INTRODUCCION.

La *Karwinskia humboldtiana* es una planta de la familia de las *Rhamnaceas*, distribuída prácticamente en todo el territorio mexicano, en el Suroeste de los Estados Unidos de Norteamérica y en parte de Centro América. Fue descrita por primera vez en el siglo XVIII por el sacerdote jesuita Francisco Javier Clavijero en su libro "Historia de la Antigua o Baja California"[1].

Por ser la sintomatología muy evidente, se ha relacionado desde antaño a la *Karwinskia humboldtiana* con un síndrome paralítico parecido al de Guillain-Barré, a la poliomielitis, y a otras polineuropatías periféricas[1,2,3,4,5,6,7,8]; de tal manera ha sido estrecha esta relación, que uno de sus nombres vulgares es el de "Tullidora". Sin embargo, la ingestión de grandes cantidades del fruto de la planta ha dado lugar a intoxicaciones de evolución mortal dentro de las primeras 72 horas, sin que hubiesen aparecido manifestaciones neurológicas. Estos cuadros tóxicos no tuvieron explicación sobre la causa de la muerte.

Al margen de la patología humana, se han reportado en cabras y ovejas[9,10,11] lesiones extraneuronales consistentes en edema agudo de pulmón, necrosis de músculo esquelético y cardíaco, y daño hepático seguido de degeneración grasa. Estas observaciones plantearon la duda de que hubiera otros órganos blanco para la acción tóxica de esta planta.

En 1975 Dreyer y cols.[12] aislaron del endocarpio de la *Karwinskia humboldtiana*, sitio ya sugerido por Clavijero desde mediados del siglo XVIII[1], cuatro substancias que fueron identificadas como antracenonas diméricas, y de manera simple, se les llamó en función de su peso molecular: T-496, T-514, T-516, y T-544. Posteriormente Waksman y cols.[13,14] han aislado un isómero de la T-514 a partir de la *Karwinskia parvifolia* y otro (T-ISO514) a partir de la *Karwinskia humboldtiana*. Mas recientemente, aislaron a partir de la *Karwinskia affin humboldtiana*, otro compuesto al que llamaron T-510.

Los nombres de las antracenonas diméricas y sus estructuras químicas se exponen a continuación:

1. 3,4-DIHIDRO-3,3'-DIMETIL-1',3,8,8',9-PENTAHIDROXI-(7,10')-BIANTRACENO-1,9'-(2H)-DIONA (T-496), aislada por primera vez de la *K. humboldtiana*[12].

2. 3,3'-DIMETIL-3,3',8,8',9,9'-HEXAHIDROXI-3,3',4,4'-TETRAHIDRO-(7,10')-BIANTRACENO-1,1'-(2H,2H')-DIONA (T-514), aislada por primera vez de la *K. humboldtiana*[12].

3. 7-(2'-ACETO-6',8'-DIMETOXI-3'-METIL-1'-HIDROXINAFT-4'-IL)-3,4-DIHIDRO-3-METIL-3,8,9-TRIHIDROXI-1-(2H)-ANTRACENONA (T-516), aislada por primera vez de la *K. humboldtiana*[12].

4. 7-[3',4',-DIHIDRO-7',9'-DIMETOXI-1',3'-DIMETIL-10'-HIDROXI-1'H-NAFTO-(2',3'-C)-PIRAN-5'-IL]-3,4-DIHIDRO-3,-METIL-3,8,9-TRIHIDROXI-1-(2H)-ANTRACENONA (T-544), aislada por primera vez de la *K. humboldtiana*[12].

5. 3,3'-DIMETIL-3,3',8,8',9,9'-HEXAHIDROXI-3,3',4,4'-TETRAHIDRO-(7,10')-BIANTRACENO-1,1'-(2H,2H')-DIONA (T-514), aislada por primera vez de la *K. parvifolia*[13].

6. 3,3'-DIMETIL-3,3',8,8',9,9'-HEXAHIDROXI-3,3',4,4'TETRAHIDRO-(7,7')-BIANTRACENO-1,1'-(2H,2'H)-DIONA (T-ISO514), aislada por primera vez de la *K. humboldtiana*[14].

7. 3,3'-DIMETIL-1,8,3',8',9'-PENTAHIDROXI-7,10'-BIANTRACENO-9,10,1'-(2'H)-TRIONA (T-510 o Anhidro 514-9,10-quinona), aislada por primera vez de la *K. affin humboldtiana*[14].

Nota: Los compuestos 2 y 5 tienen la misma estructura planar, difiriendo en la configuración de C_3 y/o C_3'.

Bermúdez y cols. han confirmado posteriormente la presencia de daño hepatopulmonar grave en distintas especies animales[15,16], tanto con el fruto completo como con las toxinas T-514 y T-544, y también han encontrado manifestaciones tóxicas en músculo estriado y músculo cardíaco. Aún más, la T-514 se encontró notoriamente tóxica para hígado, pulmón y riñón, con alteraciones

caracterizadas por necrosis centrolobulillar y esteatosis hepática, lesión en los capilares pulmonares y degeneración turbia en el riñón; sin que hubiera manifestaciones de daño neurológico ni en el aparato digestivo, v.gr. colon. Por otra parte la T-544 mostró la clásica polineuropatía periférica además del ya mencionado daño hepatorrenal.

La selectividad de la T-514 para el hígado y el pulmón sin daño neurológico periférico (recientemente Bermúdez y cols. han encontrado lesión astrocitaria en Macacus fascicularis -comunicación personal-); llevaron a dichos autores a la determinación de la $DL_{50\%}$ en distintas especies de animales, además de otras pruebas de toxicidad aguda. La curva de la distribución de la letalidad siempre mostró una forma particularmente empinada, que habla de una variación biológica estrecha. A continuación se presenta la Dosis Letal Media para cada una de las distintas especies de animales:

Ratón	6.52 ± 0.86 mg/Kg
Rata	17.27 ± 2.16 mg/Kg
Hamster	8.94 ± 1.30 mg/Kg
Cobayo	9.28 ± 1.02 mg/Kg
Macaco	5.82 ± 0.82 mg/Kg

Nota: todas estas cifras de letalidad fueron obtenidas por vía intraperitoneal.

La forma particularmente "empinada" que he mencionado de la curva de letalidad, nos hizo pensar que si hubiera toxicidad selectiva de la T-514 entre células de origen benigno y células neoplásicas malignas, por pequeña que fuera, podría tener un potencial uso terapéutico. Esto nos llevó a estudiar *in vitro* los efectos citotóxicos de la T-514 en células humanas de origen hepático y pulmonar, tanto benignas como procedentes de neoplasias malignas, y a comparar la respuesta a la T-514 con agentes citotóxicos conocidos. Adicionalmente se hizo lo mismo con células benignas y malignas de colon.

Existe una abundante información sobre la correlación entre los efectos cualitativos y cuantitativos de la cititoxicidad *in vitro* e *in vivo*[17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30], utilizándose para rastreo preclínico de nuevos agentes antineoplásicos y para determinar "oncogramas *ad hoc*" a los pacientes. La interpretación de los resultados habitualmente debe de hacerse con cuidado, sin considerarlos como definitivos, hasta no hacer una correlación con otros modelos experimentales,

y aun así, la Fase de Farmacología Clínica I para establecer las dosis terapéuticas, es una etapa en la investigación farmacológica que no puede evadirse. Sin embargo, la investigación con modelos *in vitro* tiene las siguientes ventajas: bajo costo y corto tiempo para obtener resultados.

La Quimioterapia en general y en particular la de las neoplasias, se concibe conceptualmente como "Toxicidad Selectiva" (alto daño para un tipo de células y bajo o ninguno para otras). Este concepto fue planteado por Paul Ehrlich[31,32] y rara vez se alcanza plenamente en la Quimioterapia de las neoplasias, ya que la semejanza entre las células de origen benigno y maligno es muy estrecha. Por esta razón muchos autores utilizan solamente células de origen maligno[17,18,21,22,33], siempre y cuando el efecto citotóxico de la substancia dada se alcance a concentraciones menores de 10 mcgr/ml. Sin embargo, también un número grande de autores utilizan el criterio de comparar los efectos de las substancias potencialmente citotóxicas sobre células de ambos orígenes, de tal manera que hablan de citotoxicidad selectiva *in vitro*[34,35,36].

Con el fin de definir con mayor precisión la identidad de la T-514, me permito añadir a este capítulo las siguientes características fisicoquímicas obtenidas de Martínez Villarreal[37]:

Punto de fusión	130° C
Solubilidad en agua	0.01 mg/ml
Solubilidad en cloroformo	20.00 mg/ml
Solubilidad en dimetilsulfóxido	50.00 mg/ml
Coeficiente de partición grasa/agua	8.20
pKa	7.26

Los espectros de Infrarrojo y Ultravioleta que se aprecian en las páginas 8 y 9, así como las señales de RMN de ^{1}H y ^{13}C en la páginas 10 y 11 fueron obtenidos por cortesía de la Dra. Noemí Waksman.

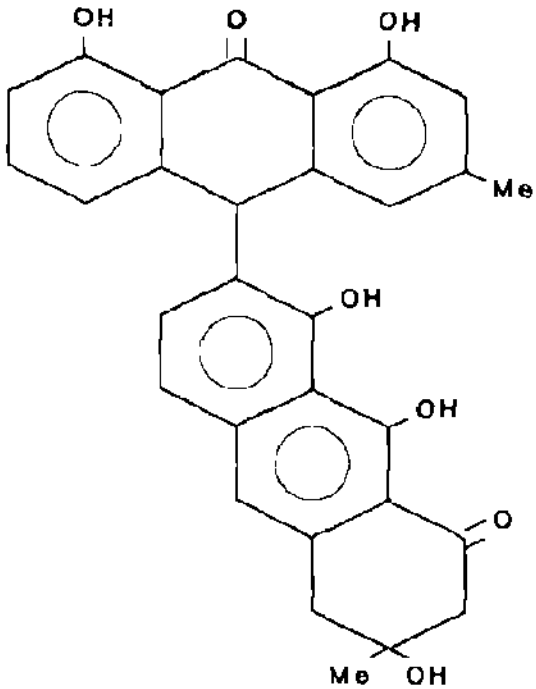


Fig. 1 (T-498)

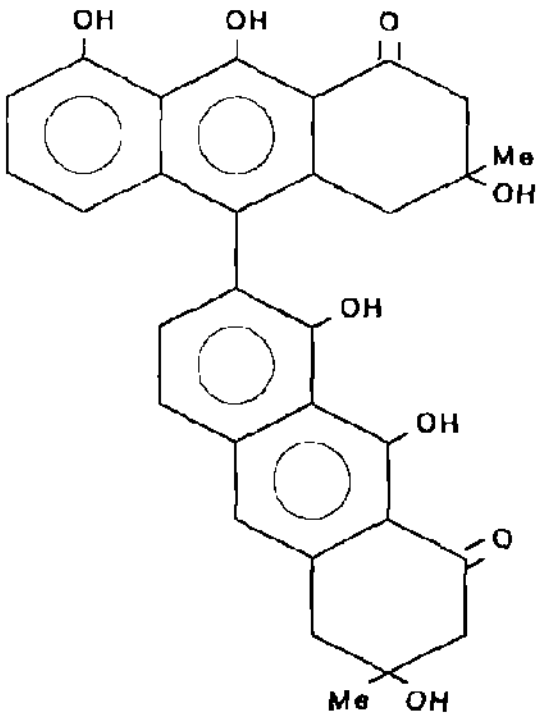


Fig. 2,3 (T-514)

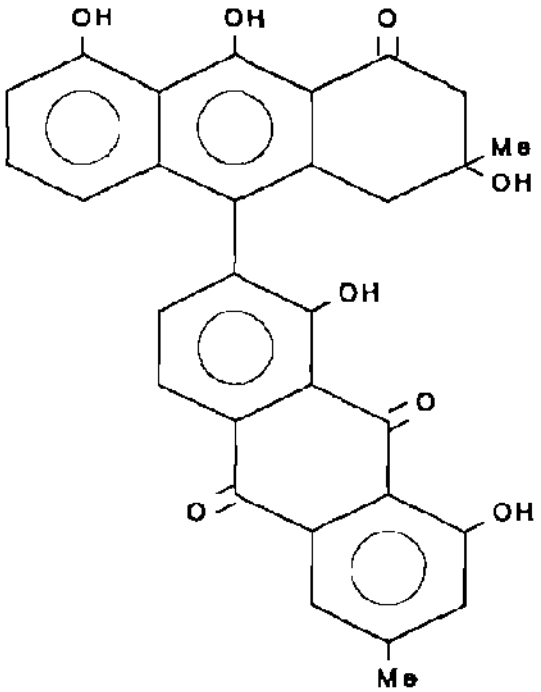


Fig. 4 (T-510)

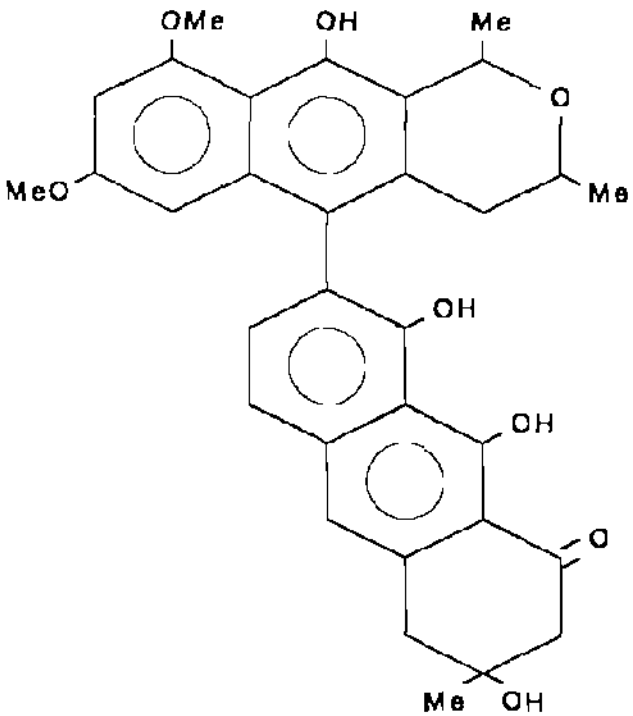


Fig. 5 (T-544)

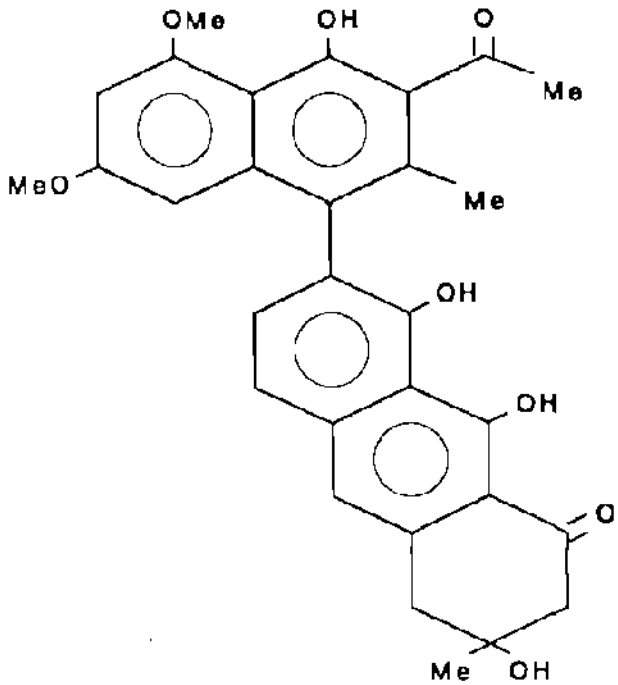


Fig. 6 (T-516)

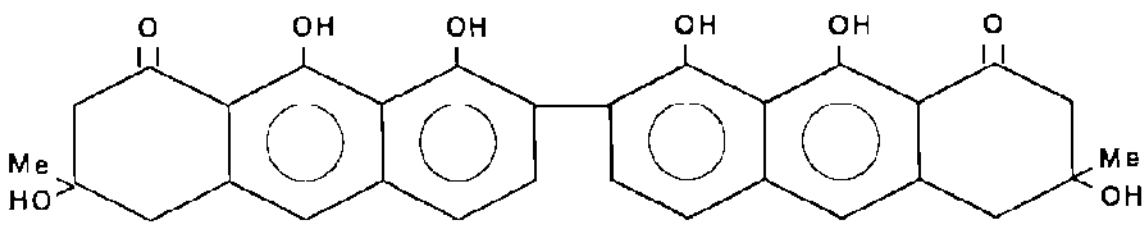
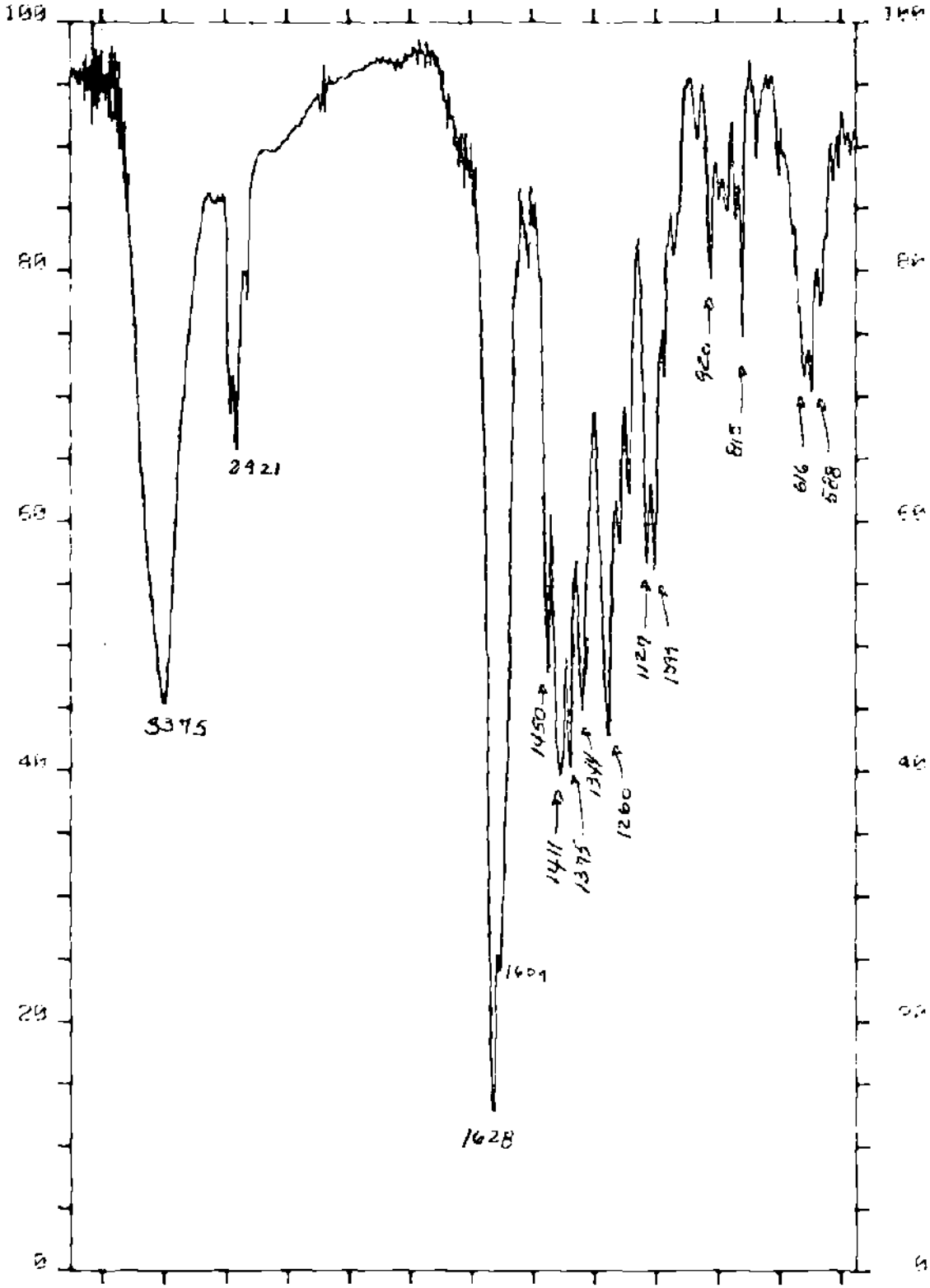
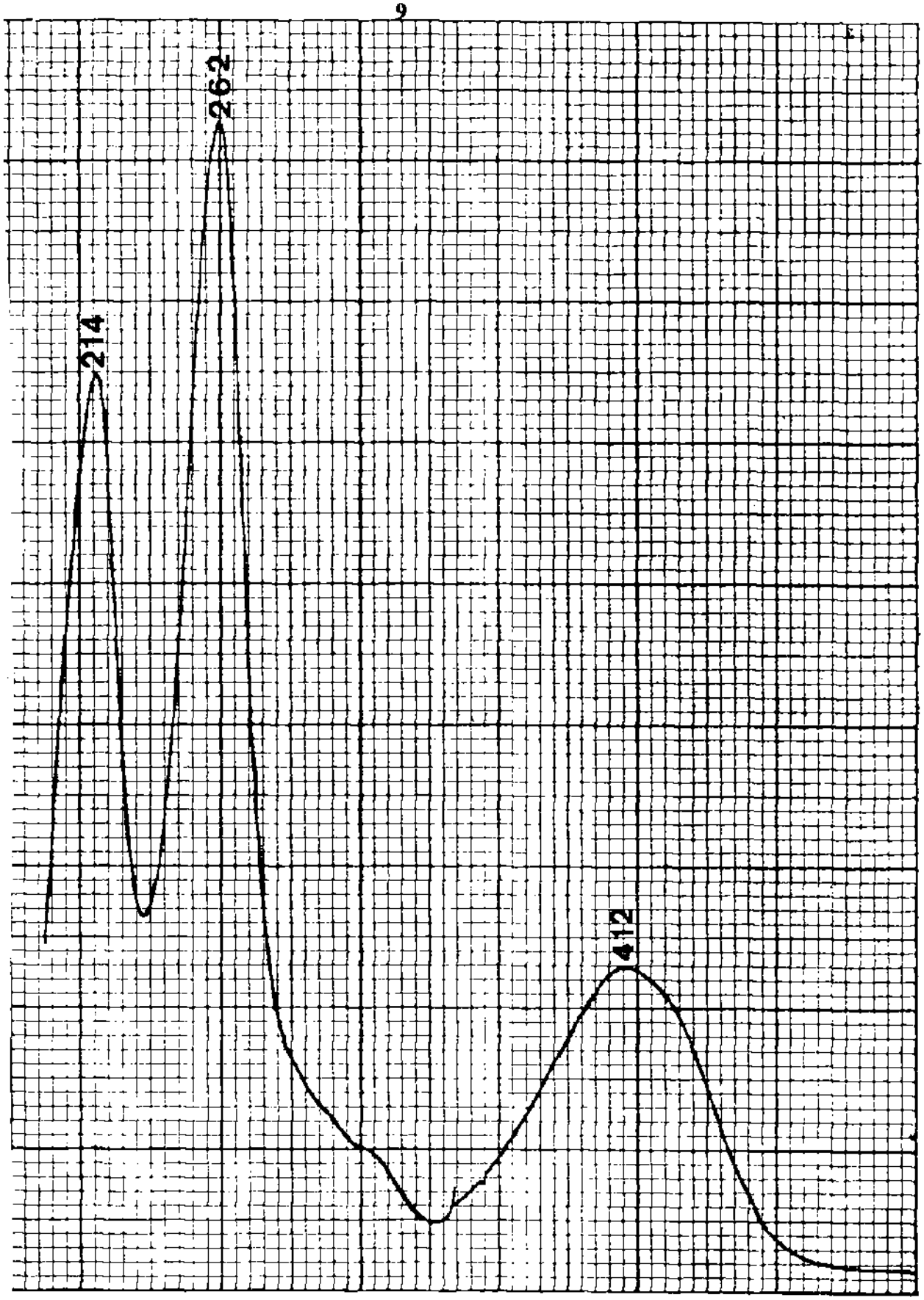


Fig. 7 (T-ISO514)



Gráfica 1. Espectro infrarrojo de la T-514.



Gráfica 2. Espectro Ultravioleta - Visible de la T-514.

TABLA No. 1

^{1}H-RMN de la T-514 y T-514'.

H	T-514	T-514'	H	T-514	T-514'
2	2.87	3.00	2'	2.85	2.95
3-Me	1.45	1.30	3-Me'	1.31	1.15
4	3.13	3.10 (d,16,7)	4'	2.91 (d,16,7)	2.90 (17,5)
		3.00 (d,17,5)		2.70 (d,16,7)	2.70 (17,5)
5	7.35 (d,8,0)	7.39 (8,0)	5'	6.70 (d,8,3)	6.60 (8,25)
6	7.32 (d,8,0)	7.34 (8,1)	6'	7.33 (dd,8,3 y 7,8)	7.34 (8,25 y 7,65)
10	7.10	7.20	7'	6.83 (d,7,8)	6.80 (7,65)
8 OH	9.98	9.95	8'OH	9.90	9.70
9 OH	16.00	15.99	9'OH	16.38	16.15

Solvente DMSO. Constantes de acoplamiento (J) entre paréntesis en Hz.

TABLA No. 2

^{13}C-RMN de la T-514 y T-514'.

C	T-514		T-514'		C	T-514		T-514'	
1	203.20	a	205.28	f	1'	203.70	a	205.53	f
2	50.84		50.83		2'	51.16		51.02	
3	71.02	b	69.68	g	3'	70.08	b	69.21	g
4	43.14		42.41		4'	40.99		40.64	
4a	135.13		138.60		4'a	135.13		138.60	
5	118.59		118.79		5'	117.10		116.50	
6	135.16		135.09		6'	132.60		132.14	
7	119.93		119.40		7'	111.16		110.45	
8	155.38		145.47		8'	158.51		157.62	
8a	112.92	c	112.10	h	8'a	112.81	c	112.02	h
9	165.61		163.98		9'	165.49		163.63	
9a	109.22	d	109.46	i	9'a	109.74	d	109.98	i
10	118.50		117.87		10'	125.26		124.61	
10a	139.34		137.18		10'a	139.43		137.18	
CH_3	29.12	e	28.93	j	$CH_{3'}$	29.22	e	29.02	j

Solvente DMSO, a,b,c,d,e,f,g,h,i,j reversibles.

HIPOTESIS.

HIPOTESIS PRINCIPAL:

Debido a la particular forma de la curva de frecuencia, si hubiera Toxicidad Selectiva a la T-514, por pequeña que fuera, la separación entre las poblaciones celulares de origen benigno y maligno, sería totalmente clara.

HIPOTESIS SECUNDARIA:

Las células de origen hepático y pulmonar, procedentes de "órganos blanco" serían más sensibles que las procedentes de órganos no atacados *in vivo* por la toxina T-514, v.gr. colon.

MATERIAL Y METODO.

Para el presente estudio se emplearon células de origen humano obtenidas de American Type Culture Collection (Rockville Maryland, E.U.A.). Como células benignas de origen hepático se utilizaron las células de Hígado de Chang y como células neoplásicas tres líneas celulares de hepatoma: la PLC/PRF/5, la Hep 3B -ambas secretan el antígeno de superficie de la Hepatitis B-, y además la Hep G2 no secretora del antígeno.

Como células benignas de origen pulmonar se utilizaron células de pulmón normal WI1003 y como células neoplásicas, cuatro líneas celulares clasificadas como: Carcinoma Pulmonar de Células Escamosas SK-Mes-1, Adenocarcinoma de Pulmón Calu-3, Carcinoma Broncogénico Indiferenciado ChaGoK-1, y Carcinoma Pulmonar de Células Pequeñas NCI-H69.

Como células benignas de colon se utilizó la línea celular CCD-33Co y como células de origen maligno una línea de Adenocarcinoma de Colon LoVo.

Los nutrientes requeridos: medio basal de Eagle y suero fetal bovino; así como la tripsina utilizada, se obtuvieron de SIGMA Chemical Company

Las substancias motivo del presente estudio, se obtuvieron de las presentaciones farmacéuticas disponibles en el mercado como medicamentos de acción antineoplásica conocida: Vincristina (Oncovin - Laboratorios Eli Lilly y Compañia de México S.A. de C.V.); 5-Fluoruracilo (Fluoro uracil - Productos Roche, S.A. de C.V.); Doxorrubicina y Epidoxorrubicina (Adriblastina y Farmorubicin - Laboratorios Farmitalia Carlo Erba, S.A. de C.V.); Mitomicina (Mitocin-C - Laboratorios Bristol de México, S.A. de C.V.); la toxina T-514 se extrajo y purificó en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina de la U.A.N.L., según el método descrito por Guerrero y cols.[38] y se añadieron a los cultivos celulares en las concentraciones referidas en la Tabla Núm. 3 siempre en el orden de microgramos/mililitro.

Por haberse utilizado etanol para disolver la T-514 y agua para las otras substancias, se probaron controles carentes de substancias citotóxicas con las respectivas concentraciones de alcohol y agua.

Se utilizó una variable del método descrito en 1974 por Lickiss y cols.[18] y se desarrolló de la siguiente forma: descongeladas las células, fueron sembradas en frascos de cultivo (Falcon T-25) y mantenidas en incubación a 37° C durante cuatro días, necesarios para la formación de monocapa; ocurrido este hecho se retiró el medio de cultivo y se lavó la capa celular con una solución amortiguadora de fosfatos a pH de 7.4 . Las células en monocapa fueron tratadas con tripsina al 0.25% con el fin de liberarlas del recipiente y separarlas entre sí. Las células en suspensión fueron contadas en un hemocitómetro (cámara de Neubauer) y se sembraron en placas de 96 celdillas (microtitre plates, Falcon 3072), en número de 5000 células por celdilla, en un volumen de 100 microlitros de medio de cultivo mas 100 microlitros de la substancia investigada o en su caso 100 microlitros de la solución hidroalcohólica al 0.08% utilizada para disolver la toxina T-514, o 100 microlitros de agua libre de iones para los controles, e incubadas a 37° C durante 72 horas; al término de este período se evaluó la potencial citotoxicidad de las substancias.

El medio de cultivo para todas las líneas celulares estudiadas fue una mezcla de medio basal de Eagle más suero fetal bovino (9 + 1).

Cada concentración indicada en la Tabla Núm. 3 fue adicionada a 16 celdillas, y se repitió en cuatro ocasiones diferentes. Las concentraciones limítrofes a los efectos máximos y mínimos se repitieron por 10 ocasiones adicionales.

La preparación de las soluciones, de los medios de cultivo y la siembra de las células, se hizo en una campana de flujo laminar. La esterilización de las soluciones y medios de cultivo se logró por filtración a través de filtros Milipore de 0.22 micras de diámetro de poro.

Las células se estudiaron bajo microscopio invertido Carl Zeiss IM35 con objetivo 32x Ph1, anotando su adhesividad a la placa, morfología y capacidad proliferativa. Las fotomicrografías se tomaron con una cámara Contax 139 de 35 mm adaptada al microscopio con un factor de cámara de 3.2x y con película Extar 25.

Gaddum[39] en 1933 expresó y demostró que el crecimiento aritmético de la respuesta farmacológica se dá en función del crecimiento exponencial de la dosis. Por otra parte, es conocido de tiempo atrás que la letalidad debida a una causa determinada es un fenómeno de distribución normal tal como se aprecia en la gráfica 3, la cual se obtiene de graficar la frecuencia de aparición del fenómeno a dosis crecientes -gráfica 4-, las que si se acumularan una sobre otra hasta totalizar el 100% de los casos podría expresarse como una curva sigmoide, de valor idéntico a la curva acampanada inicial[40], -ver gráficas 5, 6, 7, 8, 9 y 10-. A partir de cualquiera de ambos tipos de expresiones gráficas, puede conocerse por extrapolación el valor de la respuesta a una dosis determinada como ocurre con la llamada $DL_{50\%}$ que es aquella capaz de producir el 50% de muerte en una población homogénea -ver gráficas 11 y 13-; o la $DL_{95\%}$, aquella capaz de producir el 95% de muerte en una población igualmente homogénea; o cualquier otro valor intermedio, que en el caso que nos ocupa -gráficas 12 y 14- expresan el 95% de letalidad para una población versus el 5% de letalidad para otra.

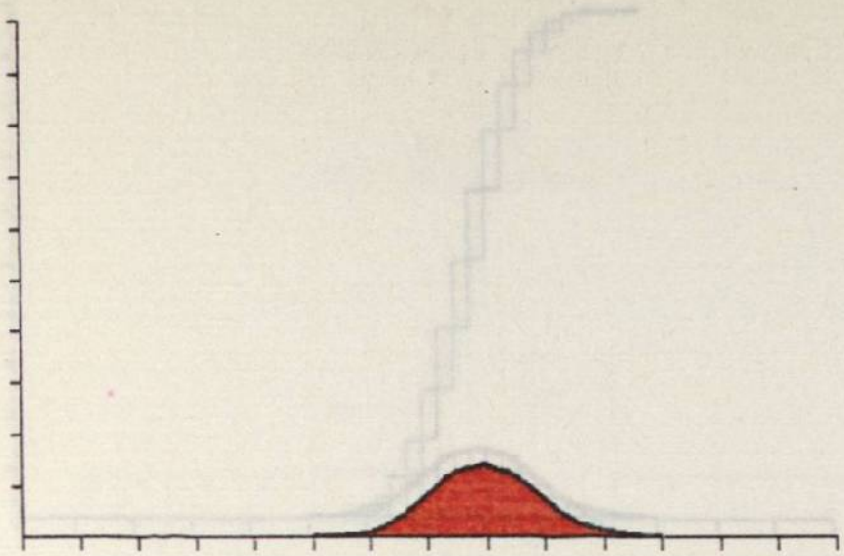
Más importante que conocer magnitudes aisladas de respuesta, importa en la Quimioterapia, conocer el margen de seguridad que puede ofrecer una substancia determinada para destruir selectivamente una población celular y respetar a otra. Este margen de seguridad ha sido expresado como el cociente de dividir la $DL_{50\%}$ entre la $DT_{50\%}$, (se ha llamado $DT_{50\%}$ a la dosis terapéutica efectiva 50%) y a dicho cociente, Ehrlich[31,32] lo llamó Indice Terapéutico, al que se puede llamar ahora Indice Terapéutico "Clásico" -gráficas 13 y 15-. Sin embargo, es evidente en dichas gráficas que aunque el Indice Terapéutico sea el mismo, lo abrupto de las curvas en la gráfica 15 ofrece un margen de seguridad mayor que en la gráfica 13. Por esta razón, con cierta frecuencia se toman otros valores de las curvas de letalidad, y en el caso actual se ha modificado la expresión aritmética y se habla de un Indice Terapéutico "Modificado", producto de dividir $DL_{05\%}$ entre la $DT_{95\%}$, de tal manera, que si nuevamente observamos las gráficas 14 y 16, encontraremos concordancia entre el margen de seguridad de la expresión gráfica y el índice de la expresión numérica.

Finalmente la expresión gráfica de los resultados en un polígono de frecuencias, además de permitir una separación visual más clara entre una curva y otra, permite valorar de manera semicuantitativa la significancia estadística de los resultados agrupados de más de una población estudiada, ya que si las curvas de distribución no se juntan en los extremos, la probabilidad de que fueran del mismo universo sería menor de 0.05%, y tanto menor cuanto más alejadas estuvieran las

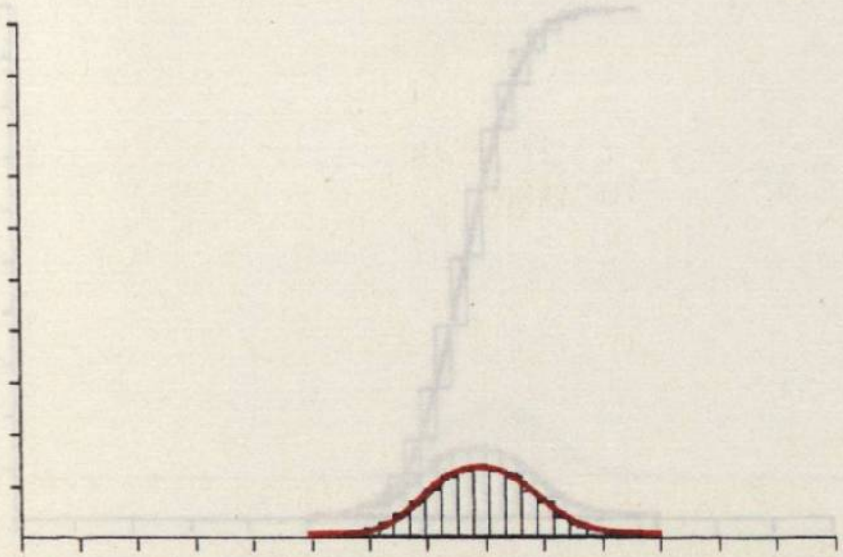
TABLA No. 3

Concentraciones utilizadas para las diversas substancias investigadas como citotóxicas.

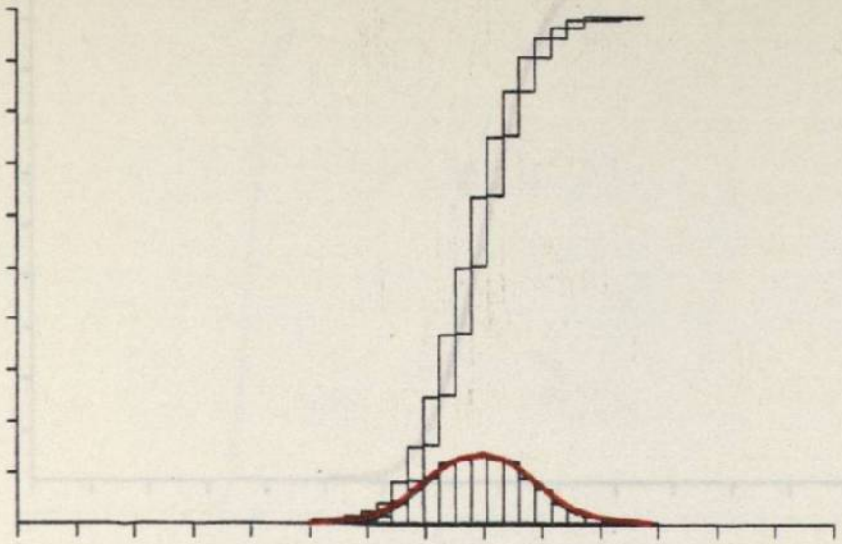
	DOSIS													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
VINCRISTINA	0.002	0.004	0.008	0.016	0.031	0.062	0.125	0.250	0.500	1.000	2.000	4.000	8.000	16.000
5-FLUORURACILO	6.25	12.50	25.00	50.00	100.00	200.00	400.00	800.00	1600.00	3200.00				
DOXORRUBICINA	0.025	0.050	0.100	0.200	0.400	0.800	1.600	3.200	6.400					
EPIDOXORRUBICINA	0.025	0.050	0.100	0.200	0.400	0.800	1.600	3.200	6.400					
MITOMICINA	0.25	0.50	1.00	2.00	4.00	8.00	16.00							
T-514	2.5	5.0	10.0	20.0	40.0	80.0	160.0	320.0						



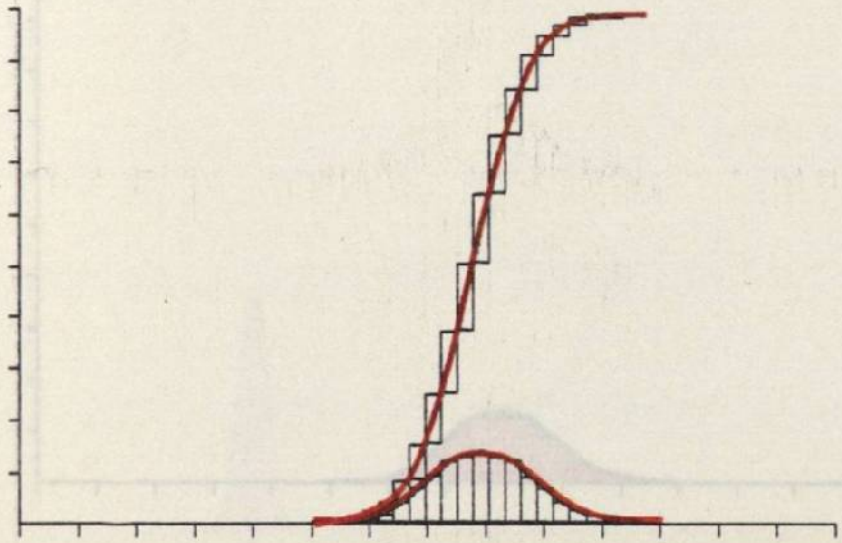
Gráfica 3. Curva de distribución normal.



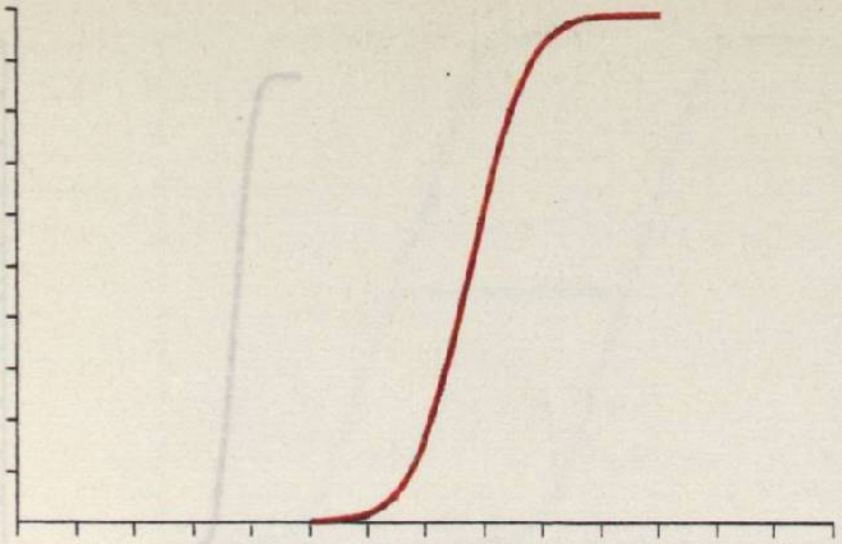
Gráfica 4. Representación de la gráfica No. 3 en intervalos de frecuencia



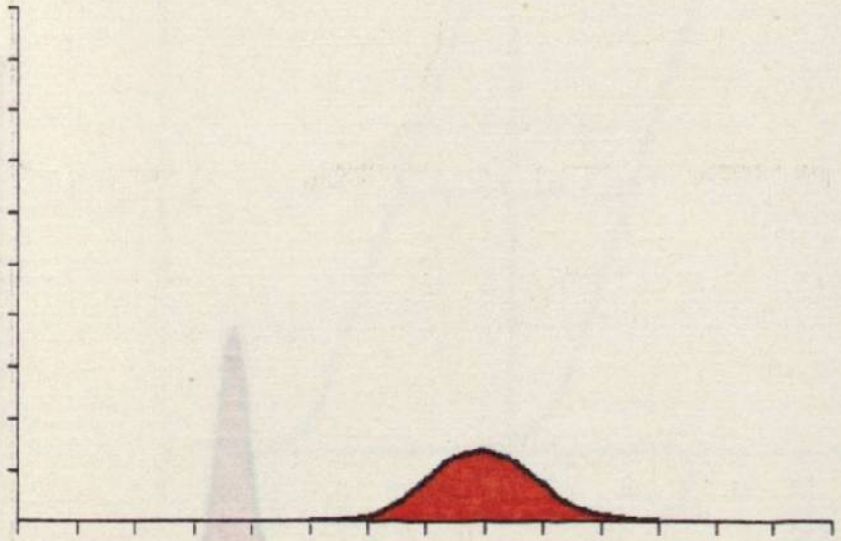
Gráfica 5. Acúmulo de frecuencias de una curva de distribución normal.



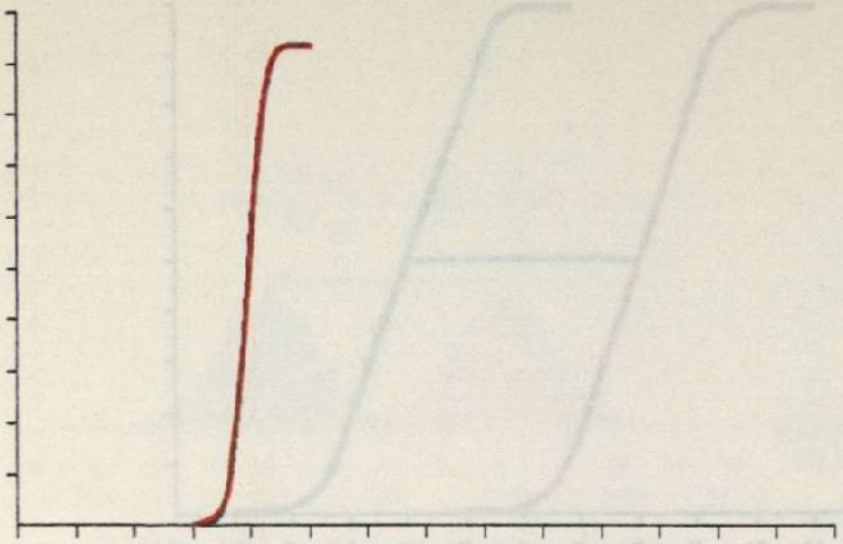
Gráfica 6. Obtención de una curva sigmide a partir de una curva de distribución normal.



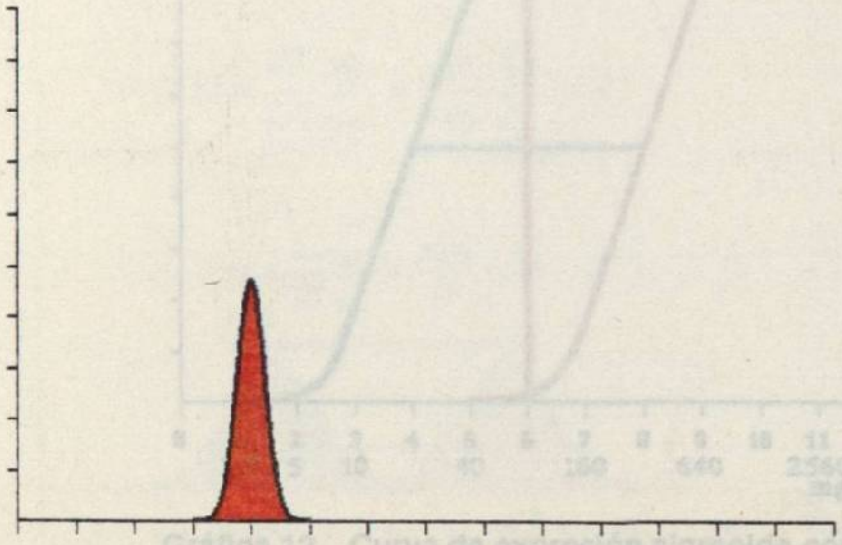
Gráfica 7. Transformación de la curva de frecuencias No. 8 en curva de intensidad.



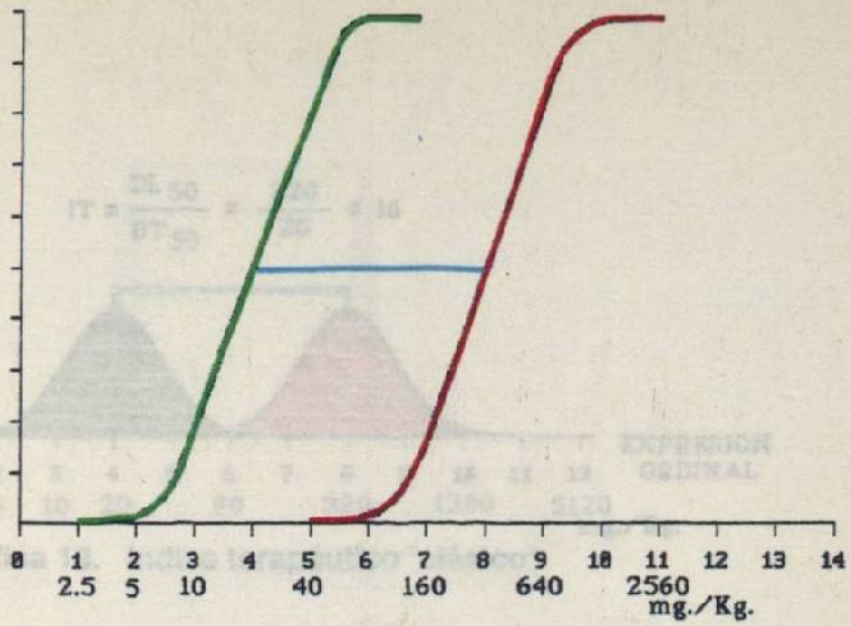
Gráfica 8. Curva de frecuencias.



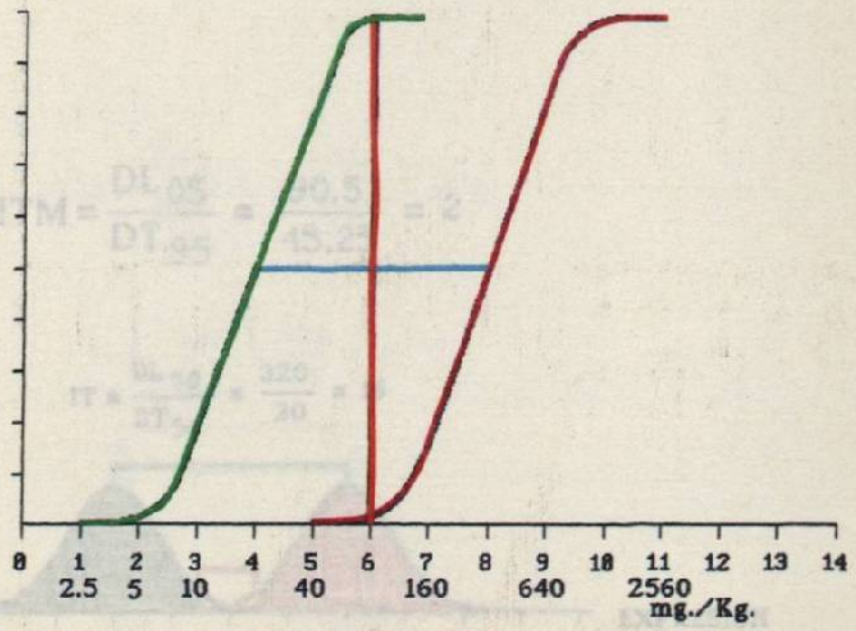
Gráfica 9. Transformación de la curva de frecuencias No. 10 en curva de intensidad.



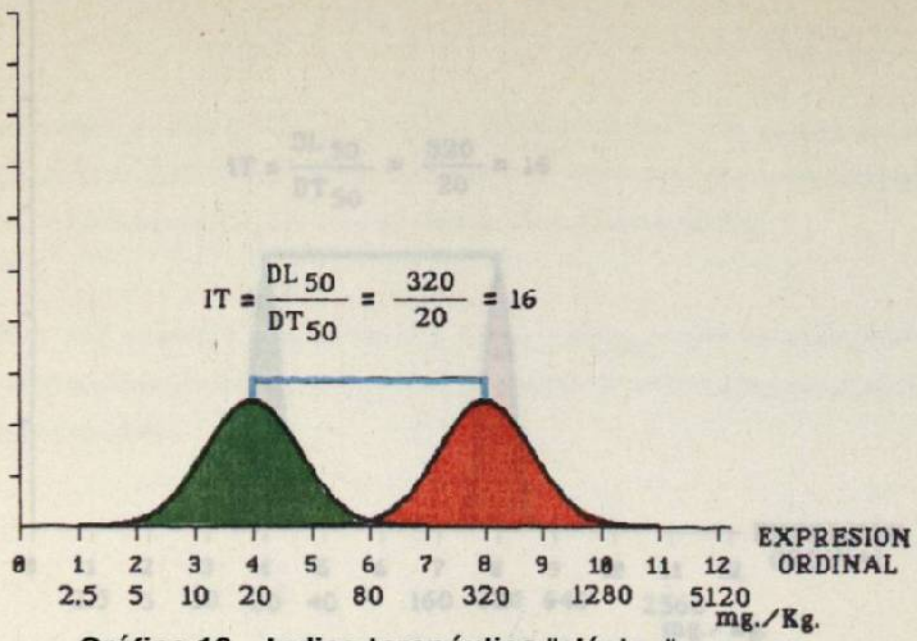
Gráfica 10. Curva de frecuencias.



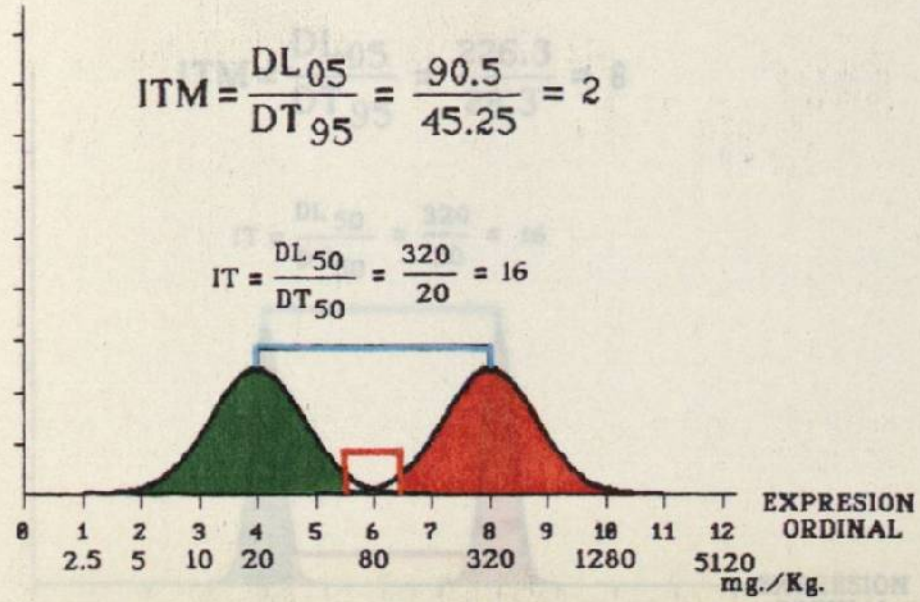
Gráfica 11. Curva de expresión sigmoide correspondiente a la gráfica 13



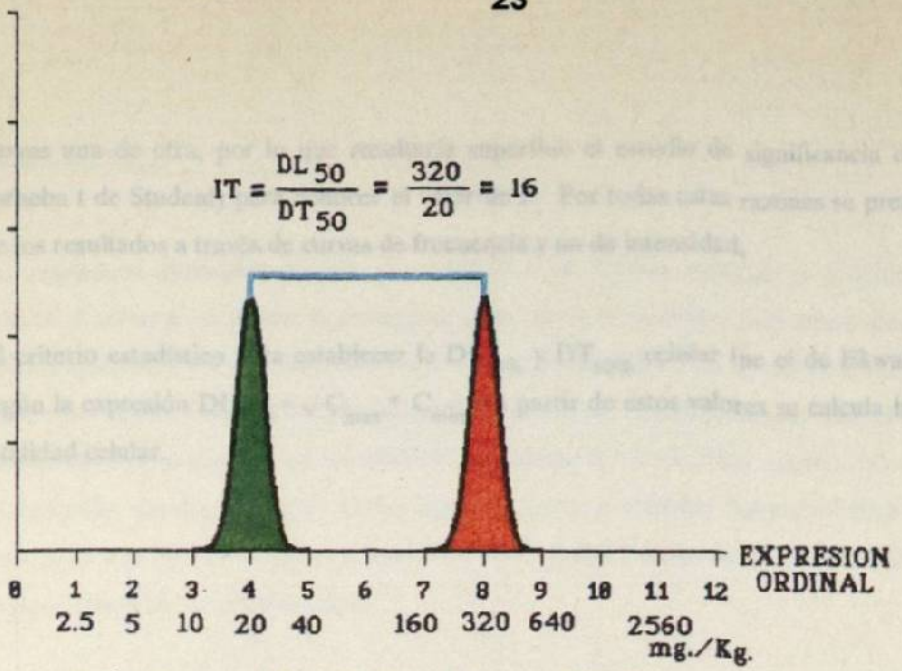
Gráfica 12. Curva de expresión sigmoide correspondiente a la grafica 14.



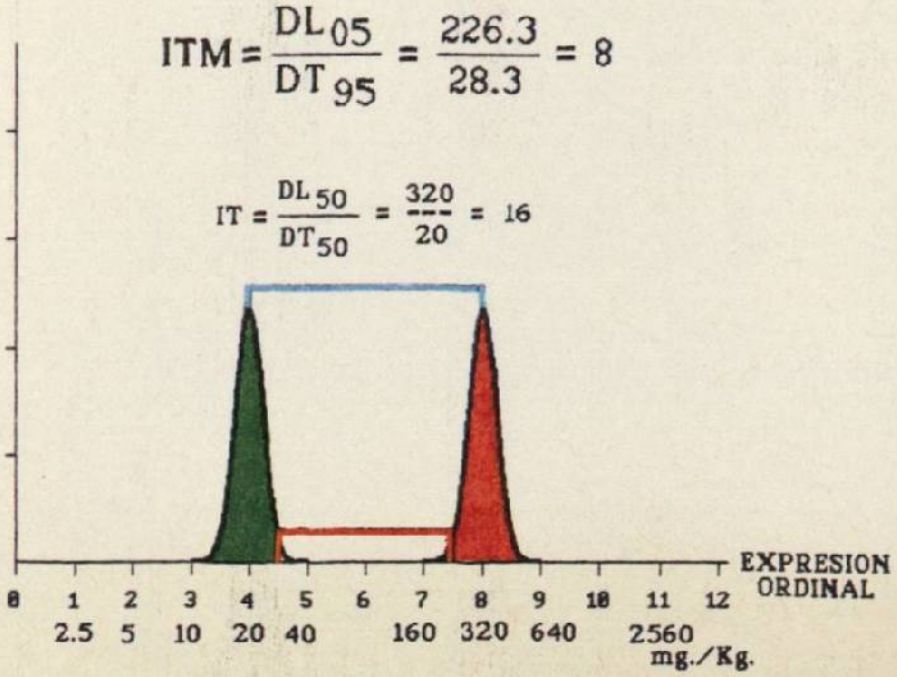
Gráfica 13. Indice terapéutico "clásico".



Gráfica 14. Indice terapéutico "modificado".



Gráfica 15. Indice terapéutico "clásico".



Gráfica 16. Indice terapéutico "modificado".

curvas una de otra, por lo que resultaría superfluo el estudio de significancia de los promedios (prueba t de Student) para conocer el valor de P. Por todas estas razones se prefirió la expresión de los resultados a través de curvas de frecuencia y no de intensidad.

El criterio estadístico para establecer la $DL_{50\%}$ y $DT_{50\%}$ celular fue el de Ekwall y Johansson [41] según la expresión $DL_{50\%} = \sqrt{C_{max} * C_{min}}$ y a partir de estos valores se calcula la dispersión de la letalidad celular.

RESULTADOS.

Los resultados obtenidos después de exponer a las células benignas y neoplásicas de hígado, pulmón y colon a las distintas concentraciones de la Vincristina, 5-Fluoruracilo, Doxorrubicina, Epidoxorrubicina, Mitomicina y la Toxina T-514 durante 72 horas, se muestran en la Tabla Núm. 4 expresados como concentraciones máximas y mínimas. Inmediatamente después, se presenta la documentación fotográfica de los efectos citotóxicos de las distintas substancias comparadas con los controles correspondientes (agua libre de iones y solución hidroalcohólica al 0.08%). Las gráficas 17 a la 34 muestran la agrupación de la letalidad expresada en curvas de frecuencia contra las dosis referidas en la Tabla Núm. 3.

Finalmente, la Tabla Núm. 5 muestra los valores de Indice Terapéutico "Clásico" y la Tabla Núm. 6 los valores del Indice Terapéutico "Modificado". Los números negativos que aparecen en dicha Tabla expresan una Toxicidad Selectiva invertida, ya que resultaron mas sensibles las células benignas que las neoplásicas.

TABLA No. 4

Concentraciones citotóxicas máximas y mínimas.

	Vincristina		5-Fluoruracilo		Doxorrubicina		Epidoxorrubicina		Mitomicina		T-514	
PLC/PRF/5	0.002	0.250	25.00	200	0.025	0.1	0.05	0.2	0.50	2.0	2.5	10
Hep 3B	4.000	16.000	12.50	200	0.200	0.8	0.20	1.6	0.25	2.0	2.5	20
Hep G2	0.062	8.000	50.00	200	0.200	0.8	0.40	1.6	0.25	2.0	2.5	20
Chang	0.002	0.125	25.00	200	0.025	0.1	0.10	0.2	0.50	2.0	80.0	160
ChaGoK-1	0.016	8.000	6.25	100	0.050	0.2	0.05	0.2	0.50	2.0	10.0	40
Calu-3	0.016	8.000	6.25	100	0.100	0.4	0.10	0.4	0.25	2.0	10.0	40
SK-Mes-1	0.500	8.000	25.00	200	0.200	0.8	0.20	0.8	0.50	2.0	10.0	80
NCI-H69	0.016	8.000	200.00	800	0.100	0.8	0.10	0.8	0.25	2.0	5.0	20
Pulmón	0.032	8.000	25.00	200	0.100	0.4	0.20	0.8	0.50	2.0	80.0	320
LoVo	0.016	8.000	6.25	100	0.200	1.6	0.40	3.2	0.25	2.0	2.5	10
Colon	0.062	8.000	100.00	3200	0.200	1.6	0.40	3.2	2.00	8.0	80.0	320

El factor de amplificación para
toda la documentación
fotográfica presentada a
continuación es de 400x.

Fig. 8' Células de Chang. Control

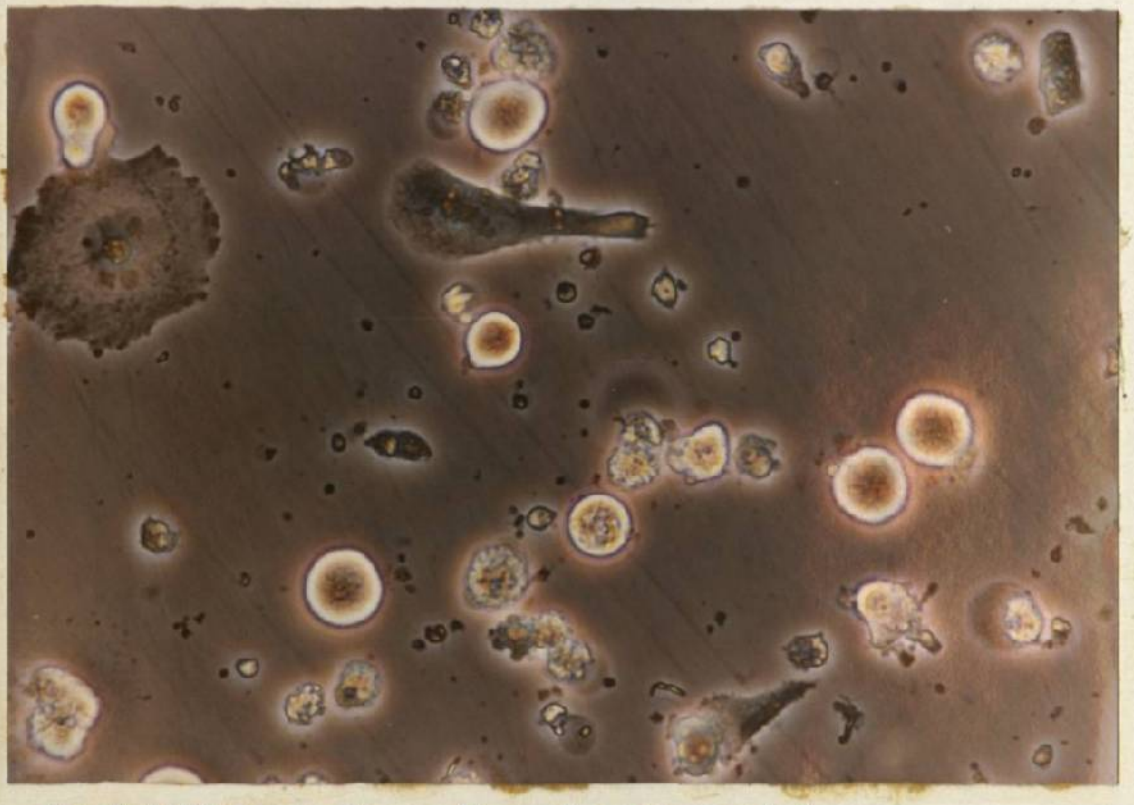


Fig. 8a' Células de Chang . Vincristina 0.2 mcgr/ml.

Fig. 8 Hepatoma PLC/PRF/5. Control.

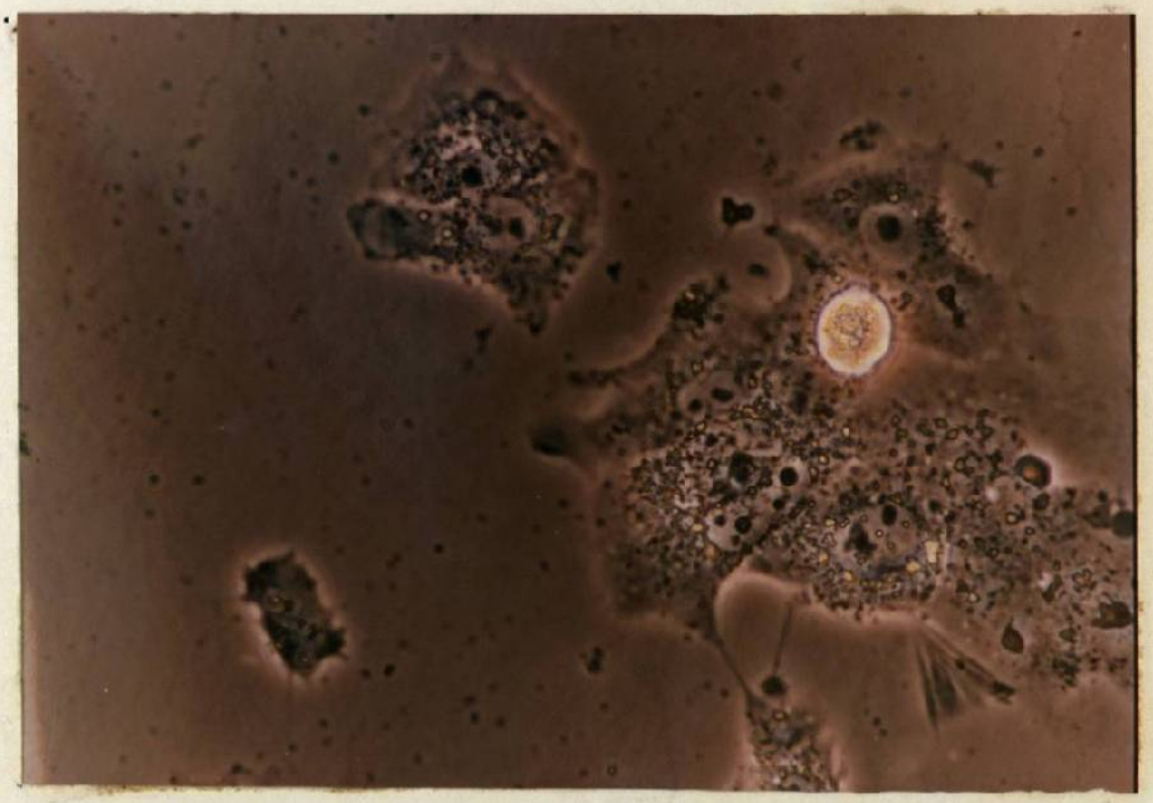


Fig. 8a Hepatoma PLC/PRF/5. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

Fig. 9' Células de Chang. Control

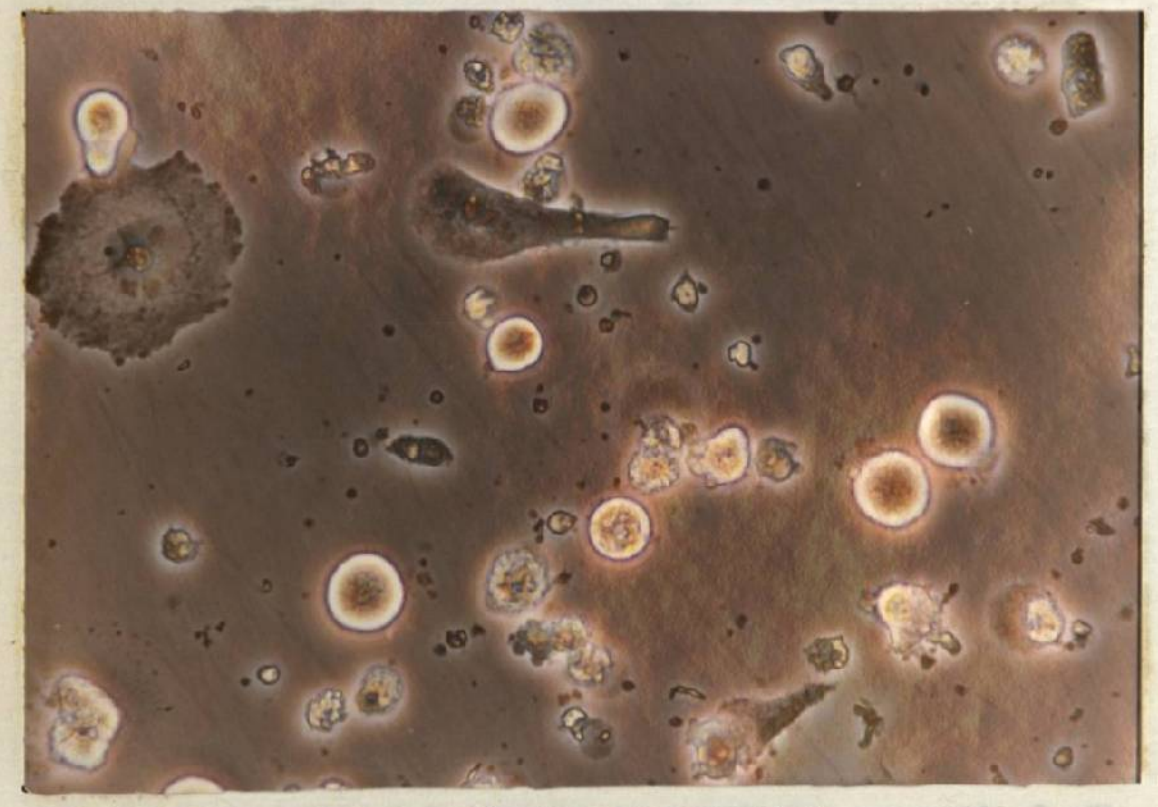


Fig. 9a' Células de Chang. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

Fig. 9 Hepatoma Hep 3B. Control.

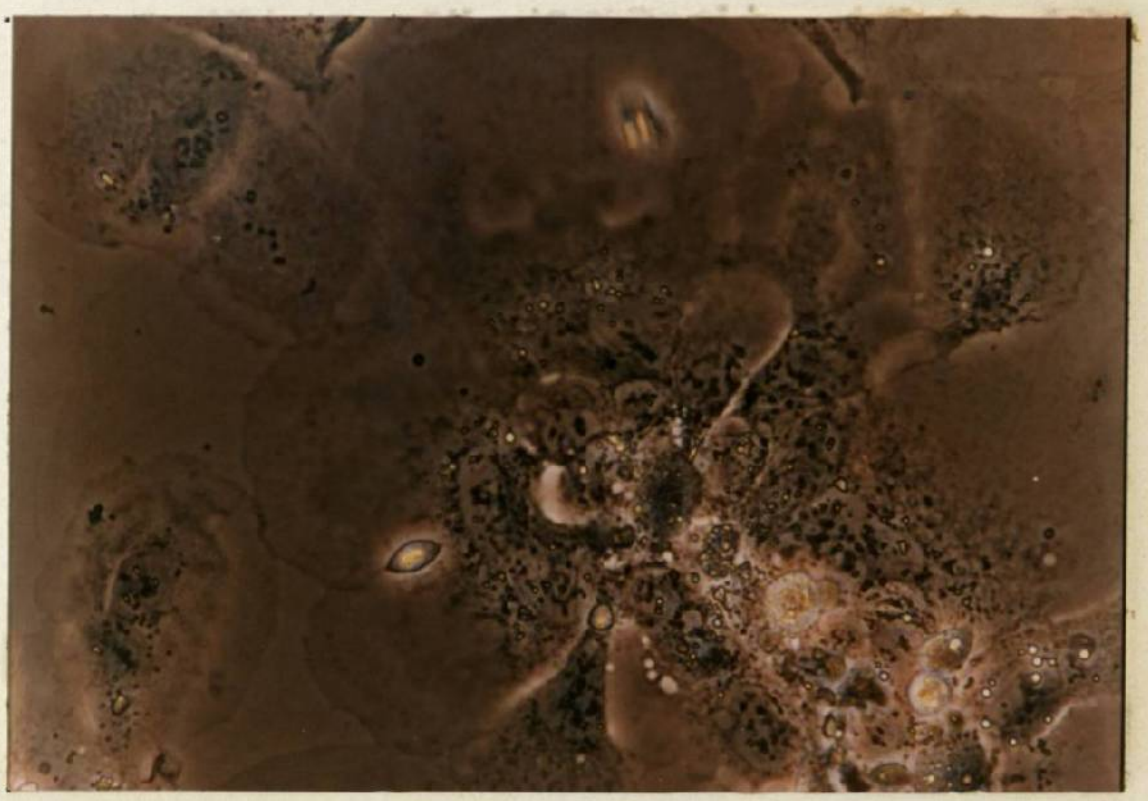


Fig. 9a Hepatoma Hep 3B. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

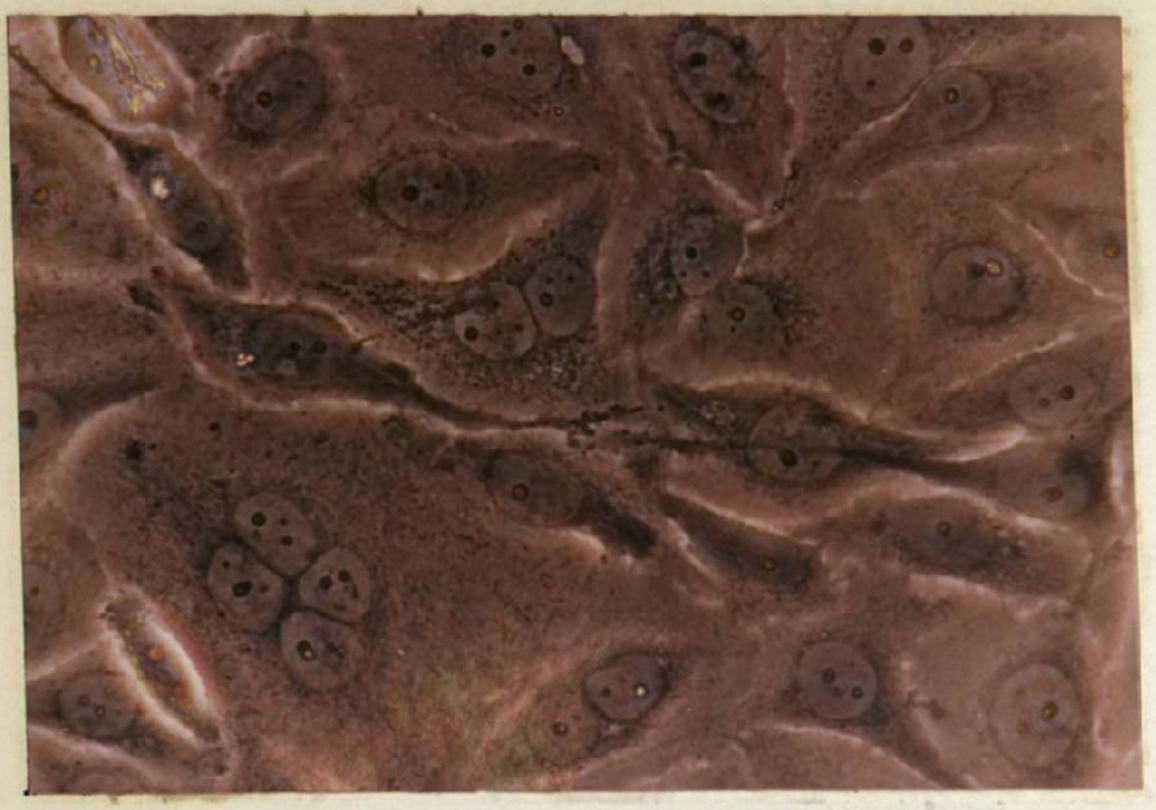


Fig. 10' Células de Chang. Control

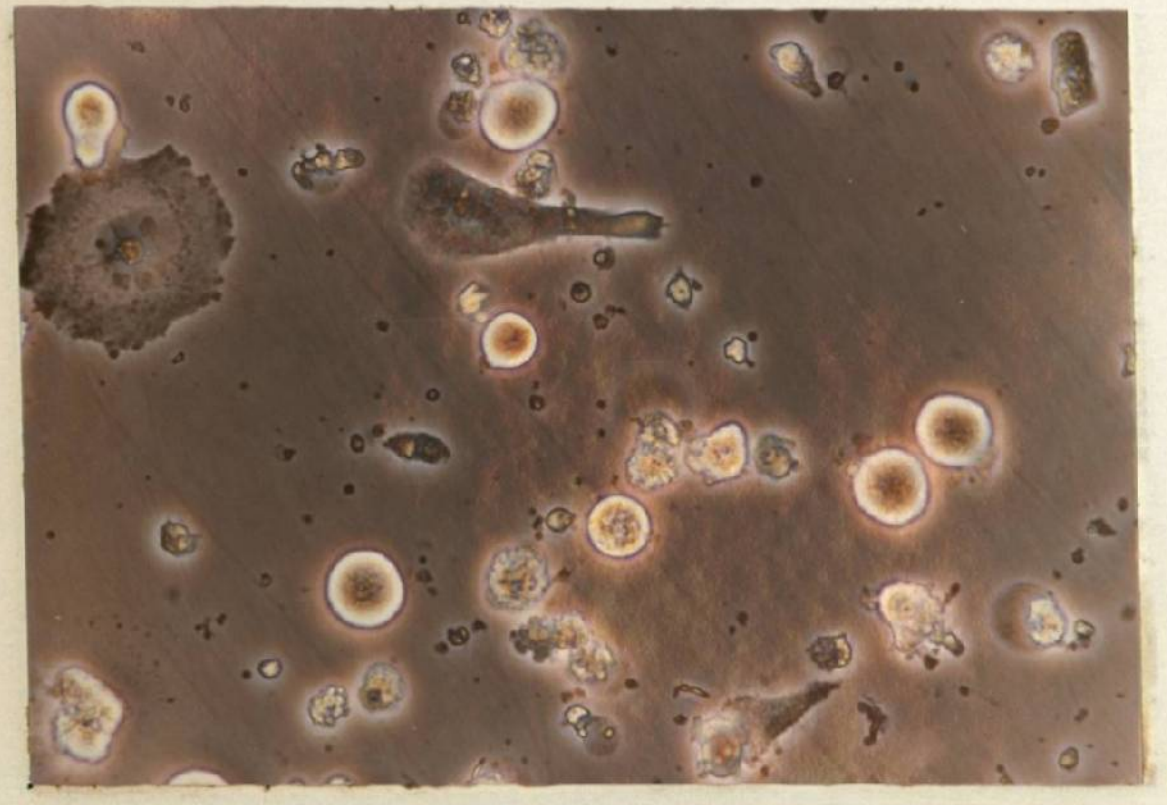


Fig. 10a' Células de Chang. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

Fig. 10 Hepatoma Hep G2. Control.

Fig. 10a Hepatoma Hep G2. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

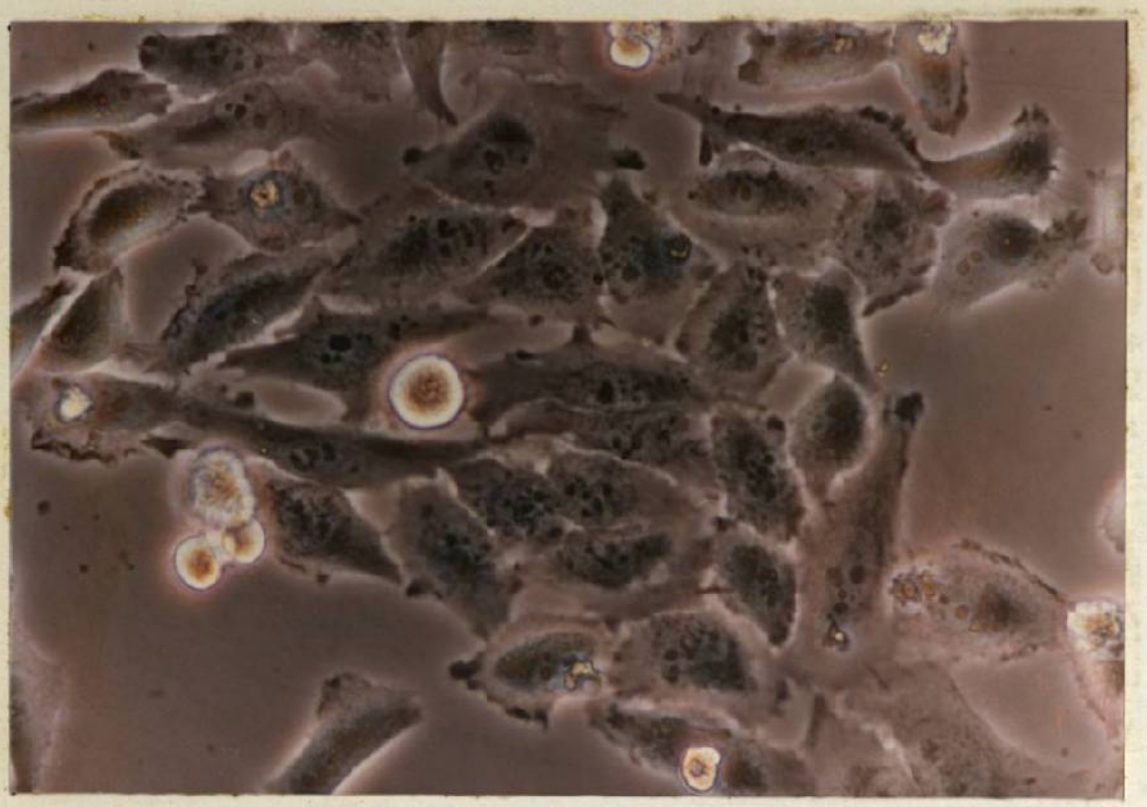


Fig. 11' Células de Pulmón. Control

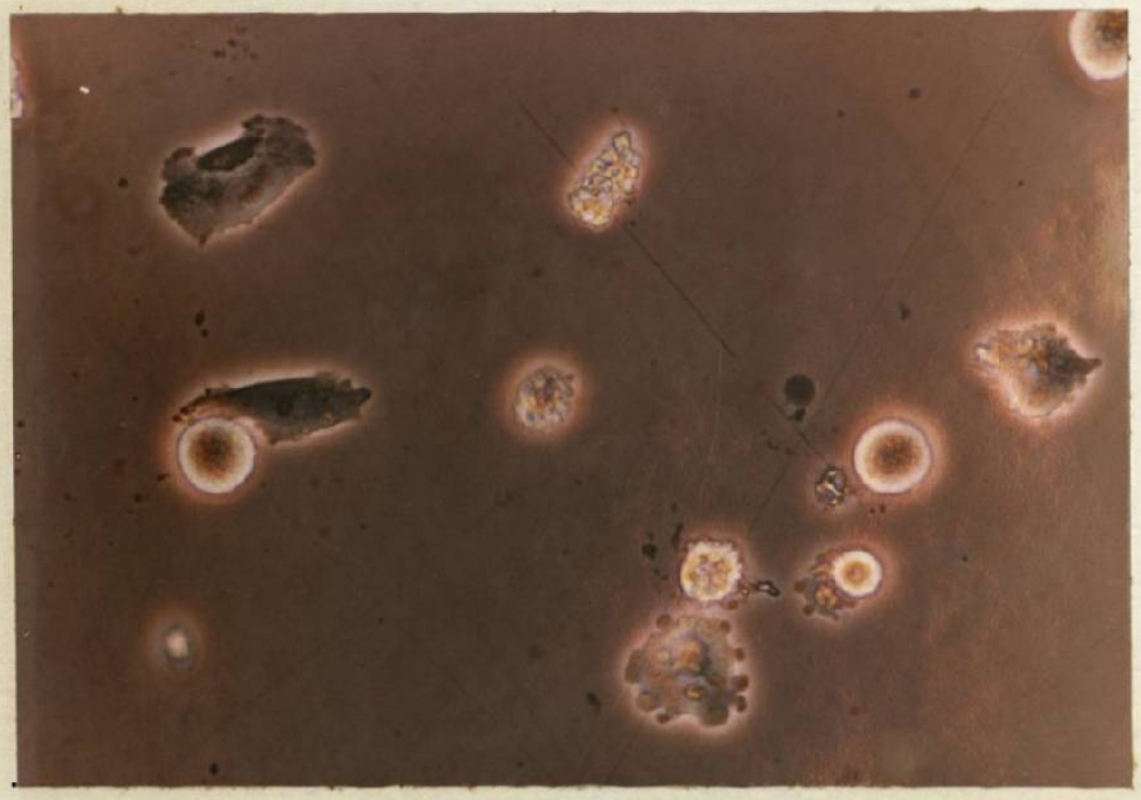


Fig. 11a' Células de Pulmón. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

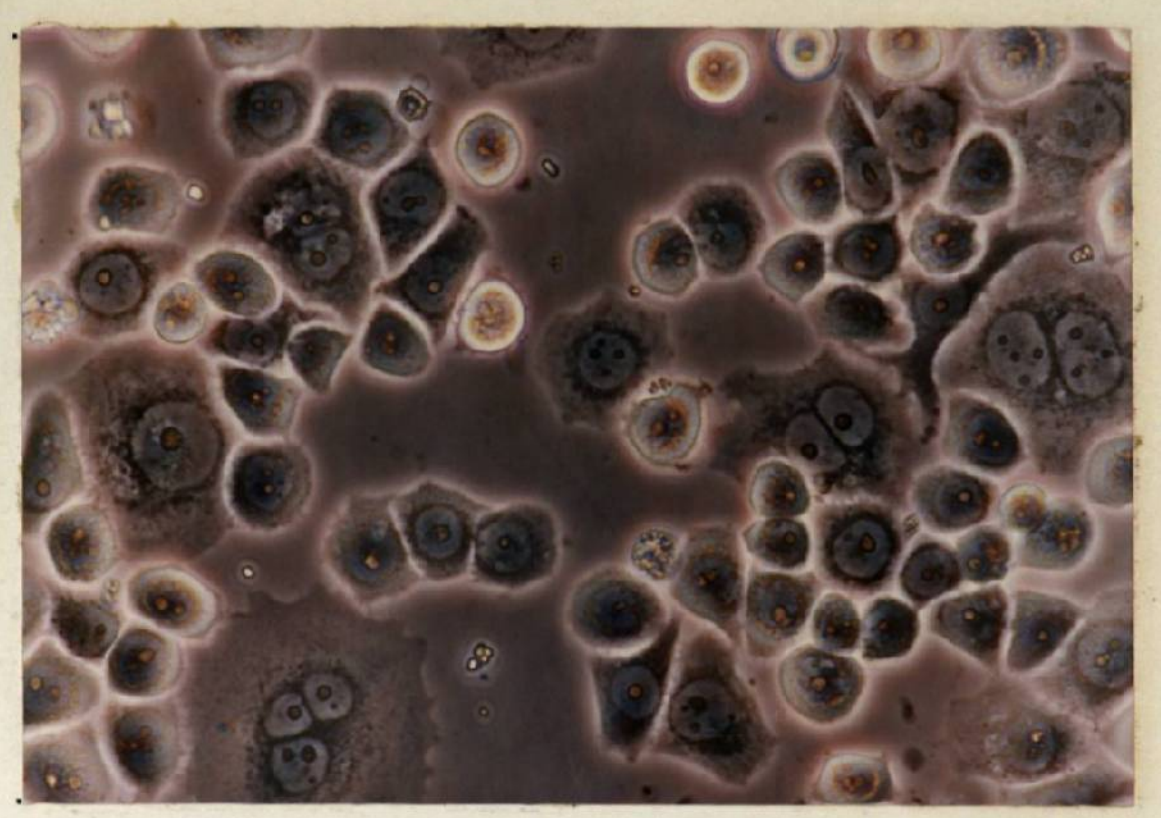


Fig. 11 Carcinoma broncogénico ChaGoK-1. Control.

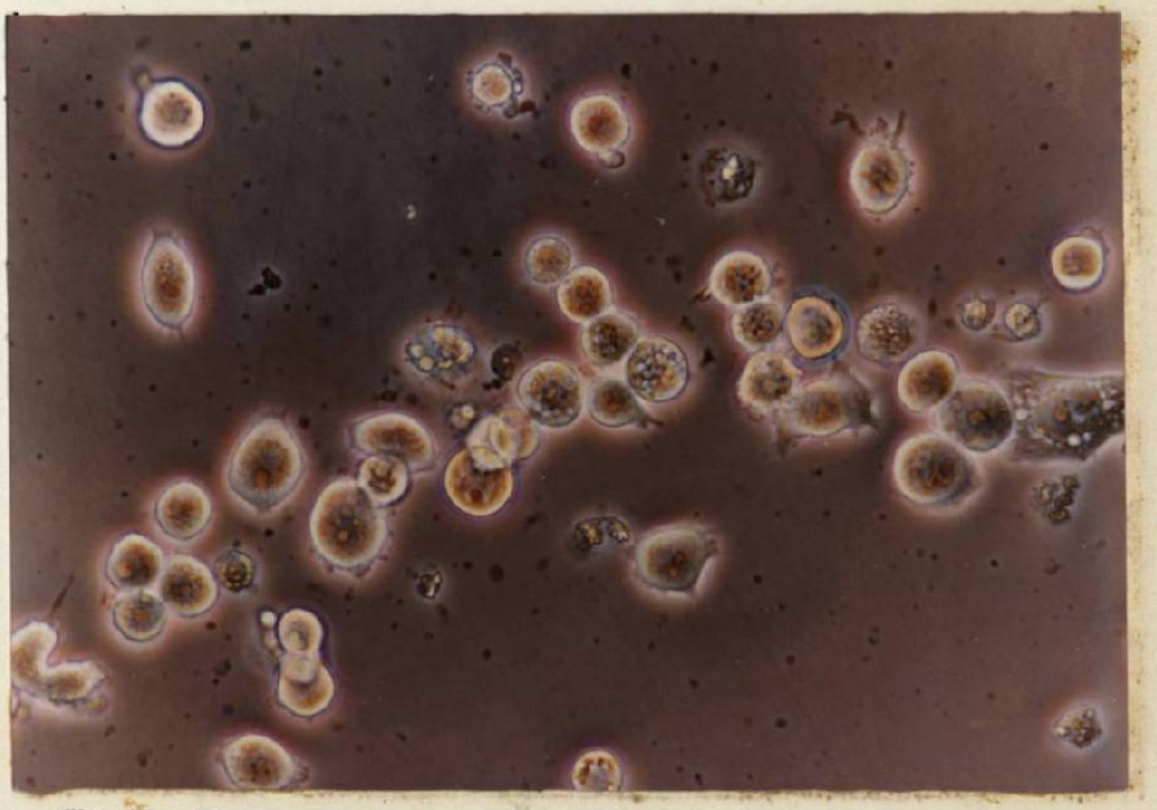


Fig. 11a Carcinoma broncogénico ChaGoK-1. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

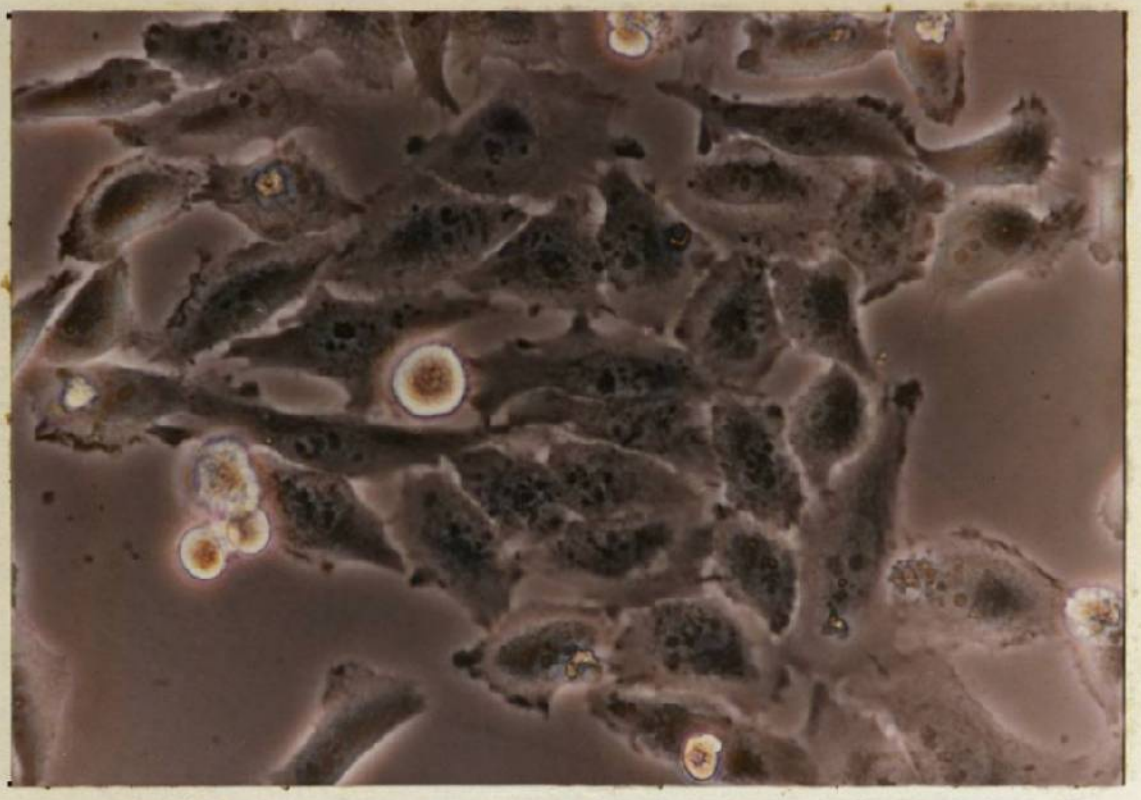


Fig. 12' Células de Pulmón. Control

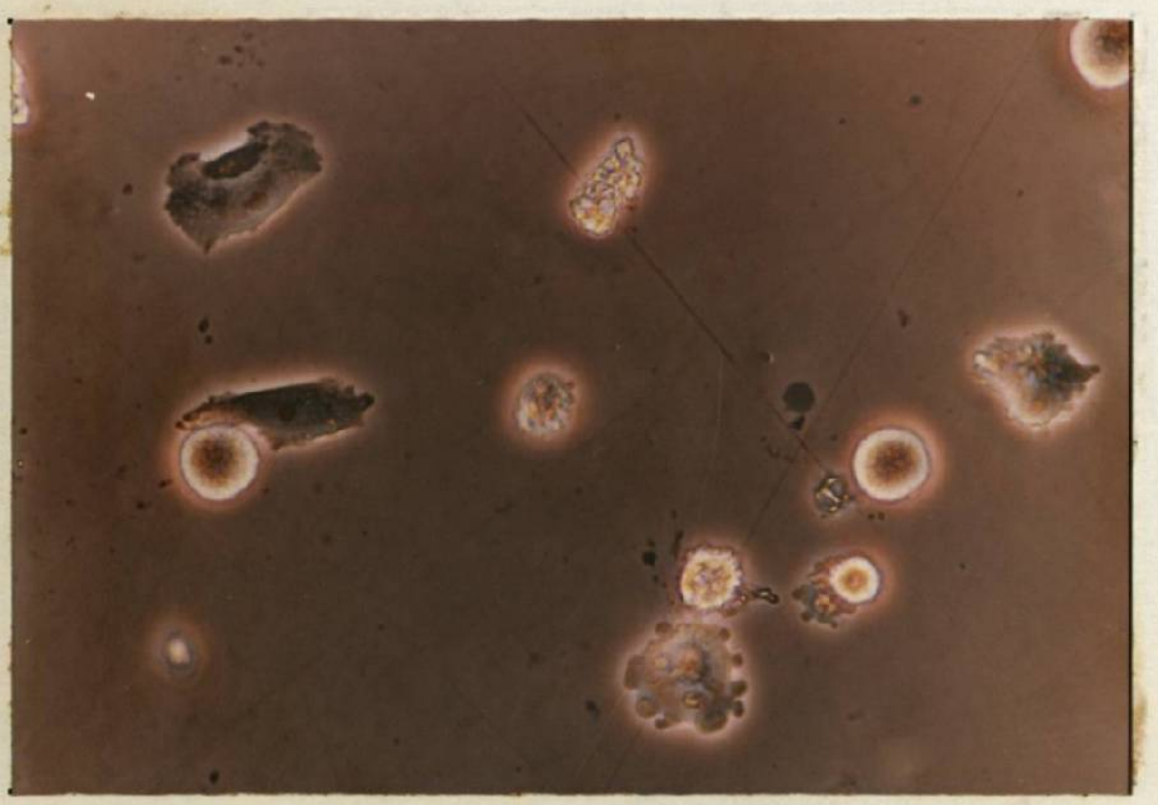


Fig. 12a' Células de Pulmón. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

Fig. 12 Adenocarcinoma pulmonar Calu-3. Control.

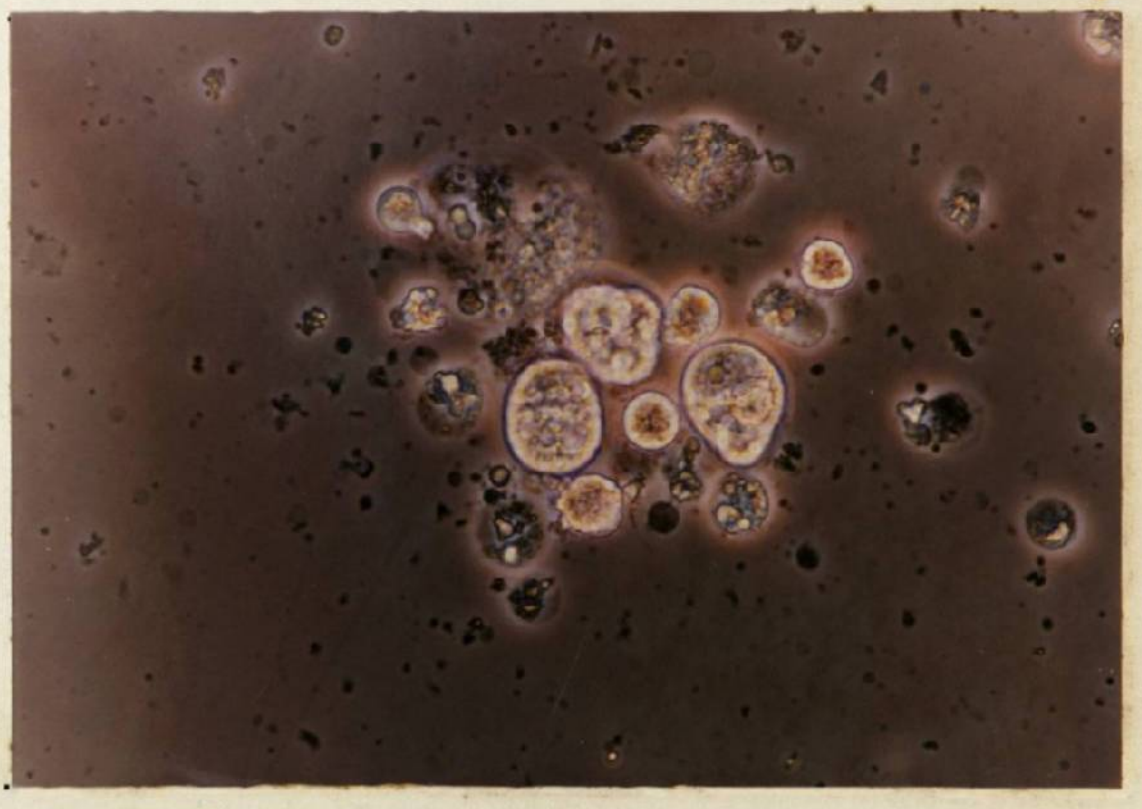


Fig. 12a Adenocarcinoma pulmonar Calu-3. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

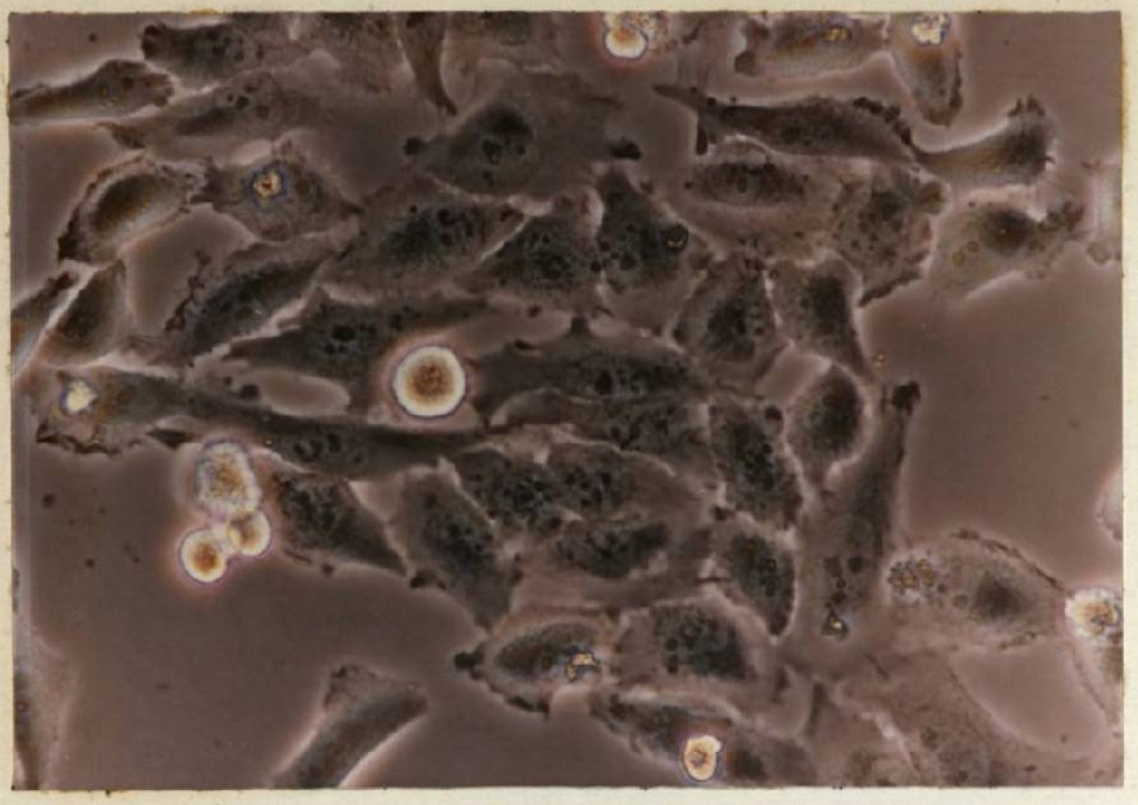


Fig. 13' Células de Pulmón. Control

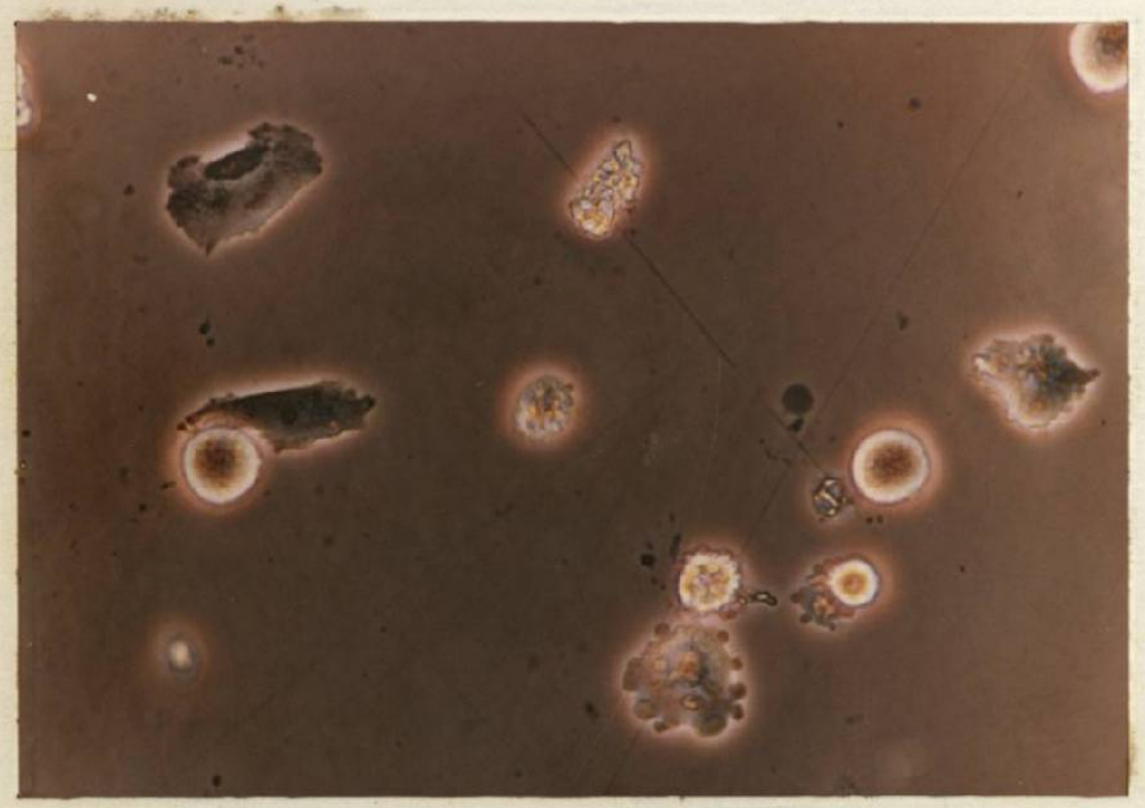


Fig. 13a' Células de Pulmón. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

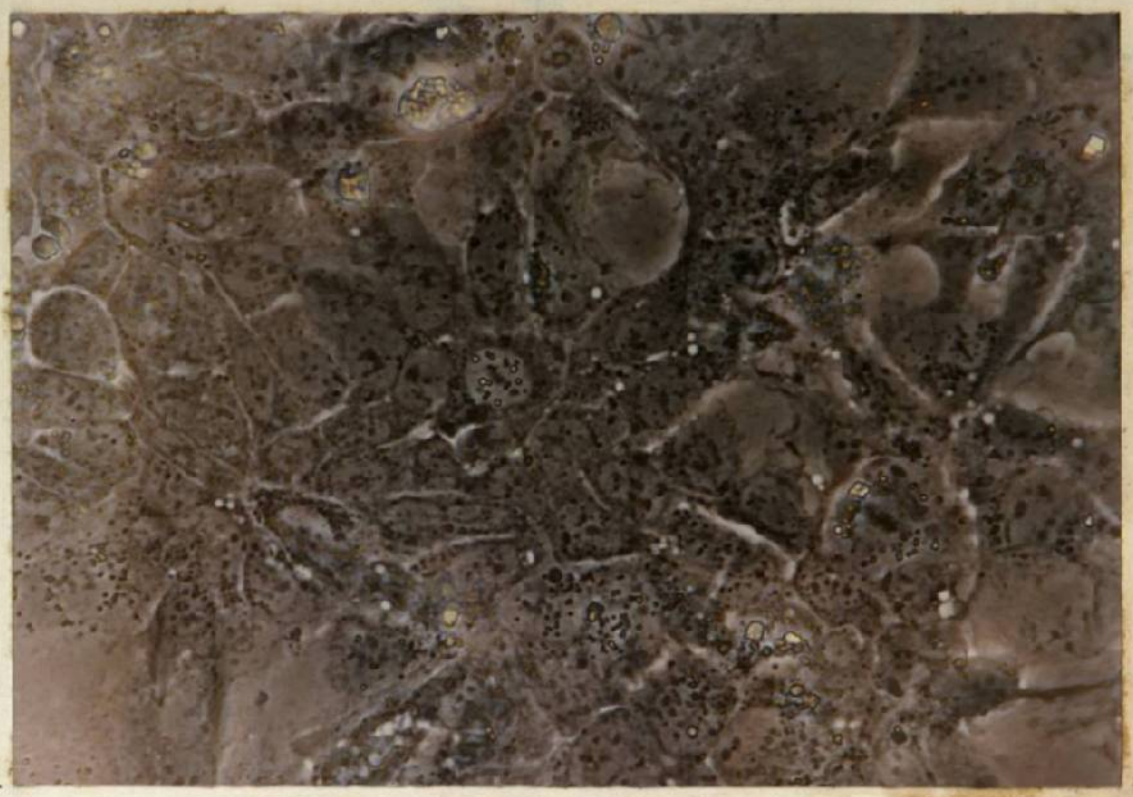


Fig. 13 Carcinoma pulmonar de células escamosas SK-Mes-1. Control.

Fig. 13a Carcinoma pulmonar de células escamosas SK-Mes-1. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

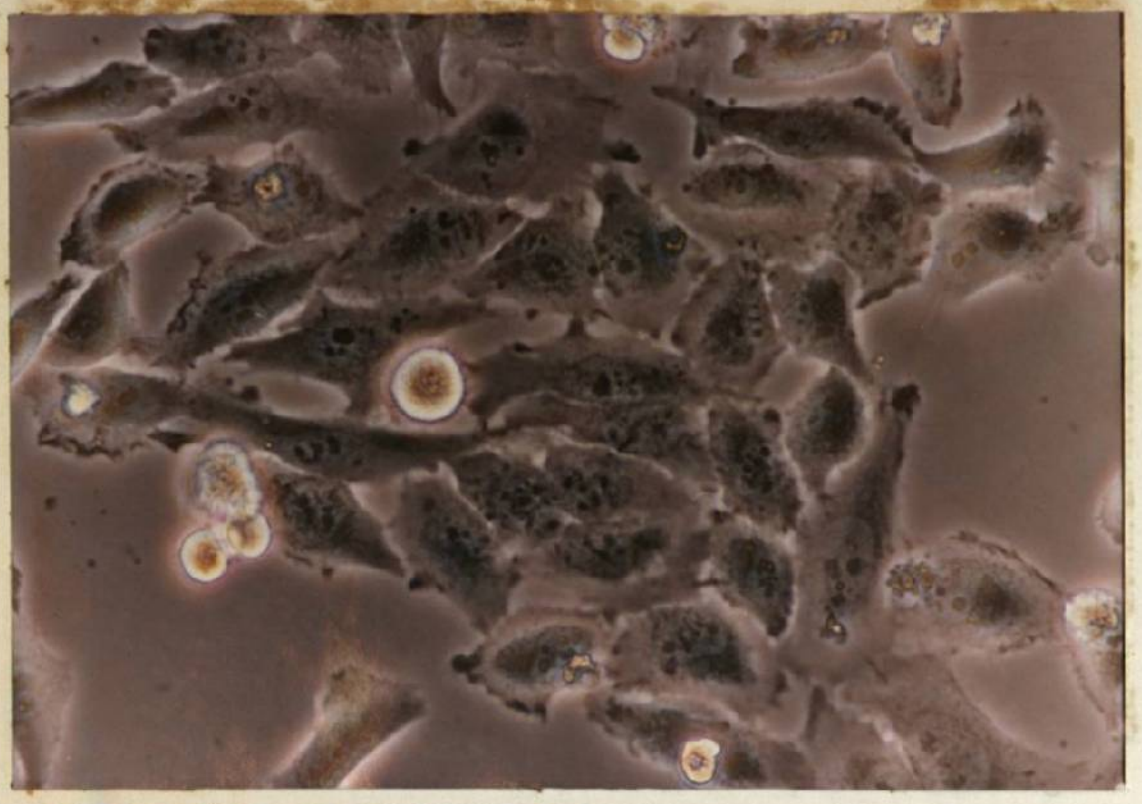


Fig. 14' Células de Pulmón. Control

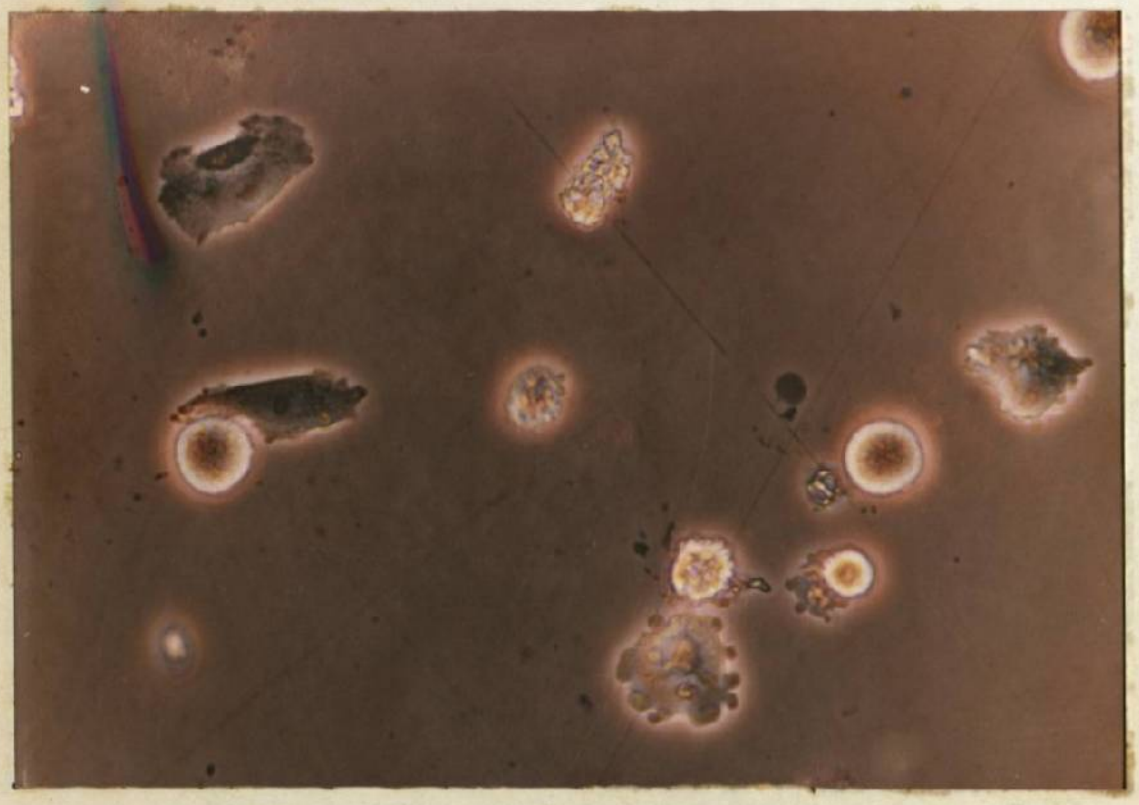


Fig. 14a' Células de Pulmón. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

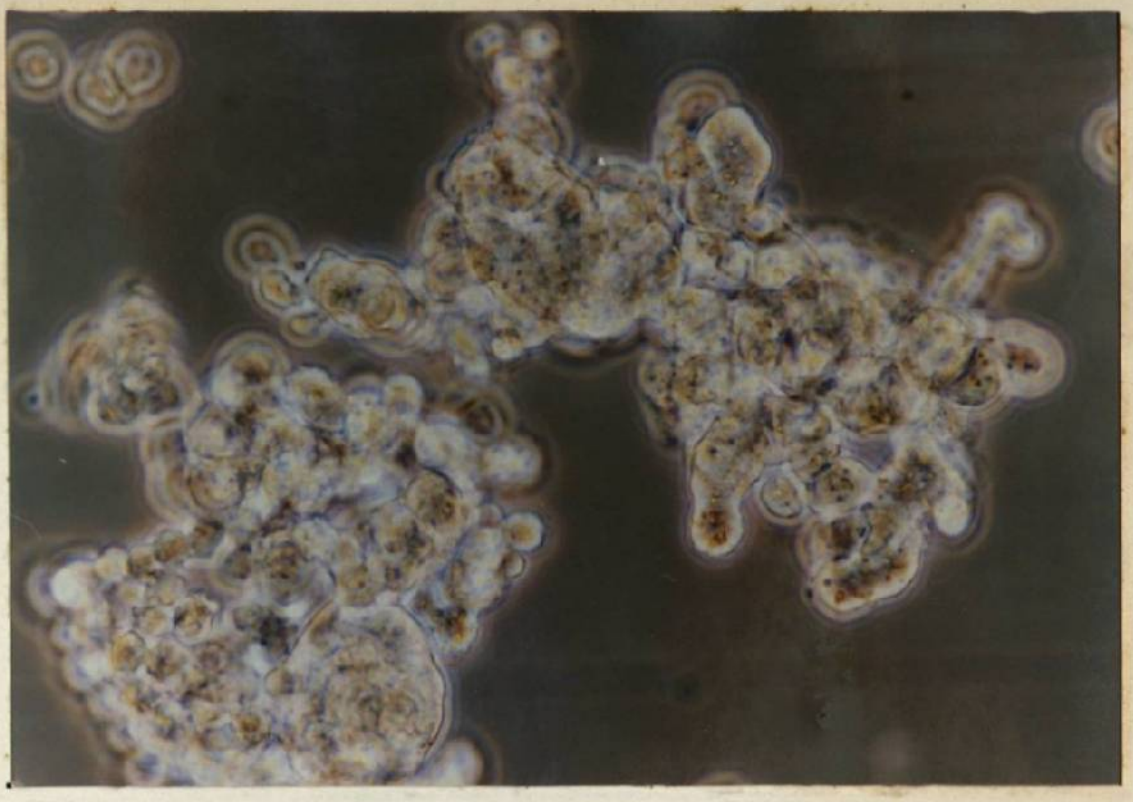


Fig. 14 Carcinoma pulmonar de células pequeñas NCI-H69. Control.

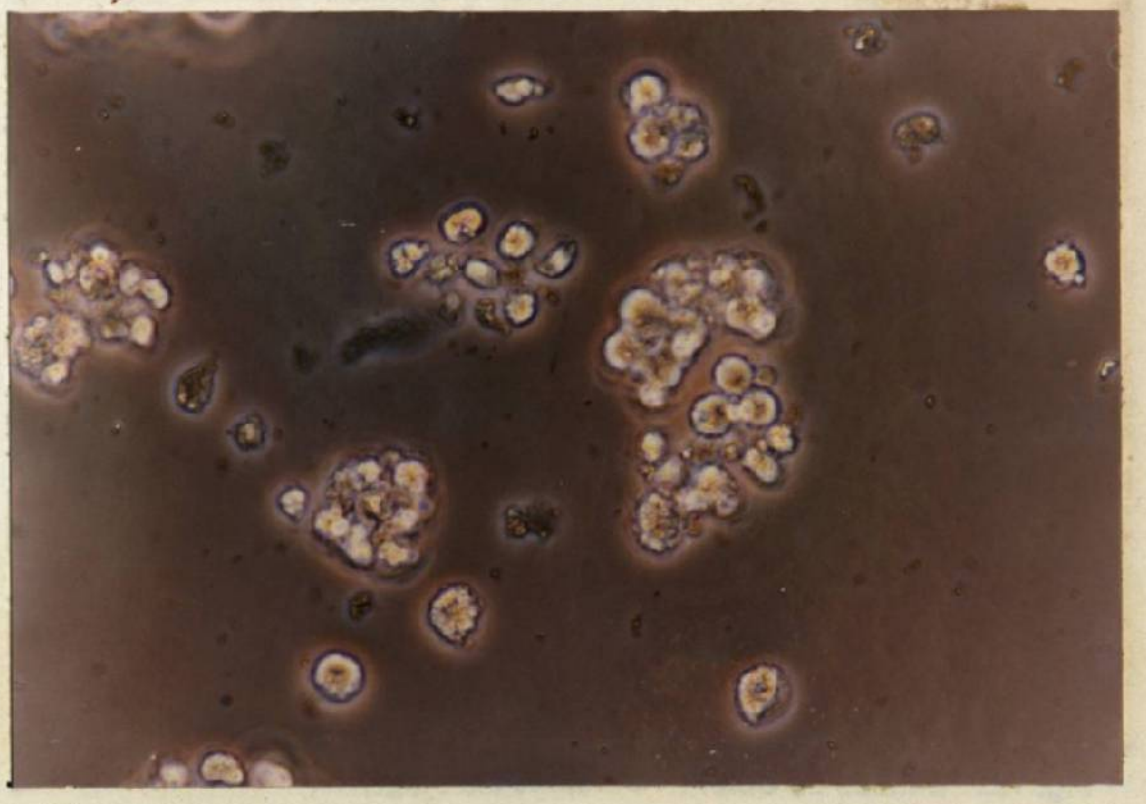


Fig. 14a Carcinoma pulmonar de células pequeñas NCI-H69. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

Fig. 15' Células de Colon. Control

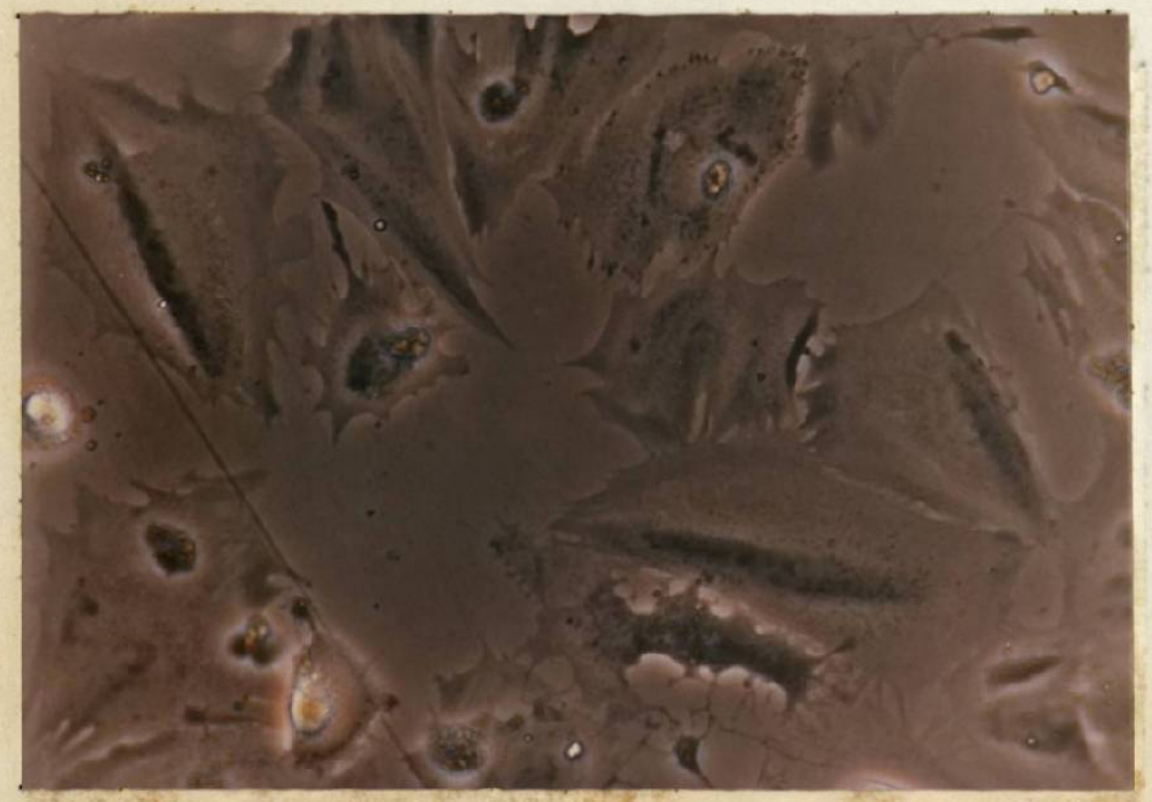


Fig. 15a' Células de Colon. Vincristina 0.2 mcgr/ml.

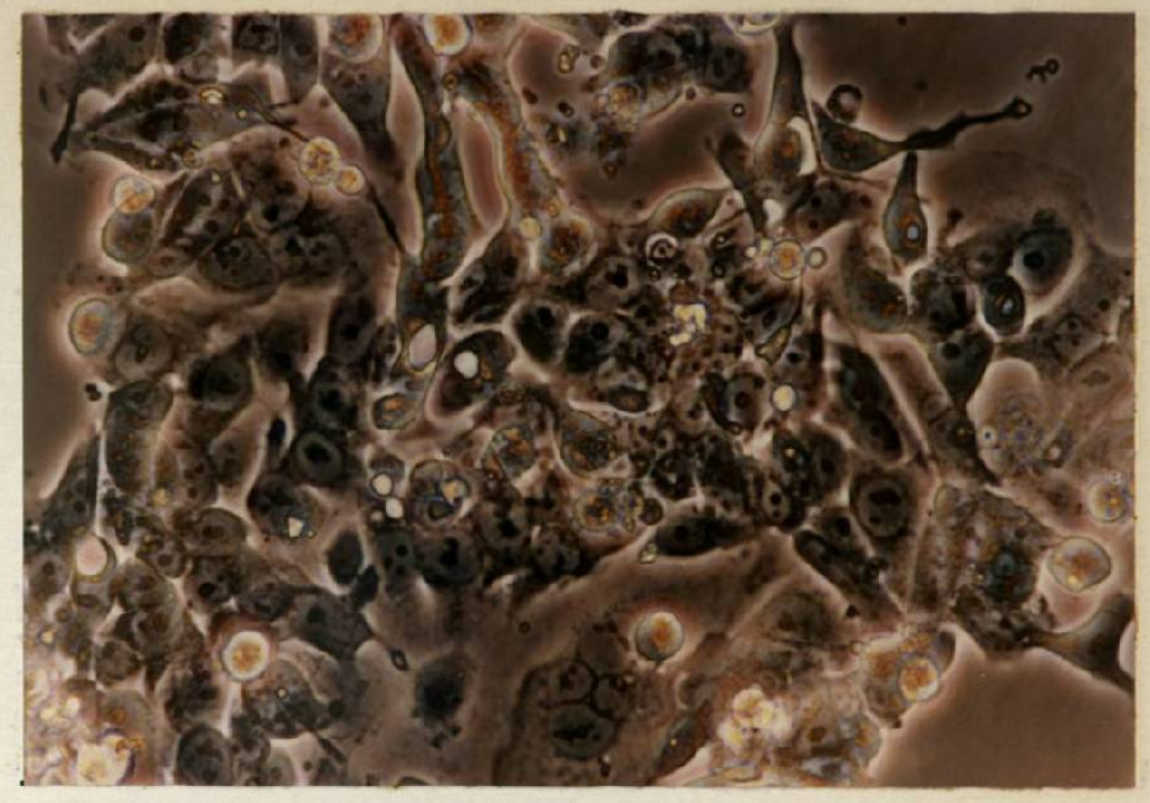


Fig. 15 Adenocarcinoma de Colon LoVo. Control.

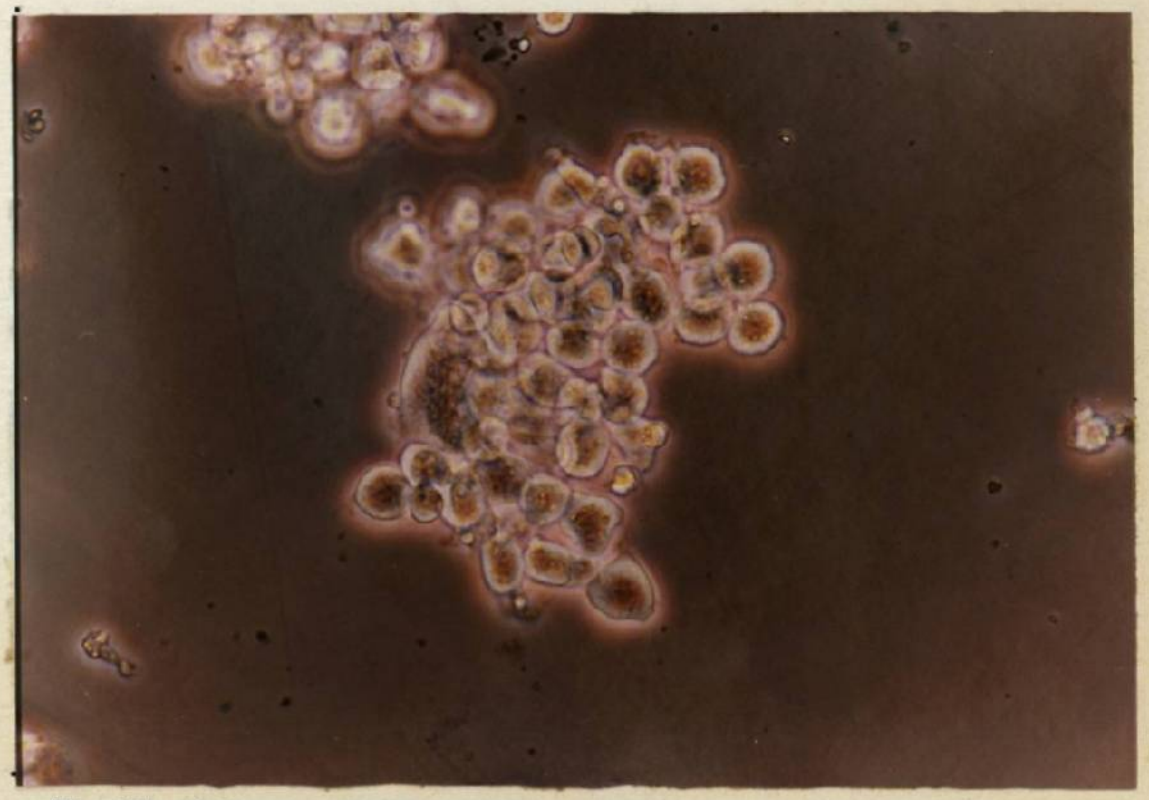


Fig. 15a Adenocarcinoma de Colon LoVo.
Vincristina 0.2mcgr/ml.

Fig. 16' Células de Chang. Control

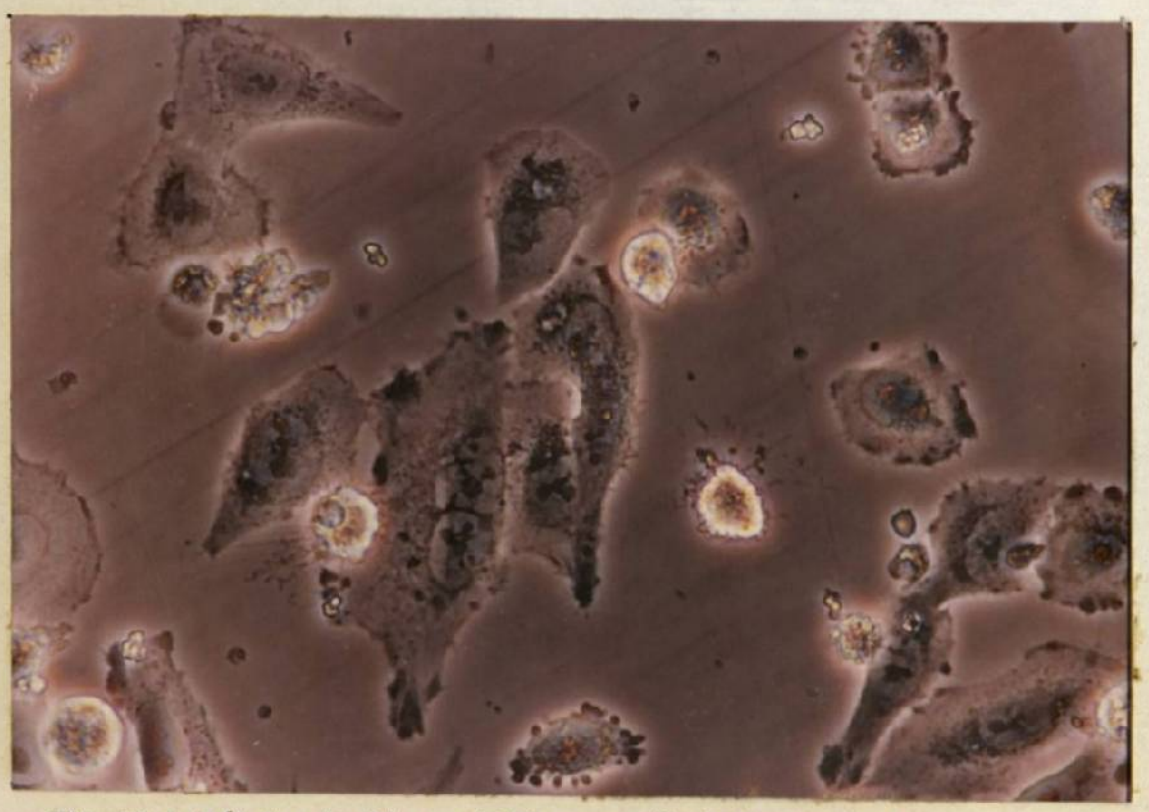


Fig. 16a' Células de Chang. 5-Fluoruracilo 100 mcgr/ml.

Fig. 16 Hepatoma PLC/PRF/5. Control.

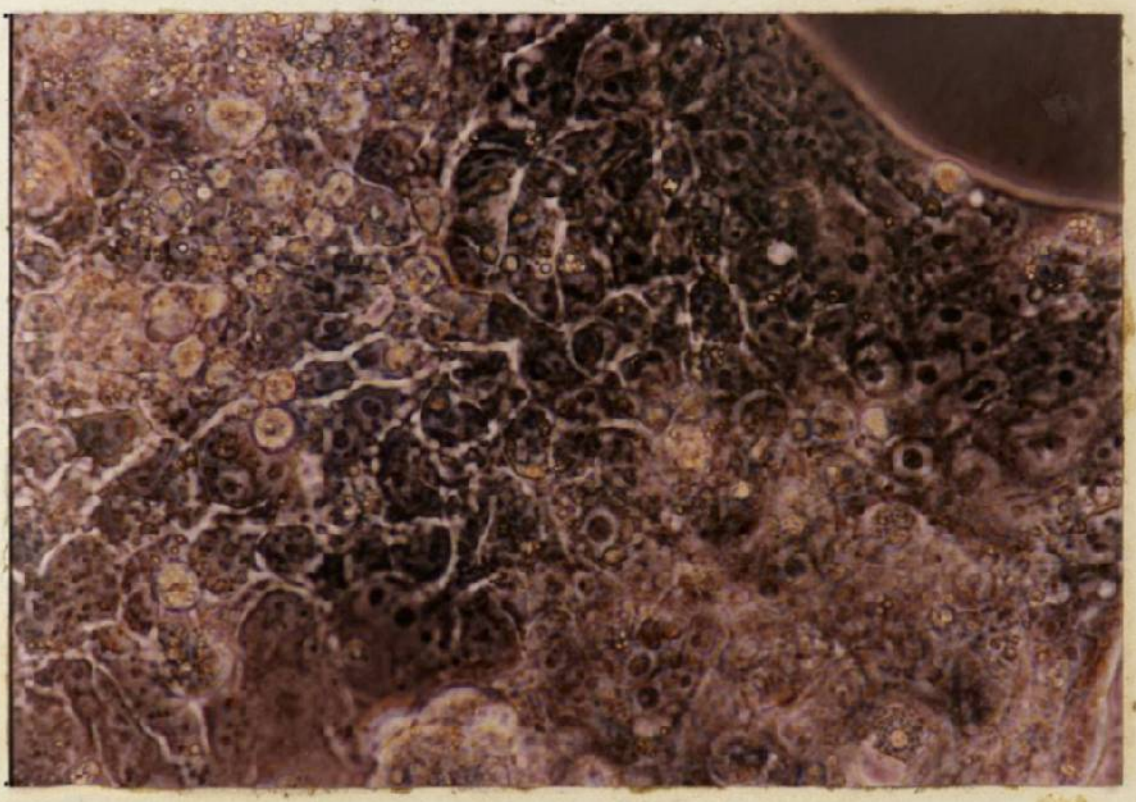


Fig. 16a Hepatoma PLC/PRF/5. 5-Fluoruracilo 100 mcgr/ml.

Fig. 17' Células de Chang. Control

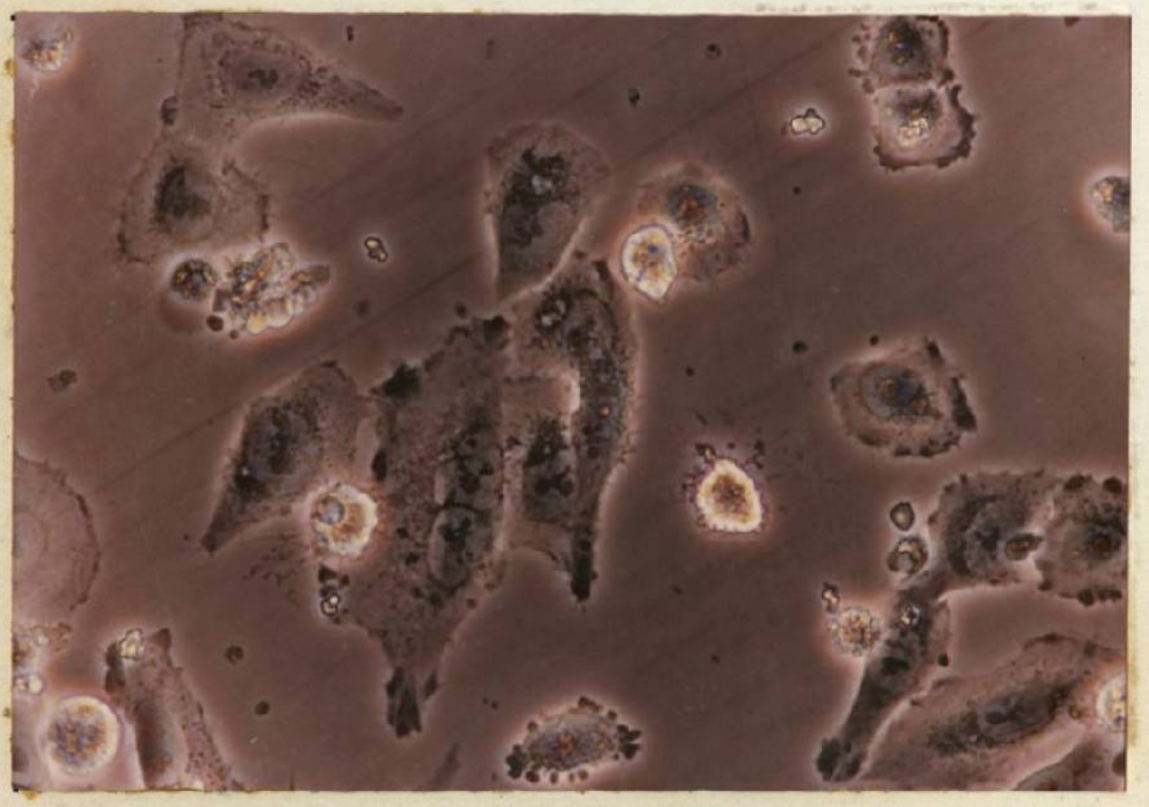


Fig. 17a' Células de Chang. 5-Fluoruracilo 100 mcgr/ml.