineoplásicos

3.2.5.1 Exposición a PA1 + Mitomicina C

Las dosis empleadas de PA1 y Mit fueron aquellas en las que se observó citotoxicidad en el 50% de la población, como se muestra en la tabla 11.

La combinación de ambos compuestos produjo en las células de hepatoblastoma, colon y adenoCa. de colon un decremento en la viabilidad de hasta un 70%, por otra parte las células de hígado de Chang y adenoCa. de mama no presentaron daño mayor que el observado con la administración de uno solo de los agentes.

<i>Línea celular</i>	PA1	Mit	PA1	Mit	PA1+Mit
	µg/ml.				
Hígado de Chang	10.0	10.0	46	57	53
Hepatoblastoma	0.6	1.25	49	53	7
Colon	20.0	50.0	47	48	12
AdenoCa. de colon	0.6	5.0	50	56	16
AdenoCa de mama	10.0	5.0	56	53	56

Tabla 11
Viabilidad de líneas celulares expuestas a PA1, Mit y PA1+Mit por 48h.
Prueba de Azul de tripano

3.3.5.2 Exposición a PA1 + 5-fluorouracilo

Las líneas celulares expuestas a la combinación PA1+5FU no mostraron en ninguno de los casos valores de viabilidad menores a los observados en la exposición de PA1 ó 5FU, como se observa en la tabla 12.

<i>Línea celular</i>	PA1	5FU	PA1	5FU	PA1+5FU
	µg/mL				
Hígado de Chang	10.0	100	46	52	43
Hepatoblastoma	0.6	125	49	48	46
Colon	10.0	500	47	53	54
AdenoCa. de colon	0.6	35	50	51	17
AdenoCa de mama	10.0	500	50	53	46

Tabla 12
Viabilidad de líneas celulares expuestas a PA1, 5FU y a la combinación de PA1+5FU por 48h.
Prueba de Azul de tripano

3.3 EVALUACIÓN CON MTT

La prueba de ANOVA realizada para evaluar la similitud entre células expuestas a cada concentración en particular del o los agentes en la misma placa y entre las placas mostró en términos generales valores de p (niveles de significancia) superiores a 0.05, con lo cual se asumió similitud de los tratamientos.

3.3.1 Efecto de la exposición a PAI

Las curvas dosis-respuesta construidas con los resultados obtenidos de este método se observan en la figura 10a.

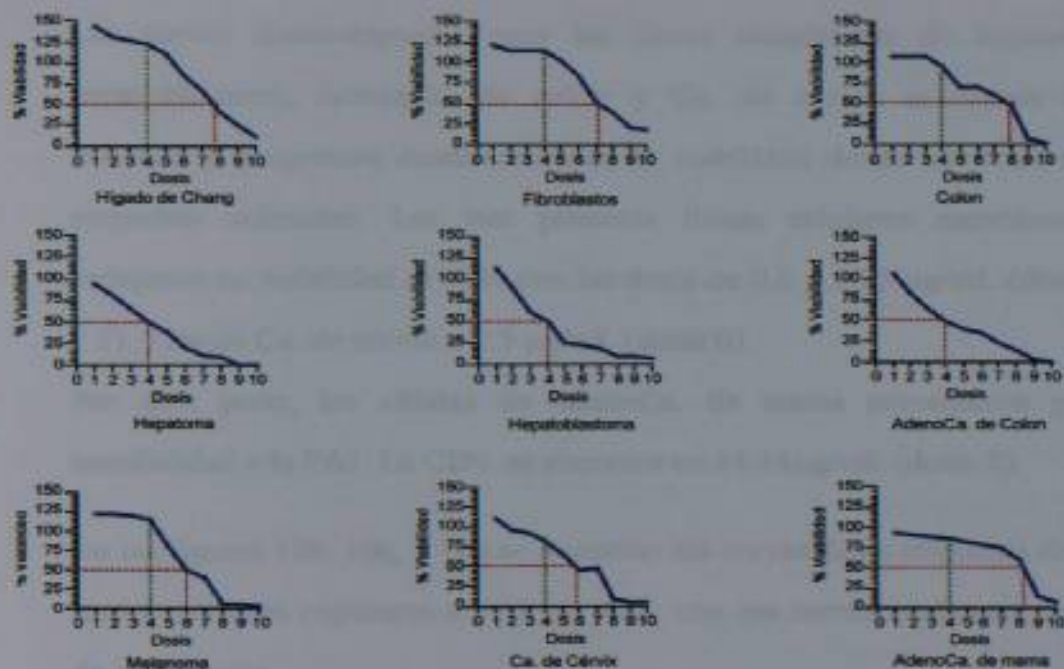


Figura 10a

Curvas dosis-respuesta de líneas celulares expuestas a Peroxisomicina A1 por 48h.

Las células de hígado de Chang, colon y fibroblastos presentaron una viabilidad celular mayor del 95% desde 0.07 a 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (dosis 1 a 4), posteriormente se observó una disminución progresiva relacionada con la cantidad de PA1 utilizada, encontrándose las concentraciones inhibitorias 50% (CI50) para las células de hígado de Chang y colon en 7.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y para las células de fibroblastos en 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Lo mismo ocurrió con las células de melanoma pero con una pendiente más pronunciada, se alcanzó la inhibición celular del 50% con 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (dosis 6).

Las curvas dosis-respuesta para las líneas neoplásicas de hepatoma, hepatoblastoma, AdenoCa. de colon y Ca. de cérvix mostraron una marcada y progresiva disminución de la viabilidad desde las dosis más pequeñas utilizadas. Las tres primeras líneas celulares mencionadas redujeron su viabilidad al 50% con las dosis de 0.6 y 1.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (dosis 4 y 5), y las de Ca. de cérvix a 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (dosis 6).

Por otra parte, las células de adenoCa. de mama presentaron poca sensibilidad a la PA1. La CI50 se encuentra en 14.14 $\mu\text{g}/\text{mL}$. (dosis 8).

En las figuras 10b, 10c, y 10d se muestran las curvas dosis respuesta de las líneas celulares expuestas a PA1 por 48h, con sus correspondientes líneas de correlación.

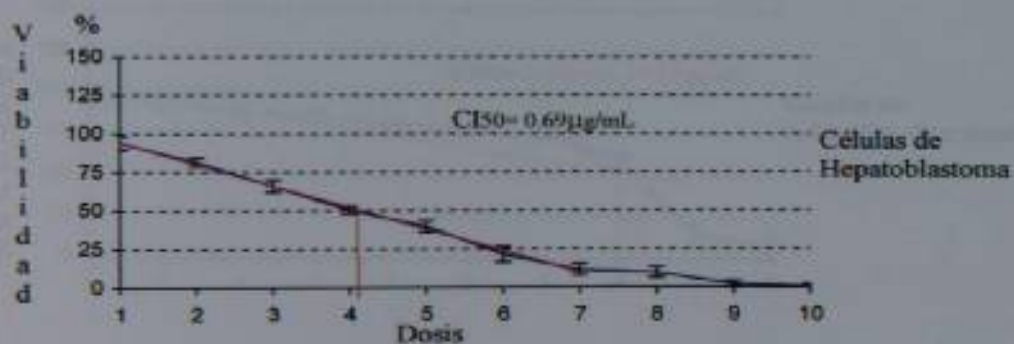
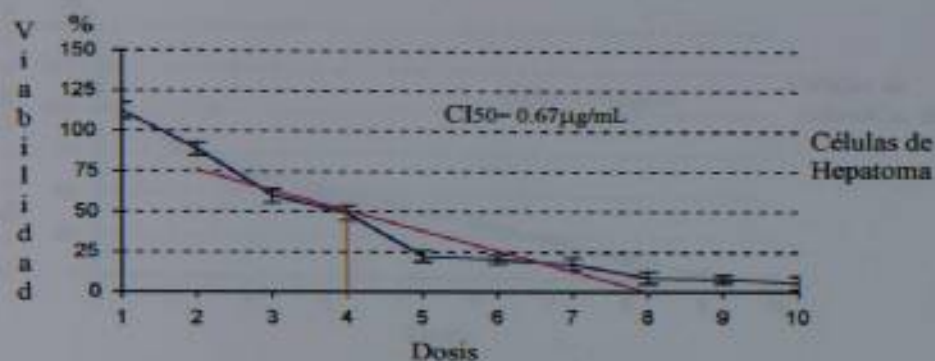
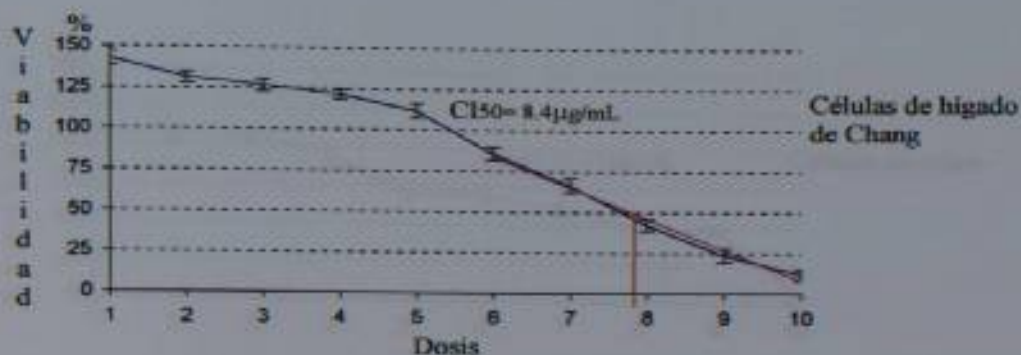


Figura 10b

Curvas dosis respuesta de líneas celulares expuestas a PA1 por 48h, con sus respectivas líneas de correlación obtenida por modelo matemático, la línea naranja indica la CI50, según la línea de tendencia.

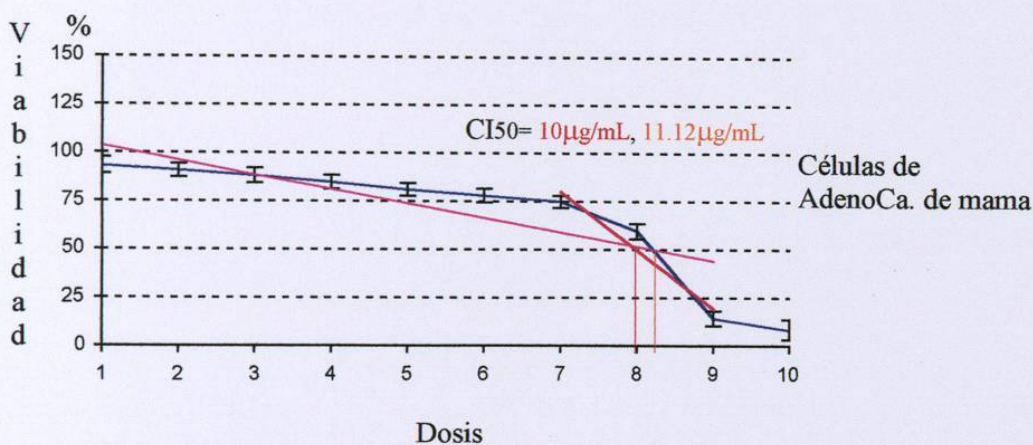
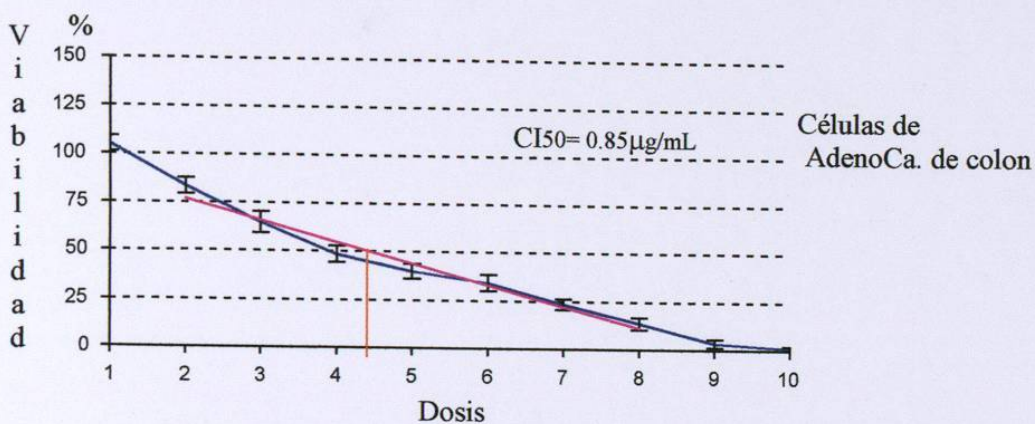
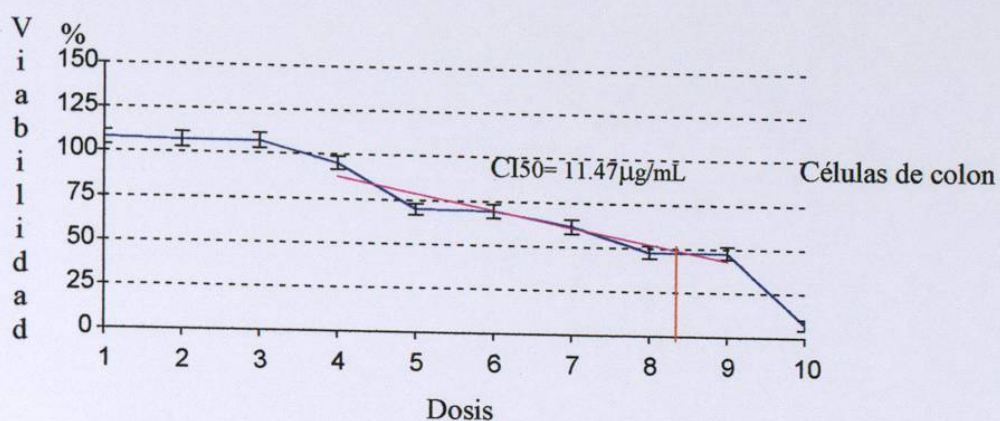


Figura 10c

Curvas dosis respuesta de líneas celulares expuestas a PA1 por 48h, con sus respectivas líneas de correlación obtenidas por modelo matemático, la línea naranja indica la CI50, según la línea de tendencia.

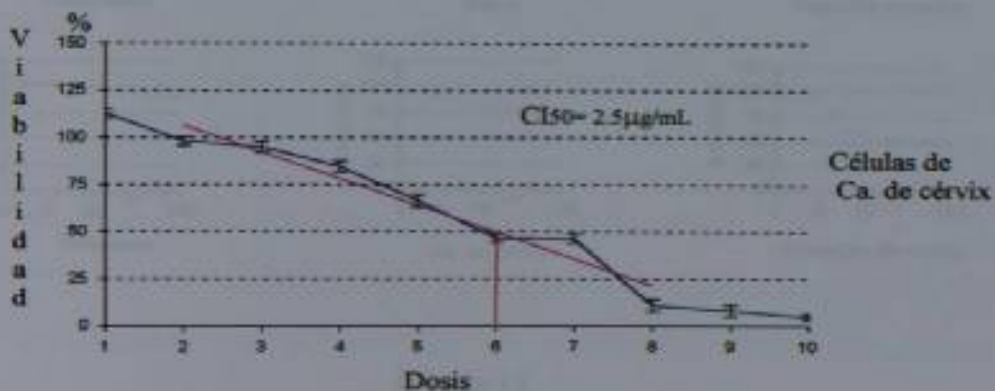
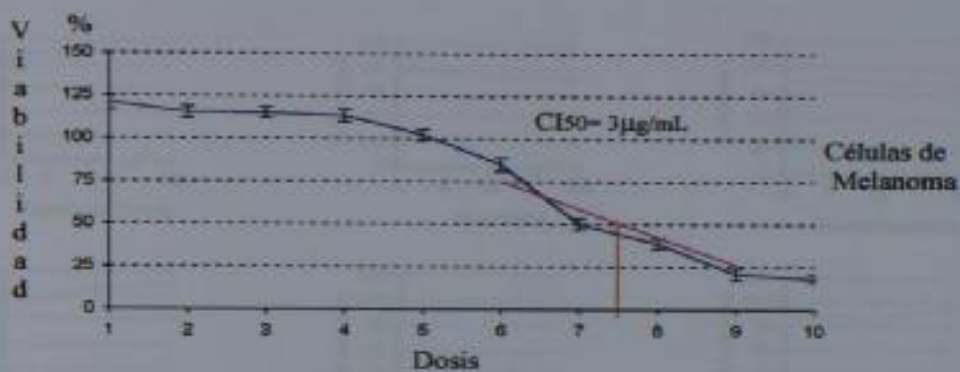
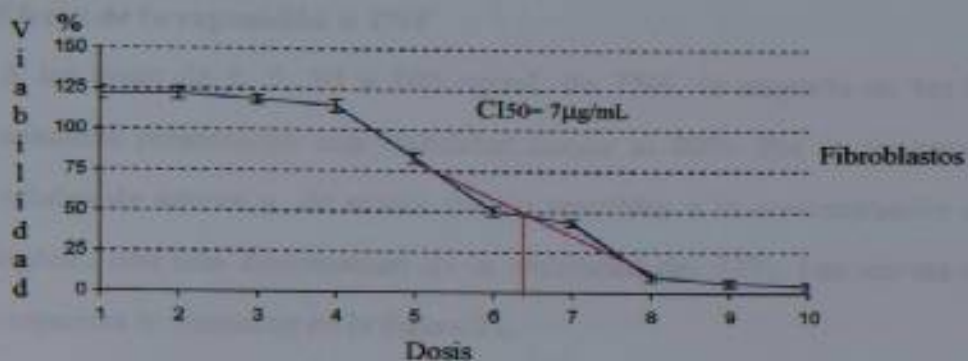


Figura 10d

Curvas dosis respuesta de líneas celulares expuestas a PA1 por 48h, con sus respectivas líneas de correlación obtenidas por modelo matemático, la línea naranja indica la CI50, según la línea de tendencia.

3.3.2 Efecto de la exposición a TNF

A las dosis de 1, 5, 10 y 160 ng/mL de TNF, la mayoría de las líneas celulares presentaron una viabilidad mayor al 80%. Por lo contrario, las células de adenoCa. de mama fueron sensibles a la concentración de 10 ng/mL, con una disminución de la viabilidad del 53%. Las curvas dosis-respuesta se muestran en la figura 11.

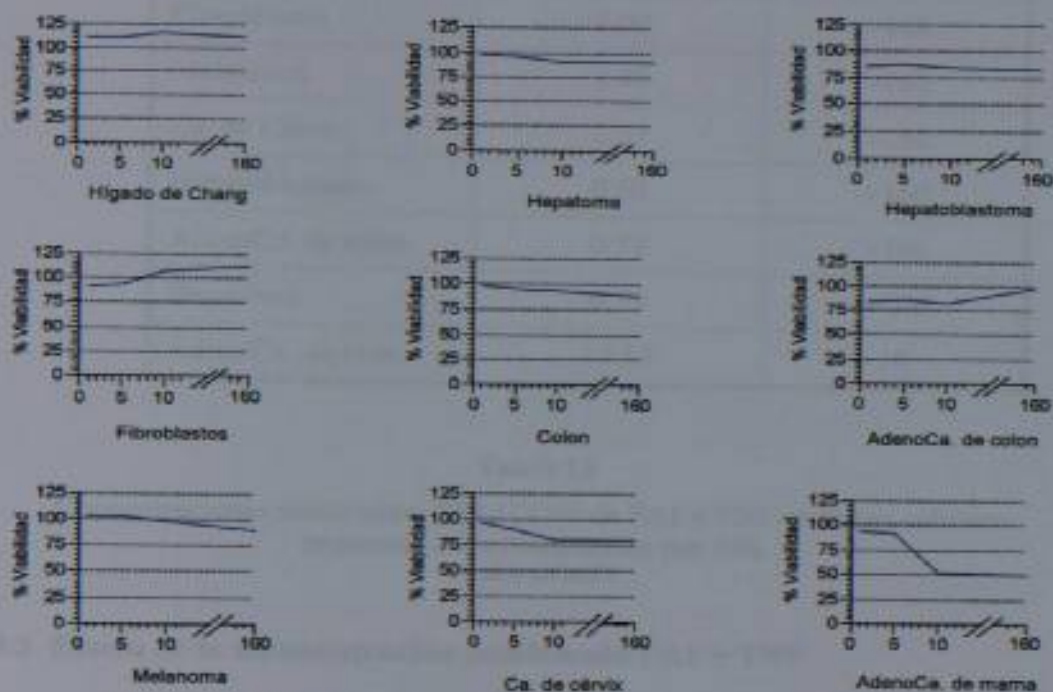


Figura 11

Curvas dosis-respuesta de líneas celulares expuestas a 1, 5, 10 y 160 ng/mL de TNF por 48h.

A partir de los valores de viabilidad obtenidos con la prueba de MTT se calcularon las concentraciones inhibitorias 50% (CI50) para ambos compuestos con el método de Ekwall, los resultados se muestran en la tabla 13.

<u>Líneas Celulares</u>	CI50 PA1 (µg/mL)	CI50 TNF (µg/mL)
Hígado de Chang	7.07	>160
Colon	7.07	>160
Fibroblastos	5.00	>160
Melanoma	2.45	>160
Ca. de Cérvix	1.67	>160
Hepatohlastoma	0.60	>160
AdenoCa. de colon	0.59	>160
Hepatoma	0.59	>160
AdenoCa. de mama	14.14	10

Tabla 13

Concentraciones inhibitorias 50% (CI50) de PA1 y TNF en líneas celulares expuestas a los compuestos por 48h.
Prueba de MTT

3.3.3 Efecto de la administración combinada PA1 + TNF

En las figuras 12a, 12b y 12c se muestran los histogramas de las diferentes líneas celulares y el efecto de las combinaciones PA1+TNF. Las dosis de PA1 empleadas en las combinaciones fueron aquellas que produjeron el 50% de viabilidad celular y la dosis inmediata menor. Para TNF se utilizaron las cuatro dosis seleccionadas para el estudio.

En la figura 12a se muestran los resultados obtenidos de las líneas celulares de origen hepático. Con respecto a las células de Chang no se observaron diferencias entre las células expuestas a las combinaciones y las expuestas a PA1, con las combinaciones de 5 μ g/mL de PA1 se observó una viabilidad mayor del 64% y para las combinaciones con 10 μ g/mL de PA1 y TNF la viabilidad se observó entre 52 y 43%.

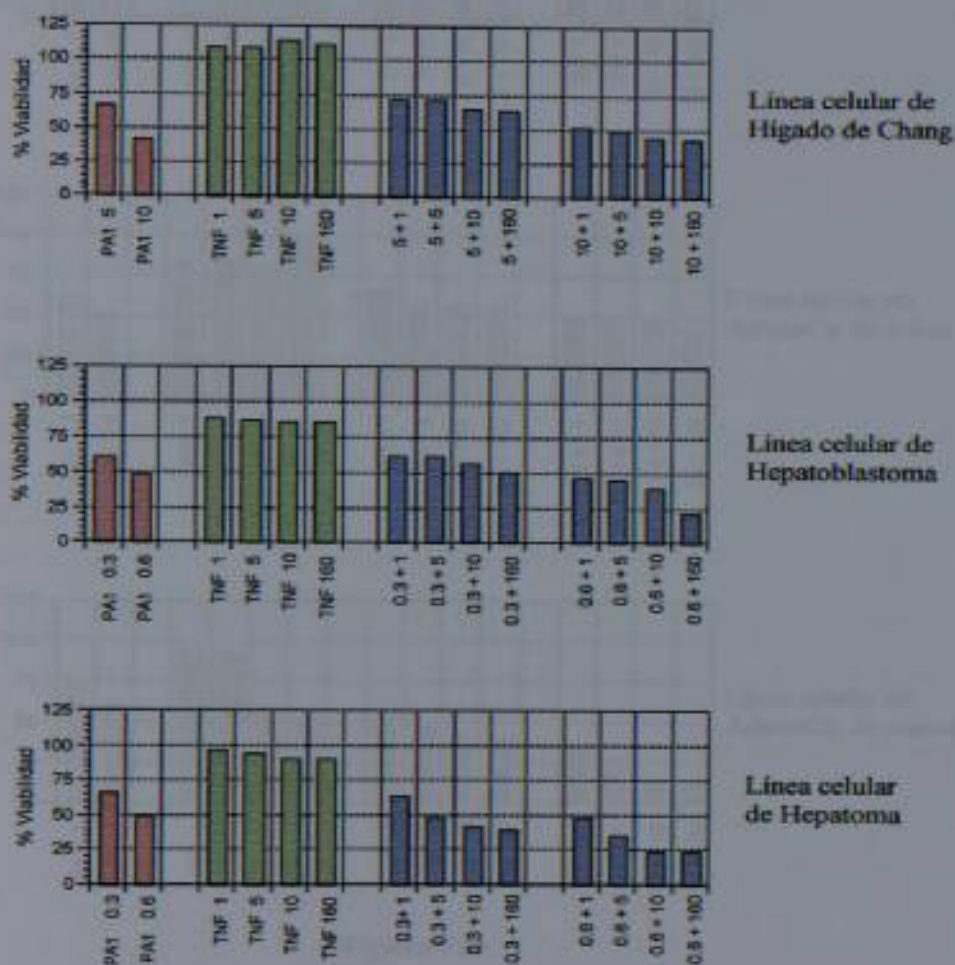


Figura 12a

Viabilidad de líneas celulares expuestas a PA1, TNF y PA1+TNF por 48h. Prueba de MTT

Los resultados obtenidos con las células benignas de colon y las neoplásicas de adenoCa. de colon y adenoCa. de mama se presentan en la figura 12b.

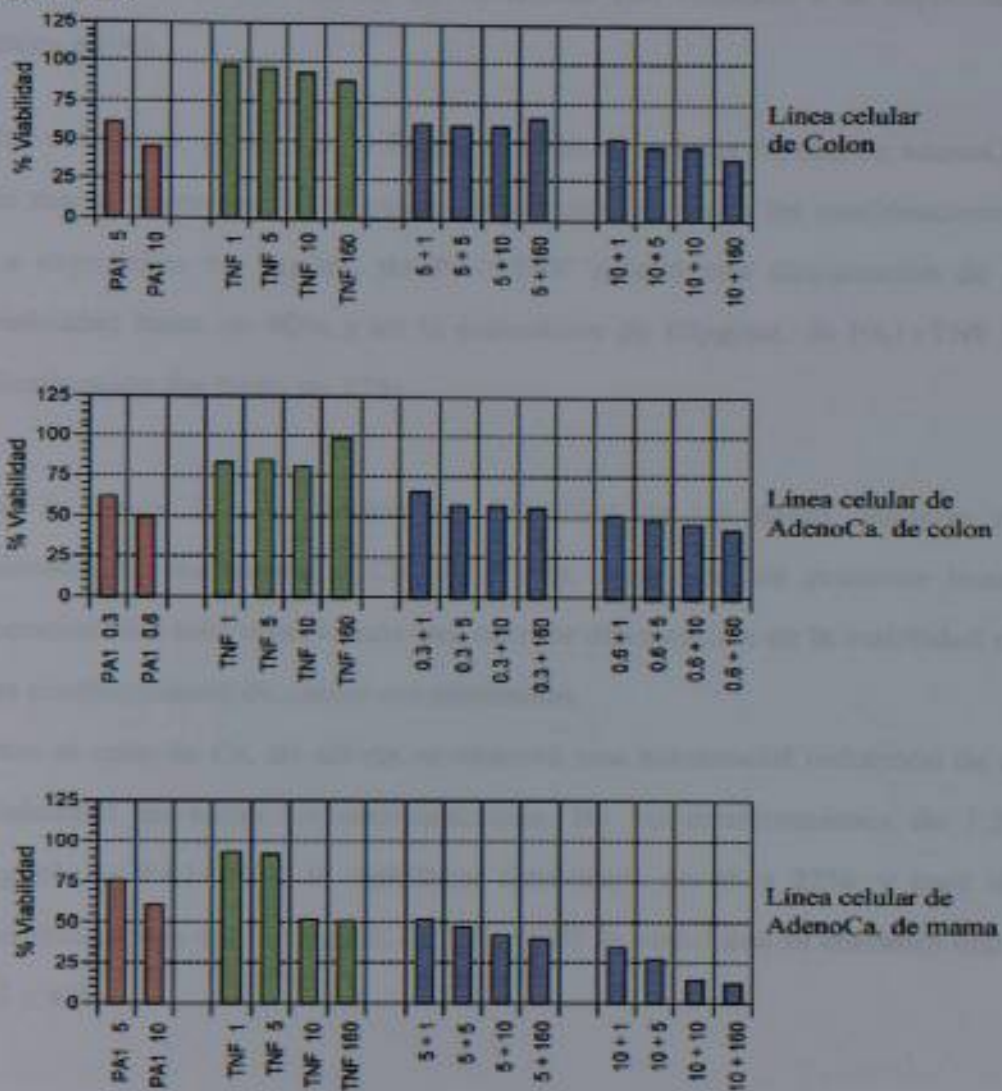


Figura 12b

Viabilidad de líneas celulares expuestas a PA1, TNF y PA1+TNF por 48h.
Prueba de MTT

Las líneas celulares de colon y adenoCa. de colon expuestas a las diferentes combinaciones de PA1+TNF no presentaron diferencias significativas en los valores de viabilidad con respecto a la exposición única a PA1.

Por otra parte, en la misma figura se observó que las células de adenoCa. de mama mostraron un marcado decremento en todas las combinaciones. La exposición de 5µg/mL de PA1+TNF mostró una disminución de la viabilidad hasta un 40% y en la exposición de 10µg/mL de PA1+TNF la disminución fue hasta un 12%.

En la figura 12c se observa la viabilidad de las líneas celulares de fibroblastos, melanoma y Ca. de cérvix. Para las dos primeras líneas mencionadas solo observamos una notable disminución de la viabilidad en las combinaciones de mayor concentración.

Para el caso de Ca. de cérvix se observó una substancial reducción de la viabilidad en todas las combinaciones. En las combinaciones de 1.25 µg/ml. de PA1+TNF, la viabilidad disminuyó de 46 a 22%; y para las combinaciones con 2.5µg/mL de PA1+TNF la viabilidad se encontró entre 43 y 4%.

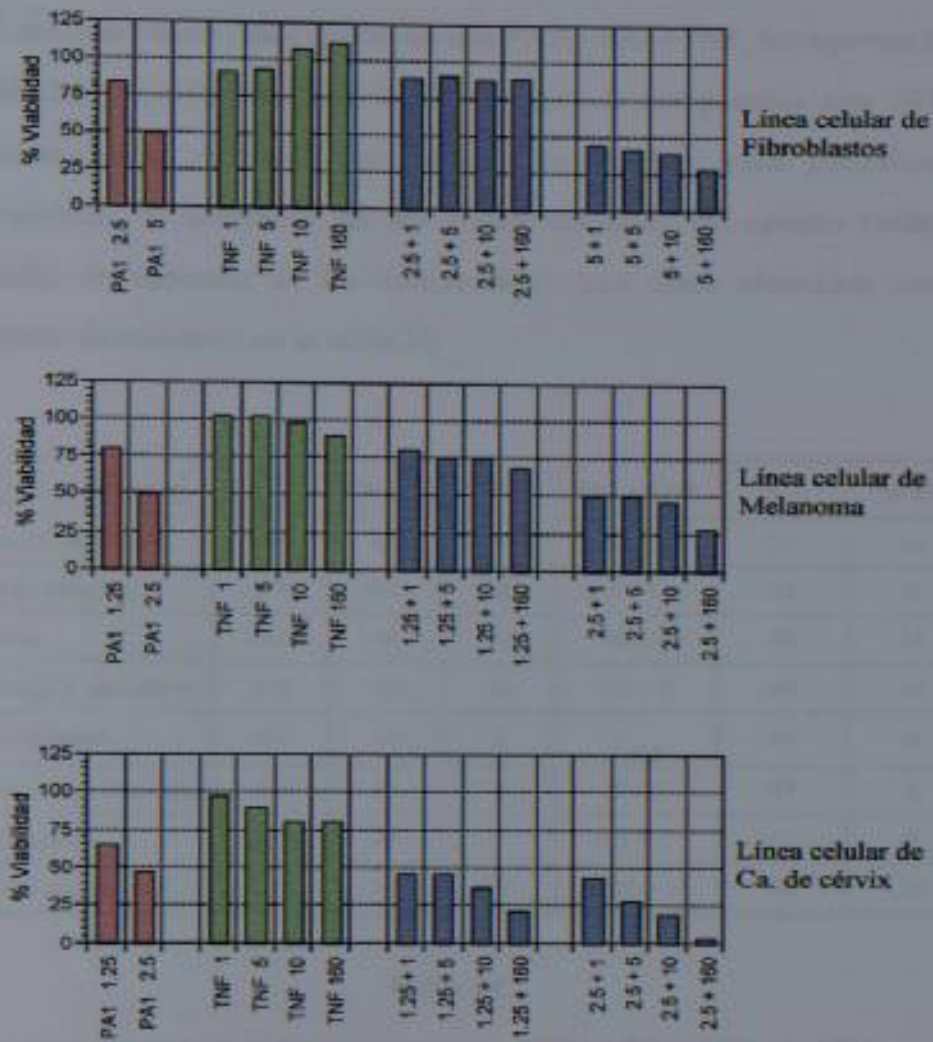


Figura 12c
 Viabilidad de líneas celulares expuestas a PA1, TNF y PA1+TNF por 48h.
 Prueba de MIT

3.3.4 Sobrevida celular anterior a la exposición de PA1 y PA1+TNF

Al concluir las 48h de exposición con PA1 y PA1+TNF, los agentes fueron retirados y sustituidos con medio de cultivo enriquecido con SFB. La incubación se prolongó por un periodo de 72h, para posteriormente determinar la sobrevida de las líneas celulares en estudio (viabilidad celular en ausencia de los compuestos). Los datos obtenidos con este método se muestran en la tabla 14.

<u>Líneas celulares</u>	PA1 µg/mL	% V	% SV	PA1 + TNF	% V	% SV
Hígado de Cheng	10.0	42	4	10 + 5	50	10
Hepatoblastoma	0.3	61	48	0.3 + 160	51	9
Colon	10.0	46	14	10 + 5	48	16
AdenoCa. de colon	0.6	49	42	0.6 + 5	49	47
Fibroblastos	5.0	51	2	5 + 1	45	4
AdenoCa. de mama	5.0	75	1	5 + 5	47	6
Melanoma	2.5	50	7	2.5 + 1	51	3
Ca. de cérvix	1.25	65	28	1.25 + 1	46	25

Tabla 14

Sobrevida de líneas celulares expuestas a PA1 y PA1+TNF por 48h y cultivo prolongado en ausencia de los compuestos por 72h.
Prueba de MTT

% V – Viabilidad celular (48h de exposición), % SV – Viabilidad celular que permanece posterior a una exposición y mantenimiento del cultivo en ausencia del agente por 72h.

La sobrevida de todas las líneas celulares expuestas a PAI disminuyó significativamente comparada con la viabilidad celular determinada a las 48h, a excepción de hepatoblastoma y adenoCa. de colon en donde la reducción fue ligeramente menor.

De igual manera la sobrevida de las células expuestas a la combinación de PAI+TNF disminuyó notoriamente a excepción de adenoCa. de colon la cual presentó una sobrevida semejante a la viabilidad determinada a las 48h.

3.3.5 Efecto del pretratamiento con Actinomicina D

3.3.5.1 Sensibilización por 1h

En las figuras 13a y 13b se observa que todas las líneas celulares respondieron al efecto de la Act-D, la exposición de 1µg/ml. de Act-D durante 1h redujo la viabilidad en algunas líneas celulares hasta un 50%. Al retirar el medio que contenía Act-D y exponer a cada línea celular a PAI y PAI+TNF por 48h, se observó que la sensibilización con Act-D aumentó significativamente el efecto tanto para la PAI como para las combinaciones en las líneas celulares de fibroblastos, melanoma y Ca. de cérvix.

Las líneas celulares de Chang, colon, hepatoblastoma y adenoCa. de colon presentaron una disminución de la viabilidad únicamente en las combinaciones.

En las células de adenoCa. de mama no se observaron cambios importantes en la viabilidad.

3.3.5.2 Sensibilización por 24h

La exposición de las líneas celulares a 1µg/mL de Act-D por 24h produjo un efecto citotóxico significativamente mayor para las líneas celulares de Chang, colon, fibroblastos, melanoma y Ca. de cérvix. Sin embargo no se observaron diferencias en el efecto entre la exposición de 1h y 24h en hepatoblastoma y adenoCa. de colon.

Se observó un decremento de la viabilidad en las combinaciones de PAI+TNF en hígado de Chang, hepatoblastoma y adenoCa. de mama y menos marcado para fibroblastos, melanoma y adenoCa. de colon. Las células de colon y Ca. de cérvix expuestas a la combinación no mostraron diferencias con las sensibilizadas con Act-D por 1h. Los histogramas de cada una de las líneas celulares estudiadas se muestran en las figuras 13a y 13b.

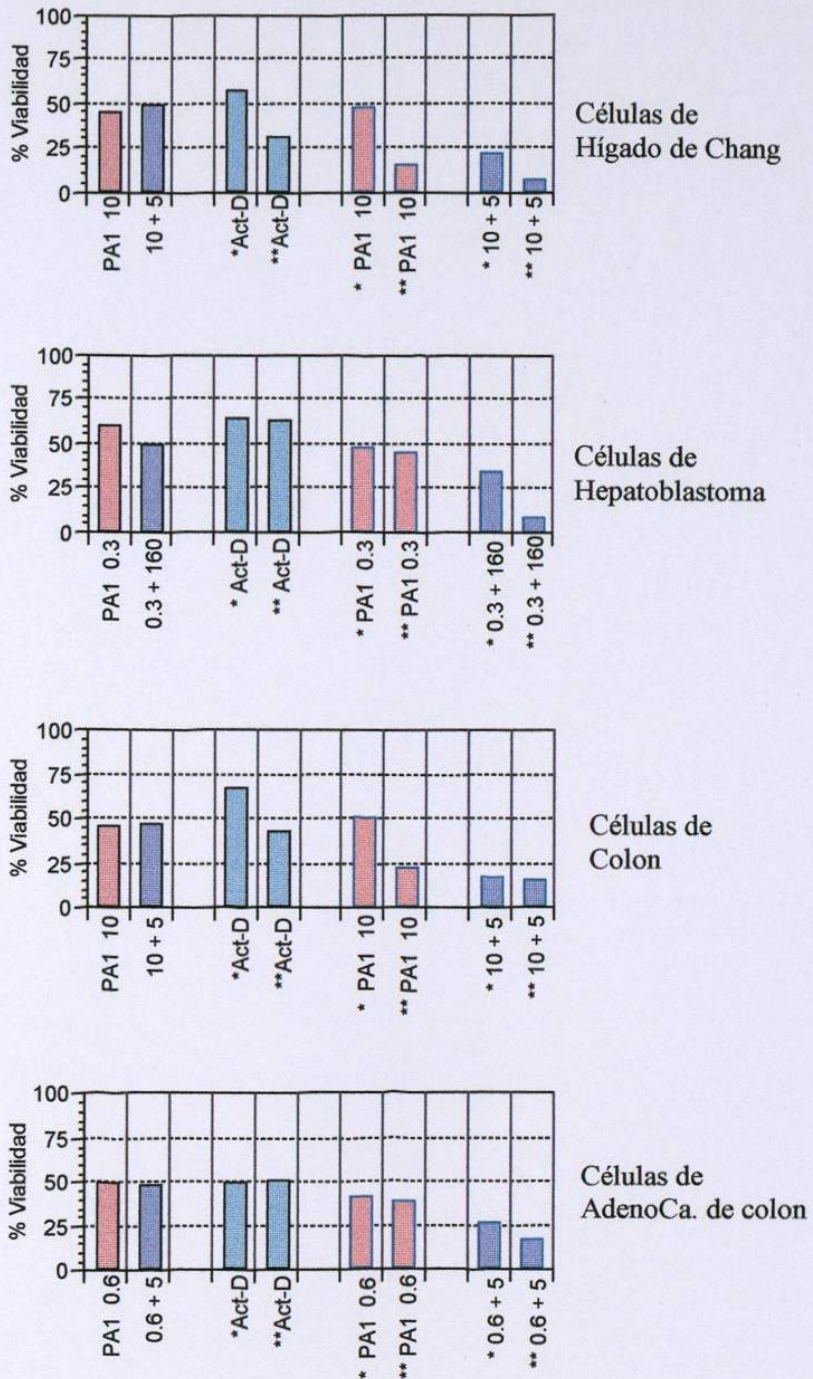


Figura 13a

Viabilidad de líneas celulares expuestas a PA1 y PA1+TNF por 48h, sensibilización previa con Actinomocina D (1µg/mL) por 1h* y 24h**. Prueba de MTT

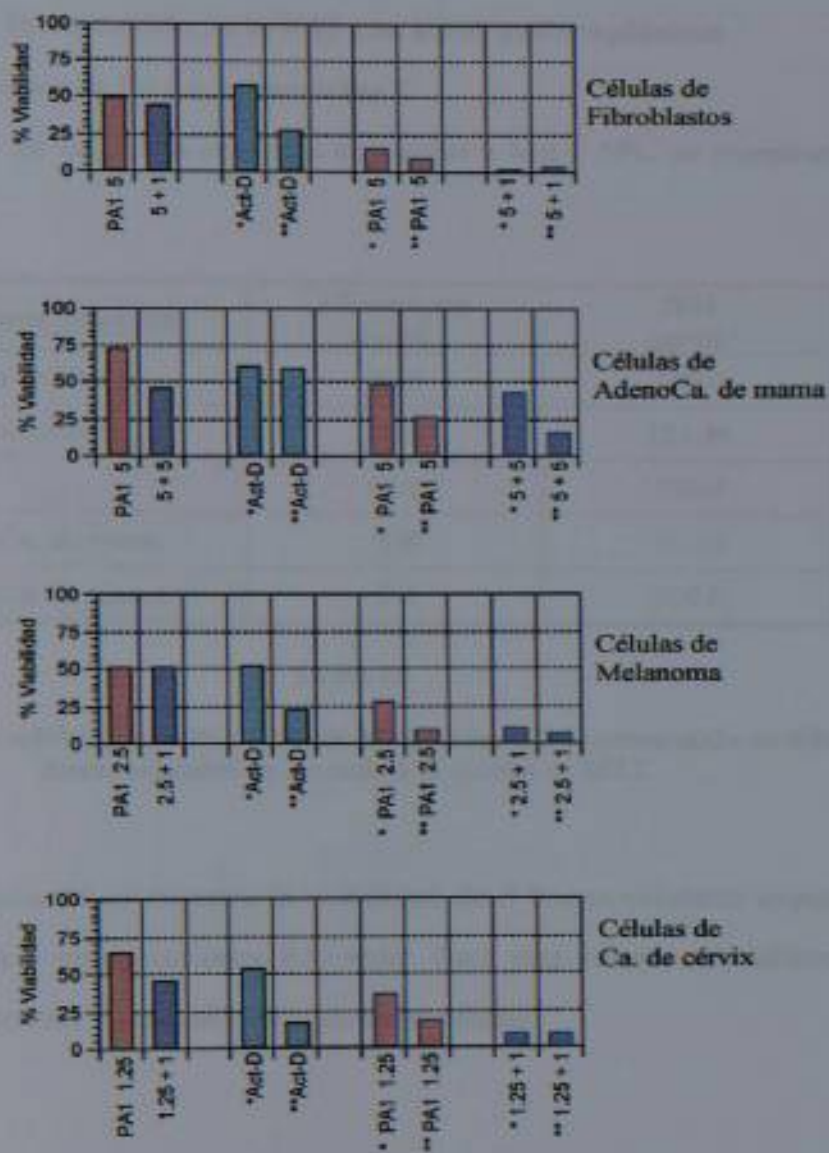


Figura 13b

Viabilidad de líneas celulares expuestas a PAI y PAI+TNF por 48h, sensibilización previa con Actinomicina D (1µg/mL) por 1h* y 24h**.
Prueba de MTT

3.3.6 Efecto de la exposición de la PA1 con otras antineoplásicas

3.3.6.1 Exposición a la PA1 + Mitomicina C

Las CI50 de las líneas celulares expuestas a Mit y 5FU se muestran en la tabla 15.

<u>Líneas celulares</u>	Mitomicina $\mu\text{g/mL}$	5FU $\mu\text{g/mL}$
Hígado de Chang	10.0	100.0
Hepatoblastoma	1.25	124.49
Colon	50.0	500.0
AdenoCa. de colon	5.0	35.35
AdenoCa. de mama	5.0	500.0

Tabla 15

Concentraciones inhibitorias 50% (CI50) de Mitomicina y 5-Fluorouracilo en diferentes líneas celulares de acuerdo a la prueba de MIT.

En la figura 14 se muestra la viabilidad de 5 líneas celulares expuestas a PA1, Mit y combinaciones PA1+Mit. Para este ensayo se utilizaron las CI50 de la PA1 y de la Mit en cada línea celular.

Las células Chang y las células de adenoCa. de mama expuestas a la combinación PA1+Mit no presentaron citotoxicidad, en tanto que hepatoblastoma, colon benigno y adenoCa. de colon fueron significativamente más sensibles a la acción de los compuestos.

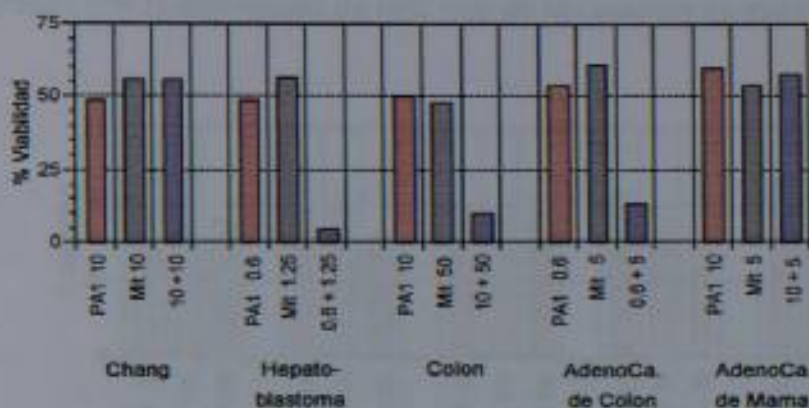


Figura 14

Líneas celulares expuestas a PA1, Mit y combinaciones PA1+Mit ($\mu\text{g}/\text{mL}$) por 48h.

3.3.6.2 Exposición a PA1 + 5-fluorouracilo

La figura 15 muestra la viabilidad de las líneas celulares expuestas a PA1, 5FU y combinaciones PA1+5FU por 48h. Las CI50 para ambos compuestos calculadas por el método de Ekwall fueron utilizadas para evaluar la administración conjunta de los compuestos. La respuesta celular a la combinación PA1+5FU en todas las líneas celulares fue igual que la observada con la exposición de solo uno de los agentes en estudio.

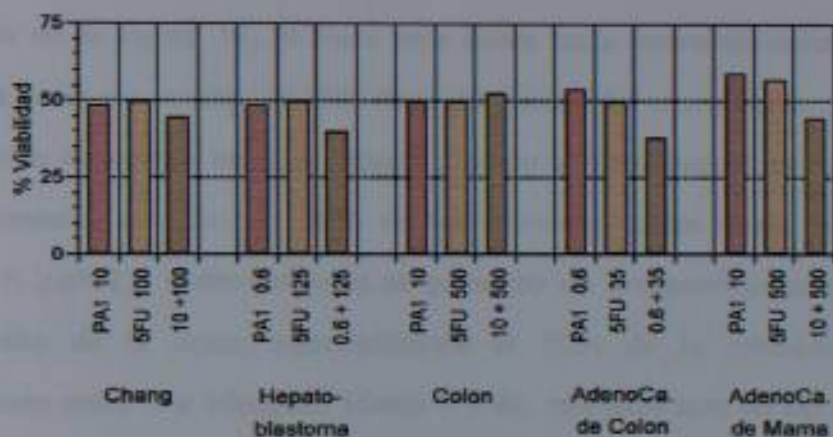


Figura 15

Líneas celulares expuestas a PA1, 5FU y combinaciones PA1+5FU ($\mu\text{g}/\text{mL}$) por 48h.

3.4 EVALUACIÓN CON SRB

La prueba de ANOVA realizada para evaluar la similitud entre células expuestas a cada concentración en particular del o los agentes en la misma placa y entre las placas mostró en términos generales valores de p (niveles de significancia) superiores a 0.05, con lo cual se asumió similitud de los tratamientos.

3.4.1 Efecto de la exposición a PA1

Las curvas dosis-respuesta obtenidas de la exposición de las distintas líneas celulares a la PA1 por 48h y evaluadas con el método de SRB se muestran en la figura 16, la línea roja sobre cada curva dosis-respuesta indica la dosis que produjo el 50% de la inhibición del crecimiento.

Las células de origen benigno (hígado, colon y fibroblastos) presentaron un crecimiento cercano al 100% en las primeras cuatro dosis probadas (0.07–0.6 $\mu\text{g/mL}$), posteriormente se presentó un decremento progresivo en función de la dosis, encontrándose el 50% de la inhibición del crecimiento entre 5 y 10 $\mu\text{g/mL}$ (dosis 7 y 8), mientras que en las células neoplásicas de hígado y colon se observó con 0.6 $\mu\text{g/mL}$ (dosis 4). Para Ca. de cérvix y melanoma la inhibición del crecimiento en el 50% de la población se obtuvo con las dosis de 1.25 y 2.5 $\mu\text{g/mL}$ (dosis 5 y 6) respectivamente.

El crecimiento de las células de adenoCa. de mama disminuyó de manera lenta; la inhibición del 50% se produjo con la dosis de 10 $\mu\text{g/mL}$ (dosis 8).

Por otra parte, hepatoma, hepatoblastoma, adenoCa. de colon y fibroblastos presentaron tras la exposición a la dosis más alta de PA1 estudiada (40 μ g/mL) letalidad del 50%.

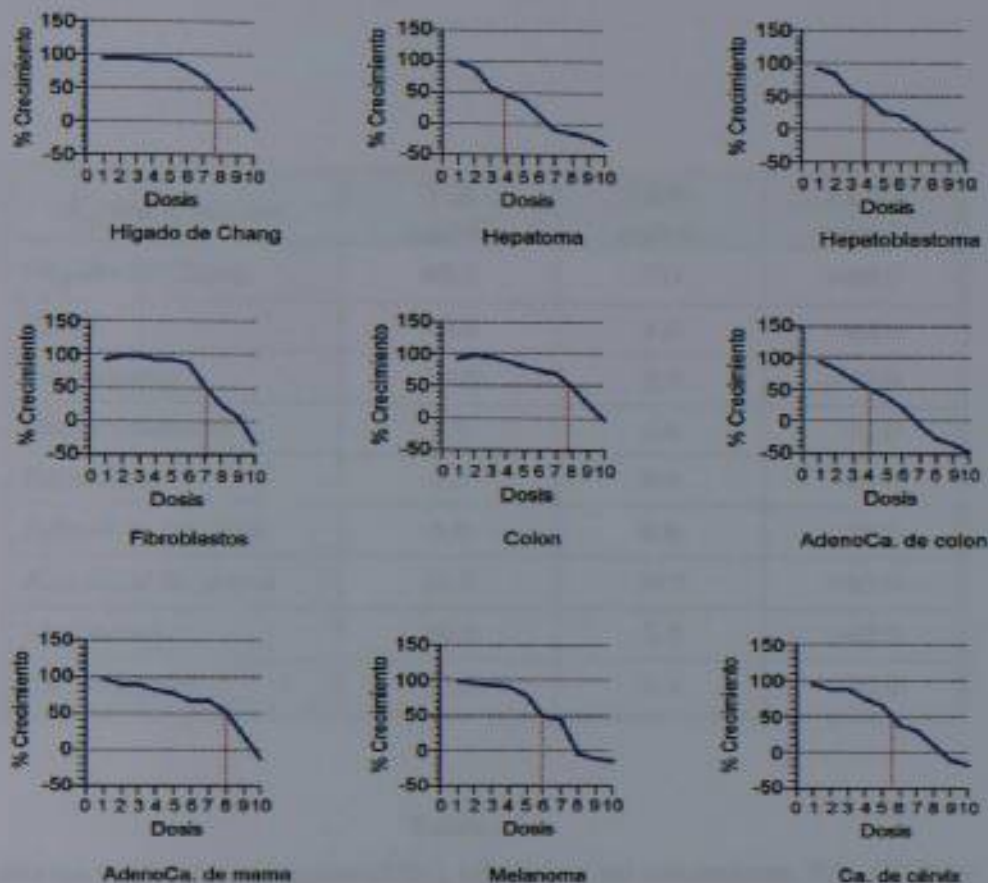


Figura 16

Curvas dosis-respuesta de líneas celulares expuestas a PA1 por 48h.

Prueba de SRB

Con los valores obtenidos se determinó la inhibición de crecimiento total (TGI), la inhibición de crecimiento 50% (GI50) y dosis letal 50% (LC50), los cuales se muestran en la tabla 16.

<i>Línea Celular</i>	TGI µg/mL	GI50 µg/mL	LC50 µg/mL
Hígado de Chang	40.0	7.0	>40.0
Colon	40.0	7.0	>40.0
Fibroblastos	20.0	5.0	>40.0
Hepatoblastoma	2.5	0.6	40.0
Hepatoma	2.5	0.6	40.0
AdenoCa. de colon	5.0	0.6	20.0
AdenoCa. de mama	30.0	10.0	>40.0
Melanoma	10.0	2.5	>40.0
Ca. de cérvix	15.0	1.7	>40.0

Tabla 16

Inhibición total del crecimiento (TGI), inhibición del crecimiento 50% (GI50) y concentración letal 50% (LC50) de líneas celulares expuestas a Peroxisomicina A1 por 48h.
Prueba de SRB

3.4.2 Efecto de la exposición a TNF

La mayoría de las líneas celulares presentaron una baja sensibilidad al TNF con excepción de adenoCa. de mama, el cual mostró porcentajes de crecimiento del 50% con 10 y 160ng/mL del TNF. Para el caso particular de fibroblastos la proliferación celular se incrementó de manera dosis dependiente, lo cual coincide con el reporte de otros grupos de investigadores (52,54). Los resultados se expresan en forma gráfica en la figura 17.

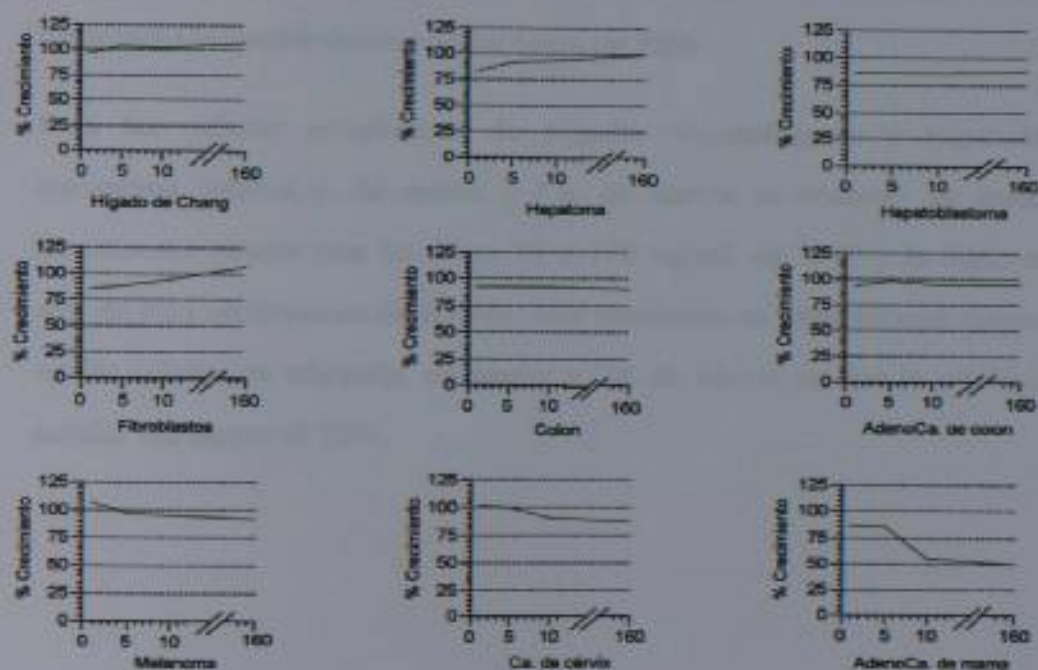


Figura 17

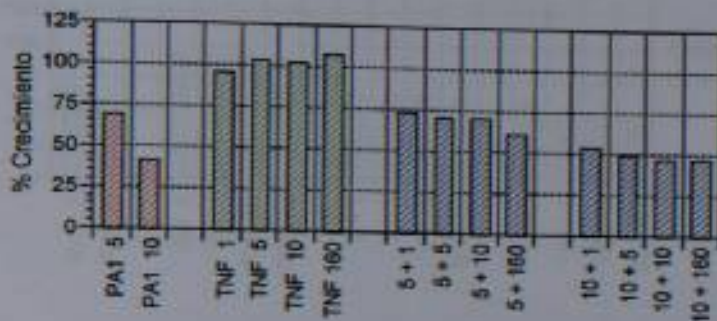
Curvas dosis-respuesta de líneas celulares expuestas a 1, 5, 10 y 160 ng/mL de TNF por 48h.
Prueba de SRB

3.4.3 Efecto de la administración combinada de la PA1 + TNF

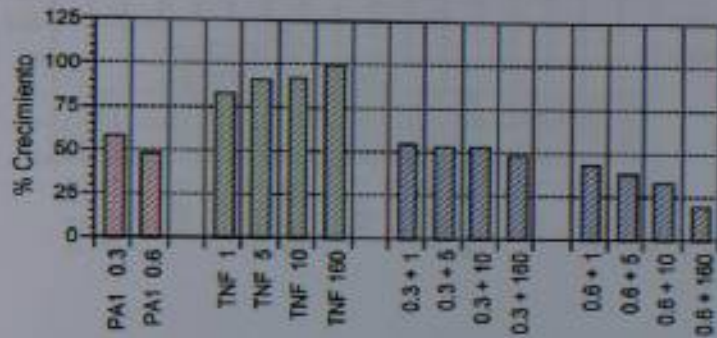
El efecto de la combinación PA1+SFU sobre las células de hígado de Chang, colon y adenoCa. de colon no fue mayor que el observado con la administración de la PA1 como se muestra en las figuras 18a y 18b.

En la figura 18c se puede observar que para los fibroblastos la administración conjunta del TNF y 2.5µg/mL de PA1 presentó un efecto positivo sobre el crecimiento celular, ya que las cuatro combinaciones presentaron valores por arriba del 80%, mientras que la administración de la 5µg/mL de PA1 junto con las distintas concentraciones de TNF disminuyó la proliferación celular hasta un 25%.

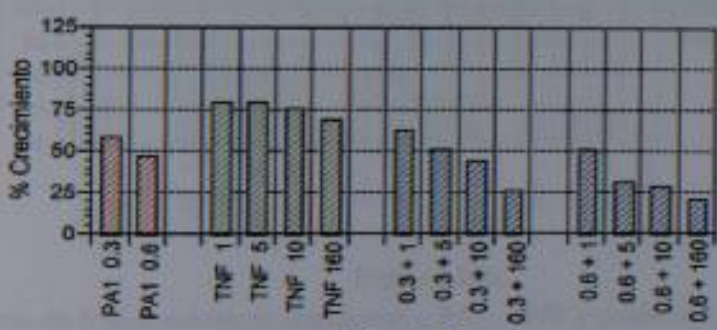
Para las células neoplásicas de hígado (hepatoblastoma y hepatoma), melanoma, adenoCa. de mama y Ca. de cérvix se observó un notable decremento celular con las dosis 10 y 160 ng/mL de TNF y la dosis más alta de PA1 utilizada en cada línea, esta condición se observó más marcada en las células de adenoCa. de mama y Ca. de cérvix ya que la inhibición celular fue mayor al 70%.



Células de Hígado de Chang



Células de Hepatoblastoma



Células de Hepatoma

Figura 18a

Crecimiento de líneas celulares expuestas a PA1, TNF y combinaciones PA1+TNF por 48h.

Prueba de SRB

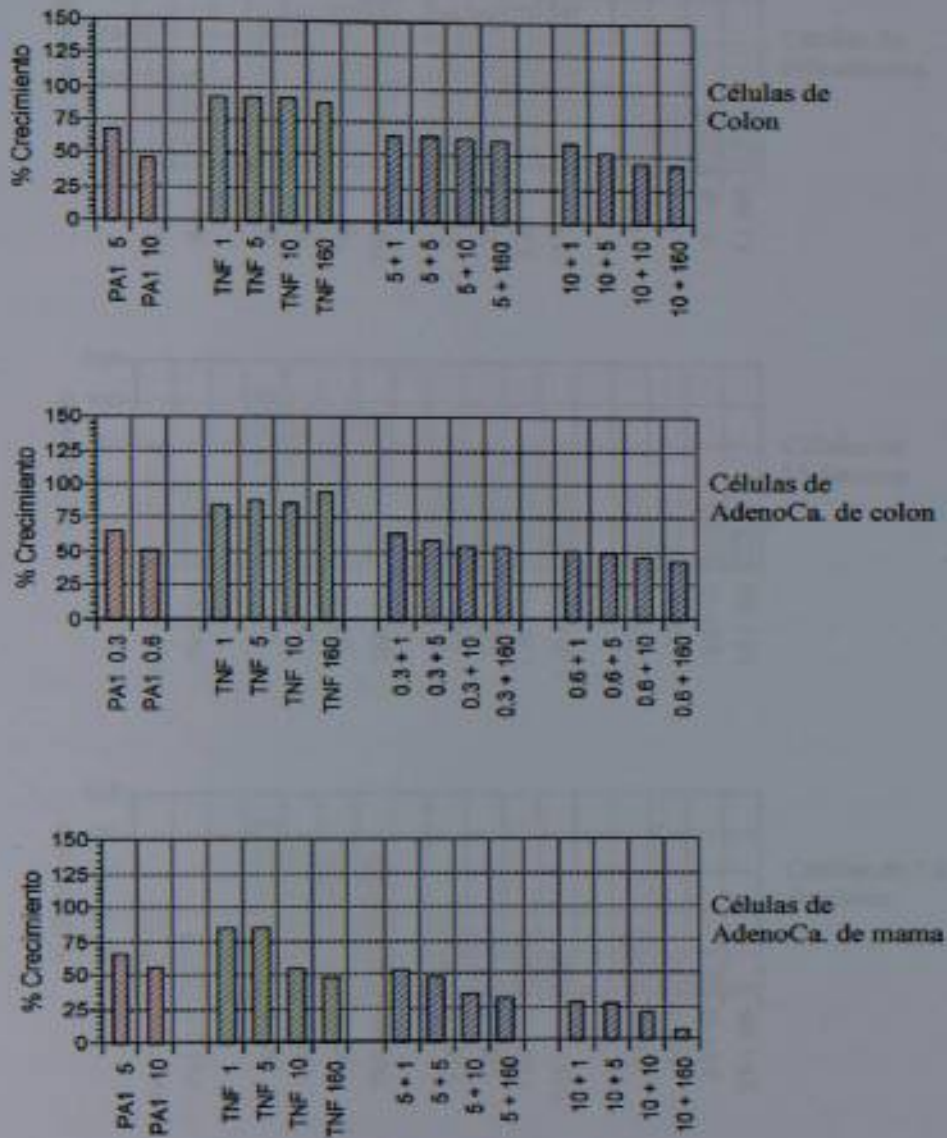


Figura 18b

Crecimiento de líneas celulares expuestas a PA1, TNF y combinaciones PA1+TNF por 48h.

Prueba de SRB

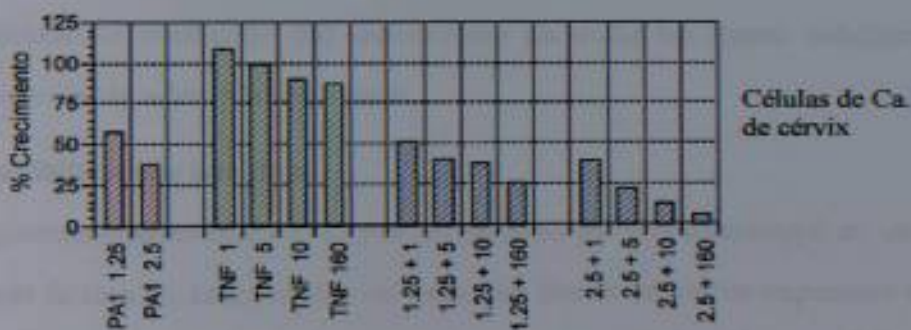
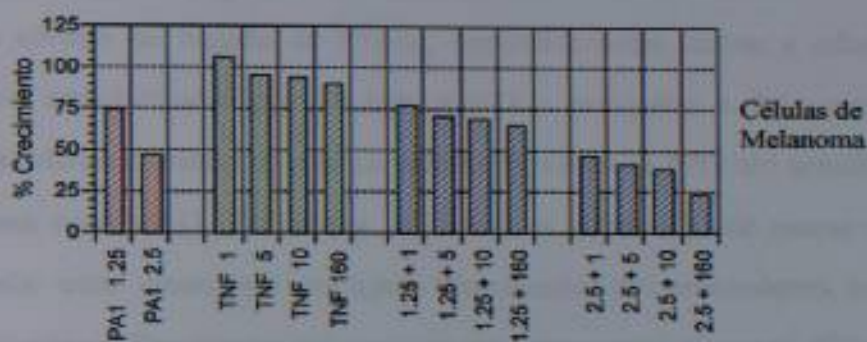
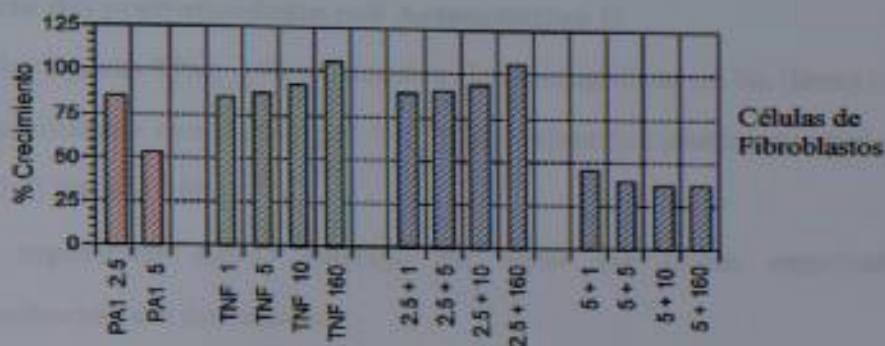


Figura 18c

Crecimiento de líneas celulares expuestas a PA1, TNF y combinaciones PA1+TNF por 48h.

Prueba de SRB

3.4.4 Efecto del pretratamiento con Actinomicina D

En las figuras 19a y 19b se muestran los histogramas de las líneas celulares sensibilizadas con Act-D por 1 y 24h y expuestas posteriormente a PA1 y PA1+TNF por 48h.

La exposición Act-D produjo en todas las líneas estudiadas una disminución del crecimiento.

3.4.4.1 Sensibilización por 1h.

Las células de hígado de Chang, hepatoblastoma, colon y adenoCa. de colon sensibilizadas por 1h con Act-D y expuestas a PA1 por 48h no presentaron diferencias con las células expuestas a PA1 sin sensibilización previa con Act-D. En lo que se refiere al AdenoCa. de mama y Ca. de cérvix estas mostraron una ligera disminución del crecimiento, en cambio melanoma y fibroblastos presentaron un decremento mayor al 50%.

Para el caso de las combinaciones PA1+TNF, la sensibilización con Act-D favoreció la inhibición del crecimiento en todas las líneas celulares con excepción de adenoCa. de mama.

3.4.4.2 Sensibilización por 24h.

El pretratamiento con Act-D por un periodo de 24h disminuyó en un 50% o más la tasa de crecimiento en todas las líneas celulares expuestas a PA1 con excepción de hepatoblastoma. En el caso de las líneas celulares de colon (benigno y adenoCa. de colon) se observó una reducción del crecimiento del 60%, en tanto que el resto de las células presentaron una disminución mayor o igual del 70% con respecto a las células no sensibilizadas.

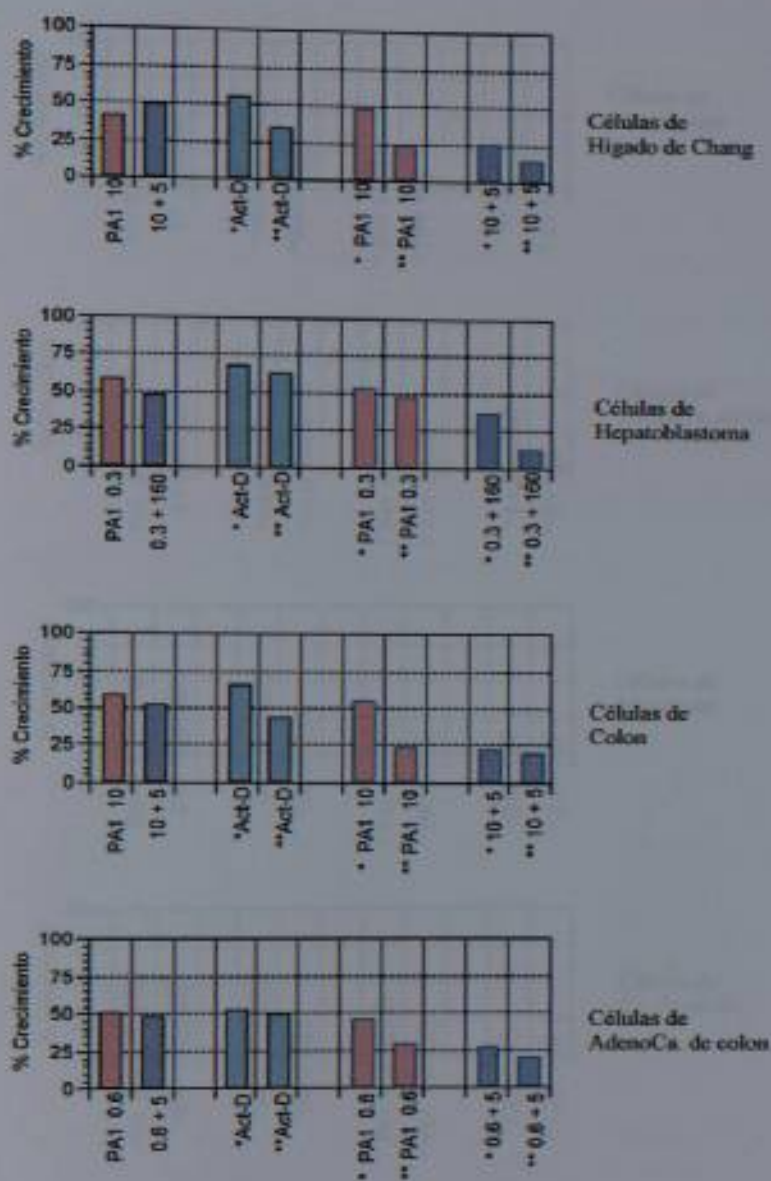


Figura 19a

Crecimiento de líneas celulares expuestas a PAI y PAI+TNF por 48h, sensibilización previa con Act-D (1µg/mL) por 1h* y 24h**.

Prueba de SRB

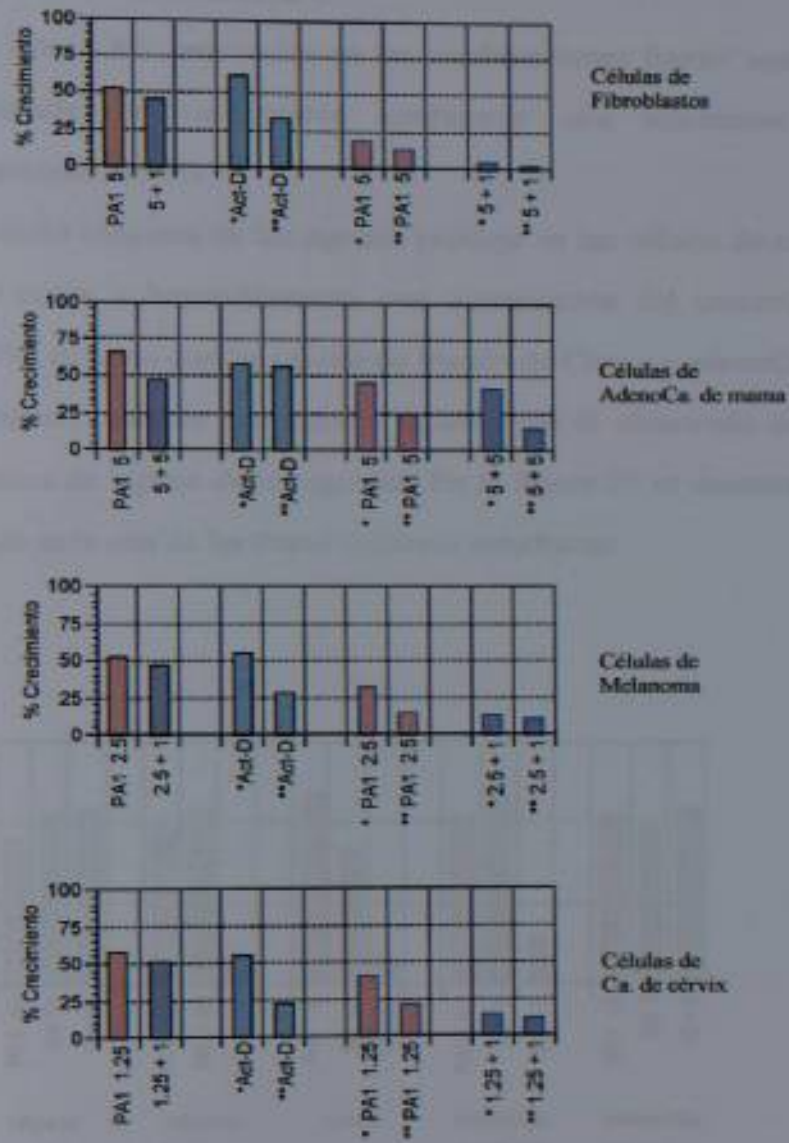


Figura 19b
 Crecimiento de líneas celulares expuestas a PAI y PAI + TNF por 48h,
 sensibilización previa con Act-D (1µg/mL) por 1h* y 24h**.
 Prueba de SRB

3.4.5 Efecto de la exposición de la PA1 con otros antineoplásicos

3.4.5.1 Exposición a PA1 + Mitomicina C

Las dosis de PA1 y Mit empleadas en las combinaciones fueron aquellas que administradas individualmente produjeron una inhibición del crecimiento cercano al 50%.

La administración conjunta de los agentes produjo en las células de colon, adenoCa. de colon y hepatoblastoma una disminución del crecimiento mayor del 70%, en tanto que las células de hígado de Chang y adenoCa. de mama presentaron tasas de crecimiento iguales que el observado con la exposición única de alguno de los agentes. En la figura 20 se muestran los histogramas de cada una de las líneas celulares estudiadas.

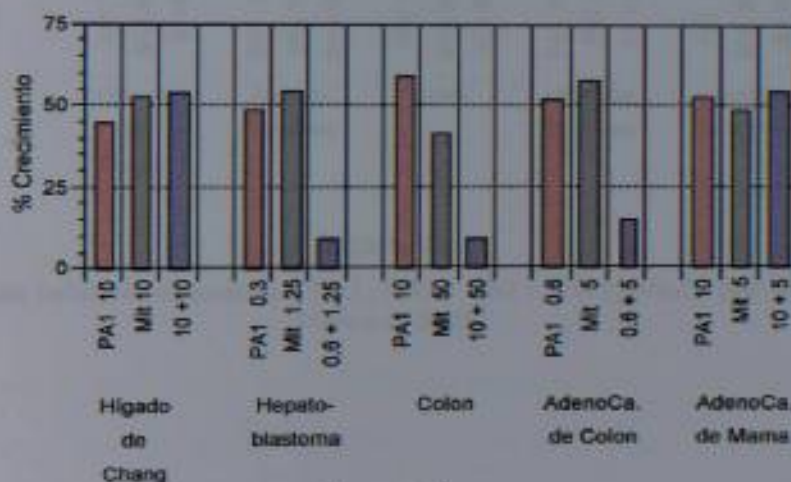


Figura 20

Líneas celulares expuestas a PA1, Mit y PA1+Mit ($\mu\text{g}/\text{mL}$) por 48h.
Prueba de SRB

3.4.5.2 Exposición a la PA1 + 5-fluorouracilo

Las dosis de PA1 y 5FU empleadas en las combinaciones fueron aquellas que administradas individualmente inhibieron el crecimiento del 50% de la población. Así mismo la combinación de estos agentes no produjo decremento significativo en ninguna de las líneas celulares estudiadas. La representación gráfica de los resultados se muestra en la figura 21.

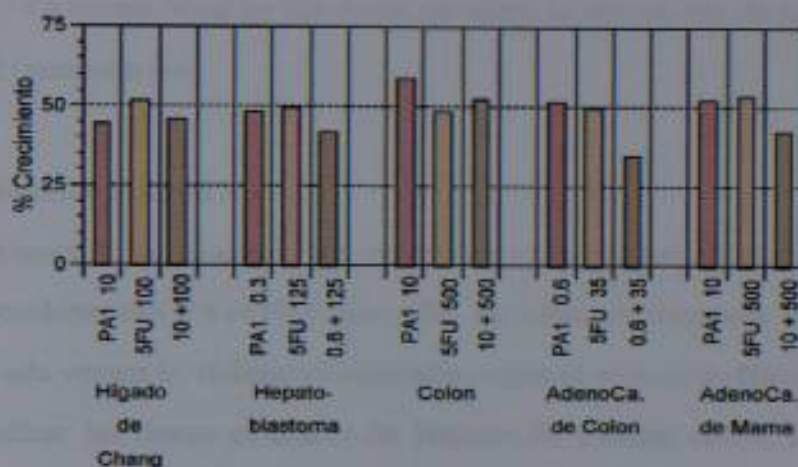


Figura 21

Líneas celulares expuestas a PA1, 5FU y PA1+5FU ($\mu\text{g}/\text{mL}$) por 48h.
Prueba de SRB

3.5 ANÁLISIS DE LA INTERACCIÓN

Con la finalidad de verificar la normalidad de los datos obtenidos se empleó la prueba Kolmogorov-Smirnov (K-S) (42) y una prueba de Cochran para comparar las varianzas. El análisis de la prueba K-S indicó que los valores obtenidos de las líneas celulares expuestas al o los agentes en las diversas concentraciones presentaron niveles de significancia mayores de 0.05 (valor requerido para no rechazar la hipótesis de normalidad) y también niveles de significancia superiores a 0.05 (para la prueba de varianza), con lo cual se asumió normalidad e igualdad de varianzas. La normalidad de los datos permitió la aplicación de la estadística convencional (paramétrica).

3.5.1 Combinación PA1+TNF

En la figura 22 se muestran los resultados de las líneas celulares expuestas a la combinación PA1+TNF por 48h, en ellas se compara la viabilidad observada versus la viabilidad esperada (según el método de Berenbaum).

Al analizar las líneas celulares de Hígado de Chang, colon, fibroblastos, adenoCa. de colon y melanoma no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre la viabilidad observada y la viabilidad esperada; se determinaron también los índices de combinación (tabla 17) y se observó que las líneas celulares mencionadas presentaron valores iguales a 1 con lo cual se asumió interacción tipo cero o sumación de los agentes en estudio.

En contraste, las líneas celulares de hepatoma, hepatoblastoma, adenoCa. de mama y Ca. de cérvix presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$), e índices de combinación (tabla 17), entre 0.35 y 0.74, lo que indica según la tabla de rangos de Berenbaum (1) y Chou (43,44) que se trata de una interacción de naturaleza positiva o sinérgica.

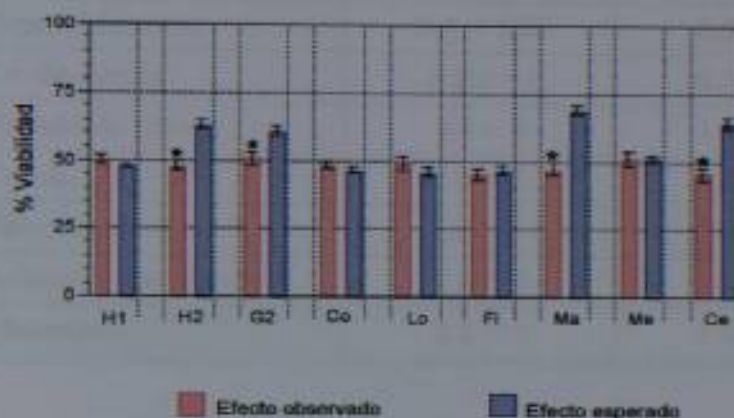


Figura 22

Comparación entre la viabilidad observada versus la viabilidad esperada de líneas celulares expuestas a PAI+TNF (Prueba de MTT).

* Efecto significativamente mayor que el efecto esperado ($p < 0.05$)

H1 = Hígado de Chang, H2 = Hepatoma, G2 = Hepatoblastoma, Co = Colon, Lo = AdenoCa. de colon, Fi = Fibroblastos, Ma = AdenoCa. de mama, Me = Melanoma y Ce = Ca. de cérvix.

<i>Linea celular</i>	Combinación isofecto PA1+TNF	IC Berenbaum
AdenoCa. de mama	5 + 5	0.3536
Hepatoma	0.3 + 5	0.5092
Hepatoblastoma	0.3 + 160	0.5084
Ca. de cérvix	1.25 + 1	0.7485
Hígado de chag	10 + 5	1.0000
Colon	10 + 5	1.0000
Fibroblastos	5 + 1	1.0000
AdenoCa. de colon	0.6 + 5	1.0166
Melanoma	2.5 + 1	1.0205

Tabla 17

Índices de combinación de líneas celulares expuestas a PA1+TNF.

IC > 1.10

Antagonismo

IC entre 0.90 y 1.10

Sumación

IC < 0.90

Potenciación

3.5.2 Exposición a PA1

3.5.2.1 Sensibilización previa con Act-D por 1h

La figura 23a muestra las líneas celulares expuestas a PA1 por 48h previamente sensibilizadas con Act-D por 1h, en ellas se compara la viabilidad observada versus la viabilidad esperada.

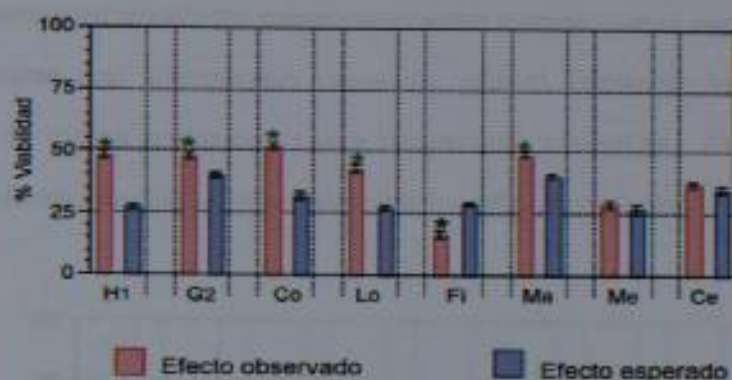


Figura 23a

Comparación entre la viabilidad observada versus la viabilidad esperada de líneas celulares expuestas a PA1 previamente sensibilizadas con Act-D por 1h.

- * Efecto significativamente mayor al efecto esperado ($p < 0.05$)
- * Efecto significativamente menor al efecto esperado ($p < 0.05$)

H1= Hígado de Chang, G2 = Hepatoblastoma, Co = Colon, Lo = AdenoCa. de colon, Fi = Fibroblastos, Ma = AdenoCa. de mama, Me = Melanoma y Ce = Ca. de cérvix.

Las líneas celulares de hígado de Chang, hepatoblastoma, colon, adenoCa. de colon y adenoCa. de mama presentaron un efecto estadísticamente menor al esperado, lo cual indicó una interacción negativa o antagónica entre los compuestos.

Melanoma y Ca. de cérvix no mostraron diferencias, con lo cual se infiere una interacción de tipo cero. En contraste, los fibroblastos presentaron un efecto estadísticamente mayor que el efecto esperado lo que indicó una interacción sinérgica.

3.5.2.2 Sensibilización previa con Act-D por 24h

En la figura 23b las células neoplásicas de hepatoblastoma y adenoCa. de colon presentaron un efecto estadísticamente menor que el esperado por lo que se asume una interacción negativa, por el contrario las células de adenoCa. de mama presentaron una interacción sinérgica. El resto de las líneas celulares estudiadas presentan interacción de tipo cero o sumación.

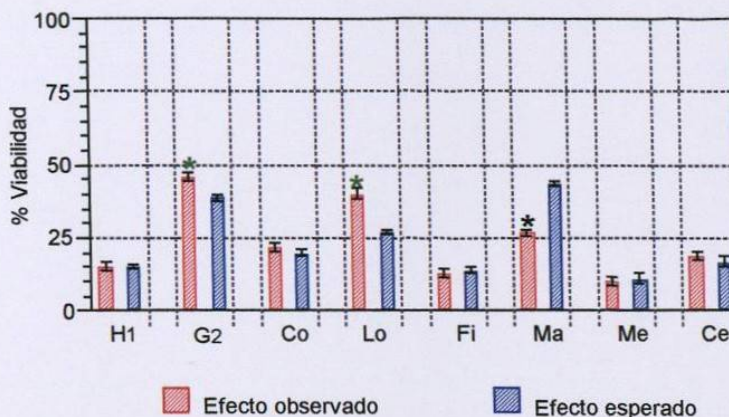


Figura 23b

Comparación entre la viabilidad observada versus la viabilidad esperada de líneas celulares expuestas a PA1 previamente sensibilizadas con Act-D por 24h.

* Efecto significativamente mayor al efecto esperado ($p < 0.05$)

* Efecto significativamente menor al efecto esperado ($p < 0.05$)

H1= Hígado de Chang, G2 = Hepatoblastoma, Co = Colon, Lo = AdenoCa. de colon, Fi = Fibroblastos, Ma = AdenoCa. de mama, Me = Melanoma y Ce = Ca. de cérvix.

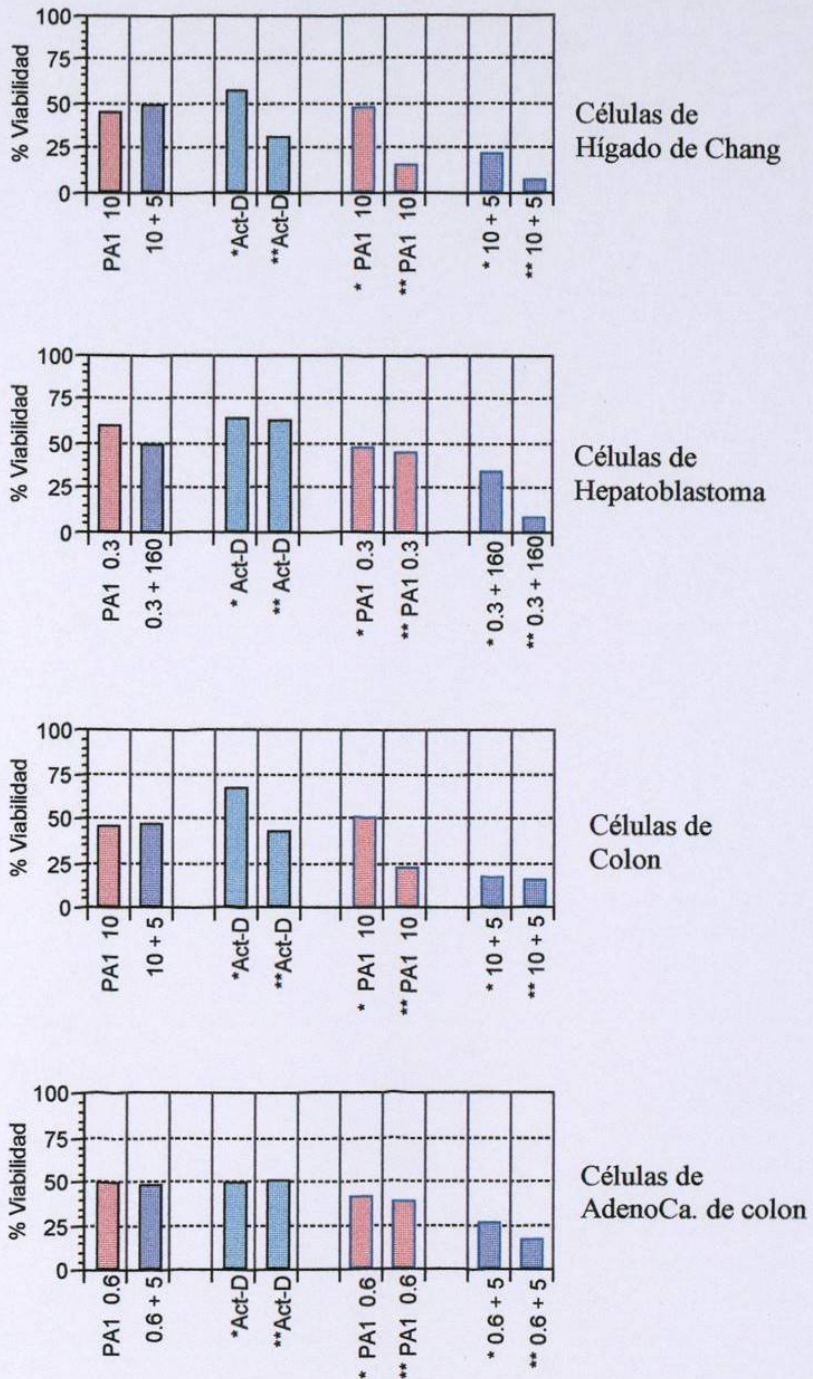


Figura 13a

Viabilidad de líneas celulares expuestas a PA1 y PA1+TNF por 48h, sensibilización previa con Actinomicina D (1µg/mL) por 1h* y 24h**.
Prueba de MTT

3.5.3 Exposición a PA1+TNF

3.5.3.1 Sensibilización con Act-D por 1h

En la figura 24a se observa que la sensibilización con Act-D favoreció el efecto citotóxico del TNF, ya que produjo en las líneas celulares de hígado de Chang, colon, fibroblastos, melanoma y Ca. de cérvix un aumento del daño estadísticamente significativo (figura 24a), con lo que se asume una interacción sinérgica. El efecto observado en hepatoblastoma y adenoCa. de colon fue similar al efecto esperado por lo que se asume una interacción clase cero y adenoCa. de mama presentó una interacción negativa o antagónica.

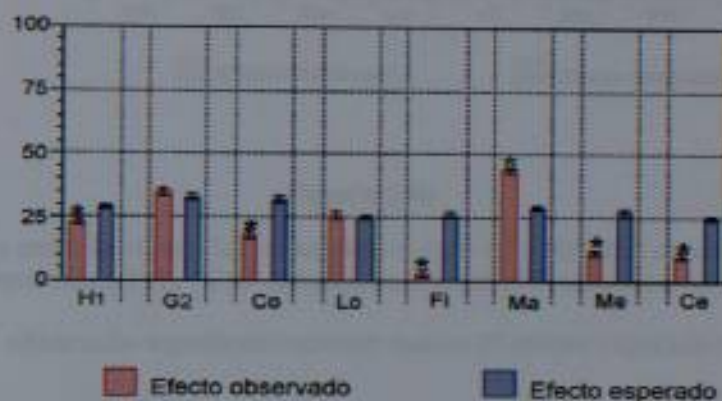


Figura 24a

Comparación entre la viabilidad observada versus la viabilidad esperada de líneas celulares expuestas a PA1+TNF previamente sensibilizadas con Act-D por 1h.

* Efecto significativamente mayor al efecto esperado ($p < 0.05$)

* Efecto significativamente menor al efecto esperado ($p < 0.05$)

H1= Hígado de Chang, G2 = Hepatoblastoma, Co = Colon, Lo = AdenoCa. de colon, Fi= Fibroblastos, Ma= AdenoCa. de mama, Me= Melanoma y Ce= Ca. de cérvix.

3.5.3.2 Sensibilización con Act-D por 24h

En la figura 24b se aprecia que todas las líneas celulares presentaron interacción sinérgica a excepción de melanoma y Ca. de cervix, las cuales mostraron sumación.

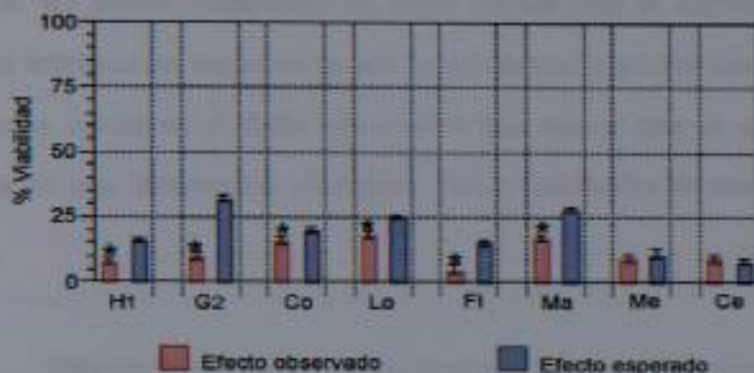


Figura 24b

Comparación entre la viabilidad observada versus la viabilidad esperada de líneas celulares expuestas a PA1+TNF previamente sensibilizadas con Act-D por 24h.

* Efecto observado significativamente mayor al efecto esperado ($p < 0.05$)

H1= Hígado de Chang, G2 = Hepatoblastoma, Co = Colon, Lo = AdenoCa. de colon, Fi= Fibroblastos, Ma= AdenoCa. de mama, Me= Melanoma y Ce= Ca. de cervix.

3.5.4 Exposición a PA1+Mit

Cuando se comparó la viabilidad observada versus la viabilidad esperada, de las líneas celulares expuestas a esta combinación, se observó que todas las líneas celulares presentaron diferencias estadísticamente significativas al compararse con la viabilidad esperada. Las células de hígado de Chang y adenoCa. de mama mostraron un daño menor que el esperado; lo que indicó una interacción negativa de los compuestos, mientras que en el resto de las líneas celulares el daño observado fue mayor que el esperado, lo cual habla de una interacción sinérgica. Estos resultados se muestran en la figura 25.

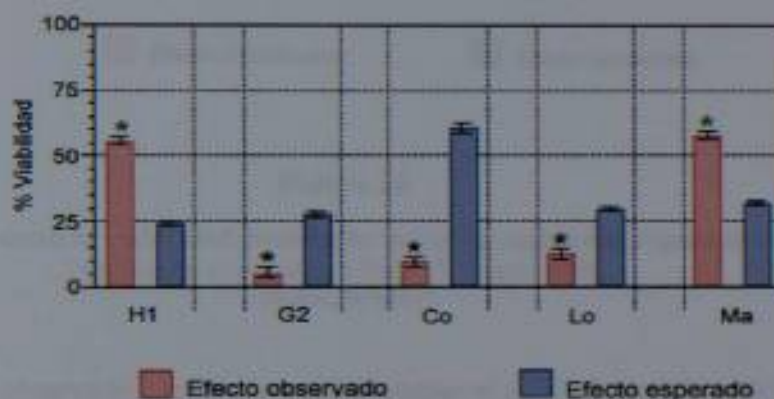


Figura 25

Comparación entre la viabilidad observada versus la viabilidad esperada de líneas celulares expuestas a PA1 + Mit por 48h.

Prueba de MTT

- * Efecto significativamente mayor al efecto esperado ($p < 0.05$)
- * Efecto significativamente menor al efecto esperado ($p < 0.05$)

H1= hígado de Chang, G2= hepatoblastoma, Co= colon, Lo= adenoCa. de colon y Ma= adenoCa. de mama.

3.5.5 Exposición a PA1+5FU

En la figura 26 se observa que las líneas celulares expuestas a esta combinación presentaron una interacción de naturaleza antagónica, la viabilidad en todos los casos se mantuvo cercana al 50%; la cual fue significativamente mayor a la viabilidad esperada.

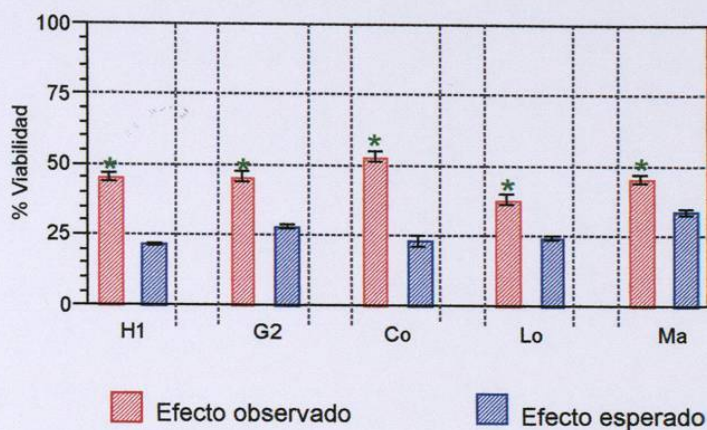


Figura 26

Comparación entre la viabilidad observada versus la viabilidad esperada de líneas celulares expuestas a PA1+5FU por 48h.
Prueba de MTT

* Efecto observado significativamente menor al efecto esperado $p < 0.05$

H1= Hígado de Chang, G2 = Hepatoblastoma, Co = Colon, Lo = AdenoCa. de colon, y Me = Melanoma.

CAPÍTULO CUATRO

DISCUSIÓN

El avance de la quimioterapia antitumoral ha dependido en gran medida de la combinación de medicamentos, existen bases teóricas y experimentales para esperar interacciones positivas, ya sea a través de sus mecanismos de acción o de sus efectos en la cinética celular (3).

Este estudio se diseñó para investigar la acción concurrente de la Peroxisomicina A1 en combinación con el TNF. Para contrastar los resultados de esta combinación se utilizaron otros tres agentes quimioterapéuticos conocidos: Act-D, Mit y SFU en distintas líneas celulares (47).

El efecto antitumoral de cada uno de los agentes sugirió la posibilidad de que la administración conjunta de ellos diera una interacción, la confirmación de este hecho dio lugar a la presente investigación (24,28,47,48).

4.1 Toxicidad selectiva de la PAI

La evaluación de la toxicidad de uno o varios compuestos sobre una línea celular puede expresarse en función de la viabilidad. En 1994, Piñeyro y cols. (12) describieron la citotoxicidad de la T-514 (PAI) con el parámetro CT50, esta expresión indicó la concentración citotóxica para el 50% de la población y fue determinada considerando como criterio citotóxico, el daño celular y desprendimiento del sustrato. En el presente estudio se decidió utilizar como parámetro de viabilidad la CI50. Ambos parámetros reflejan el efecto tóxico del o los compuestos y debieran tener correlación.

Al realizar la comparación entre las CT50 reportadas por Piñeyro y cols. (12) y las CI50 determinadas en este estudio se encontraron diferencias en las concentraciones que producen las CT50 y las CI50. Esta discrepancia pudiera explicarse, ya que a través de los años los procesos de separación y la técnica empleada para el aislamiento de la T-514 fueron modificándose, lo que dio como resultado la identificación de nuevos isómeros con peso molecular similar (514), este avance permitió el mejoramiento en el proceso de purificación del compuesto (16). La diferencia en la actividad biológica hace suponer que en el estudio de Piñeyro y cols. (12) pudieran haber participado dos o más compuestos con el mismo peso molecular. A pesar de lo anteriormente mencionado, la PAI mantiene la toxicidad selectiva hacia estos tejidos con un alto índice terapéutico como también fue demostrado por Piñeyro y cols. (12)

4.2 Efecto del TNF sobre distintas líneas celulares

Las líneas celulares expuestas al TNF no presentaron daño a las dosis empleadas en este estudio, a excepción de adenoCa. de mama que mostró inhibición del crecimiento a partir de la dosis de 1 ng/mL, estos datos coinciden con los reportes de Franssen y cols., y Hill y cols. para las líneas neoplásicas de hígado y mama quienes encontraron inhibición del crecimiento con las mismas dosis (26,27).

En el caso de los fibroblastos (I-929), células preferentemente empleadas para evaluar la actividad del TNF, se observó un incremento en la densidad celular con las dosis de 10 y 160 ng/mL.

Por otra parte, las investigaciones realizadas por Kirsten y cols. en referencia a esta línea celular, indican que el TNF se vuelve citotóxico después de que las células alcanzan una densidad de saturación, el daño inicia con un efecto citostático seguido de actividad citotóxica que desencadena citolisis (19). En nuestro estudio, encontramos que con la cantidad de células (5×10^4 células/mL) y condiciones experimentales empleadas no se observó lo anteriormente descrito.

4.3 Combinación PA1+TNF

El efecto citotóxico de la combinación PA1+TNF fue claramente evidenciado en todas las líneas celulares a excepción de las células neoplásicas de adenoCa. de colon en las cuales se observó permanencia de la actividad celular tras la prolongación del cultivo por 72h. Esta

observación indicó un efecto citostático, aunque no es claro si el TNF tiene una actividad citostática diferente de la actividad citotóxica. El efecto citostático del TNF puede simplemente reflejar la sensibilidad variable de diferentes líneas celulares (50).

Entre los mecanismos de citotoxicidad descritos para el TNF los grupos de Sugarman y Tsuchimoto (51,52) refieren que la respuesta al daño no se debe a diferencias en el número o tipo de receptores de superficie. Wallach y cols., y Kirstein y cols. (53,54) por su parte indican que las diferencias en sensibilidad reflejan la presencia de proteínas protectoras que son expresadas en las células resistentes y son deficientes en las células sensibles. Estudios posteriores publicados por Wong y cols. sugieren que la manganeso superóxido dismutasa (MnSOD) actúa como proteína protectora, bajo la hipótesis de que los radicales superóxido generados mitocondrialmente son componentes clave en la muerte celular mediada por el TNF, esta enzima cataliza a los radicales superóxido (55).

En la identificación del tipo de interacción entre los agentes se determinó la combinación que produjo daño en el 50% de la población celular. Esta combinación se conoce con el nombre de combinación-isoefecto (tabla 17).

De acuerdo con los criterios empleados para definir el tipo de interacción (*índice de combinación y efecto multiplicativo*) se observó que la combinación PA1+TNF mostró interacción positiva o potenciación en las células de hepatoma, hepatoblastoma, adenoCa. de mama y Ca. de cérvix presentaron.

La combinación PA1+TNF sobre estas líneas celulares además de presentar potenciación en la combinación-isoefecto también lo presentaron en otras combinaciones.

Todas las combinaciones probadas sobre las células de adenoCa. de mama y Ca. de cérvix mostraron un efecto citotóxico substancial en todas las combinaciones, en tanto que las células de hepatoma presentaron este efecto en las combinaciones con TNF de 5, 10 y 160 ng/ml. y en hepatoblastoma solo ocurrió con las dosis más altas del TNF.

Por el contrario, en las líneas celulares de melanoma y fibroblastos no se observó interacción entre los agentes de la combinación que produjo el isoefecto. Sin embargo las combinaciones con las dosis más altas de PA1 y 160 ng/mL de TNF presentaron potenciación. En referencia a estas observaciones Berenbaum menciona que la dirección de una interacción entre dos agentes no es necesariamente la misma en todas las combinaciones, ya que es posible observar potenciación, sumación o antagonismo en combinaciones diferentes de la combinación en estudio. Lo cual describe un comportamiento bimodal o multimodal en los agentes probados (1).

Para fines de valoración e interpretación de una interacción se emplea la combinación-isoefecto.

La combinación PA1+TNF sobre las células benignas de hígado y de colon y el adenoCa. de colon no presentaron interacción, el daño observado en las

combinaciones fue similar al que presentaron las células tratadas únicamente con PAI.

Los datos referidos previamente hacen evidente que la PAI sensibiliza o induce al efecto tumoricida del TNF y que la combinación PAI+TNF mantiene la toxicidad celular.

En relación a los mecanismos de lesión celular de la PAI se ha reportado inhibición de la topoisomerasa II por Lansiaux y cols. (56) y la generación de radicales libres por Zanatta (57). En este contexto, los grupos de Alexander (58), Orr (59), y Raymond (60) han encontrado que inhibidores de la topoisomerasa II como el etopósido y agentes quimioterapéuticos que inducen la generación de radicales libres a través de mecanismos intra y extracelulares, como la mitomicina C y la adriamicina respectivamente, potencian la acción antitumoral del TNF. En este estudio se demuestra que la PAI también sensibiliza el daño celular del TNF.

Estas observaciones sugieren que la administración conjunta de estos agentes en neoplasias hepáticas y de cérvix pudiera resultar en la remisión parcial o total de estos tumores lo que conduciría a aumentar la sobrevida en pacientes con estas entidades patológicas.

En el estudio de fase clínica I para evaluar el efecto de la PAI en pacientes con carcinoma cérvico uterino (CaCu) recurrente, Martínez y cols (61) encontraron un aumento significativo en la sobrevida y una mejor calidad de la misma, debida a la disminución de la masa tumoral, lo cual disminuyó las molestias.

Este rango de sobrevida pudiera incrementarse al optimizar el esquema de tratamiento de la combinación PA1+TNF y lograr eventualmente la disminución de los efectos tóxicos.

Estudios realizados por Ballesteros y cols. (62) han evidenciado que la PA1 induce la secreción del TNF tanto en sangre como en homogenado pulmonar de ratones albinos cepa CD-1. Este efecto también se ha reportado en macrófagos murinos para agentes quimioterapéuticos como la adriamicina y mitomicina C (63).

La información mencionada sugiere que las observaciones del estudio de fase clínica I de la PA1, pudiera deberse al efecto conjunto de ambos compuestos.

La administración de la combinación PA1+TNF podría inducir tolerancia celular hacia la toxicidad inducida por el TNF. Se ha descrito que la línea celular hepática Hep G2 (20) pretratada con el TNF y posteriormente expuesta a dosis normalmente tóxicas del TNF y Act-D no presenta daño celular.

Con base en el efecto observado sobre la línea celular adepoCa. de mama sería conveniente evaluar el efecto de esta combinación en otras neoplasias de glándula mamaria, ya que la línea celular estudiada presenta una pobre respuesta a la toxina; aún y cuando su interacción con el TNF sea positiva, las dosis de PA1 que mostraron este efecto se encuentran muy cercanas a las que produjeron daño en las células benignas.

4.4 Sensibilización con Act-D

Debido a que la mayoría de las células estudiadas presentaron resistencia al efecto tóxico del TNF, se realizó un pre-tratamiento sensibilizador con el inhibidor de la síntesis proteínas Act-D, este compuesto ocasiona una notoria inducción de la citólisis mediada por el TNF (28, 63).

Las líneas celulares expuestas a este bloqueador metabólico previo a la exposición con la PA1 no mostraron interacción, sino la sumación de los efectos de ambos compuestos. En cambio, se observó un aumento en la sensibilidad de las líneas celulares a la citólisis del TNF (en combinación con la PA1) en donde se presentó sumación excepto para las células de hepatoblastoma, fibroblastos y adenoCa. de mama en el pretratamiento por 24h, donde si se observó interacción positiva. Las líneas celulares mostraron daño irreversible y lisis celular, lo cual se encuentra en total concordancia con los grupos de Franssen (26) y Ruff (64).

En este estudio el daño fue observado en todas las líneas celulares; es decir no se mantuvo la toxicidad selectiva, este hecho permite rechazar el pre-tratamiento con Act-D en la combinación PA1+TNF ya que se aleja de uno de los objetivos de la quimioterapia: "el dañar preferentemente a células malignas" (3).

4.5 Combinación PA1 + Mit

La administración conjunta de PA1+Mit sobre las líneas celulares resultó en potenciación para las células benignas y neoplásicas de colon y hepatoblastoma. Por lo contrario, las células de hígado de Chang y adenoCa.

de mama no se observó interacción. Lo anterior indicó que la combinación presenta toxicidad selectiva hacia hígado mas no para colon. Ya que tanto la PAI como la Mit son generadores de radicales libres (57,60), la sensibilidad o resistencia hacia el daño oxidativo de esta combinación puede deberse a la expresión de la proteína protectora manganeso superóxido dismutasa (MnSOD). La expresión de la MnSOD es regulada por el estrés oxidativo y por ciertas citocinas, entre las que se incluye al TNF. (65,66,67).

Pogrebniak ha publicado que compuestos que ejercen citotoxicidad a través de la generación de radicales libres potencian el efecto citocida del TNF(68). Por lo tanto, en este trabajo se hace evidente que la PAI que también es un compuesto que produce radicales libres, de igual forma sensibiliza al daño celular mediado por el TNF en las células neoplásicas de hepatoma, hepatoblastoma, adenoCa. de mama y Ca. de cérvix.

4.6 Combinación PAI+5FU

La combinación de la PAI con el antimetabolito 5FU no presentó interacción en ninguna de las líneas celulares estudiadas. El inertismo resultante puede deberse a uno u otro de los agentes participantes en este experimento. Pogrebniak y cols. (68) han reportado que este agente quimioterapéutico no genera especies activas de oxígeno y no amplifica la producción del TNF, esto pudiera explicar el porque no se observó interacción en esta combinación.

CAPÍTULO CINCO

CONCLUSIONES, PERSPECTIVAS Y CONTRIBUCIONES

5.1 CONCLUSIONES

- La determinación de las CT_{max}, CT_{min} y CT₅₀ con los métodos morfológico y de azul de tripano indicaron que el daño celular producido por la PAI es dependiente de la dosis y que mantiene la toxicidad selectiva hacia células tumorales.
- Las líneas celulares expuestas al TNF no presentaron daño, a excepción de adenoCa. de mama a las dosis de 10 y 160ng/mL.
- Todas las líneas celulares estudiadas expuestas a la combinación PAI+TNF que produjo isoeffecto presentaron toxicidad selectiva, esto se observó en los cuatro métodos de evaluación.

- La combinación PA1+TNF produjo interacción positiva o potenciación en las líneas celulares de hepatoma PLC/PRF/5, hepatoblastoma Hep G2, adenoCa. de mama BT-20 y carcinoma de cerviz SIHA.
- El pretratamiento con Act-D sensibilizó al daño producido por el TNF pero no mantiene la toxicidad selectiva observada con la combinación PA1+TNF.
- La combinación PA1+Mit presentó potenciación en las líneas celulares de hepatoblastoma HepG2, colon benigno y adenoCa. de colon LoVo, en tanto que las células benignas de hígado de Chang y adenoCa. de mama BT-20 no mostraron interacción.
- La combinación PA1+5FU presentó interacción antagónica con todas las líneas celulares estudiadas.

5.2 PERSPECTIVAS

- Determinar la presencia de la proteína protectora Manganeso superóxido dismutasa en las líneas celulares empleadas en este estudio, ya que esta enzima cataliza a los radicales superóxido los cuales son componentes clave en la muerte celular mediada por el TNF.
- Determinar el efecto de la combinación PA1+TNF en otras líneas tumorales de mama.
- Elucidar el mecanismo de la interacción positiva de la combinación PA1+TNF sobre una base celular y/o molecular.

- Estudiar el efecto de la combinación PA1+TNF en distintos esquemas de administración en un modelo *in vivo*.
- Estudiar el efecto de la combinación PA1+TNF con un tratamiento previo con el TNF en un modelo *in vivo*.
- Determinar las concentraciones de TNF circulante en los pacientes incluidos en los protocolos de fase clínica I de la PA1.

5.3 CONTRIBUCIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo nos indican que la PA1 sensibiliza al daño celular mediado por TNF e interacciona positivamente con este compuesto en las líneas celulares de hepatoma PLC/PRF/5, hepatoblastoma HepG2, adenoCa. de mama BT20 y Ca. de cérvix SIHA y con la mitomicina C en las líneas celulares de hepatoblastoma HepG2, colon benigno y adenoCa. de colon LoVo.

Con base a los resultados aquí presentados se sugiere que el tratamiento combinado de estos agentes, podría brindar nuevas oportunidades terapéuticas a los pacientes que manifiesten este tipo de neoplasias.

Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales para esclarecer los mecanismos involucrados y su efecto *in vivo*, ya que este trabajo por ser el primero en este tópico, es sólo el principio de un campo todavía inexplorado para esta sustancia.

REFERENCIAS

1. Berenbaum MC. (1981) Criteria for analyzing interactions between biologically active agents. *Adv. Cancer Res.* 35, 269-335.
2. Kenakin TP. (1985) The quantification of relative efficacy of agonists. *Journal of Pharmacological Methods* 13, 281-308.
3. Tarnock IF. and Hill RP. (1992) *The basic science of Oncology*, 2nd edn., McGraw-Hill, New York 19, 338-359.
4. Ariens E. and Simonsis AM. (1962) Drug-receptor interaction. *Acta Physiol. et Pharmacol.* 11, 151-172.
5. Ariens E. and Simonsis AM. (1964) A molecular basis for drug action. The interaction of one or more drugs with different receptors. *J. Pharm. Pharmacol.* 16, 137-157.
6. Valdecasas FG, Laporta J, Salvá J, Casasa E, Espinagues J, et al (1978) *Bases farmacológicas de la terapéutica medicamentosa*. Ed. Salvat. 10, 131.
7. Dreyer D, Arni I, Bashirzadeh C, Anderson W, Smith R. and Daves D. (1975) Toxins causing non-inflammatory paralytic neuropathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am Chem. Soc.* 97, 4986-4990.
8. Bermudez MV, González-Spencer D, Guerrero M, Wakeman N. and Páñez A. (1986) Experimental intoxication with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicology* 24, 1091-1097.
9. Bermudez MV. (1989) "Toxicidad aguda de la *Karwinskia humboldtiana* en diferentes especies animales". Tesis doctoral U.A.N.L., Monterrey, N.L.
10. Loomis T. (1978) Numbers in Toxicology. In: T. Loomis, (Ed), *Essentials of Toxicology*, Lea and Febiger, Philadelphia, 2, 13-28.
11. Páñez A. (1990) Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T-514 de *K. humboldtiana*. Tesis doctoral, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, N.L.
12. Páñez A, Martínez LE. and González R. (1994) *In vitro* selective toxicity of toxin T-514 from *Karwinskia humboldtiana* (buckthorn) plant on various human tumor cell lines. *Toxicology* 92, 217-227.
13. Sepúlveda J, Bermúdez MV, Páñez A., Taméz V, Lozano F. (1990) Efectos de la T-514 de la *K. humboldtiana* sobre los peroxisomas de hepatocitos de *M. fascicularis*. VIII Enc. Reg. Inv. Biom. 19.
14. Moreno M, Vargas R, Wakeman N. and Sepúlveda J. (1994) Effect of Peroxisomycin on catalase activity. The Am. Soc. for cell Biology. 34th annual meeting 10-14, San Francisco, Ca.

15. Sepúlveda J, Van Der Klei I, Piñeyro A, Harder W, and Vecalnis M. (1992) Studies on the effect of T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* 91, 207-212.
16. Salazar ML, Piñeyro A. and Waksmuta N. (1996) A reverse phase HPLC method for quantification of Peroxiantronic and other anthracenonic compounds. *J. liq. Chrom.* 19 (19), 1391-1403.
17. Coley WB. (1894) Treatment of inoperable malignant tumors with toxins of erysipelas and the bacillus prodigiouus. *Trans. Am. Surg. Assoc.* 12, 183-212.
18. Beutler B. (1992) Tumor necrosis factors, the molecules and their emerging role in Medicine, Raven Press, New York.
19. Carswell EA, Old LJ, Kassel RI, Green S, Fiore N, Williamson B. (1975) An endotoxin induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72, 3666-3670.
20. Shear MJ. (1936) Chemical treatment of tumors. IX. Reactions of mice with primary subcutaneous tumors to injection of a hemorrhage-producing bacterial polysaccharide. *J. Natl. Cancer Inst.* 4, 461-476.
21. Paul NL, Ruddle NH. (1988) Lymphotoxin. *Annu. Rev. Immunol.* 6, 407.
22. Goeddel DV, Aggarwal B, Gray PW, Leung DW, Nedwin GE, Palladino MA, Patton JS, Pezzica D, Shepard HM, Sagarman B). and Wong (GHW. (1986) Tumor necrosis factor: gene structure and biological activities. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 51, 597-609.
23. Le J. and Vilcek J. (1987) Tumor necrosis factor and interleukin 1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab Invest.* 56, 234-248.
24. Old LJ. (1988) Tumor necrosis factor. *Sci. Am.* 258, 59-75.
25. Wong GHW. and Goeddel D. V. (1989) Tumor necrosis factor, In the human monocyte. G. L. Asherson and M. Zembala eds. (New York: Academic Press), 195-215.
26. Franzen L, Van der Heyden J, Ruyschaert R. and Fiers W. (1986) Recombinant Tumor necrosis factor: its effect and its synergism with Interferon- γ on a variety of normal and transformed human cell lines. *Eur. J.Cancer Clin. Oncol.* 22, 419-426.
27. Reid TR, Tani FM. and Ringold GM. (1989) Evidence for two mechanisms by which TNF kills cells. *J. Bio. Chem.* 264, 8, 4581-4589.
28. Hill D, Schmidt J, Shefelokey S, Cohen D. and McClain C. (1995) In vitro Tumor necrosis factor cytotoxicity in HEP G2 liver cells. *Hepatology* 21, 4, 1114-1119.
29. Yasutake WG, Parkin JL, Caspers JJ. and Theologides A. (1991) Tumor Necrosis factor/cachectin decreases catalase activity of rat liver. *Cancer Res.* 51, 3990-3995.

30. Natanson C, Eichenthal FW, Danner KL, et al. (1989) Endotoxin and TNF challenges in dogs simulate the cardiovascular profile of human septic shock. *J. Exp. Med.* 169, 823-832.
31. Sherman MI, Spriggs DR, Arthur KA, Imamura K, Frei E, and Kufe DW. (1990) Recombinant human tumor necrosis factor administered as a five-day continuous infusion in cancer patients: phase I toxicity and effects on lipid metabolism. *J. Clin. Oncol.* 6, 344-350.
32. Bucer KA, Tan CH, Barzgar S, Spriggs DR, Sherman MI, and Rosenberg DR. (1989) TNF infusions have a procoagulant effect on the hemostatic mechanism of humans. *Blood* 74, 165-172.
33. Demetri G, Spriggs D, Herman M, et al. (1989) A phase I trial of recombinant human tumor necrosis factor and interferon gamma: effects of combination cytokine administration *in vivo*. *J. Clin. Oncol.* 7, 1545-1553.
34. Abbuzzese JL, Levin B, Ajani JA, et al. (1989) Phase I trial recombinant human gamma-interferon and recombinant human tumor necrosis factor in patients with advanced gastrointestinal cancer. *Cancer Res.* 49, 4057-4061.
35. Jakubowski A, Larchian W, Starna P, et al. (1988) Phase I trial of intravenous tumor necrosis factor plus interferon gamma in patients with advanced cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 7, 164.
36. Urban W, Clark JW, Longo DL, et al. Phase I evaluation of the toxicity and immunomodulating effects of tumor necrosis factor and interferon gamma. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.* 7, 166 (abst).
37. Schiller JH, Alberti DB, Arzoozian RZ, et al. (1990) Phase I trial of combination of recombinant gamma interferon and recombinant tumor necrosis factor alpha. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.* 31, 183.
38. Tolnai S. (1975) A method for viable cell count. V. J. Evans and M. M. Vincent (Eds), *Tissue culture assoc. manual*, Rockville MD 37.
39. Metcalf T. (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.* 65, 55-63.
40. Alley M, et al (1988) Feasibility of Drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res.* 48, 589-601.
41. Scudiero D, et al (1988) Evaluation of a soluble Tetrazolium/Formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and other tumor cell lines. *Cancer Res.* 48, 4827-4833.

42. Monks A, Scudiero D, Skolnik P, Shoemaker R, et al. (1991) Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Nat. Cancer Institute* 83, 757-766.
43. Ekwall B. and Johanson A. (1980) Preliminary studies on the validity of *in vitro* measurement of drug toxicity using HeLa cells I. Comparative *in vitro* cytotoxicity of 27 drugs. *Toxicol. Lett* 5, 199-210.
44. Kolmogorov-Smirnov (1974) Introduction to the theory of statistics, 3rd ed. Modd and Graybill, 504-520.
45. Chou TC. (1994) Assessment of synergistic and antagonistic effect of chemotherapeutic agents *in vitro*. In chemotoxicity testing in gynecologic malignancies and breast cancer. *Contrib. Gynecol. Obstet.* (Koschli OR., Sevin BU., Haller U., eds.) Karger-Verlag, Basel. 19, 91-107.
46. Chou TC and Bertino JR. (1996) Chemotherapy: Synergism and antagonism. In *Encyclopedia of Cancer Biology* (Bertino JR., ed) Academic Press.
47. Steel GT. and Peckham MJ. (1979) Exploitable mechanisms in combined radiotherapy-chemotherapy: the concept of additivity. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 5, 85-91.
48. Unkelbach HD. and Wolf T. (1985) *Biometric Qualitative Dosis-Wirkungs-Analyse.* Gustav Fischer Verlag Stuttgart 90-93.
49. Kirstein M, Piers W, Baglioni C. (1986) Growth inhibition and cytotoxicity of tumor necrosis factor in L-929 cells is enhanced by high cell density and inhibition of mRNA synthesis. *J. Immunol* 137, 2277-2280.
50. Ruggiero V, Latham K, Baglioni C. (1987) Cytostatic and cytotoxic activity of tumor necrosis factor on human cancer cells. *J. Immunol* 138, 2711-2717.
51. Sogamori EJ, Aggarwal BB, Haas PJ, Figari IS, Palladino MA. and Shepard HM. (1985). Recombinant human tumor necrosis factor α : effects on proliferation of normal and transformed cells *in vitro*. *Science* 230, 943-945.
52. Taniguchi M, Yip YK. and Vilcek J. (1985) Tumor necrosis factor: specific binding and internalization in sensitive and resistant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 7626-7630.
53. Wallach D. (1986) Cytotoxins (tumor necrosis factor, lymphotoxin and others): molecular and functional characteristics and interactions with interferons. *Interferon* 7, 89-124.
54. Kirstein M. and Baglioni C. (1986) Tumor necrosis factor induces synthesis of two proteins in human fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 261, 9565-9567.

55. Wong GH, Howell JH, Oberley LW and Goeddel DV. (1989) Manganese super oxide dismutase is essential for cellular resistance to cytotoxicity of tumor necrosis factor. *Cell* 58, 923-931.
56. Lamasers A, Leino W, Baldeyron B, Malton C, Watter N, Vezia H, Martinez F, Piñeyro A. and Bally C. (2001) DNA topoisomerase II inhibition by Peroxisomicina A1 and its radical metabolite induces apoptotic cell death of HL-60 and HL-60/MX2 human leukemia cells. *Chem Res. Tox.* 14 (1), 16-24.
57. Zamatta MT. (2000) Generación de radicales libres *in vitro* de la Peroxisomicina A1 sobre las enzimas mitocondriales hepáticas de *Musca domestica* y ratas wistar. Tesis doctoral, Facultad de Medicina, UANL, Monterrey, N.L.
58. Alexander RH, Nelson WG, Conley DS. (1987) Synergistic enhancement by tumor necrosis factor of *in vitro* cytotoxicity from chemotherapeutic drugs targeted at DNA topoisomerase II. *Cancer Res.* 47, 2403-2406.
59. Orr D, Oldham R, Lewis M, Bertoli L, Birch R. (1989) Phase I study of the sequenced administration of etoposide and recombinant tumor necrosis factor in patients with advanced malignancy. *Proc Am. Soc. Clin. Oncol.* 8, 741.
60. Raymond J, Logan M, Ernstoff M, et al. (1990) Phase I study of tumor necrosis factor combined with doxorubicin C in cancer patients. *Proc. Am Soc. Clin. Oncol.* 9, 286.
61. Martínez LE, González JF, Vidal O. and Piñeyro A. (1996) Clinical phase I study of peroxisomicin in patients with recurrent cervical cancer. VI world conference on clinical pharmacology and therapeutics. Buenos Aires, Argentina.
62. Halletteras R, Flores S, Piñeyro A. and Sepúlveda J. (1998) Peroxisomicina A1 induces TNF α secretion and pmn infiltration in lung microvascular bed of the albino mice (CTB-1). *Electron microscopy Symposium RR, IV.*
63. Bancr KA, Tam CH, Hartzgar S, Spriggs DR, Sherman ML, Rosenberg RD. (1989) Tumor necrosis factor infusions have a procoagulant effect on the hemostatic mechanism of humans. *Blood* 74, 165-172.
64. Ruff MR. and Hifford GE. (1981) Tumor necrosis factor. In: Pick E., ed. *Lymphokines*. New York, Academic Press, 2, 235-275.
65. Wang GHW, Goeddel DV. (1988) Induction of manganese superoxide dismutase by tumor necrosis factor: possible protective mechanism. *Science* 242, 941-944.
66. Hazan HM. (1988) Biosynthesis and regulation of superoxide dismutases. *Free Radical Biol. Med.* 5, 377-385.

67. Hahn T, Toker L, Budilovsky S, Aderka D, Eshhar Z, Wallach D. (1985) Use of monoclonal antibodies to a human cytotoxin for its isolation and for examining the self-induction of resistance to this protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 3814-3818.
68. Pogrebniak HW, Matthews W. and Pass HI. (1991) Chemotherapy amplifies production of tumor necrosis factor. *Surgery* 110 (2), 231-237.
69. Boccardo F, Cannata D, Rubagotti A, Guarneri D, Decensi A, et al (1994) Prophylaxis of superficial bladder cancer with mitomycin or interferon- α 2b: results of a multicentric italian study. *J. Clin. Oncol.* 12, 7-13.
70. Mauro D, De Riel J, Tallarida R. and Sirover M. (1993) Mechanisms of excision of 5-fluorouracil by uracil DNA glycosylase in normal human cells. *Mol. Pharmacol.* 43, 854-857.

RESUMEN AUTOBIOGRÁFICO

María Sachiko Leo Wang

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

Título de la Tesis: Interacción de la Peroxisomicina A1 con el Factor de necrosis tumoral alfa *in vitro*.

Biografía

Datos Personales:

Lugar y Fecha de Nacimiento: Hgo. del Parral, Chih., México, el 13 de julio de 1969.

Estado Civil: Casada.

Residencia: Químico Farmacobiólogo por la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Autónoma de Coahuila en 1991.

Experiencia Profesional: Becario del departamento de Biofísica y Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la U.A.C. de 1990 a 1991. Participación como maestro de laboratorio de Farmacología y Toxicología de la U.A.N.L. desde 1992 a la fecha, que se imparte a los alumnos del tercer año de la carrera de Médico Cirujano y Partera.

Presentación de trabajos de investigación en Congresos Nacionales e Internacionales:

- Effect of Peroxisomicine A1 and Tumor necrosis factor α *in vitro*. Fifth Chemical Congress of North America 1997, Cancún, Q.R., Abstract book 2362.
- Efecto de la Peroxisomicina A1 con el Factor de necrosis tumoral α *in vitro*. Congreso Nacional de Investigación biomédica 1996, Monterrey, N.L.
- Variabilidad de extractos de fermentación de *Bacillus thuringiensis* contra lepidópteros. III Congreso de Biotecnología 1996, Chihuahua, Chih.
- Evaluación del efecto citotóxico de la toxina T-496 de *K. humboldtiana* en cultivos celulares primarios de hígado y riñón. XI Encuentro de investigación biomédica 1993, Monterrey, N.L.

Distinciones:

- Reconocimiento al Mejor Estudiante del Doctorado en Ciencias con Especialidad en Farmacología y Toxicología por la Fac. de Medicina de la U.A.N.L. durante el ciclo escolar 1998-1999.
- Diploma otorgado por el Comité de la institución. Los mejores estudiantes de México, en la carrera de QFB de la Universidad Autónoma de Coahuila. Conacyt, Atenalecyt y Diario de México, México, D.F. 1991.
- Medalla Juan Antonio de la Fuente, otorgado al promedio más alto de calificaciones al término de los estudios profesionales de la Universidad Autónoma de Coahuila, 1991.



