



**CITOTOXICIDAD IN VITRO;  
ESTUDIO DEL POTENCIAL DE DIVERSAS LINEAS  
CELULARES EN LA EVALUACION DE TOXICIDAD  
DE SUBSTANCIAS**

**T E S I S**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA**

**P R E S E N T A**

**MCP LOURDES GARZA OCAÑAS**

**MONTERREY, NUEVO LEON      ENERO 1990**

Doc. Med.

15-Ene-90

GARZA OCAÑAS, LOURDI

TD  
RA1199  
.4  
.J5  
G3  
1990  
c.1



1080125925

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON  
FACULTAD DE MEDICINA**

**CITOTOXICIDAD IN VITRO: ESTUDIO DEL POTENCIAL DE DIVERSAS LINEAS  
CELULARES EN LA EVALUACION DE TOXICIDAD DE SUBSTANCIAS**

**T E S I S**

**QUE EN OPCION AL GRADO DE DOCTOR EN MEDICINA**

**PRESENTA**

**MCP LOURDES GARZA OCAÑAS**

**MONTERREY, NUEVO LEON, ENERO 1990**

TU  
RA1199

.9  
.IS

G3  
1990

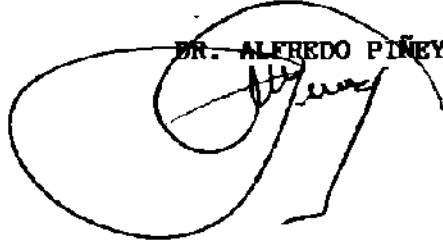
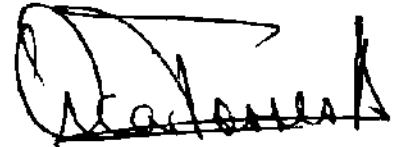


EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA Y TOXICOLOGIA  
DE LA FACULTAD DE MEDICINA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

A S E S O R E S

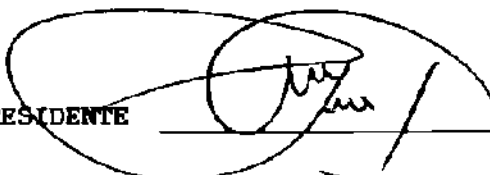
DR. med. OSCAR TORRES ALANIS

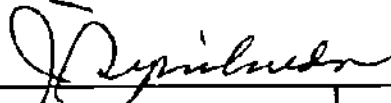
DR. ALFREDO PINEYRO LOPEZ

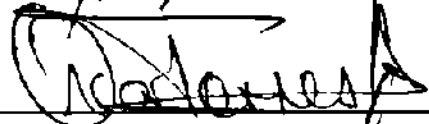
A large, stylized handwritten signature in black ink, consisting of several overlapping loops and a long horizontal stroke at the bottom.A handwritten signature in black ink, featuring a large, rounded initial 'A' followed by several connected letters in a cursive style.

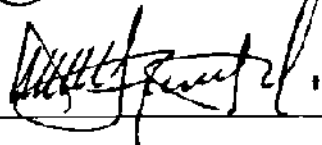
ACEPTADA POR LA SUBDIRECCION DE INVESTIGACION Y ESTUDIOS DE  
POSTGRADO DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA  
UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON EL

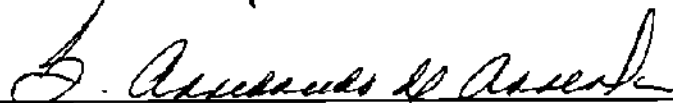
---

PRESIDENTE 

SECRETARIO 

PRIMER VOCAL 

SEGUNDO VOCAL 

TERCER VOCAL 

**D E D I C A T O R I A**

**A MIS PADRES**

**FORTUNATO GARZA GARZA Y ANGELICA OCAÑAS DE GARZA**

**POR LA DICHA DE TENERLOS.**

**A MIS HERMANOS**

**MARTHA LETICIA, MARIA MAGDALENA,**

**FORTUNATO Y MARIA GUADALUPE**

**CON CARÍÑO.**



## A G R A D E C I M I E N T O S

**Dr. Alfredo Piñeyro López:**

mi más sincero reconocimiento por el estímulo y apoyo brindados, gracias a los cuales fue posible la realización de este trabajo.

**Dr. med. Oscar Torres Alanís:**

por el consejo, crítica y valiosa asesoría brindados en todo momento.

El presente trabajo fue realizado en parte, por la Beca-Crédito Complementaria # 51506 de CONACYT, México.

## I N D I C E

	Página
INTRODUCCION .....	1
HIPOTESIS .....	7
MATERIAL Y METODOS .....	8
RESULTADOS .....	19
DISCUSION .....	44
CONCLUSIONES .....	49
BIBLIOGRAFIA .....	50
CURRICULUM VITAE .....	56

<b>FIGURAS</b>	<b>Página</b>
<b>1</b>	<b>Esquema de la técnica de dilución utilizada..... 14</b>
<b>2a y 2b</b>	<b>Aspecto normal de la línea celular de piel de rata y reacción celular a pentobarbital sódico.. 23</b>
<b>3a y 3b</b>	<b>Aspecto normal de la línea celular de pulmón de rata y reacción celular a bitartrato de epinefrina..... 24</b>
<b>4a y 4b</b>	<b>Aspecto normal de la línea celular de intestino de rata y reacción celular a pentoxifilina..... 25</b>
<b>5a y 5b</b>	<b>Aspecto normal de la línea celular de hígado de rata y reacción celular a sulfato de talio... 26</b>
<b>6a y 6b</b>	<b>Aspecto normal de la línea celular de corazón de rata y reacción celular a cloruro de mercurio... 27</b>
<b>7a y 7b</b>	<b>Aspecto normal de la línea celular de riñón de rata y reacción celular a sulfato de talio..... 28</b>
<b>8</b>	<b>Captación del colorante azul de tripano por las células de la línea de hígado de rata..... 29</b>
<b>9</b>	<b>Vacuolización en la línea celular de riñón de rata NRK-52E..... 30</b>
<b>10</b>	<b>Aspecto del color del medio de cultivo; placa de 24 h de incubación..... 42</b>
<b>11</b>	<b>Aspecto del color del medio de cultivo; placa al 7º día de incubación..... 43</b>

**TABLAS**

**Página**

1	Líneas celulares utilizadas en el estudio.....	11
2	Compuestos utilizados para evaluar toxicidad celular in vitro.....	15
3	Características de las soluciones empleadas.....	20
4	Rango de concentraciones evaluadas para citotoxicidad.....	21
5	Valores de citotoxicidad en la línea celular de hígado de rata C-9.....	32
6	Valores de citotoxicidad en la línea celular de pulmón de rata L-2.....	33
7	Valores de citotoxicidad en la línea celular de intestino de rata IEC-2.....	34
8	Valores de citotoxicidad en la línea celular de piel de rata FR.....	35
9	Valores de citotoxicidad en la línea celular de riñón de rata NRK-52E.....	36
10	Valores de citotoxicidad en la línea celular de corazón de rata H9c2.....	37
11	Log CT <sub>50</sub> µg/ml de 18 compuestos en seis líneas celulares de rata.....	41
12	Comparación de citotoxicidad in vitro (CT <sub>50</sub> ) con los valores de toxicidad in vivo (DL <sub>50</sub> ).....	48

## I N T R O D U C C I O N

La utilización de la técnica de cultivo de células se inició a principios de este Siglo con Harrison (1907) y A. Carrel (1912) (1, 2) y hasta hace 20 años existían solo 50 laboratorios en todo el mundo que la utilizaban; sin embargo su uso en toxicología en los últimos años se ha incrementado debido a varios motivos, entre los cuales están:

- 1.- La cantidad de sustancias químicas que aparecen en el mercado es muy grande y cada vez es de mayor importancia complementar las pruebas de toxicidad in vivo con pruebas in vitro para que estas sustancias reúnan los requerimientos establecidos para poder ser usadas por la industria manufacturera.
- 2.- El éxito que se ha obtenido con los ensayos para determinar mutagenicidad en cultivo de células que han resultado ser extrapolables a los ensayos hechos in vivo.
- 3.- El hecho de ser una técnica que permite realizar pruebas de toxicidad con un número de muestras grande en un período corto (lo cual no se puede hacer en animales de experimentación), además de ser económica.
- 4.- El aumento del número de grupos de campañas en contra de la experimentación animal (antiviviseccionistas), que ha llevado al desarrollo de los llamados métodos de pruebas alternativas siendo el cultivo de células uno de ellos.

Hasta ahora el campo de cultivo de células en el área de la Toxicología es aún pequeño debido a que la mayoría de los estudios toxicológicos han sido realizados desde hace mucho tiempo con preparaciones de órganos o animales totales; sin embargo dada la importancia que han adquirido actualmente los sistemas in vitro en las distintas áreas de investigación, el establecimiento de la técnica de cultivo de células es a la fecha una necesidad indispensable para el desarrollo de pruebas de toxicidad in vitro que permitan evaluar el potencial tóxico de sustancias nuevas y/o conocidas y que complementen los resultados de toxicidad evaluada in vivo.

Algunos autores han realizado amplios estudios de revisión acerca de la utilización del cultivo de células en pruebas toxicológicas así como en relación a los métodos existentes para evaluar citotoxicidad in vitro, señalando las características de cada uno de ellos así como sus posibles ventajas y/o inconvenientes (3-11). Los sistemas celulares utilizados por la mayoría de estos métodos pueden ser agrupados básicamente en dos: cultivos celulares primarios y líneas celulares.

Referente a la utilización de cultivos celulares primarios en pruebas toxicológicas, éstos son preferidos por algunos autores debido a que en ellos las células conservan aunque sea por corto tiempo (2-5 días) las funciones del órgano del cual provienen.

Sin embargo con excepción del cultivo primario de hepatocitos en el cual se puede evaluar el potencial tóxico de una sustancia

en relación a la actividad metabólica celular (12-18) el resto de sistemas organoespecíficos (cultivos primarios de riñón, corazón, pulmón) resultan caros e ineficientes para ser utilizados como pruebas toxicológicas de rutina.

Las líneas celulares en cambio han sido ampliamente utilizadas en los últimos años para la realización de pruebas de toxicidad in vitro ya que estas resultan más económicas y de más fácil manejo que los cultivos celulares primarios.

Existe a la fecha una gran cantidad de líneas celulares obtenidas de diferentes órganos y especies las cuales han sido propuestas para valorar toxicidad celular in vitro (9, 19).

El tipo, origen y número de líneas celulares empleadas por cada investigador son muy variables y existe la tendencia a la realización de las pruebas de toxicidad en varias líneas celulares.

Una pregunta que surge cuando se pretende establecer un sistema celular para el rastreo de toxicidad in vitro es ¿Qué línea o líneas celulares se deben elegir? y si se deben utilizar las mismas líneas celulares para valorar la citotoxicidad de cualquier compuesto o éstas se deben seleccionar en relación al probable órgano blanco de toxicidad del mismo.

Ya que una de las desventajas de las líneas celulares en relación a los cultivos celulares primarios es que en éstas hay una pérdida de la mayoría de las funciones organoespecíficas (20) y solo conservan funciones básicas para su subsistencia las cuales son comunes a todas ellas se planteó la posibilidad de que

las líneas celulares provenientes de diferentes órganos pudieran tener una respuesta semejante de sensibilidad general in vitro en relación a la citotoxicidad de un compuesto, independientemente del órgano del cual provienen.

Al respecto existen reportes en la literatura de diferentes estudios que han sido realizados utilizando dos o más líneas celulares (21-36). Estos estudios sin embargo presentan el inconveniente de haber sido efectuados mezclando el tipo (neoplásicas, benignas), origen (mesenquimatoso, epitelial) y especie (humano, rata, ratón) en cuanto a las líneas celulares utilizadas; ya que mientras que algunos autores han comparado líneas celulares benignas o neoplásicas humanas con líneas neoplásicas de ratón otros, han comparado líneas neoplásicas humanas con líneas benignas de rata o líneas benignas de rata con líneas neoplásicas de ratón; ésto ha ocasionado que no se pueda generalizar en cuanto a los resultados obtenidos ya sea de semejanza o de diferencia en la sensibilidad de las distintas líneas celulares utilizadas. La existencia de este tipo de reportes en la literatura habla sin embargo de la controversia en cuanto a la sensibilidad y uso de diferentes líneas celulares en las pruebas de toxicidad in vitro.

El presente trabajo fué realizado con el propósito de contar con un estudio sistemático efectuado con diferentes líneas celulares de una misma especie y un mismo origen (benigno) que nos permita establecer la diferencia o semejanza en cuanto a la suscepti-



bilidad general de las líneas celulares provenientes de distintos órganos y de esta forma valorar la necesidad del establecimiento de baterías de líneas celulares representativas de cada órgano para la realización de pruebas de toxicidad general in vitro o bien establecer si una o dos líneas celulares pueden ser suficientes para representar el potencial citotóxico de una sustancia hacia otras líneas celulares de la misma especie.

Para el desarrollo de este trabajo se utilizaron 6 líneas celulares benignas de rata provenientes de hígado, riñón, intestino, corazón y piel en las cuales se determinaron los valores de citotoxicidad de 18 compuestos clasificados en 6 grupos (metales, simpaticomiméticos, xantinas, hipnóticos, anticolinérgicos y alcoholes).

Ya que uno de los objetivos fundamentales de los estudios in vitro es contribuir en un futuro a la disminución del número de animales utilizados en las pruebas de toxicidad in vivo, las líneas celulares elegidas en este estudio fueron de rata para que los resultados obtenidos sirvan de base para la realización de comparaciones posteriores de toxicidad in vitro-in vivo ( $DL_{50}$  en rata) y de esta forma valorar el potencial de las pruebas de toxicidad in vitro en la predictividad de toxicidad in vivo.

Las sustancias utilizadas en este estudio forman parte de una lista propuesta por un programa de evaluación multicéntrica

de citotoxicidad in vitro (MEIC) (37-39), con lo cual se pretende además que los resultados obtenidos contribuyan para la valoración de la variabilidad de las pruebas de citotoxicidad realizadas en diferentes laboratorios.

## H I P O T E S I S

Las líneas celulares benignas provenientes de diferentes órganos de una misma especie presentan una susceptibilidad semejante in vitro independientemente del órgano del cual provienen.

## MATERIAL Y METODOS

### 1.- Reactivos:

Bitartrato de adrenalina, bitartrato de noradrenalina, clorhidrato de isoproterenol, bromhidrato de escopolamina, metilbromuro de homatropina, sulfato de atropina, cafeína, pentoxifilina, teofilina, pentobarbital sódico e insulina de páncreas bovino fueron obtenidos de Sigma Chemical Company, Saint Louis MO., E.U.A.; trióxido de arsénico, hidrato de cloral, barbital sódico (ácido 5, 5, dietilbarbitúrico), metanol, etanol, propanol, cloruro de potasio, hidróxido de sodio y bicarbonato de sodio de Merck de México S.A.; cloruro de mercurio II, fosfato dibásico de sodio y fosfato monobásico de potasio de J.T. Baker Chemical Company, N.J., E.U.A. y sulfato de talio de Bayer de México S.A.

### 2.- Soluciones:

A) Las soluciones con las sustancias a ensayar fueron preparadas cada vez que se realizaron las pruebas de toxicidad. El solvente utilizado fue agua libre de iones en todos los casos. El pH fue medido en un potenciómetro digital modelo 3500 (Beckman Instruments Inc. Irvine, CA., E.U.A.). Las soluciones fueron esterilizadas por filtración antes de ser analizadas (filtros Milipore 0.22 micras de diámetro de poro).

B) La solución amortiguadora de fosfatos fue preparada disolviendo 0.24 g de KCl, 10 g de NaCl, 0.25 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y 1.44 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  en un litro de agua libre de iones; el pH fue ajustado a 7.4 con hidróxido de sodio 1 N o HCl 1 N. La solución se esterilizó por filtración (filtros Milipore 0.22 micras de diámetro de poro) y se almacenó a temperatura ambiente).

C) La solución de tripsina 0.25% fue preparada disolviendo 0.100 g de tripsina de páncreas bovino (Sigma Chemical Co., Saint Louis MO., E.U.A.) en 40 ml. de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4; se esterilizó por filtración (filtros Milipore 0.22 micras de diámetro de poro) y se almacenó a 0°C.

### 3.- Medio Nutritivos:

Medio Dulbecco modificado Eagle (DME), medio Basal Eagle (BME), medio Ham F-12K (HF-12K), suero fetal bovino (SFB) y suero de ternera (ST) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., Saint Louis MO., E.U.A.

Los medio de cultivo fueron preparados disolviendo 13.4 g de DME, 10.7 g de HF-12K ó 9.7 g de BME en un litro de agua libre de iones y posteriormente se agregó bicarbonato de sodio 3.7 g, 1.176 g y 0.35 g para el DME, HF-12K y BME respectivamente. El pH fue ajustado a 7.4 con hidróxido de sodio 1 N o HCl 1 N; se les esterilizó por filtración (filtros Milipore

0.22 micras de diámetro de poro) y fueron mantenidos en refrigeración (4-6°C) en frascos estériles.

Los sueros fueron almacenados entre 0 y -4°C y una vez que fueron descongelados para su utilización se mantuvieron entre 4 - 6°C.

#### 4.- Líneas Celulares:

Las líneas celulares utilizadas fueron de origen epitelial benigno y se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, Maryland, E.U.A.

La tabla 1 muestra el tejido de origen, nombre y codificación de las mismas de acuerdo a el catálogo de la ATCC.

La descongelación de las líneas celulares así como su manejo durante el desarrollo de las pruebas de toxicidad se llevó a cabo dentro de una campana de flujo laminar (Venter de México S.A.) manteniéndose así un área de trabajo estéril; para administrar o retirar medios de cultivo a las células se utilizó un pipeteador automático (American Scientific Products E.U.A.)

Las pipetas, material de cristalería e instrumental de laboratorio utilizados fueron esterilizados en autoclave (American Scientific Products E.U.A.) a 115°C durante una hora.

#### 5.- Mantenimiento de las Líneas celulares:

Las células fueron sembradas en frascos de cultivo (Falcon T-25) y mantenidas en incubación a 37°C (Incubadora G.C.A. Precision Scientific group, Chicago Illinois E.U.A.) nutrién-

T A B L A 1

LINEAS CELULARES UTILIZADAS EN EL ESTUDIO

TEJIDO DE ORIGEN	NOMBRE	CODIGO ATCC*
RIÑON DE RATA	NRK-52E	CRL 1571
PULMON DE RATA	L-2	CCL 149
INTESTINO DELGADO DE RATA	IEC-6	CRL 1592
HIGADO DE RATA	C-9	CRL 1439
CORAZON DE RATA	H9c2	CRL 1446
PIEL DE RATA	FR	CRL 1213

\*American Type Culture Collection

doseles con medio y sueros específicos para cada una de ellas: HF-12K suplementado al 10% con SFB para las células de hígado y pulmón, MDE suplementado al 10% con SFB para las células de corazón y piel, MDE suplementado al 5% con SFB y con 10  $\mu$ g de insulina/ml para las células de intestino y MDE suplementado al 5% con ST para las células de riñón.

Cuando hubo confluencia celular o formación de monocapa en los frascos de cultivo se procedió a subcultivar las células (cada cuatro días aproximadamente), para lo cual el medio de cultivo fue retirado y se efectuaron tres lavados celulares utilizando 5 ml de solución amortiguadora de fosfatos para cada uno de ellos; posteriormente se agregó un ml. de tripsina 0.25% y se les incubó a 37°C durante 10 a 15 minutos para desprender las células del sustrato (tripsinización); después de este tiempo las células fueron resuspendidas en medio nutritivo suplementado con SFB o ST según la línea celular y se les transfirió a frascos de cultivo rotulando la fecha, tipo y pasaje celular correspondientes.

En el caso de las células de corazón el proceso de tripsinización se efectuó antes de que las células hicieran monocapa para evitar una posible fusión celular de acuerdo a las indicaciones de la ATCC.

#### 6.- Procedimiento para el desarrollo de las Pruebas de Toxicidad:

El día de la realización de las pruebas de toxicidad las mono-



capas celulares fueron resuspendidas de acuerdo a el procedimiento de tripsinización ya mencionado y se les mantuvo en medio nutritivo específico suplementado con suero.

La densidad celular fue determinada en un hemocitómetro (Eharnack R.F.A.) y ajustada a  $5 \times 10^4$  células/ml.

Las pruebas de toxicidad fueron realizadas en placas de titulación de 96 celdillas, con fondo plano y tapa (Falcon 3072). Cada celdilla fue inoculada con 0.1 ml de medio nutritivo específico para cada línea celular; posteriormente se agregaron 0.05 ml de la solución con la sustancia a ensayar y se procedió a hacer diluciones seriadas 1:3 en las celdillas teniendo al final 8 series de diluciones paralelas para cada sustancia ensayada en un área de 5 x 8 celdillas de las placas de cada línea celular (Fig. 1).

La tabla 2 muestra los nombres y grupos de los 18 compuestos evaluados.

Finalmente todas las celdillas recibieron 0.1 ml de medio nutritivo suplementado con SFB o ST el cual contenía la suspensión celular previamente preparada con la densidad apropiada ( $5 \times 10^4$  células/ml ).

Al final de la prueba cada celdilla contenía  $5 \times 10^4$  células/ml , medio de cultivo específico suplementado con SFB o ST y la sustancia a ensayar. El volumen total fue de 200  $\mu$ l para cada celdilla.

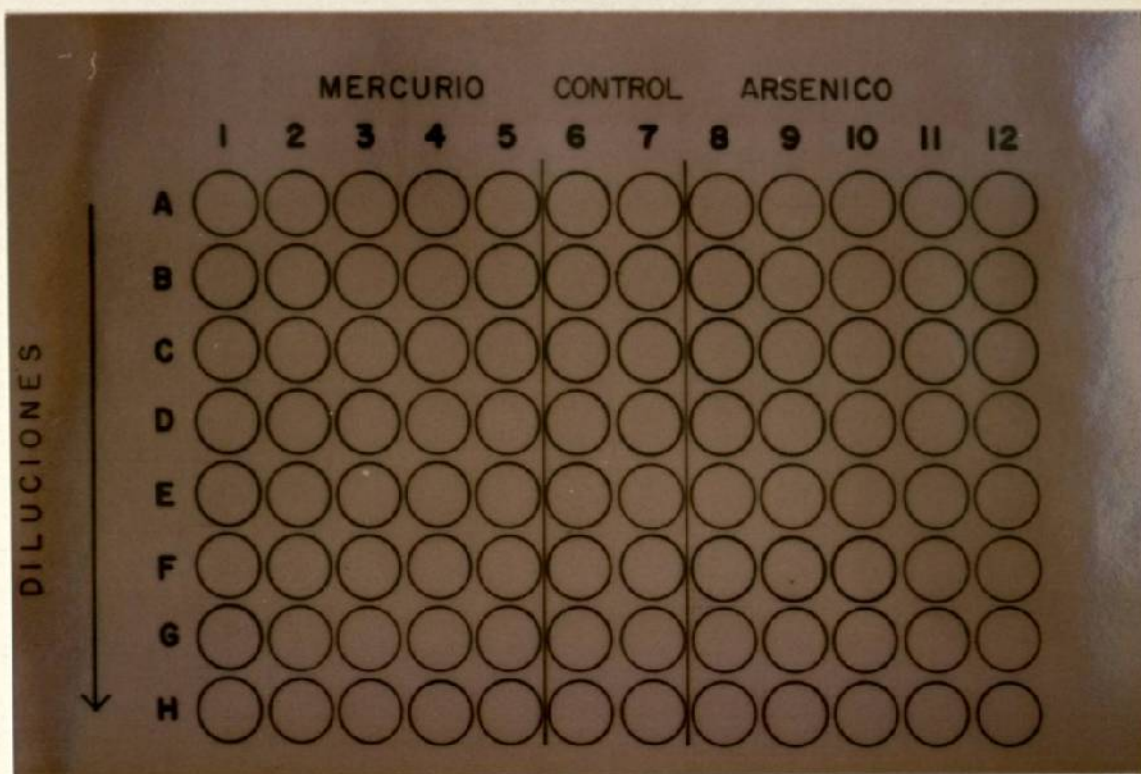


Fig. 1 Esquema que representa la técnica de dilución utilizada para las pruebas de toxicidad en una placa de cultivo de 96 celdillas.

T A B L A 2

COMPUESTOS UTILIZADOS PARA EVALUAR  
TOXICIDAD CELULAR IN VITRO

COMPUESTO	GRUPO
1 TRIOXIDO DE ARSENICO	
2 CLORURO DE MERCURIO II	METALES
3 SULFATO DE TALIO	
4 CLORHIDRATO DE ISOPROTERENOL	
5 BITARTRATO DE NOREPINEFRINA	SIMPATICOMIMETICOS
6 BITARTRATO DE EPINEFRINA	
7 TEOFILINA	
8 PENTOXIFILINA	XANTINAS
9 CAFEINA	
10 PENTOBARBITAL SODICO	
11 HIDRATO DE CLORAL	HIPNOTICOS
12 BARBITAL SODICO	
13 SULFATO DE ATROPINA	
14 BROMHIDRATO DE ESCOPOLAMINA	ANTICOLINERGICOS
15 METILBROMURO DE HOMATROPINA	
16 PROPANOL	
17 ETANOL	ALCOHOLES
18 METANOL	

Las placas de cultivo fueron cubiertas con su tapa, selladas con cinta adhesiva y se les rotuló con la hora, fecha de sembrado, nombre y pasaje de la línea celular. Posteriormente las placas fueron incubadas a 37°C.

Se consideraron dos tiempos de incubación para la evaluación de la toxicidad de las sustancias: 24 h y 7 días (168 h).

A las 24 h de incubación las células sembradas en las placas de cultivo fueron revisadas microscópicamente en un invertoscopio IM 35 (Carl Zeiss R.F.A.) con objetivos Ph 1 10x, 20x y 32x.

Los parámetros indicativos de citotoxicidad fueron: ausencia de adhesión celular al sustrato y de propagación celular en el mismo, los cuales fueron revisados en relación a cada una de las concentraciones ensayadas con cada compuesto.

Además de estos parámetros básicos se revisó la forma celular, integridad de membrana, aspecto del núcleo, presencia de vacuolas o granulaciones citoplasmáticas y *franca lisis* celular.

Las placas fueron incubadas nuevamente y se revisaron los parámetros ya mencionados cada 24 h evaluando la evolución del daño hasta el 7° día.

El daño evaluado microscópicamente a las 24 h y al 7° día fue expresado de la siguiente manera: las celdillas con el total de la población celular sembrada no adherida a el sustrato, sin propagación celular, con aspecto redondeado igual a la

suspensión inicialmente sembrada o bien con franca lisis celular, fueron consideradas como celdillas con concentración citotóxica total ( $CT_{100}$ ).

Las celdillas con el total de la población celular sembrada adherida a la placa de cultivo con aspecto fusiforme o poliédrico y propagación celular igual a la de los controles fueron consideradas como celdillas con concentraciones no citotóxicas ( $CT_0$ ).

Las concentraciones citotóxicas cincuenta por ciento de cada uno de los compuestos fueron calculadas como el promedio geométrico entre las concentraciones citotóxicas totales y las concentraciones no citotóxicas evaluadas a las 24 h y a los 7 días de incubación (27).

El daño celular evaluado microscópicamente en base a adhesión y morfología celular fue corroborado con la realización de la prueba de captación del colorante azul de Tripano (11).

La revisión del pH del medio de cultivo se utilizó como parámetro complementario para corroborar citotoxicidad en relación a los cambios de color del medio de cultivo (violeta-alkalino, amarillo-ácido) los cuales fueron registrados por el indicador de pH rojo fenol incluido en el mismo.

Durante el desarrollo de las pruebas de toxicidad se tomaron microfotografías del daño producido por cada una de las sustancias a diferentes concentraciones y tiempos en cada una de las líneas celulares.

Las microfotografías fueron tomadas a través de una cámara Contax 139 Quartz, 35 mm. adaptada al invertoscopio IM-35; con objetivos Ph 1 20x y 32x; película Kodak Ektachrome ASA 100.

#### 7.- Evaluación Estadística:

Para comparar los valores de citotoxicidad en los dos tiempos de incubación en las diferentes líneas celulares se utilizó la prueba t de Student (40); se eligieron valores de p menor a 0.05 para indicar un nivel de significancia diferente.

Las pruebas de toxicidad fueron repetidas al menos dos veces con cada uno de los compuestos en cada línea celular.

## RESULTADOS

### 1.- Características de las Soluciones

La tabla 3 muestra las concentraciones y el pH de las soluciones estándares preparadas con cada uno de los compuestos.

Las concentraciones de los estándares fueron obtenidas en base a los resultados de varios ensayos preliminares tanto de solubilidad como de búsqueda del rango de toxicidad de las sustancias en las diferentes líneas celulares. Todos los compuestos fueron solubles en agua libre de iones.

La tabla 4 muestra el rango de concentraciones utilizadas con cada uno de los compuestos para la evaluación del grado de citotoxicidad de los mismos en las diferentes líneas celulares.

### 2.- Observaciones Morfológicas

Las figuras 2A - 7A muestran el aspecto celular normal observado por revisión microscópica en las celdillas control de las líneas celulares de hígado, pulmón, intestino, piel, riñón y corazón de rata después de 24 h ó 7 días de incubación. En todos los casos se observó una buena adhesión celular la cual se inició desde las 3 h posteriores al sembrado de las mismas. El aspecto celular fue poliédrico o fusiforme con propagación celular y tendencia a la formación de monocapa. En la revisión microscópica efectuada a las 24

T A B L A 3

CARACTERISTICAS DE LAS SOLUCIONES EMPLEADAS

COMPUESTO	CONCENTRACION mg/ml*	pH
1 TRIOXIDO DE ARSENICO	1	6
2 CLORURO DE MERCURIO II	0.2	7
3 SULFATO DE TALIO	4	7
4 CLORHIDRATO DE ISOPROTERENOL	6	3.7
5 BITARTRATO DE NOREPINEFRINA	6	3.5
6 BITARTRATO DE EPINEFRINA	6	3.5
7 TEOFILINA	4.5	4.6
8 PENTOXIFILINA	30	6.4
9 CAFEINA	33	5
10 PENTOBARBITAL SODICO	20	10
11 HIDRATO DE CLORAL	10	6
12 BARBITAL SODICO	40	11.2
13 SULFATO DE ATROPINA	6	4.5
14 BROMHIDRATO DE ESCOPOLAMINA	6	5
15 METILBROMURO DE HOMATROPINA	60	4.5
15 PROPANOL	39.5	7
16 ETANOL	39.5	9
17 METANOL	39.5	8

\* Solvente: agua libre de iones.



T A B L A 4

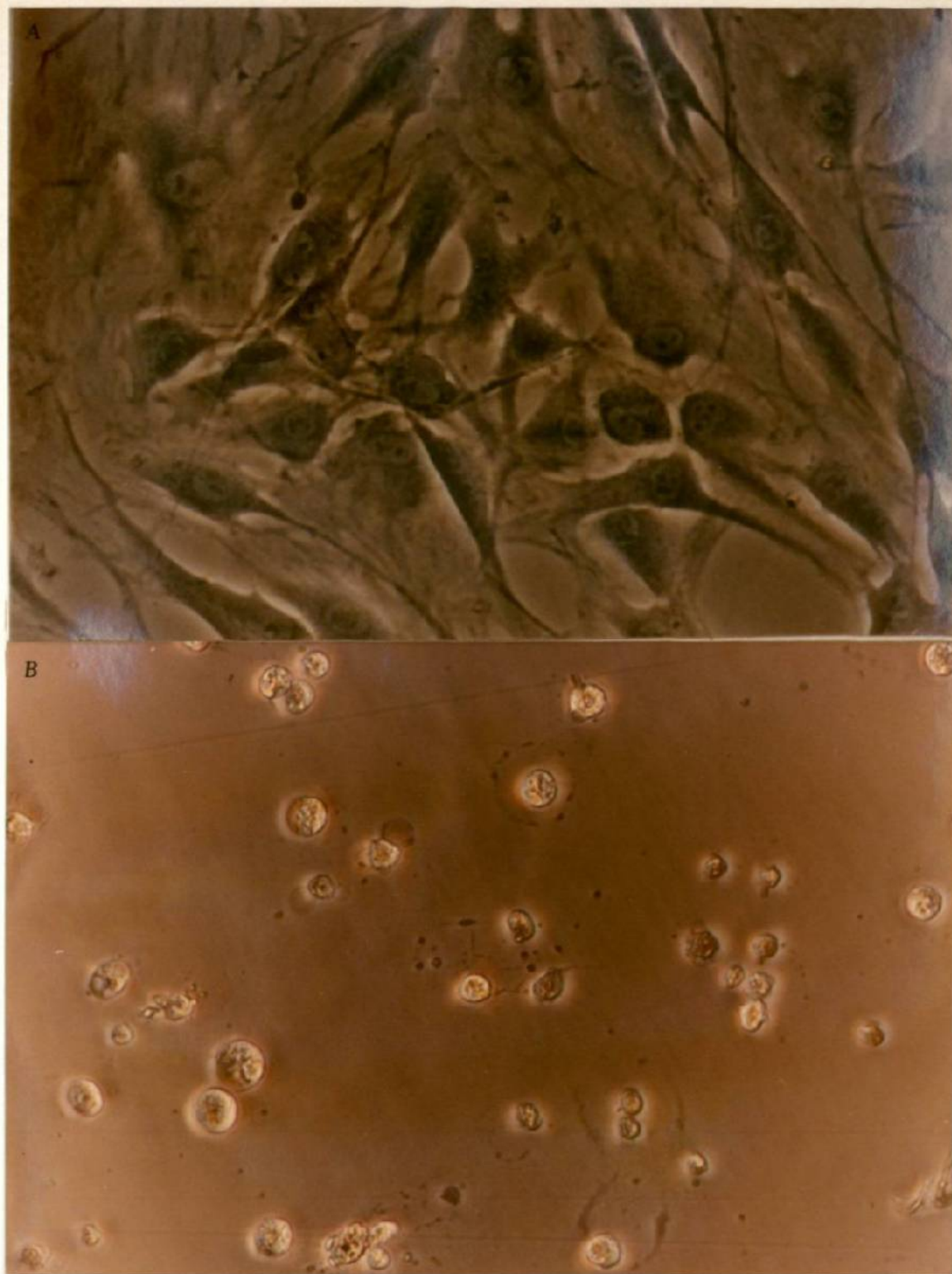
## R A N G O D E C O N C E N T R A C I O N E S (µg/ml) E V A L U A D A S P A R A C I T O T O X I C I D A D

No.	C O M P U E S T O	A*	B	C	D	E	F	G	H
1	TRIOXIDO DE ARSENICO	166	55	18	6	2	0.68	0.22	0.076
2	CLORURO DE MERCURIO II	33	11	3.7	1.2	0.4	0.13	0.045	0.015
3	SULFATO DE TALIO	666	222	74	24	8	2.7	0.9	0.3
4	CLORHIDRATO DE ISOPROTERENOL	1000	333	111	37	12	4	1.3	0.45
5	BITARTRATO DE NOREPINEFRINA	1000	333	111	37	12	4	1.3	0.45
6	BITARTRATO DE EPINEFRINA	1000	333	111	37	12	4	1.3	0.45
7	TEOFILINA	756	252	84	28	9	3	1	0.34
8	PENTOXIFILINA	5000	1666	555	185	61	20	6	2
9	CAFEINA	5553	1851	617	205	68	22	7	2
10	PENTOBARBITAL SODICO	3333	1111	370	123	41	13	4	1
11	HIDRATO DE CLORAL	1666	833	277	92	30	10	3	1
12	BARBITAL SODICO	6666	2222	740	246	82	27	9	3
13	SULFATO DE ATROPINA	1000	333	111	37	12	4	1.3	0.45
14	BROMHIDRATO DE ESCOPOLAMINA	1000	333	111	37	12	4	1.3	0.45
15	METILBROMURO DE HOMATROPINA	10000	3333	1111	370	123	41	13	4.5
16	PROPANOL	131670	43890	14630	4876	1625	541	180	60
17	ETANOL	131670	43890	14630	4876	1625	541	180	60
18	METANOL	131670	43890	14630	4876	1625	541	180	60

\* A → H: Secuencia de diluciones realizadas en la placa de cultivo.

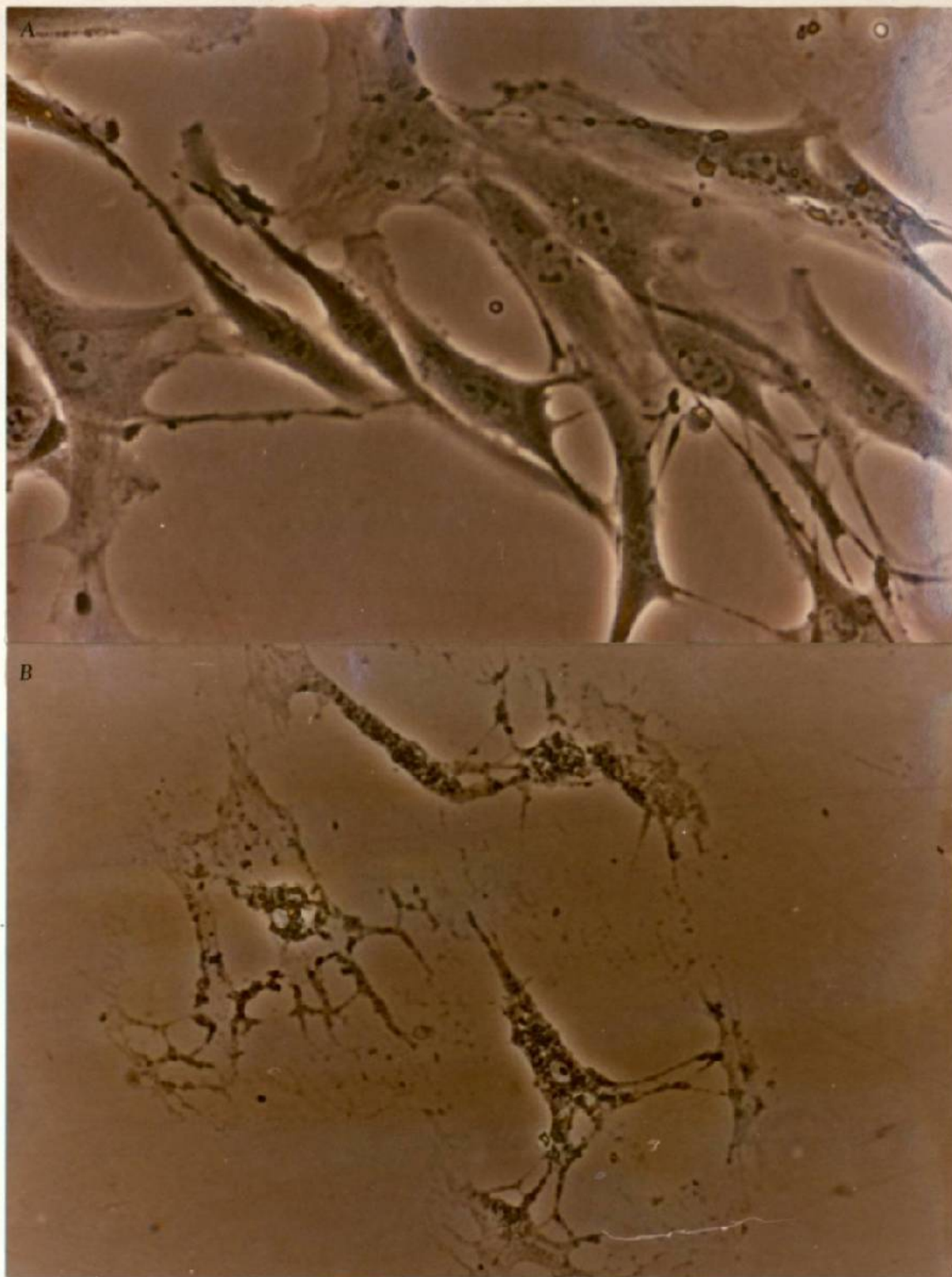
h o el 7° día de incubación en las celdillas en las cuales las concentraciones utilizadas fueron citotóxicas ( $CT_{100}$ ), la adhesión a la placa de cultivo fue nula, no se presentó propagación celular ni tendencia a la formación de monocapa. Las células expuestas a dichas concentraciones estaban desprendidas del substrato, con forma redonda, microcitosis o bien con franca lisis celular (Figs. 2B - 7B). En estos casos la prueba de azul de tripano corroboró la muerte celular evaluada por falta de adhesión al substrato. Al realizar la prueba se observó captación del colorante por todas las células desprendidas (Fig. 8).

Dos compuestos produjeron un importante fenómeno de vacuolización celular; éstos fueron el sulfato de talio y el bromhidrato de escopolamina. La vacuolización se presentó en todas las líneas celulares expuestas a las concentraciones citotóxicas de dichos compuestos y su extensión fue directamente proporcional al tiempo de exposición. Después de 24 h de incubación la mayoría de las células habían desarrollado una o varias vacuolas centrales, redondas o irregulares las cuales generalmente se iniciaron en el área perinuclear y gradualmente aumentaron de tamaño desplazando al núcleo hacia la periferia. Esto pudo ser claramente observado a las 48 h tiempo en el cual en algunas células el área vacuolar excedió una tercera parte del área celular total (Fig. 9).



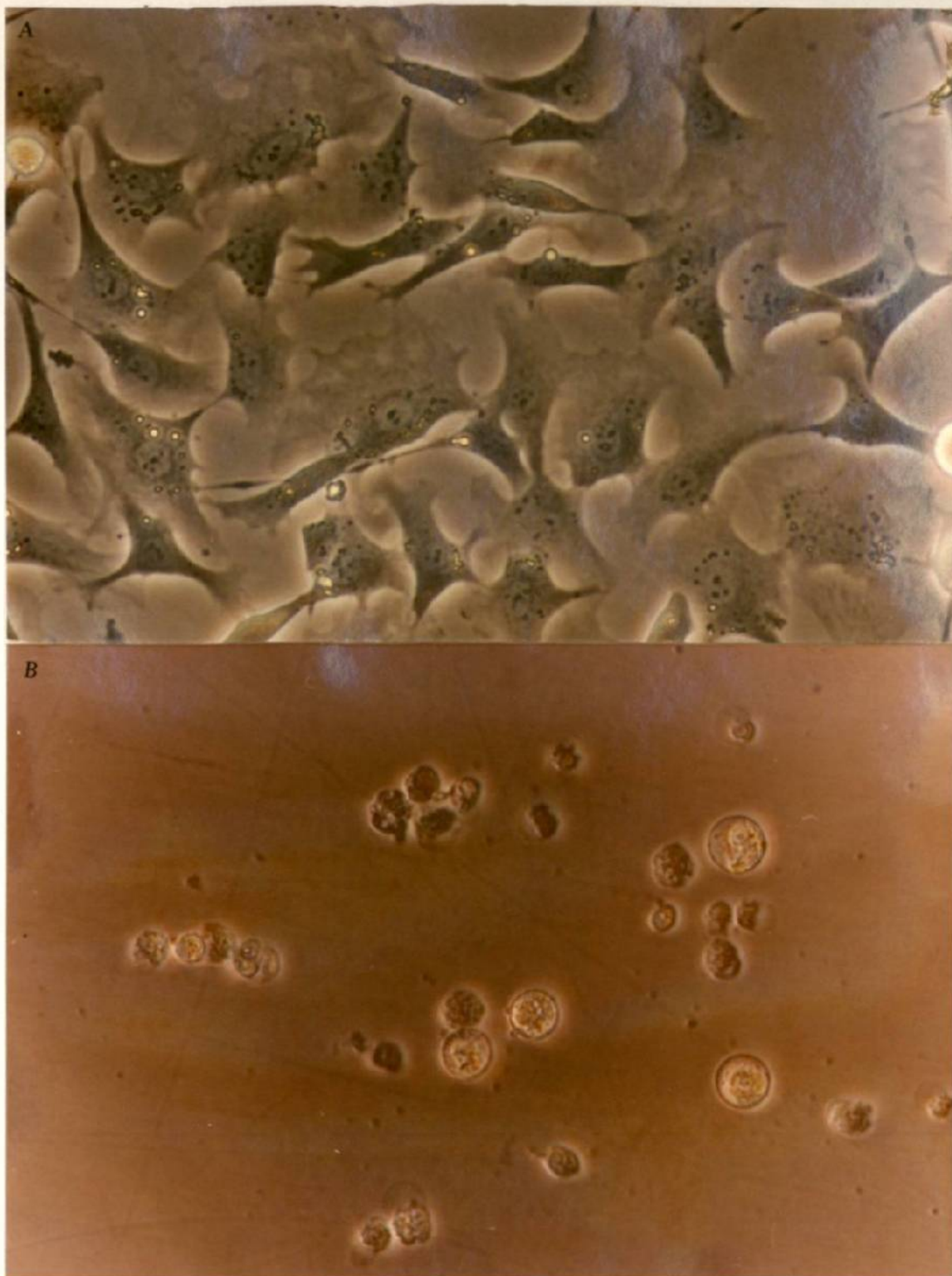
**Fig. 2 A:** Aspecto normal de la línea celular de piel de rata FR, (32x).

**B:** Reacción celular después de 24 h de incubación con 3333 µg/ml ( $CT_{100}$ ) de pentobarbital sódico.



**Fig. 3 A:** Aspecto normal de la línea celular de pulmón de rata L-2, (32x).

**B:** Reacción celular después de 24 h de incubación con 12 µg/ml (CT<sub>100</sub>) de bitartrato de epinefrina.



**Fig. 4 A:** Aspecto normal de la línea celular de intestino de rata IEC, (32x).

**B:** Reacción celular después de 24 h de incubación con 5000 µg/ml ( $CT_{100}$ ) de pentoxifilina.

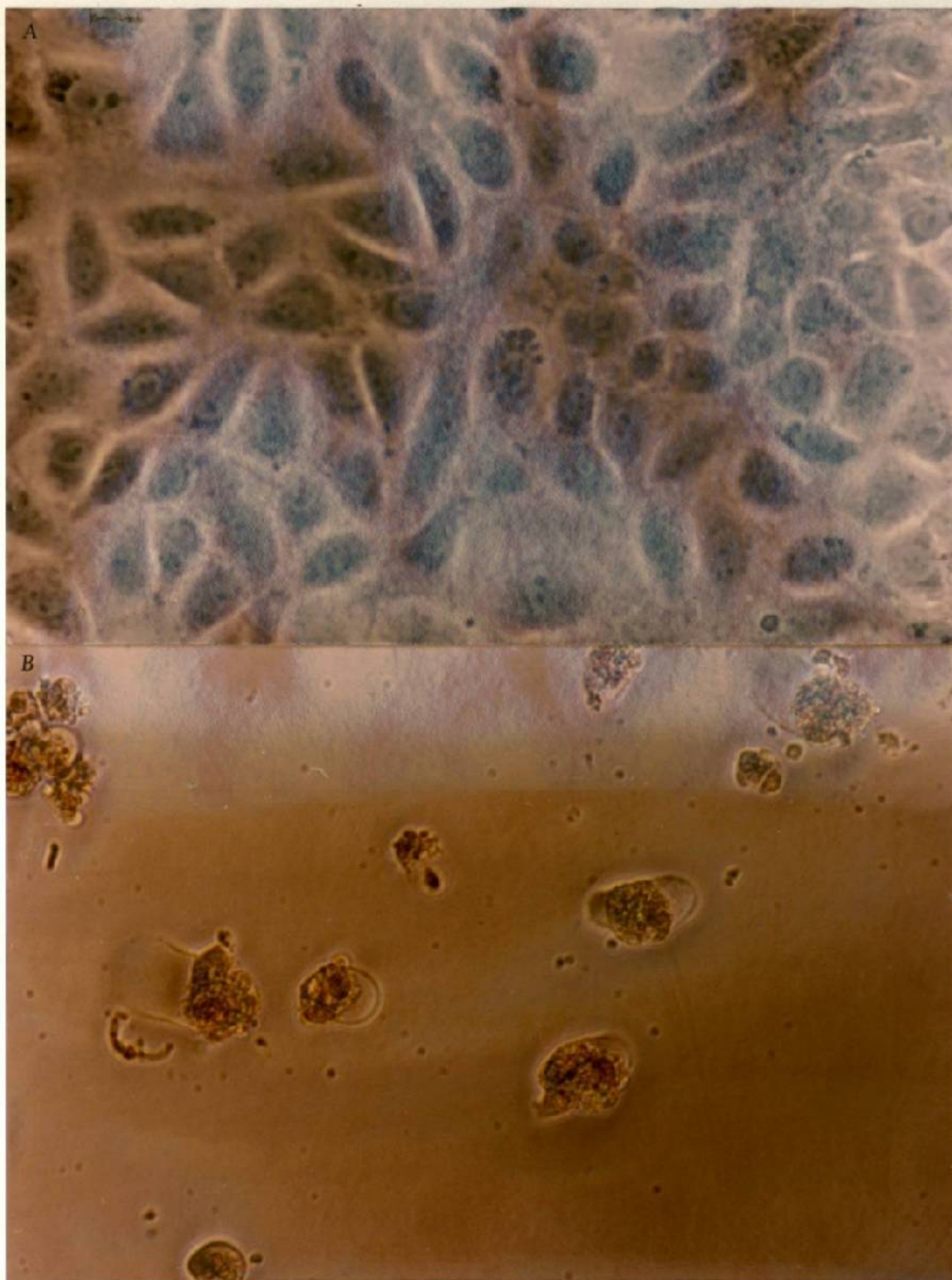


Fig. 5 A: Aspecto normal de la línea de hígado de rata C-9, (32x).

B: Reacción celular después de 7 días de incubación con 74 µg/ml (CT<sub>100</sub>) de sulfato de talio.

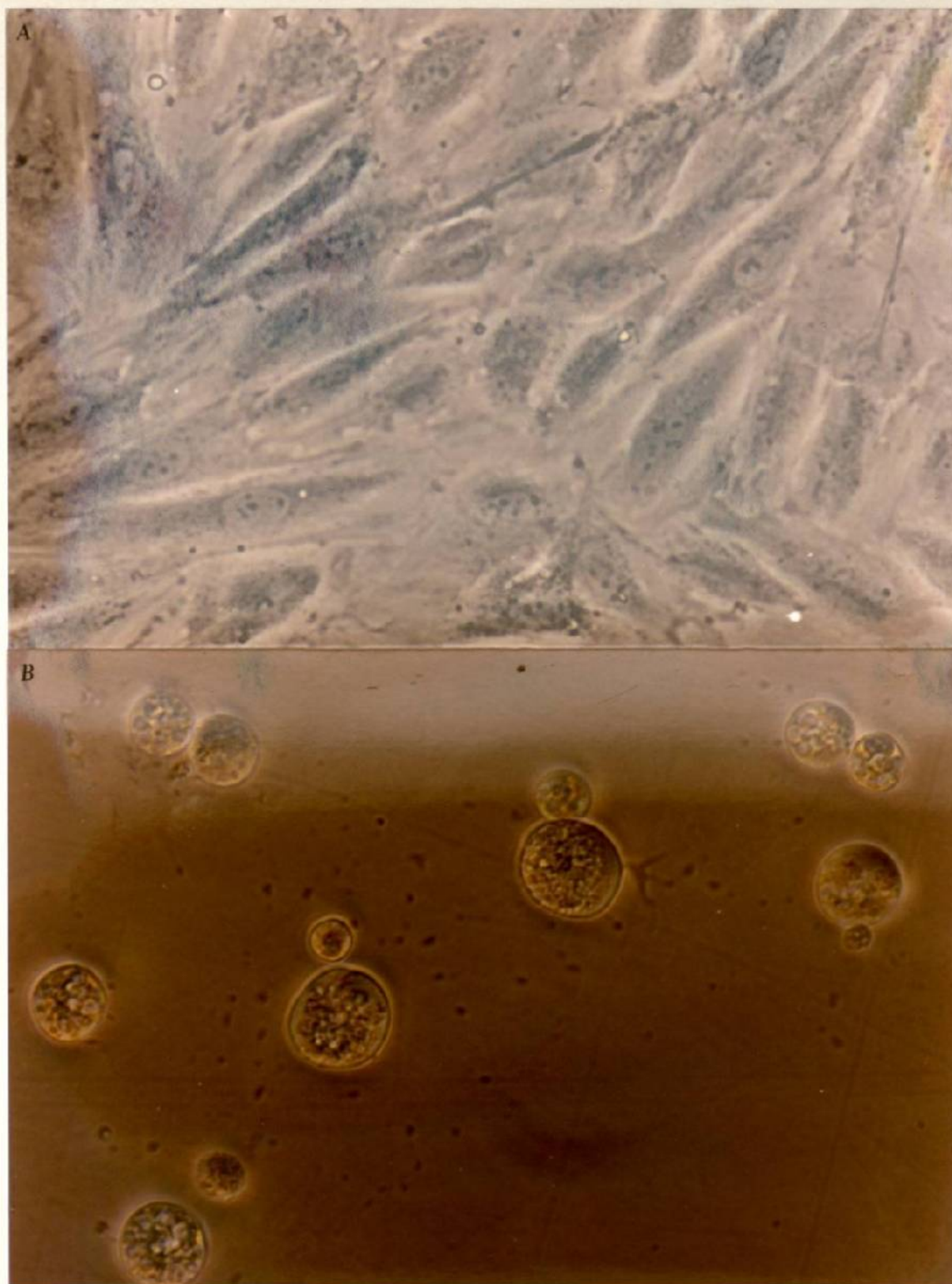


Fig. 6 A: Aspecto normal de la línea celular de corazón de rata H9c2, (32x).

B: Reacción celular después de 7 días de incubación con  $3.7 \mu\text{g/ml}$  ( $\text{CT}_{100}$ ) de cloruro de mercurio.

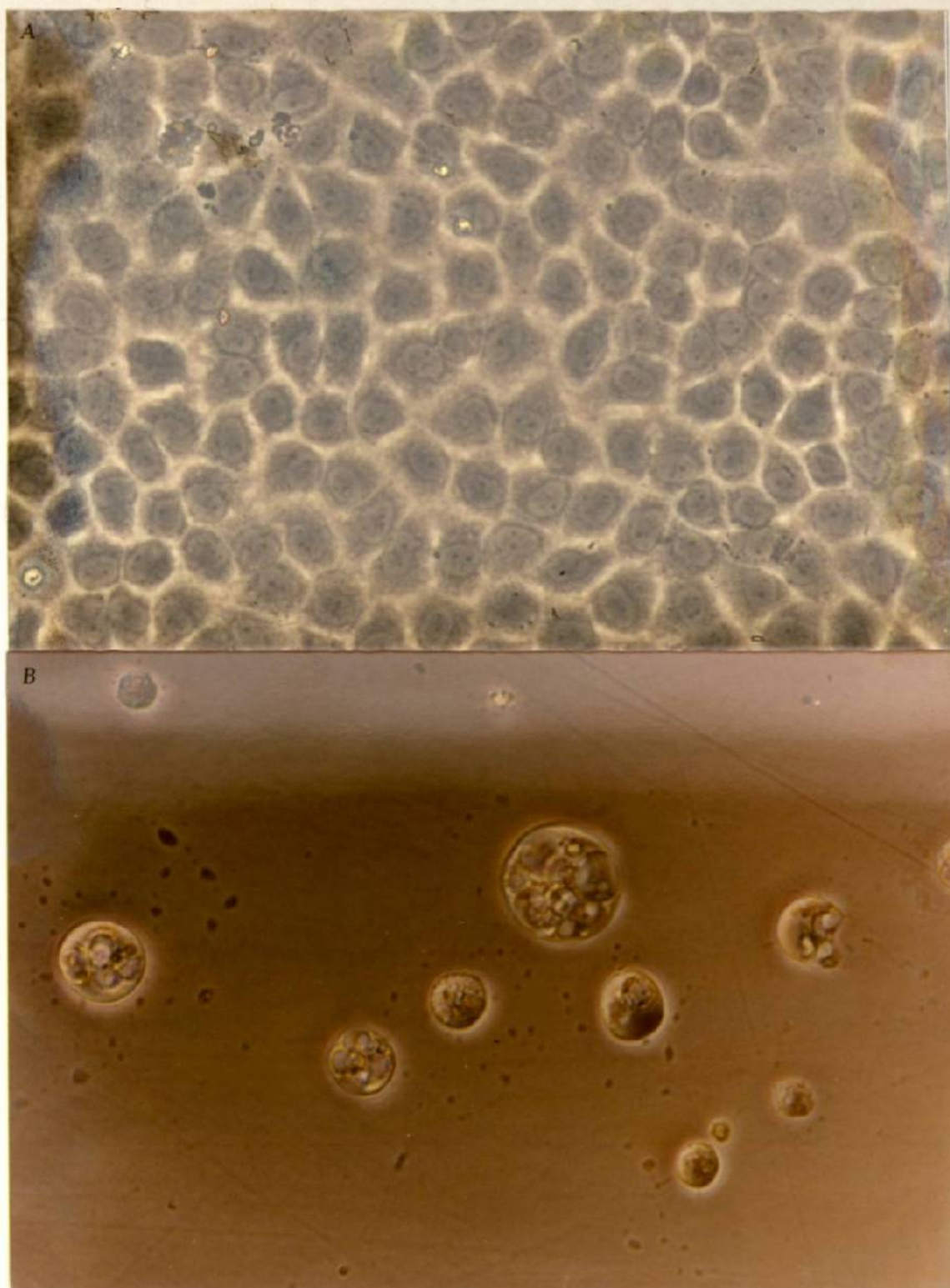


Fig. 7 A: Aspecto normal de la línea celular de riñón de rata NRK-52E, (32x).

B: Reacción celular después de 7 días de incubación con 74  $\mu\text{g/ml}$  ( $\text{CT}_{100}$ ) de sulfato de talio.



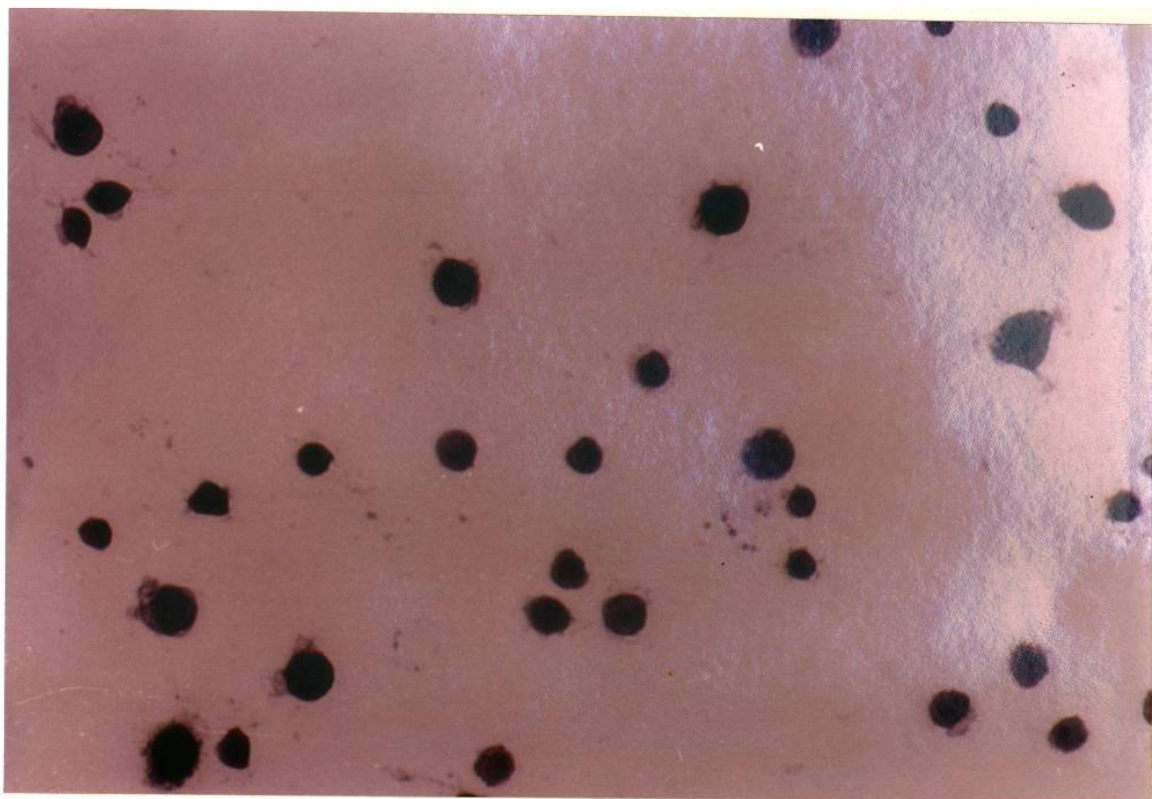
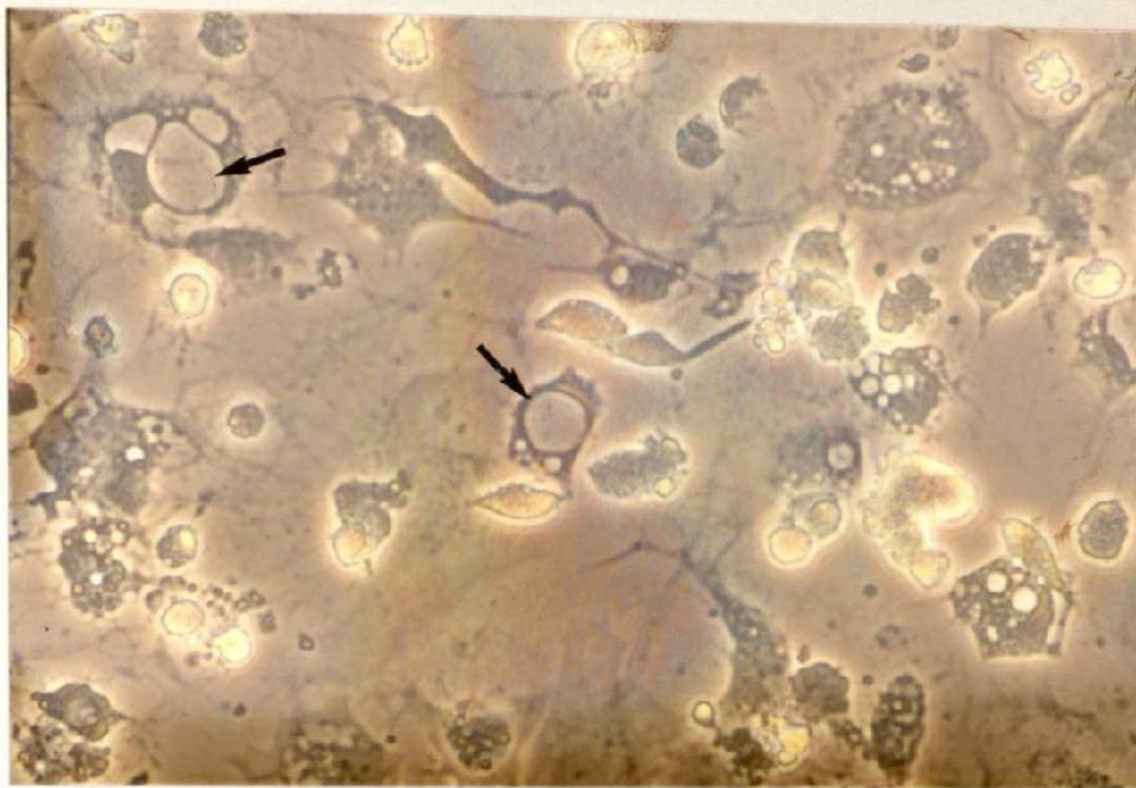


Fig. 8 Captación del colorante azul de tripano por las células de la línea de hígado de rata C-9 expuestas a 74  $\mu\text{g/ml}$  de sulfato de talio durante 24 h (32x).



**Fig. 9** Vacuolización observada en la línea celular de riñón de rata NRK-52E después de 48 h de incubación con 24  $\mu\text{g/ml}$  de sulfato de talio.

### 3.- Grado de Citotoxicidad de los Compuestos

Las tablas 5-10 muestran las concentraciones  $CT_{100}$  y  $CT_0$  obtenidas para cada una de las líneas celulares después de 24 h y 7 días de exposición a los diferentes compuestos. Las concentraciones  $CT_{50}$  para las 24 h y el 7° día fueron obtenidas a partir de estos datos ( $CT_{100}$ ,  $CT_0$ ) y se utilizaron para comparar el grado de citotoxicidad de los diferentes compuestos.

Las concentraciones citotóxicas de cada uno de los compuestos evaluados fueron muy diferentes entre sí; encontrándose valores de  $CT_{50}$  de menos de 10  $\mu\text{g/ml}$  para algunos compuestos y hasta de 25  $\text{mg/ml}$  para otros. La secuencia encontrada en el grado de citotoxicidad de los 18 compuestos evaluados fue la misma en todas las líneas celulares utilizadas (Tabla 11).

El trióxido de arsénico y el cloruro de mercurio del grupo de metales y los compuestos del grupo de los simpáticomiméticos (Nrs. 4, 5 y 6) fueron los más citotóxicos. Las concentraciones requeridas para producir citotoxicidad ( $CT_{50}$ ) con estos compuestos fueron menores a 10  $\mu\text{g/ml}$  tanto para las 24 h como para el 7° día de exposición celular a los mismos.

El rango de concentraciones citotóxicas para el sulfato de talio, sulfato de atropina y el bromhidrato de escopolamina fue de 100 a 300  $\mu\text{g/ml}$  para las 24 h y de 10 a 300  $\mu\text{g/ml}$  para el 7° día siguiendo estos compuestos en el orden de secuencia de toxicidad en todas las líneas celulares.

T A B L A 5

VALORES DE CITOTOXICIDAD ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) EN LA LINEA CELULAR DE  
HIGADO DE RATA C-9\*

COMPUESTO	24 h		168 h	
	CT <sub>100</sub>	CT <sub>0</sub>	CT <sub>100</sub>	CT <sub>0</sub>
TRIOXIDO DE ARSENICO	2	0.68	0.68	0.22
CLORURO DE MERCURIO II	3.7	1.2	3.7	1.2
SULFATO DE TALIO	666	24	24	8
CLORHIDRATO DE ISOPROTERENOL	4	1.3	4	1.3
BITARTRATO DE NOREPINEFRINA	12	4	12	4
BITARTRATO DE EPINEFRINA	12	4	12	4
TEOFILINA	2269	756	756	84
PENTOXIFILINA	5000	555	555	61
CAFEINA	5553	617	617	205
PENTOBARBITAL SODICO	3333	123	1111	41
HIDRATO DE CLORAL	1666	833	833	277
BARBITAL SODICO	20000	740	20000	740
SULFATO DE ATROPINA	333	37	111	37
BROMHIDRATO DE ESCOPOLANINA	1000	111	1000	111
METILBROMURO DE HOMATROPINA	30000	3333	10000	1111
PROPANOL	14630	4876	14630	4876
ETANOL	43890	4876	43890	4876
METANOL	43890	4876	43890	4876

\* American Type Culture Collection

T A B L A 6

VALORES DE CITOTOXICIDAD ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) EN LA LINEA CELULAR DE  
PULMON DE RATA L-2 \*

COMPUESTO	24 h		168 h	
	CT <sub>100</sub>	CT <sub>0</sub>	CT <sub>100</sub>	CT <sub>0</sub>
TRIOXIDO DE ARSENICO	6	0.68	2	0.68
CLORURO DE MERCURIO II	3.7	1.2	3.7	1.2
SULFATO DE TALIO	666	24	74	8
CLORHIDRATO DE ISOPROTERENOL	12	4	12	4
BITARTRATO DE NOREPINEFRINA	12	4	12	4
BITARTRATO DE EPINEFRINA	12	4	12	4
TEOFILINA	2269	756	756	84
PENTOXIFILINA	5000	555	555	61
CAFEINA	5553	1851	1851	205
PENTOBARBITAL SODICO	3333	123	370	41
HIDRATO DE CLORAL	1666	833	833	277
BARBITAL SODICO	20000	740	20000	740
SULFATO DE ATROPINA	333	37	111	37
BROMHIDRATO DE ESCOPOLAMINA	1000	111	1000	111
METILBROMURO DE HOMATROPINA	30000	3333	10000	1111
PROPANOL	14630	4876	14630	4876
ETANOL	43890	4876	43890	4876
METANOL	43890	4876	43890	4876

\* American Type Culture Collection

T A B L A 7

VALORES DE CITOTOXICIDAD ( $\mu\text{g/ml}$ ) EN LA LINEA CELULAR DE  
INTESTINO DE RATA IEC-2\*

COMPUESTO	24 h		168 h	
	CT <sub>100</sub>	CT <sub>0</sub>	CT <sub>100</sub>	CT <sub>0</sub>
TRIOXIDO DE ARSENICO	2	0.68	0.68	0.22
CLORURO DE MERCURIO II	3.7	1.2	3.7	1.2
SULFATO DE TALIO	666	24	74	8
CLOBRIDRATO DE ISOPROTERENOL	12	4	12	4
BITARTRATO DE NOREPINEFRINA	12	4	12	4
BITARTRATO DE EPINEFRINA	12	4	12	4
TEOFILINA	2269	756	756	84
PENTOXIFILINA	5000	555	555	61
CAFEINA	5553	617	617	205
PENTOBARBITAL SODICO	3333	123	1111	41
HIDRATO DE CLORAL	1666	833	833	277
BARBITAL SODICO	20000	740	20000	740
SULFATO DE ATROPINA	333	37	111	37
BROMHIDRATO DE ESCOPOLAMINA	1000	111	1000	111
METILBROMURO DE HOMATROPINA	30000	3333	10000	1111
PROPANOL	14630	4876	14630	4876
ETANOL	43890	14630	43890	14630
METANOL	43890	14630	43890	14630

\* American Type Culture Collection

T A B L A 8

VALORES DE CITOTOXICIDAD ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) EN LA LINEA CELULAR DE  
PIEL DE RATA FR\*

COMPUESTO	24 h		168 h	
	CT <sub>100</sub>	CT <sub>0</sub>	CT <sub>100</sub>	CT <sub>0</sub>
TRIOXIDO DE ARSENICO	2	0.68	0.68	0.22
CLORURO DE MERCURIO II	3.7	0.4	3.7	0.4
SULFATO DE TALIO	666	24	24	8
CLORHIDRATO DE ISOPROTERENOL	4	1.3	4	1.3
BITARTRATO DE NOREPINEFRINA	12	4	12	4
BITARTRATO DE EPINEFRINA	12	4	12	4
TEOFILINA	2269	756	756	84
PENTOXIFILINA	5000	555	555	61
CAFEINA	5553	617	617	205
PENTOBARBITAL SODICO	3333	123	1111	123
HIDRATO DE CLORAL	1666	833	833	277
BARBITAL SODICO	20000	740	20000	740
SULFATO DE ATROPINA	333	37	111	37
BROMHIDRATO DE ESCOPOLAMINA	1000	111	1000	111
METILBROMURO DE HOMATROPINA	30000	3333	30000	3333
PROPANOL	14630	4876	14630	4876
ETANOL	43890	4876	43890	4876
METANOL	43890	4876	43890	4876

\* American Type Culture Collection

T A B L A 9

VALORES DE CITOTOXICIDAD ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) EN LA LINEA CELULAR DE  
RIÑÓN DE RATA NRK-52E\*

COMPUESTO	24 h		168 h	
	CT <sub>100</sub>	CT <sub>0</sub>	CT <sub>100</sub>	CT <sub>0</sub>
TRIOXIDO DE ARSENICO	2	0.68	0.68	0.22
CLORURO DE MERCURIO II	3.7	0.4	3.7	0.4
SULFATO DE TALIO	666	24	74	8
CLORHIDRATO DE ISOPROTERENOL	12	4	12	4
BITARTRATO DE NOREPINEFRINA	12	4	12	4
BITARTRATO DE EPINEFRINA	12	4	12	4
TEOFILINA	2269	756	756	84
PENTOXIFILINA	5000	555	555	61
CAFEINA	5553	617	617	205
PENTOBARBITAL SODICO	3333	123	1111	41
HIDRATO DE CLORAL	1666	833	833	277
BARBITAL SODICO	20000	740	20000	740
SULFATO DE ATROPINA	333	37	111	37
BROMHIDRATO DE ESCOPOLAMINA	1000	111	1000	111
METILBROMURO DE HOMATROPINA	30000	3333	10000	1111
PROPANOL	14630	4876	14630	4876
ETANOL	43890	4876	43890	4876
METANOL	43890	4876	43890	4876

\* American Type Culture Collection



T A B L A 10

VALORES DE CITOTOXICIDAD ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) EN LA LINEA CELULAR DE  
CORAZON DE RATA H9c2\*

COMPUESTO	24 h		168 h	
	CT <sub>100</sub>	CT <sub>0</sub>	CT <sub>100</sub>	CT <sub>0</sub>
TRIOXIDO DE ARSENICO	6	0.68	2	0.68
CLORURO DE MERCURIO II	3.7	0.4	3.7	0.4
SULFATO DE TALIO	666	24	74	8
CLORHIDRATO DE ISOPROTERENOL	12	1.3	12	1.3
BITARTRATO DE NOREPINEFRINA	12	4	12	4
BITARTRATO DE EPINEFRINA	12	4	12	4
TEOFILINA	2269	756	756	84
PENTOXIFILINA	5000	555	555	61
CAFEINA	5553	617	617	205
PENTOBARBITAL SODICO	3333	123	1111	123
HIDRATO DE CLORAL	1666	833	833	277
BARBITAL SODICO	20000	740	20000	740
SULFATO DE ATROPINA	333	37	111	37
BROMHIDRATO DE ESCOPOLAMINA	1000	111	1000	111
METILBROMURO DE HOMATROPINA	30000	3333	10000	1111
PROPANOL	14630	4876	14630	4876
ETANOL	43890	4876	43890	4876
METANOL	43890	4876	43890	4876

\* American Type Culture Collection

Para los compuestos del grupo xantinas (teofilina, pentoxifilina y cafeína) e hipnóticos (pentobarbital, hidrato de cloral y barbital) el rango de concentraciones citotóxicas fue de 1000 a 4000  $\mu\text{g/ml}$  para las 24 h y de 180 a 4000  $\mu\text{g/ml}$  para el 7° día.

Los compuestos menos citotóxicos en todas las líneas celulares fueron el metilbromuro de homatropina y los alcoholes (propañol, etanol y metanol) para los cuales el rango de concentraciones citotóxicas fueron de 10,000 a 25,000  $\mu\text{g/ml}$  para las 24 h y de 3000 a 25,000  $\mu\text{g/ml}$  para el 7° día.

#### 4.- Tiempo de Exposición Celular y Citotoxicidad de los Compuestos

El comportamiento de citotoxicidad de los compuestos en relación al tiempo de exposición celular fue el mismo para todos los tipos celulares utilizados. Los compuestos 1, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 13 y 15, mostraron tener un incremento en su citotoxicidad en relación al tiempo de exposición (Tabla 11). Todas las líneas celulares mostraron ser más sensibles a dichos compuestos a partir de las 72 h de incubación con los mismos. En este tiempo pudo observarse que las celdillas que tenían concentraciones que no habían producido daño celular a las 24 h ya presentaban desprendimiento de la población celular del substrato a las 72 h.

El aumento de toxicidad celular de estos compuestos en relación al tiempo de exposición se manifestó en forma evidente al comparar las concentraciones requeridas para producir citoto-

xicidad al 7° día las cuales fueron significativamente menores que las requeridas a las 24 h.

El resto de los compuestos (Nos. 2, 4, 5, 6, 12, 14, 16, 17 y 18) no mostraron incremento en su toxicidad al aumentar el tiempo de incubación con los mismos. En estos casos no hubo diferencia significativa entre las concentraciones citotóxicas de 24 h y del 7° día.

#### 5.- pH del Medio de Cultivo y Citotoxicidad

Se observó una buena correlación entre el daño celular evaluado microscópicamente y el daño evaluado por los cambios de color del medio de cultivo en relación al pH del mismo al 7° día.

El pH del medio de cultivo en las placas que tenían de 0 a 24 h de incubación fue alcalino (color violeta) en todas las celdillas (Fig. 10). Al 7° día de incubación el pH fue ácido (color amarillo) en las celdillas control así como en las celdillas expuestas a concentraciones que permitieron el crecimiento celular (no citotóxicas); mientras que en las celdillas expuestas a concentraciones  $CT_{100}$ , el pH al 7° día fue alcalino corroborando el daño evaluado microscópicamente en dichas celdillas (Fig. 11).

#### 6.- Comparación de las Concentraciones $CT_{50}$ de los 18 Compuestos en las Diferentes Líneas Celulares.

Para la mayoría de los compuestos no hubo diferencia signifi-

cativa en los valores de citotoxicidad ( $CT_{50}$ ) obtenidos en las diferentes líneas celulares. Once de los 18 compuestos evaluados (Nos. 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15 y 16), presentaron el mismo valor de  $CT_{50}$  en las seis líneas celulares tanto en las concentraciones citotóxicas de 24 h como las del 7° día (Tabla II). Para 5 de los compuestos (Nos. 1, 2, 3, 17 y 18) la diferencia en los valores de  $CT_{50}$  fue de un rango de 0.6 a 0.7 veces la dosis citotóxica la cual se consideró no significativa.

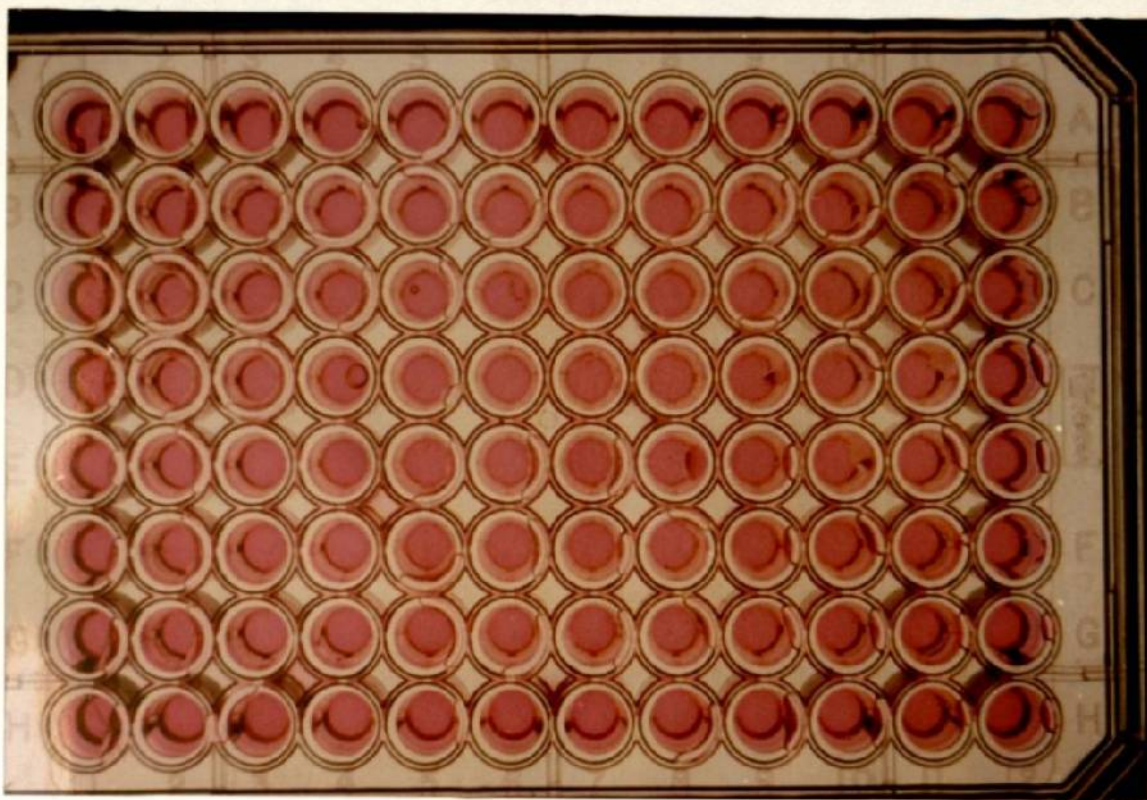
Solamente 2 de los compuestos evaluados presentaron una diferencia en el orden de magnitud de dos veces menos la concentración citotóxica, éstos fueron el clorhidrato de isoproterenol y el pentobarbital sódico. En el caso del clorhidrato de isoproterenol éste fue 2 veces más tóxico para las líneas celulares de hígado y piel para las cuales se requirió de una concentración 2 veces menor para producir la muerte celular en relación a las otras líneas celulares.

El pentobarbital sódico fue 2 veces más tóxico para la línea celular de pulmón; en este caso la diferencia se presentó solo en la concentración citotóxica del 7° día, mientras que la  $CT_{50}$  de 24 h fue igual en todas las líneas celulares.

No.	Log CT50 ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	DE	18		EN		SEIS		LINEAS		CELULARES		DE	RATA	
			HIGADO (C-9)	PULMON (L-2)	INTESTINO (IEC-6)	PIEL (FR)	RIÑON (NRK-52E)	CORAZON (H9c2)							
		CT <sub>50</sub> <sup>a</sup>		CT <sub>50</sub>		CT <sub>50</sub>		CT <sub>50</sub>		CT <sub>50</sub>		CT <sub>50</sub>		CT <sub>50</sub>	
		24 h	168 h	24 h	168 h	24 h	168 h	24 h	168 h	24 h	168 h	24 h	168 h	24 h	168 h
1	TRICIXIDO DE ARSENICO <sup>b</sup>	0.08	-0.15	0.3	0.8	0.08	-0.15	0.08	-0.15	0.08	-0.15	0.08	-0.15	0.3	0.08
2	CLORURO DE MERCURIO II	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08	0.08
3	SULFATO DE TALIO <sup>b</sup>	2.1	1.14	2.1	1.38	2.1	1.38	2.1	1.14	2.1	1.38	2.1	1.38	2.1	1.38
4	ISOPROTERENOL HCl	0.36	0.36	0.84	0.84	0.84	0.84	0.36	0.36	0.84	0.84	0.36	0.84	0.6	0.6
5	BITARTRATO DE NOREPINEFRINA	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84
6	BITARTRATO DE EPINEFRINA	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84	0.84
7	TEOFILINA <sup>b</sup>	3.11	2.4	3.11	2.4	3.11	2.4	3.11	2.4	3.11	2.4	3.11	2.4	3.11	2.4
8	PENTOXIFILINA <sup>b</sup>	3.22	2.26	3.22	2.26	3.22	2.26	3.22	2.26	3.22	2.26	3.22	2.26	3.22	2.26
9	CAFEINA <sup>b</sup>	3.26	2.55	3.5	2.79	3.26	2.55	3.26	2.55	3.26	2.55	3.26	2.55	3.26	2.55
10	PENTOBARBITAL SODICO <sup>b</sup>	2.80	2.32	2.80	2.08	2.80	2.32	2.80	2.56	2.80	2.32	2.80	2.32	2.80	2.56
11	HIDRATO DE CLORAL <sup>b</sup>	3.07	2.68	3.07	2.68	3.07	2.68	3.07	2.68	3.07	2.68	3.07	2.68	3.07	2.68
12	BARBITAL SODICO	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58	3.58
13	SULFATO DE ATROPINA <sup>b</sup>	2.04	1.8	2.04	1.8	2.04	1.8	2.04	1.8	2.04	1.8	2.04	1.8	2.04	1.8
14	ESCOPOLAMINA HBr	2.52	2.52	2.52	2.52	2.52	2.52	2.52	2.52	2.52	2.52	2.52	2.52	2.52	2.52
15	HOMATROPINA Br <sup>b</sup>	4.0	3.52	4.0	3.52	4.0	3.52	4.0	3.52	4.0	3.52	4.0	3.52	4.0	3.52
16	PROPANOL	3.92	3.92	3.92	3.92	3.92	3.92	3.92	3.92	3.92	3.92	3.92	3.92	3.92	3.92
17	ETANOL	4.16	4.16	4.16	4.16	4.4	4.4	4.16	4.16	4.16	4.16	4.16	4.16	4.16	4.16
18	METANOL	4.16	4.16	4.16	4.16	4.4	4.4	4.16	4.16	4.16	4.16	4.16	4.16	4.16	4.16

a - Los valores de CT<sub>50</sub> fueron calculados como el valor promedio geométrico entre la concentración citotóxica total (CT<sub>100</sub>) y la concentración no-citotóxica (CT<sub>0</sub>).

b - Compuestos con mayor citotoxicidad al aumentar el tiempo de incubación.



**Fig. 10** Aspecto del color del medio de cultivo (pH alcalino) en una placa después de 24 h de incubación.



**Fig. 11** Aspecto del color del medio de cultivo de una placa al 7° día de incubación en la cual el compuesto evaluado en las líneas 1-5 fue tóxico en la concentración de las celdillas B y el compuesto de las líneas 8-12 en la concentración de las celdillas E en las cuales se observó un color violeta (pH alcalino) En las celdillas con color amarillo (pH ácido) la morfología celular fue normal.

## D I S C U S I O N

Los resultados de citotoxicidad mostraron que todas las líneas celulares utilizadas en este estudio presentaron una respuesta de susceptibilidad semejante hacia la mayoría de los compuestos evaluados. Estos compuestos pueden ser clasificados en tres grupos de acuerdo a la actividad citotóxica encontrada en las seis líneas celulares:

- 1.- Compuestos con poca citotoxicidad:  $CT_{50}$  de 1000 a 10,000  $\mu\text{g/ml}$  o más.
- 2.- Compuestos con citotoxicidad media:  $CT_{50}$  de 100 a 1000  $\mu\text{g/ml}$ .
- 3.- Compuestos altamente citotóxicos:  $CT_{50}$  de 1 a 10  $\mu\text{g/ml}$ .

Es importante señalar que la clasificación de los compuestos en estos grupos pudo ser obtenida de igual manera con cualquiera de las líneas utilizadas. Un ejemplo de esto es que el trióxido de arsénico, el cloruro de mercurio y los simpáticomiméticos fueron los compuestos más citotóxicos en todas las líneas celulares mientras que los alcoholes fueron los menos citotóxicos en todos los casos.

La comparación de los valores de  $CT_{50}$  obtenidos en este estudio mostró que para once compuestos el grado de acción citotóxica fue el mismo en las diferentes líneas celulares por lo cual los valores de  $CT_{50}$  de estos compuestos fueron iguales en todas las líneas.

Para cinco de los compuestos la diferencia encontrada no fue



importante (rango 0.6-0.7) y solamente 2 compuestos presentaron una diferencia en el orden de magnitud de 2 veces menos la dosis citotóxica; éstos fueron el clorhidrato de isoproterenol el cual fue más tóxico para las líneas celulares de hígado y piel y el pentobarbital sódico para el cual la línea celular de pulmón fue dos veces mas sensible. Vale la pena considerar en estos dos casos si en un rastreo de toxicidad una diferencia de esa magnitud es o no importante ya que permitió de igual manera situar la acción citotóxica de estos dos compuestos en el rango que lo hicieron las otras líneas celulares, lo cual no hubiera sido posible de haber existido una diferencia del orden 10, 20 o aún mayor lo que nos hubiera orientado a pensar en una probable toxicidad selectiva.

Algunos autores han planteado en relación a la semejanza en la susceptibilidad de diferentes líneas celulares in vitro la posibilidad de que las células después de haber sido cultivadas bajo condiciones ambientales y de crecimiento semejantes, sufran modificaciones que las lleven a convertirse a un tipo celular común con propiedades biológicas similares que las hagan igualmente vulnerables (26).

En relación a la utilización de diferentes períodos de incubación para la determinación de citotoxicidad in vitro se observó que éste es un factor que puede revelar algunos datos preliminares referentes a la acción citotóxica de un compuesto. En este estudio la valoración de la citotoxicidad tanto a las 24 h como al 7° día

de incubación mostró que para un grupo de nueve compuestos hubo un incremento en su toxicidad al aumentar el tiempo de exposición celular a los mismos, mientras que para el resto de los compuestos las concentraciones citotóxicas de 24 h y del 7° día fueron iguales; estos datos podrían sugerir un comportamiento diferente de estos dos grupos de compuestos in vivo.

Al respecto se ha planteado la posibilidad de que los compuestos que presentan una mayor toxicidad al aumentar el tiempo de exposición celular in vitro puedan tener una tendencia a la producción de daño acumulativo, mientras que los que presentan la misma toxicidad en diferentes tiempos de incubación pudieran tener una penetración celular rápida o bien una acción celular directa (41).

La acción citotóxica de los dos grupos de compuestos en relación al tiempo de exposición celular fue representada de igual manera por todas las líneas celulares utilizadas.

La semejanza en los valores de  $CT_{50}$  obtenidos en las diferentes líneas celulares para la mayoría de los compuestos evaluados en este estudio sugiere la posibilidad de que todas tengan un potencial similar para su utilización en el rastreo de toxicidad de sustancias in vitro independientemente del órgano de origen.

De acuerdo a estos resultados se propone que una o dos líneas celulares benignas sean suficientes para representar la posible toxicidad de un compuesto hacia otras líneas celulares be-

nignas de la misma especie y que por lo tanto no sea necesario el mantenimiento de baterías de líneas celulares provenientes de diferentes órganos, lo cual resulta mas costoso.

Se sugiere por otro lado que cuando el interés particular en relación a un compuesto sea el conocimiento de su posible actividad selectiva se considere la utilización de cultivos celulares primarios.

La utilización de este tipo de pruebas de rastreo de toxicidad de sustancias in vitro presenta la ventaja de poder evaluar un número de muestras grande en poco tiempo y permite además identificar y separar a los compuestos altamente citotóxicos de los compuestos con baja probabilidad de toxicidad; así como la posibilidad de disminución en el número de animales utilizados en las pruebas de toxicidad in vivo (42). Al respecto la comparación de los valores de citotoxicidad in vitro ( $CT_{50}$  mg/L) obtenidos en este estudio con los datos de toxicidad in vivo ( $DL_{50}$  mg/Kg en rata) reportados en la literatura (43-45) mostró que para algunos compuestos hubo una buena correlación entre éstos dos valores, mientras que para otros no hubo correlación aparente (Tabla 12).

La valoración de la posible utilidad de los datos de toxicidad in vitro en la predictividad de toxicidad in vivo será motivo de otro estudio en el que se deberá considerar la farmacocinética y biodisponibilidad de los compuestos evaluados.

T A B L A 1 2

COMPARACION DE CITOTOXICIDAD IN VITRO (CT<sub>50</sub>) CON  
LOS VALORES DE TOXICIDAD IN VIVO (DL<sub>50</sub>)

COMPUESTO	CT <sub>50</sub> <sup>*</sup> ng/L	DL <sub>50</sub> <sup>**</sup> mg/Kg	VIA	CORRELACION APARENTE
SULFATO DE ATROPINA	64	41	IV	+
SULFATO DE TALIO	14	12	IV	+
TEOFILINA	252	240	IV	+
BARBITAL SODICO	3847	280	IV	-
CAFEINA <sup>a</sup>	355	105	IV	-
		233	oral	+
METANOL <sup>a</sup>	14630	9540	IP	-
		13000	oral	+
ETANOL <sup>a</sup>	14630	5000	IP	-
		13700	oral	+
PROPANOL	8446	3216	IP	-
PENTOBARBITAL SODICO	213	75	IP	-
HIDRATO DE CLORAL <sup>a</sup>	480	479	oral	+
BITARTRATO DE ADRENALINA <sup>a</sup>	7	5	SC	+

\* Valores de CT<sub>50</sub> obtenidos al 7° día de incubación celular in vitro.

\*\* La comparación se efectuó solo para los compuestos con valores de DL<sub>50</sub> IV o IP (en rata) reportados en la literatura; sin embargo para algunos compuestos (a) se observó que hubo mejor correlación aparente con la DL<sub>50</sub> vía oral o subcutánea.

## CONCLUSIONES

- 1.- Las líneas celulares benignas provenientes de diferentes órganos de rata utilizadas en este estudio presentaron una susceptibilidad semejante para la mayoría de los compuestos evaluados independientemente del órgano de origen.
- 2.- Se propone que el uso de una o dos líneas celulares benignas provenientes de órganos blanco de la mayoría de los compuestos como lo son el hígado y el pulmón sean suficientes para representar el potencial tóxico de un compuesto hacia otras líneas celulares benignas de la misma especie.

## B I B L I O G R A F I A

- 1.- Harrison, R. G.: Observations on living developing nerve fiber. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1907. 4: 140-143.
- 2.- Carrel, A.: On the permanent life of tissues outside the organism. J. Exp. Med. 1912. 15: 156-528.
- 3.- Pomerat, C. W. and Leake, C. D.: Short term cultures for drug assay: General considerations. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1954. 58: 1110-1124.
- 4.- Krasovskij, G. N.: The use of tissue culture methods in toxicological evaluation. Gig. Sanit. 1967. 32: 66-70.
- 5.- Nardone, R. M.: Toxicity testing in vitro. In: Growth, Nutrition and Metabolism of cells in culture. (Rothblat, G. H., and Cristofalo, V. J., Eds.), Vol. III. Academic Press, New York. 1977.
- 6.- Paul, J.: Cell and Tissue Culture. Churchill-Livingstone, Edinburgh. 1975. p.376.
- 7.- Rosenbluth, S. A., Weddington, G. R., Guess, W. L., and Avtian, J.: Tissue culture method for screening toxicity of plastic materials to be used in medical practice. J. Pharm. Sci. 1965. 54: 156-159.
- 8.- Tardiff, R. G.: In vitro methods of toxicity evaluation, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 1978. 18: 357-369.
- 9.- Paganuzzi, S. A.: Toxicology investigations with cell culture systems. Toxicology. 1981. 20: 91-153.

- 10.- Ekwall, B.: Screening of toxic compound in tissue culture. *Toxicology*. 1980. 17: 127-142.
- 11.- Nardone, R. M.: Neurotoxicity testing: an in vitro strategy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1983. 407: 458-459.
- 12.- Bonney, R. J.: Adult parenchymal cells in primary culture: characteristics and cell recognition standards. *In Vitro*. 1974. 10: 130-141.
- 13.- Paine, A. J., and Hokin, L. J.: The maintenance of cytochrome P-450 in liver cell culture: recent studies on P-450 mediated mechanisms of toxicity. *Toxicology*. 1982. 25: 42-45.
- 14.- Maslansky, C. J., and Williams, G. M.: Primary cultures and the levels of cytochrome P-450 in hepatocytes from mouse, rat, hamster, and rabbit liver. *In Vitro*. 1982. 18: 683-639.
- 15.- Klavnig, J. E., Ruch, R. J., and Goldblatt, P. J.: Trout hepatocyte culture: isolation and primary culture. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 1984. 21: 221-228.
- 16.- Wirthensohn, K., and Barth, C. A.: Influence of hormones and growth factors on viability, DNA, and protein content of adult hepatocytes in primary cultures. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 1985. 21: 546-552.
- 17.- Maier, P.: Development of in vitro toxicity test with cultures of freshly isolated rat hepatocytes. *Experientia*. 1988. 44: 807-823.
- 18.- Long, R. M., and Moore, L.: Biochemical evaluation of rat hepatocyte primary cultures as a model for carbon tetra-

- chloride hepatotoxicity: comparative studies in vivo and in vitro. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 1988. 92: 295-306.
- 19.- American Type Culture Collection. *Catalogue of Cell Lines and Hybridomas*. (Hay, R. Ed.). 1988.
- 20.- Acosta, D., and Sorensen, E. M.: An in vitro approach to the study of target organ toxicity of drug and chemicals. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*. 1985. 21: 495-504.
- 21.- Hill, B. T., and Whelan, R. D. H.: Attempts to optimise colony-forming efficiencies using three different survival assays and a range of human tumor continuous cell lines. *Biology International Reports*. 1983. 7: 617-624.
- 22.- Ekwall, B., and Acosta, D.: In vitro comparative toxicity of selected drugs and chemicals in HeLa cells, Chang liver cells, and rat hepatocytes. *Drug and Chemical Toxicology*. 1982. 5: 219-231.
- 23.- Walum, E., and Marchner, H.: Effects of mercuric chloride on the membrane integrity of cultured cell lines. *Toxicology Letters*. 1983. 18: 89-95.
- 24.- Bhuyan, B. K., Loughman, B. E., Fraser, T. J., and Day, K. J.: Comparison of different methods of determining cell viability after exposure to cytotoxic compounds. *Experimental Cell Research*. 1976. 97: 275-280.
- 25.- Eagle, H., and Foley, G. E.: The cytotoxic action of carci-



- nolitic agents in tissue culture. *Am. J. Med.* 1956. 21: 739-749.
- 26.- Eagle, H., and Foley, G. E.: Cytotoxicity in human cell cultures as a primary screen for the detection of anti-tumor agents, *Cancer, Res.* 1958. 18: 1017-1025.
- 27.- Ekwall, B., and Johansson, A.: Preliminary studies on the validity of in vitro measurement of drug toxicity using HeLa cells. 1. Comparative in vitro cytotoxicity of 27 drugs. *Toxicology Letters.* 1980. 5: 299-307.
- 28.- Ceccarini, C., and Eagle, H.: pH as a determinant of cellular growth and contact inhibition. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1971. 68: 229-233.
- 29.- Inmon, J., Stead, A., Waters, M., and Lewtas, J.: Development of a toxicity test system using primary rat liver cells. *In Vitro.* 1981. 17: 1004-1009.
- 30.- De Angelis, I., Ekwall, B., Stannati, A., and Zucco, F.: Biological effects of some natural products on different cell culture systems. *Proceedings of the Second World Congress of Foodborne Infection and Intoxication.* West-Berlin. 1986.
- 31.- Clemenson, C., Odland, L., Varnbo, I., and Walum, E.: A comparative study of the effects of carbon tetrachloride on neurons, astrocytes and hepatocytes. *Proceedings of the VIIth Scandinavian Congress of In Vitro Toxicology.* Denmark. 1989.
- 32.- Jover, R., Pousoda, X., Castell, J., and Gómez-Lechón, M. J.: In vitro toxicity of the ten first chemicals of the MEIC

- list on two cellular systems. Proceedings of the VIIth Scandinavian Congress of In Vitro Toxicology. Denmark. 1989.
- 33.- Grenman, S., Shapira, A., and Carey, T. E.: In vitro response of cervical cancer cell lines CaSki, HeLa, and ME-180 to the antiestrogen tamoxifen. *Gynecol. Oncol.* 1988. 30: 228-238.
- 34.- Viluksela, M., Ranta, S., Sarnesto, A., Hanhijarvi, H., and Mannisto, P.: Predictive value of in vitro cytotoxicity tests in assessing the hepatotoxic potential of erythromycins. Proceedings of the 3rd. Congress of the Federation of the European Societies of Toxicology. München. 1988.
- 35.- Pinelli, A., Trivulzio, Z., Von Hoff, D., and Warfel, L.: Comparison of two methods to evaluate drug cytotoxicity on tumor cell lines cultured in vitro. *Pharmacol. Res. Commun.* 1987. 19: 913-923.
- 36.- Ericsson, A., and Walum, E.: Cytotoxicity of cyclophosphamide and acrylamide in glioma and neuroblastoma cell lines cocultured with liver cells. *Toxicology letters.* 1984. 20: 251-256.
- 37.- Bernson, V., Bondesson, I., Ekwall, B., Stenberg, K., and Walum, E.: A Multicentre Evaluation Study of In vitro cytotoxicity. *ATLA.* 1987. 14: 144-146.
- 38.- Bondesson, I., Ekwall, B., Stenberg, K., Romert, L., and Walum, E.: Instructions for Participants in the Multicentre Evaluation Study of In Vitro Cytotoxicity (MEIC). *ATLA.*

1988. 15: 191-193.
- 39.- Ekwall, B., Bondesson, I., Högberg, J., Romert, L., Walum, E., and Lavrijsen, K.: Preliminary MEIC results: in vitro toxicity to HeLa cells and rat hepatocytes of 35 chemicals compared to acute human and rodent toxicity. ATLA. 1989. 1: 1-4.
- 40.- Sachs, L.: Angewandte Statistik, Statistische Methoden und ihre Anwendungen. Springer-Verlag. Berlin. 1978.
- 41.- Ekwall, B.: Microphotography of unstained HeLa cells responding to inhibitory drug concentrations. Report from the Tissue Culture Laboratory. BMC. Uppsala. 1981.
- 42.- Goldberg, A., and Frazier, J.: Alternatives to animals in toxicity testing. Scientific American. 1989. 2: 24-30.
- 43.- Handbook of Toxicology, (W. S. Spector Ed.), Vol I. Saunders Co., Philadelphia. 1956.
- 44.- The Merck Index, an encyclopedia of chemicals and drugs. (Windholz, M., Ed.), Merck and Co., Inc. Rahway, N. J. 1976.
- 45.- Sax, N. I.: Dangerous properties of industrial materials. Van Nostrand Reinhold Co., N. Y. 1984.

## CURRICULUM VITAE

### ANTECEDENTES PERSONALES

**Nombre:** Lourdes Garza Ocañas  
**Fecha de Nacimiento:** 22 de Septiembre de 1957  
**Lugar de Nacimiento:** Monterrey, N. L., México

### ESTUDIOS ESCOLARES

**Primaria:** Escuela Francisco G. Sada  
Monterrey, N. L.  
1964 - 1970

**Secundaria:** Esc. Sec. No. 3  
"Eduardo Livas Villarreal"  
Monterrey, N. L.  
1970 - 1973

**Preparatoria:** Preparatoria No. 7  
Universidad Autónoma de Nuevo  
León  
Monterrey, N. L.  
1973 - 1975

**Licenciatura:** Médico Cirujano y Partero  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Nuevo  
León  
Monterrey, N. L.  
1975 - 1981

**Servicio Social:** Departamento de Farmacología y Toxicología  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Monterrey, N. L.  
1981 - 1982

**Fecha de Examen Profesional:** Diciembre 9 de 1982

**Puesto Actual:** Maestro de tiempo completo por examen de oposición  
Departamento de Farmacología y Toxicología  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Nuevo León

**Fecha de Examen de Oposición:** Marzo 11 de 1987

**Práctica Profesional Docente:** Maestro del curso práctico de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Agosto de 1981 a la fecha  
Maestro del curso teórico de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Marzo de 1987 a la fecha

**Servicio Social:** Departamento de Farmacología y Toxicología  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Monterrey, N. L.  
1981 - 1982

**Fecha de Examen Profesional:** Diciembre 9 de 1982

**Puesto Actual:** Maestro de tiempo completo por examen de oposición  
Departamento de Farmacología y Toxicología  
Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Nuevo León

**Fecha de Examen de Oposición:** Marzo 11 de 1987

**Práctica Profesional Docente:** Maestro del curso práctico de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Agosto de 1981 a la fecha  
Maestro del curso teórico de Farmacología y Toxicología de la Facultad de Medicina  
Universidad Autónoma de Nuevo León  
Marzo de 1987 a la fecha

Maestro Titular del Curso de  
Postgrado de Farmacología y  
Terapéutica en especies inferiores

Facultad de Medicina Veterinaria  
Universidad Autónoma de Nuevo  
León

Agosto - Diciembre 1988

**Sociedades Científicas:**

Miembro de la Asociación Mexicana  
de Farmacología A. C.

Miembro de la Asociación Española  
de Toxicología

Miembro de Scandinavian Society  
for cell Toxicology

**Becas Otorgadas:**

U. A. N. L. Beca Académica  
Estudios de Post - Grado  
Doctorado en Medicina

CONACYT Beca Académica Complementaria 51506

Estudios de Post - Grado  
Doctorado en Medicina

**Publicaciones:**

Garza Ocañas L., Páez Ríos J.,  
Torres Alanís O.

Intoxicación por talio: Evaluación  
clínica y tratamiento

Revista Compendium de Investigaciones  
Clínicas Latinoamericanas  
Vol. V No. 1, Junio de 1985

Garza Ocañas, L., Torres Alanís, O.  
Intoxicaciones: un estudio retros-  
pectivo en el Hospital Universita-  
rio "Dr. José E. González",  
1980 - 1984.

Revista de Investigación Clínica  
del Instituto Nacional de la Nutri-  
ción "Dr. Salvador Zubirán".  
Vol. 38, No. 4 (1986).

Torres-Alanís, O., Garza-Ocañas, L.  
and Piñeyro-López, A.

Cytochrome P-450, P-448 and Lipid  
Peroxidation in cell damage. In:  
Cell Function and Disease. Plenum  
Publishing Corp., New York. (1988).

Torres Alanís, O., Garza Ocañas, L.  
Piñeyro López, A.

Inhibition of hepatic Lipid Peroxi-  
dation in vitro by toxin (544) of  
Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*)  
*Naunyn-Schmiedeberg's Archives of*  
*Pharmacology. Suppl. to Vol. 33*  
(1988).

Garza Ocañas, L., Torres Alanís, O.  
Piñeyro López, A.

Evaluation of Cytotoxicity of 18  
compounds in six rat cell lines.  
ATLA (1990) In press.



Trabajos Presentados en  
Congresos:

Torres Alanís, O., Páez Ríos, J.,  
Garza Ocañas, L.

Thallium: Intoxication and treat-  
ment.

First Joint Meeting of Western  
Pharmacology Society

Texas Pharmacologists and Asocia-  
ción Mexicana de Farmacología  
Puerto Vallarta, México

Enero 1983.

Garza Ocañas, L., Torres Alanís, O.  
Evaluation of the effectiveness of  
sodium iodide and prussian blue in  
thallium poisoning.

IUPHAR 9th International Congress  
of Pharmacology, Londres, Inglate-  
rra.

Julio 1984.

Garza Ocañas, L., Torres Alanís, O.  
Intoxicaciones: un estudio retros-  
pectivo en el Hospital Universita-  
rio "Dr. José E. González"

1980 - 1984.

Cuarto Encuentro Regional de Inves-  
tigación Biomédica, Monterrey,

Nuevo León, México

Octubre 1985.

Torres Alanís, O., Garza Ocañas, L.  
Influencia del talio en la actividad del Citocromo P-450, Glucosa-6-Pasa y Lipidoperoxidación en células hepáticas.

X Congreso Nacional de Farmacología y Reunión de la Asoc. Latinoamericana de Farmacología.

Taxco, Guerrero, México

Octubre 1986.

Torres Alanís, O., Garza Ocañas, L.  
Neurotoxicidad por mercurio: intoxicación subaguda.

VII Jornadas Toxicológicas Españolas, Mahón, Islas Baleares (España).

Junio 1987.

Garza Ocañas, L., Torres Alanís, O.  
Piñeyro López, A.

Determinación de la citotoxicidad de metales in vitro mediante la prueba de inhibición metabólica (MIT-24) modificada.

XI Congreso Nacional de Farmacología.

Taxco, Guerrero, México.

Octubre 1987.

Torres Alanís, O., Garza Ocañas, L.  
Piñeyro López, A.

Efectos de *Karwinskia humboldtiana*  
sobre citocromo P-450, Glucosa-6-  
fosfatasa y el tiempo de sueño  
inducido por pentobarbital.

XI Congreso Nacional de Farmacolo-  
gía.

Taxco, Guerrero, México.

Octubre 1987.

Torres Alanís, O., Garza Ocañas, L.  
Piñeyro López, A.

Inhibition of hepatic lipid peroxi-  
dation in vitro by toxin T 544 of  
Buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*)  
Deutsche Gesellschaft für Pharmako-  
logie und Toxikologie.

Hamburgo, R. F. A.

Septiembre 1988.

Garza Ocañas, L., Torres Alanís, O.

Efecto de la toxina 514 de  
*Karwinskia humboldtiana* sobre la  
lípidoxidación microsomal  
hepática "in vitro".

XII Congreso Nacional de Farmacolo-  
gía.

Pátzcuaro, Mich., México.

Noviembre 1988.

Garza Ocañas, L., Torres Alanís, O.  
Piñeyro López, A.

Evaluation of cytotoxicity of 18  
compounds in six rat cell lines.

VIIth Scandinavian Congress of  
In Vitro Toxicology.

Ebeltoft, Denmark.

Octubre 1989.

Torres Alanís, O., Garza Ocañas, L.  
y Piñeyro López, A.

Influencia de *Karwinskia humbold-*  
*tiana* sobre el tiempo de sueño de  
pentobarbital y el tiempo de pará-  
lisis de Zoxazolamina.

VII Encuentro Regional de Investi-  
gación Biomédica.

Monterrey, N. L., México.

Octubre 1989.



DONA 34

