

126
2e



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

SINTESIS Y CARACTERIZACION DE LOS INMUNOCONJUGADOS DE HELENALINA Y DE SU DIMERO BIS (HELENALINILO).

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G A
P R E S E N T A :
MAGDA PARRA CORTAZAR

M. EN C. ARTURO NAVARRO OCANA



1998



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

265567



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrin Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: SINTESIS Y CARACTERIZACION
DE LOS INMUNOCONJUGADOS DE HELENALINA Y DE SU DIMERO PIS (HELENALINILO)

realizado por Maeda Perre Cortazar

con número de cuenta 8833495-0 , pasante de la carrera de Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis M. en C. Arturo Navarro Ocaña.
Propietario

Propietario M. en C. Enrique Melendez Herrada.

Propietario Dr. Manuel Jiménez Estrada.

Suplente Dr. Emilio Rojas del Castillo.

Suplente O. F. B. Fernando Ramos Reyes.

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Alejandro Martínez Mena.

FACULTAD DE CIENCIAS
U.N.A.M.



DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL INSTITUTO DE QUIMICA Y EN LA
FAC. DE MEDICINA DE LA U.N.A.M. CON EL APOYO FINANCIERO DE
DGAPA
(BECA REC/04/034161)**

SUSTENTANTE: P. de Biol. MAGDA PARRA CORTAZAR.

**Bajo la asesoría de: M. en C. Arturo Navarro Ocaña.
M. en C. Enrique Meléndez Herrada
Dr. Manuel Jiménez Estrada.**

AGRADECIMIENTOS

Un especial agradecimiento a mis asesores: M. en C. Enrique Meléndez Herrada, Dr. Arturo Navarro Ocaña y al Dr. Manuel Jiménez Estrada por que, además del continuo interés que demostraron en la realización de éste trabajo, sin su ayuda y sus conocimientos no hubiese sido posible la realización de este proyecto. A la Dra. Yolanda López Vidal por las facilidades otorgadas durante el desarrollo experimental de ésta tesis. Al Biol. David Bonavidez Velázquez y al Biol. Enrique Ortíz B. que sin su colaboración y experiencia en la colecta de *Helanium mexicanum*, HBK éste proyecto nunca hubiese comenzado. A cada uno de los integrantes del personal técnico del Instituto de Química de la U.N.A.M. que nos auxiliaron con los espectros de RMM, EM, de IR y Raman en especial a la Quim. Rocío Patiño Maya a quien le dimos mucha lata con los espectros de Raman. A los amigos y compañeros del laboratorio 2-8 del Inst. de Química y del laboratorio de Microbiología y Parasitología de la Fac. de Medicina por su apoyo y amistad. También a mis amigas Karla y Rosalía por su comprensión, ayuda y consejo en momentos difíciles de mi vida y a los profesores de la Fc. de Ciencias quienes contribuyeron en mi formación como biólogo. Y por su puesto, muchísimas gracias a mis padres, Profra. Magda Cortazar W. y al Dr. Pedro Parra S., y a mis hermanas, Patty y Alex, por la confianza y paciencia incondicional que me aportaron durante la carrera y en el desarrollo de esta tesis

DEDICATORIA

Este trabajo va dirigido a toda la gente que me ha apoyado y ha creído en mí, a pesar de los grandes baches que he tenido que afrontar en el último trecho de mi vida, en especial a mis padres: Profa. Magda Cortazar W. y al Dr. Pedro Parra S. quienes han sido mis guías y modelos, y a quienes debo el amor hacia la naturaleza.

ÍNDICE

Índice de abreviaturas.....	viii-ix
I. Introducción.....	1-2
II. Generalidades.....	3-32
2.1. El cáncer y sus tratamientos.....	3-5
2.2. Familias o clases de drogas anticancerígenas.....	6-9
2.3. Anticuerpos y antígenos.....	10-17
2.3.1. Estructura de las inmunoglobulinas.....	11
2.3.2. Fragmentación de inmunoglobulinas.....	11-13
2.3.3. Clases de inmunoglobulinas.....	13-14
2.3.4. Subclases de inmunoglobulinas.....	14-15
2.3.5. Anticuerpos policlonales y monoclonales.....	15
2.3.6. Técnica del hibridoma para la obtención de AcMo.....	16-17
2.4. Antecedentes.....	18-26
2.5. Lactonas sesquiterpénicas y la helenalina.....	27-32
III. Hipótesis.....	33
IV. Objetivos generales.....	33
V. Objetivos particulares.....	33
VI. Material y método.....	34-44
6.1. Obtención y síntesis de los agentes citotóxicos.....	34-37
6.1.1. Obtención de helenalina.....	34-36
6.1.2. Síntesis del ester de glutarato de bis (helenalinilo).....	36-37
6.2. Obtención de anticuerpos policlonales de ratón.....	37-39
6.2.1. Inmunización y obtención del suero hiperinmune.....	37-38
6.2.2. Precipitación de inmunoglobulinas.....	38
6.2.3. Aislamiento de inmunoglobulinas.....	38
6.2.4. Isotipificación.....	38-39

6.2.5. Evaluación del rendimiento de inmunoglobulinas.....	39
6.3. Adición de grupos sulfidrilos.....	39-40
6.4. Pruebas de solubilidad de los agentes citotóxicos.....	40-41
6.5. Liberación y cuantificación de grupos sulfidrilos libres.....	41-42
6.6. Acoplamiento de la lactona y su dímero a anticuerpos policlonales de ratón.....	42-44
6.7. Electroforesis.....	44
VII. Resultados.....	45-60
7.1. Rendimiento y características físicas y químicas de los agentes citotóxico.....	45-51
7.2. Rendimiento e isotipificación de las Ig obtenidas.....	52
7.3. Solubilidad de los agentes citotóxicos.....	53
7.4. Cuantificación de grupos sulfidrilos libres estándar.....	53-54
7.5. Resultados de las reacciones de acoplamiento.....	54-55
7.6. Análisis espectroscópico de las reacciones de acoplamiento.....	56-59
7.6. Electroforesis.....	60
VIII. Discusión.....	61-68
8.1. Colecta de <i>Helenium mexicanum</i> , HBK.....	61
8.2. Obtención de los agentes citotóxicos.....	61-63
8.3. Ensayos de solubilidad de los agentes citotóxicos.....	63-64
8.4. Rendimiento e isotipificación de las Ig obtenidas.....	64-65
8.5. Incorporación de grupos SH libres en Ig y síntesis de los conjugados Ig-helenalina e Ig-EGBH.....	65-66
8.6. Análisis espectroscópico de las reacciones de acoplamiento.....	67-68

8.7. Electroforesis.....	68
IX. Conclusiones.....	69-70
X. Propuestas a futuro.....	71
XI. Glosario.....	72-75
XII. Apéndices.....	76-94
Apéndice 1. <i>Helenium mexicanum</i> , HBK.	76
Apéndice 2. Revelador cérico.	77
Apéndice 3. Soluciones usadas para la obtención de Ig.	77
Apéndice 4. Soluciones usadas para la desacetilación de Ig.	77
Apéndice 5. Soluciones usadas en electroforesis.....	78-79
Apéndice 6. Espectros de IR y Raman realizadas durante el seguimiento experimental.....	80-94
XIII. Bibliografía.....	96-102

ÍNDICE DE ABREVIATURAS

- A-I, II, III. Amidas I, II y III.
- A(R). Fragmento A de la toxina ricina.
- A(R)-SH. Fragmento A de la toxina ricina con grupos sulfhidrilos libres.
- A(TD). Fragmento A de la toxina difteria.
- A₂₈₀. Absorbancia a 280 nm.
- Ac. Anticuerpo.
- AcMo. Anticuerpo monoclonal.
- ADM. Adriamicina.
- ADN. Acido desoxirribonucleico.
- ANTI EL4-IgG. Inmunoconjugado dirigido a células que expresen en su superficie el antígeno EL4.
- AR-IgG. Inmunoconjugado del fragmento A de la ricina.
- BSA. Suero albúmina bovina.
- Ca²⁺. Calcio.
- CBL. Clorambucil.
- C=C. Doble enlace carbono-carbono
- CD19. Marcador de superficie expresado linfocitos B, presente en leucemia mielocítica aguda.
- CD5. Antígeno expresado en la superficie de linfocitos B en leucemia linfocítica crónica y en linfomas.
- CDDP. Cis diamina dicloro platino II.
- C-n. Carbono 1, 2, 3, ... ∞ .
- COOH. Grupo carboxilo.
- CPT-II. Cis platino II.
- C-S. Enlace carbono azufre.
- Cys. Cisteína.
- DMF. Dimetilformamida.
- DMSO. Dimetilsulfoxido.
- DNM. Daunicina.
- DOX. Doxorubicina.
- EDTA. Ácido etilendiaminatetracético.
- EG. Etilenglicol.
- EGBH. Ester de glutarato de bis (helenalnilo).
- EMIE. Espectroscopia de masas de impacto electrónico.
- Fab. Fragmento de inmunoglobulina que conserva su capacidad para combinarse con el antígeno.
- F(ab')₂. Dos unidades Fab unidas por un enlace disulfuro.
- F(ab')-SH. Fracciones F (ab') con grupos sulfhidrilos libres.

SFUDR. 2' desoxi 5' fluoridina.

HAMA. Anticuerpo humano anti-ratón.

HEL. Helenalina.

HPGRT. Hipoxantina guanina ribosil transferasa.

Ig. Inmunoglobulina.

IgG. Inmunoglobulina clase G.

IR. Infrarrojo.

KBr. Bromuro de potasio.

LSQ. Lactona sesquiterpénica.

Me₂CO. Acetona.

MEL. Melfalan.

MTX. Metotrexate.

NCS. Neocarcinostatina.

OH. Grupo hidroxilo.

p.d. Punto de descomposición.

p.f. Punto de fusión.

P.M. Peso molecular.

PDM. N, N-bis(2-Cl-etil)-p-fenilenediamina.

PEG. Polietilenglicol.

PGA. Poli(L- α -ácido glutámico).

R_f. Factor de desplazamiento de los compuestos en cromatografía en capa fina.

RMNP. Resonancia magnética nuclear protónica.

R-SH. Grupo sulfhidrilo libre.

R-X. Rayos X.

SATA. Ester de n-hidroxisuccimida del ácido S-acetil tioacético.

SDS. Sulfato dodecyl de sodio.

SFB. Suero fetal bovino.

SSAF. Solución salina amortiguadora de fosfatos.

T/C%. Porcentaje de mortandad celular entre células tratadas T y células control C.

TD. Toxina de la difteria.

TRIS. Tris- hidroximetil amino-metano.

I. INTRODUCCIÓN

El desarrollo de nuevas tecnologías para generar anticuerpos monoclonales ha creado nuevas esperanzas en oncología por su potencial uso en la terapia del cáncer debido a la especificidad de los anticuerpos monoclonales de reconocer antígenos de superficie presentes en células cancerosas y a sus mecanismos detectores para destruir células blanco como son: la opsonización, la citotoxicidad mediada por anticuerpos o lisis celular mediada por el complemento.⁶⁰

Por otro lado, el desarrollo de nuevas formas de la inmunoterapia de cáncer han aprovechado la especificidad de los anticuerpos de origen monoclonal o policlonal como acarreadores de productos citotóxicos o radioisótopos capaces de destruir selectivamente células tumorales o malignas. Tal es el caso de los trabajos pioneros de Mathé (1958) y Dercavalho (1964) que han dado origen al desarrollo de los llamados inmunoconjugados o inmunoquímicos, en donde se han incluido anticuerpos conjugados con productos químicos aislados de productos naturales como es el caso del clorambucil, metotrexate, vinblastina, gelonina, etc.^{16,61,80} En este sentido, también se han sintetizado y aplicado, con cierto éxito, radioinmunoconjugados en donde los anticuerpos monoclonales marcados con radioisótopos como el yodo 131 y el indio 111 se han propuesto para el diagnóstico y terapia de algunos cánceres.⁶¹

Por otra parte, Vitteta y colaboradores (1993), en los E.U.A., conjugaron anticuerpos monoclonales con la toxina A de la ricina, una proteína de origen natural. Estos trabajos se han realizado con otras proteínas citotóxicas de origen bacteriano como la toxina del cólera, lo cual ha generado diversas líneas de investigación en el campo de las llamadas inmunotoxinas.⁸⁰

A pesar de esto, la aplicación clínica de los diferentes inmunoconjugados e inmunotoxinas ha tenido un limitado empleo en la terapéutica del cáncer pero a la fecha muchos de ellos se encuentran en fase I y II de evaluación clínica en países desarrollados como E.U.A. Sin embargo, nuestro país no cuenta con éstas líneas de investigación. En México el estudio de los componentes activos de las plantas medicinales mexicanas ha sido un área de gran importancia en el Instituto de Química de la U.N.A.M. En particular, el aislamiento y la determinación estructural de las lactonas sesquiterpénicas ha sido de amplio reconocimiento a nivel nacional e internacional.³³ Así como estudios colaborativos con instituciones nacionales y extranjeras en donde se ha determinado la estructura y la capacidad citotóxica de estos componentes entre los que destaca la helenalina y sus derivados bis (helenalinilo), a los cuales se les ha determinado su potencial uso como anticancerígenos.^{33,69}

Estos compuestos presentan en sus estructuras grupos reactivos esenciales como el α -metileno exocíclico γ -lactona y el cetona- α -insaturada que pueden conjugarse por adición a un tiol o a un grupo electrofílico, los cuales son los responsables de su citotoxicidad.^{37,41} Es posible que puedan ser conjugados vía grupos sulfidrilos libres e incorporados en anticuerpos policlonales o monoclonales murinos o a las fracciones Fab que reconozcan a antígenos de superficie de células de leucemia humana como es el caso de los antígenos CD5, CD10 o CALLA, o CD19.

Por ello, la presente tesis es un estudio colaborativo entre el Instituto de Química y la Facultad de Medicina para el desarrollo de dos inmunocombinados: helenalina y éster de glutarato de bis(helenalinilo) vía grupos sulfidrilos libres generados en anticuerpos policlonales de ratón bajo condiciones suaves de reacción y conocer su rendimiento y pureza.

II. GENERALIDADES

2.1. EL CANCER Y SUS TRATAMIENTOS

El **cáncer** es un conjunto de enfermedades que tienen como características comunes: la pérdida del control del crecimiento y de la división celular, la invasión de tejidos sanos que rodean al tumor y, en algunos casos, la invasión de estas células anormales a todo el cuerpo (metástasis).

Actualmente existen varios tratamientos para combatir el cáncer como son: la cirugía, la radioterapia, la quimioterapia, la terapia génica y la inmunoterapia.^{25.79}

La terapia temprana para el tratamiento del cáncer es la **cirugía**. La excisión quirúrgica de un tumor es rápida y efectiva, ya que ofrece la oportunidad de confirmar que un tumor ha sido removido. Sin embargo, no es una garantía para la eliminación de extensiones microscópicas. Para ello se necesitaría eliminar parte del tejido sano que rodea al tumor pudiendo dañar severamente el funcionamiento o la apariencia del paciente. Algunas veces el tumor cancerígeno se puede encontrar en estructuras vitales las cuales no pueden ser removidas quirúrgicamente. Además, la principal limitación es que no se pueden tratar cánceres en metástasis.^{25.79}

La **radiación** es preferible en muchas ocasiones. Este método consiste en irradiar con rayos-X o gama la región donde se localiza el tumor, ya sea por una emisión aplicada externamente o por la implantación de una pequeña fuente radiactiva. La radiación actúa al infligir suficientes daños genéticos para matar a las células de una manera directa o por la inducción del suicidio celular. La terapia por radiación puede preservar estructuras anatómicas que rodean al crecimiento canceroso, por lo tanto, se puede curar el cáncer sin necesidad de sacrificar la función de los órganos del paciente. La radiación presenta varias ventajas como: el de poder destruir extensiones microscópicas del tejido canceroso que se encuentren en los alrededores del tumor y es un tratamiento seguro para pacientes de edad avanzada o débiles quienes pueden tener dificultades para recurrir a la cirugía. Por otro lado, esta terapia presenta algunos inconvenientes: puede fallar al tratar de erradicar todo el tumor y no se puede usar cuando hay metástasis, en éste caso, sí se aplica una radiación suficiente para atacar el cáncer ya dispersado se podrían destruir tejidos vitales.^{25.79}

Otra alternativa de tratamiento es el uso de drogas anticancerígenas que viajan por todo el cuerpo por medio del sistema circulatorio; a este tratamiento se le conoce como **quimioterapia**. Las drogas quimioterapéuticas generalmente operan sobre las células humanas. Ellas evitan la multiplicación celular al interferir en la replicación del ADN y en algunos casos pueden inducir la apoptosis o suicidio celular de las células cancerosas.^{25,79}

En los años 60, los médicos descubrieron que la quimioterapia puede curar algunos cánceres cuando varias drogas son administradas al mismo tiempo. Muchas enfermedades como la leucemia, los linfomas y el cáncer testicular son tratadas por quimioterapia combinada. En otros cánceres la quimioterapia sirve sólo como una terapia de apoyo de la cirugía o de la radiación. Pero, las drogas quimioterapéuticas pueden fallar porque éstas no son específicas, pueden matar a las células sanas, algunos tumores pueden hacerse resistentes a la o a las drogas anticancerígenas usadas en el tratamiento, y provocar efectos secundarios como anemia, diarrea, náuseas, vómitos y pérdida del cabello.²⁵

En la actualidad éstos tratamientos se combinan dependiendo del tipo de cáncer y del estadio del mismo, dándose las siguientes modalidades: cirugía-quimioterapia, radioterapia-quimioterapia, quimioterapia-cirugía o quimioterapia-radioterapia.²⁵

Dentro de las terapias biológicas que han sido propuestas como tratamientos contra el cáncer se encuentran: la terapia génica y la inmunoterapia.

La **terapia génica** utiliza un vector (que puede ser un virus) portador de un gene capaz de insertarse dentro del genoma de la célula blanco y de detener su división, pero como es una terapia que ha sido propuesta muy recientemente, se encuentra en sus primeros pasos, no se ha encontrado un vector totalmente satisfactorio, no existe un buen modelo animal y todavía no se obtienen resultados clínicos comprobados.^{68,74}

Por otro lado, otra terapia alternativa que fue sugerida en el siglo pasado, que ha sido muy estudiada en los últimos años -gracias a los grandes avances que ha tenido la inmunología-, y que, a su vez, a causado mucha controversia es la **inmunoterapia**, es decir, un tratamiento que permita incrementar el potencial innato del sistema inmune para eliminar a las células cancerosas. La inmunoterapia constituye un buen complemento de los tratamientos ya existentes. Ello se debe a una propiedad que comparte con la quimioterapia:

la de poder administrarse por vía sistémica para combatir la metástasis. Además, por ser selectivo el sistema inmune se pueden poner en práctica inmunoterapias contra el cáncer más específicas que las quimioterapias, tratamientos que a menudo matan sin apenas discriminar, toda célula en división.⁵

La inmunoterapia puede ser **activa** o **pasiva**. La primera consiste en la activación de sistema inmune del paciente para atacar al cáncer, dentro de los tratamientos que se encuentran en esta terapia tenemos las vacunas, las cuales pueden ser péptidos, proteínas, ácidos nucleicos, vectores virales o bacteriales.³⁹ Otra terapia que ha surgido gracias a los avances de la inmunoterapia activa es la **inmunoterapia adoptiva** la cual está basada en la tranferencia de células, se extraen células que participan en la defensa inmune de un paciente con cáncer y las "educan" para que reaccionen contra las células cancerosas o se estimula su propio potencial anticancerígeno, y después, se devuelven al torrente sanguíneo.⁵ También, tenemos a la **inmunoterapia pasiva** en la cual se suministra al paciente algún tipo de droga o molécula, que no puede producir por sí mismo, para atacar a la enfermedad. En ésta modalidad tenemos el uso de los anticuerpos monoclonales (AcMo) los cuales pueden atacar a la célula tumoral mediante el reconocimiento específico de antígenos tumorales que se encuentran en su superficie celular. Estos anticuerpos se han enlazado a agentes químicos, tóxicos y radioisótopos para hacerlos más citotóxicos. De ésta manera los anticuerpos sirven como acarreadores específicos de éstas moléculas o compuestos, contrarrestando la gran desventaja de inespecificidad que posee la quimioterapia.³⁹

2.2. FAMILIAS O CLASES DE DROGAS ANTICANCERIGENAS

Las drogas por su actividad antineoplásica se clasifican en 5 familias dependiendo de la acción que ejercen sobre el ADN:

Antimetabolitos. Algunos compuestos cancerígenos actúan como falsas sustancias en las reacciones bioquímicas de la célula viva. Un ejemplo es el metotrexate, el cual es un químico análogo al ácido fólico. Esta droga impide la división celular al incapacitar a la célula en su habilidad para construir nuevas cadenas de ADN. Otros ejemplos son: el fluoracil, la aminopterina, la fenilediamina y la gemcitabina.^{25.79}

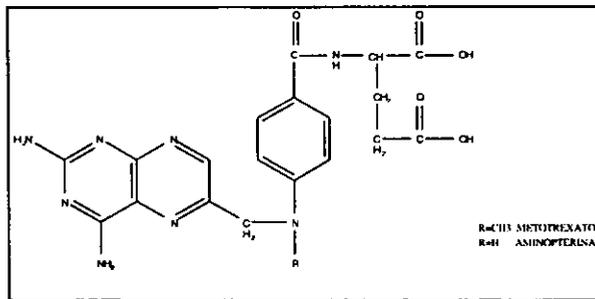


FIGURA 1. Estructura de antimetabolitos.⁷⁹

Inhibidores de topoisomerasas. La replicación del material genético celular requiere de mediadores para separar temporalmente la doble hélice de ADN en sus dos cadenas. Esta separación se realiza con la ayuda de una enzima especial llamada topoisomerasa la cual rompe temporalmente la cadena y después vuelve a unir las zonas terminales del ADN. Las drogas que inhiben a las topoisomerasas causan el rompimiento del ADN en las células que se están dividiendo, lo que provoca la muerte celular. Ejemplos de ellas son: la doxubicina y el cisplatino (CPT-I).^{25.79}

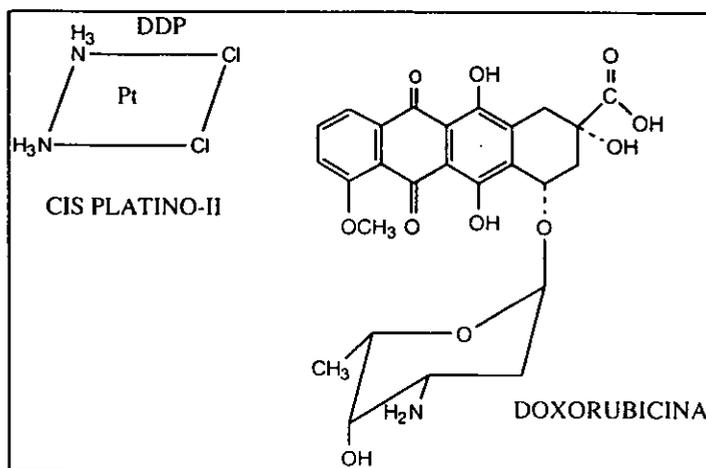


FIGURA 2. Estructura de inhibidores de topoisomerasas.^{24,35}

Inhibidores del uso mitótico. Ciertos compuestos forman enlaces con bloques específicos del ADN produciendo defectos en su estructura y con ello el suicidio celular, como son: la ciclofosfamida, el melfalan, la prenilenediamina de la mostaza, el cis-platino, el trenimon y el clorambucil.^{25,79}

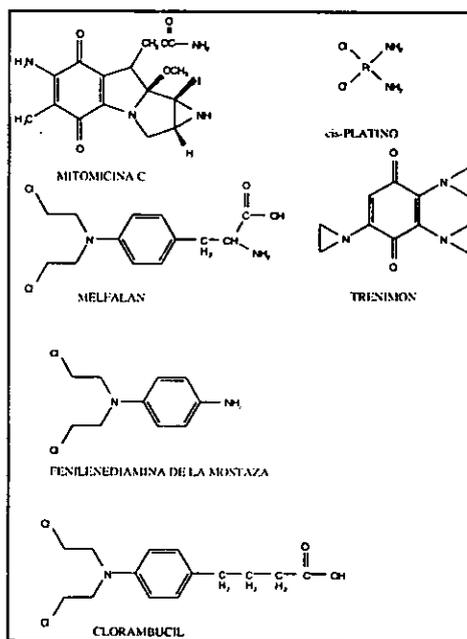


FIGURA 3. Estructura de agentes alquilantes.³⁹

Alcaloides vegetales. Algunas sustancias aisladas a partir de plantas pueden impedir la división celular al enlazarse con la proteína de tubulina. La tubulina forma fibras microtubulares que ayudan a organizar la división celular. Estas fibras ayudan a desplazar a los cromosomas hacia los extremos de la célula parental antes de la citocinesis durante la división celular. Las drogas que interfieren en el ensamblaje y desensamblaje de las fibras de tubulina pueden impedir, por consiguiente, la división celular. Por ejemplo: la vinsblastina, la vinorelbina, el paclitaxel, la videsina, la vincristina y el docetaxel.^{25.79}

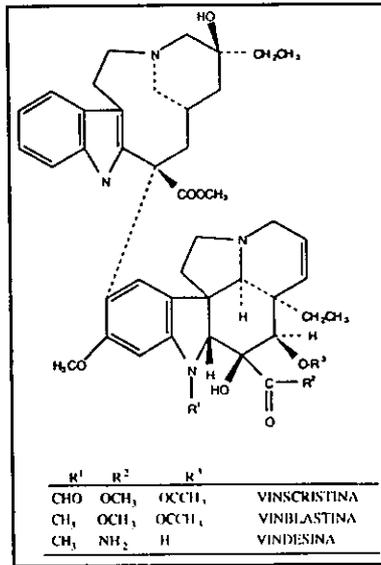


FIGURA 4. Estructura de alcaloides vegetales.³⁹

Antraciclina. El mecanismo de acción de éstas sustancias no ha sido claramente descrito, pero se sabe que pueden intercalarse en el ADN y tener alguna interacción con las membranas celulares. Como ejemplos mencionaremos a la daunicina y a la adriamicina.²⁵

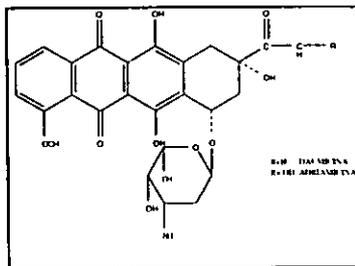


FIGURA 5. Estructura de antraciclina.²⁵

2.3. ANTICUERPOS Y ANTIGENOS

Para poder comprender mejor como funciona la inmunoterapia es necesario tener en cuenta algunos conceptos básicos sobre el sistema inmune incluyendo la función de las moléculas responsables del desencadenamiento de la respuesta inmune.

La **respuesta inmune** implica la acción integrada de un ejército de diferentes tipos celulares (monocitos, macrófagos, eosinófilos, basófilos y linfocitos). Las células del sistema inmune se distinguen de las de otros órganos en que circulan por todo el cuerpo. Cada tipo de célula desempeña una función diferenciada, aunque pueden interaccionar entre ellas e incluso regularse unas a otras en sus actividades. Un tipo celular importante son los linfocitos, de los cuales existen dos clases: las células T y las B.^{5,58}

Las **células B** gobiernan la respuesta inmune humoral o mediada por **anticuerpos** (glicoproteínas compuestas de una o más unidades producidas en respuesta a la presencia de un agente extraño) que neutralizan a las bacterias y a otros invasores. Cada célula B es capaz de reconocer sólo a un **antígeno**, molécula que identifica a una bacteria o a un invasor como extraño. Las células B activadas producen anticuerpos circulantes que se unen a los antígenos, y los "marcan" para su posterior destrucción por los otros componentes del sistema inmune.^{5,58}

Las **células T** dirigen la inmunidad mediada por células, esto es, la destrucción por parte de células del sistema inmune de los tejidos extraños o células infectadas. Hay varios tipos de células T; entre ellas se encuentran las coadyudantes, que modulan la respuesta inmune, y las citotóxicas (o asesinas), que pueden matar de manera directa a las células anormales. La célula T, una vez que reconoce y se une al antígeno situado sobre la superficie celular de otra célula, se activa, esto es se multiplica y si es citotóxica, mata a la célula con la que ha entrado en contacto.^{3,5}

La reacción antígeno-anticuerpo es específica de ahí su importancia en la investigación y en la diagnosis de diferentes enfermedades, como el cáncer. Muchos **antígenos tumorales** específicos han sido obtenidos y estudiados en varios padecimientos neoplásicos humanos incluyendo el linfoma de Burkitt, el melanoma maligno, el sarcoma osteógeno, ciertos tipos de leucemia, neuroblastomas y carcinoma de células transicionales de vejiga urinaria, como los

antígenos CD5, CD10 o CALLA, CD19 y CD20 que se encuentran sobreexpresados en las membranas celulares de diferentes clases de leucemia.³

2.3.1. Estructura de las inmunoglobulinas.

Los anticuerpos, o inmunoglobulinas (Ig), contienen dos cadenas pesadas idénticas (C_p) y dos cadenas ligeras (C_l), también idénticas. Las cadenas ligeras contienen un dominio variable (D_v) y un dominio constante (D_c). Las cadenas pesadas tienen un dominio variable y tres dominios constantes. Las cadenas pesadas y ligeras se encuentran unidas por medio de enlaces no covalentes, y en la mayoría de los anticuerpos, por enlaces disulfuros covalentes formándose de esta manera una simetría bilateral y confiriéndole, al mismo tiempo, la forma de "Y". Las regiones variables tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera, son los sitios de enlace antígeno-anticuerpo dentro de las moléculas de inmunoglobulina. La región de bisagra es el área entre las cadenas pesadas entre el primer y el segundo dominio constante de la cadena pesada que se encuentra unida por enlaces disulfuro (ver figura 6 y 7).⁵⁸

2.3.2. Fragmentación de inmunoglobulinas

El conocimiento de la estructura de las inmunoglobulinas ha mejorado mucho gracias al empleo de enzimas proteolíticas, como la pepsina y la papaina, que desintegran la molécula en dos o tres fragmentos.

La **papaina** rompe la molécula de inmunoglobulina en tres fragmentos de tamaños similares: dos fragmentos Fab, que conservan su capacidad para combinarse con el antígeno, y un fragmento Fc, el cual puede ser recristalizado y contiene la mayor parte de los determinantes antigénicos específicos IgG de la molécula. La actividad de enlace y reconocimiento del antígeno se encuentra asociada con los dominios variables tanto de la cadena pesada como de la ligera de los fragmentos Fab (ver figura 6).⁵⁸

Los productos de la **pepsina** son un fragmento $F(ab')_2$ y numerosos péptidos pequeños de la porción Fc. El fragmento $F(ab')_2$ está compuesto de dos unidades Fab unidas por un enlace disulfuro, más la región de bisagra (ver figura 8).^{1, 58, 67}

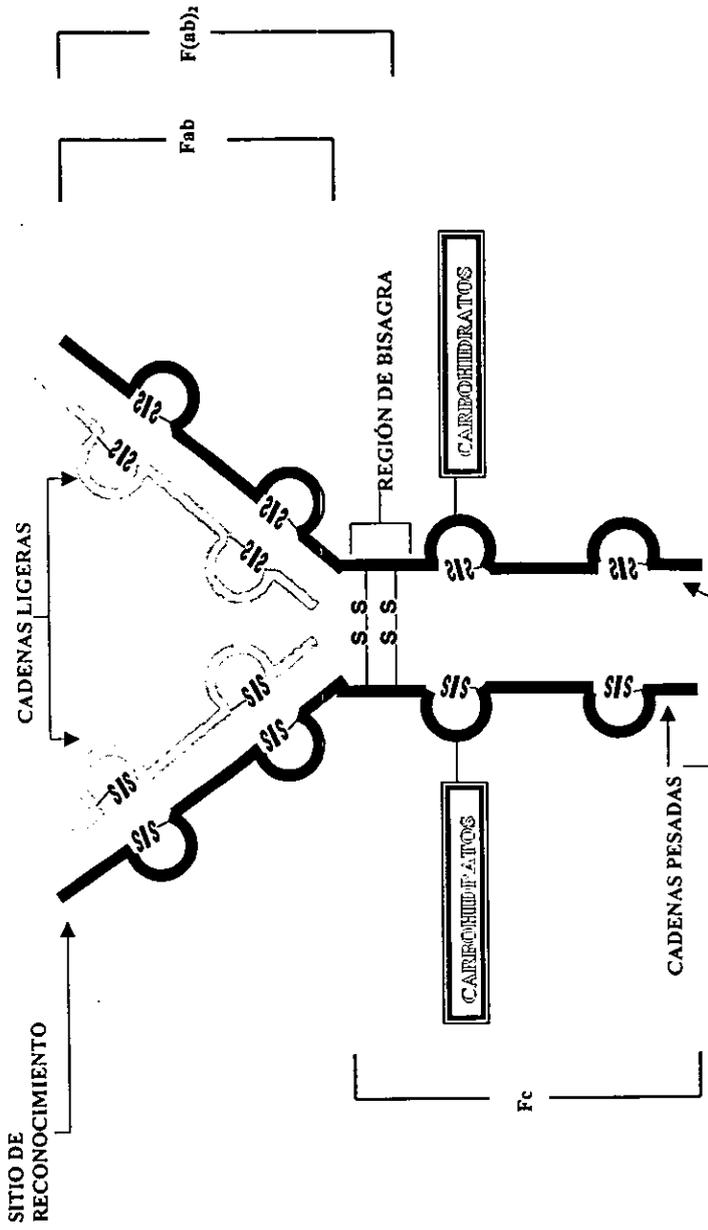


FIGURA 7. Molécula de inmunoglobulina

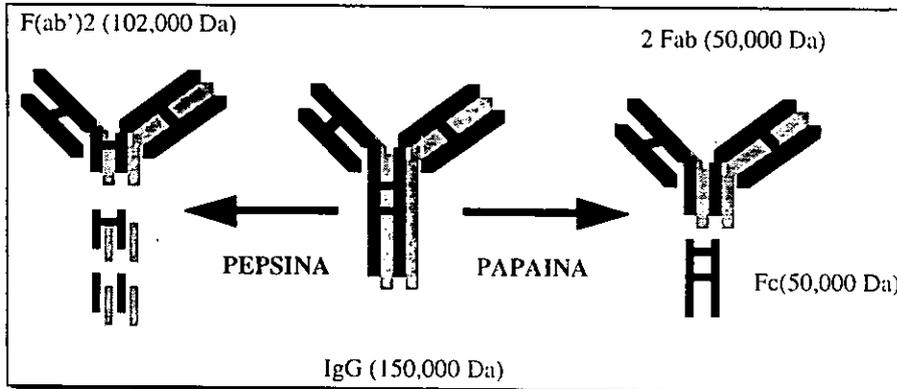


FIGURA 8. Degradación de inmunoglobulinas por las enzimas: pepsina y papaina.^{58,67}

2.3.3. Clases de inmunoglobulinas.

Existen cinco clases de inmunoglobulinas las cuales son: IgG, IgA, IgM, IgD e IgE. Estas inmunoglobulinas se diferencian entre sí por el tipo de cadenas pesadas que se encuentran en sus moléculas. Las diferencias que existen entre las cadenas pesadas confieren a cada inmunoglobulina una función específica dentro del sistema inmune, de ahí su importancia.⁵⁸

La IgG, es un monómero, es la clase más predominante en el suero humano ya que constituye el 75% de las inmunoglobulinas contenidas. Las IgG son las únicas que pueden atravesar la placenta en humanos, e intervienen en la protección del recién nacido durante los primeros meses de vida.^{1,58}

Las IgA, existen tanto en formas monoméricas como diméricas, y forman el 15% de las inmunoglobulinas totales. La IgA secretoria es la defensa contra algunas infecciones locales. La principal función de las IgA puede no ser la de destruir los antígenos, pero sí el de impedir el paso de sustancias extrañas al torrente sanguíneo.^{1,58}

La IgM, es un pentámero, que comprende aproximadamente el 10% de las inmunoglobulinas totales en el suero humano. Las IgM, participan en la respuesta primaria, por

lo tanto, es el que se expresa en mayor proporción en las superficies de los linfocitos-B.^{1.58}

La cuarta clase de inmunoglobulinas son las IgD, son monoméricas, hasta ahora no se les ha atribuido un papel biológico específico como anticuerpo humoral, pero han sido estudiadas en casos de hipersensibilidad a la penicilina en el hombre. Ya que las IgD se encuentran en la superficie de los linfocitos en mayores concentraciones, es probable, que tenga un papel como receptor específico de superficie destinado a iniciar la respuesta inmune.^{1.58}

La última clase de inmunoglobulinas es: la IgE, es una inmunoglobulina que se encuentra en cantidades mínimas en el suero. Es producida por el revestimiento de las vías respiratorias y digestivas y forma parte del sistema secretor externo de los anticuepos. Además tiene capacidad para iniciar aspectos de "reacción alérgica".^{1.58}

2.3.4. Subclases de inmunoglobulinas.

Por análisis antigénicos se han podido descubrir diferencias relativamente pequeñas entre las moléculas de una clase determinada de anticuerpos, las cuales han sido estudiadas principalmente en tres especies de mamíferos (ratón, rata y humano), de esta forma se han descubierto diferentes clases de IgG que se han denominado: IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4 en humano; IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3 en ratón e IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG2c en rata. Además, de dos subclases de IgA (IgA1 e IgA2) en el humano. Análisis químicos subsecuentes han demostrado diferencias sustanciales de amino ácidos y en la localización y número de puentes disulfuro entre las cadenas. Que resultan en diferencias en la vida media *in vivo*, en sus enlaces con los receptores celulares, en la fijación del complemento, en su sensibilidad a la digestión de enzimas proteolíticas y en su tendencia a formar agregados.^{56,58}

TABLA I. Propiedades físicas y biológicas de clases de inmunoglobulinas humanas.^{1,67}

CLASE	CONC. SER. MEDIA (mg/100 ml)	P. M. (kD)	SUPERVIVENCIA MEDIA T/2 (días)	FUNC. BIOLÓGICA	RECEPTORES:	TIPO DE CADENA PESADA	No. DE SUB-CLASES
IgG o γ G	1240	150	23	Fija el complemento. Cruza la placenta	Polinuclear es linfocitos monocitos	γ	4
IgA o γ A	280	150, 300 o 400	6	Anticuerpo secretorio	Polis. linfocitos monocitos.	α	2
IgM o γ M	120	950	5	Fija el complemento	linfocitos	μ	1
IgD o γ D	3	180	2.8	Receptor en la superficie de linfocitos	-----	δ	1
IgE o γ E	0.03	190	1.5	Anticuerpo reagnífico	Células cebadas linfocitos	ϵ	1

2.3.5. Anticuerpos policlonales y monoclonales.

Los anticuerpos pueden ser **policlonales** o **monoclonales (AcMo)** dependiendo de su origen. Los primeros son producidos por diferentes líneas celulares (o clones) de linfocitos-B, los cuales reaccionan con diferentes determinantes contra el mismo antígeno. Para obtenerlos se requiere de la inyección de un antígeno (inmunógeno) dentro de un animal para su inmunización, para provocar una respuesta inmune o producción de anticuerpos en el animal. Los AcMo, en cambio, son el resultado de una única línea celular por lo que su especificidad aumenta ya que sólo reconoce a un sólo determinante antigénico -epitopo-, dentro de un complejo antigénico.^{13,73}

2.3.6. Técnica del hibridoma para la obtención de AcMo.

La obtención de AcMo ha abierto una nueva era en el campo de la inmunología tumoral.

Los AcMo pueden atacar a las células cancerígenas mediante el reconocimiento de antígenos tumorales específicos que se pueden encontrar en la superficie celular e iniciar el ataque y la destrucción de las células blanco pero ignorar, al mismo tiempo, a las células sanas que carecen de dichos antígenos cancerígenos.¹³

En 1975 Cesar Milstein y George, J.F. Köhler demostraron que las células que producen anticuerpos podrían sobrevivir indefinidamente si eran fusionadas con células cancerosas obteniendo de esta manera una cantidad ilimitada de anticuerpos monoclonales.¹³

Los AcMo han permitido un rápido desarrollo en el conocimiento de las neoplasias tanto en la caracterización de antígenos de células tumorales, mecanismos de diferenciación celular normal y neoplásica, así como, en el tratamiento y diagnóstico de neoplasias como leucemias, linfomas, cáncer colorrectal y de mamas (ver figura 9).^{13,25}

El mecanismo de acción de un AcMo en la terapéutica frente a células neoplásicas se fundamenta en la unión al determinante antigénico contra el cual va dirigido: ejerce posteriormente su acción sobre esa célula diana mediante un mecanismo de citotoxicidad o de forma indirecta, al actuar como transportador de agentes citotóxicos que destruyen a las células. Entre éstos agentes tóxicos se citan las toxinas, los isótopos y algunas drogas quimioterapéuticas como el metotrexato, el clorambucil, entre otros.^{13,25}

El uso de AcMo presenta cuatro principales problemas: a) la cantidad de anticuerpos obtenidos es mínima; b) movilidad muy pobre por lo tanto tienen poca eficiencia, y no llega hasta el tumor; c) tienen una vida media corta y d) el desencadenamiento de una respuesta inmune contra inmunoglobulinas extrañas, conocida como humana en el caso de los anticuerpos de ratón (HAMA). Las soluciones a estos problemas han sido: el uso de anticuerpos humanos para evitar el HAMA, la síntesis de anticuerpos quiméricos con fragmentos de inmunoglobulinas humanas y/o realizar inmunoconjugados para aumentar la citotoxicidad y, al mismo tiempo, la probabilidad de matar a las células tumorales.^{13,59,60}

17

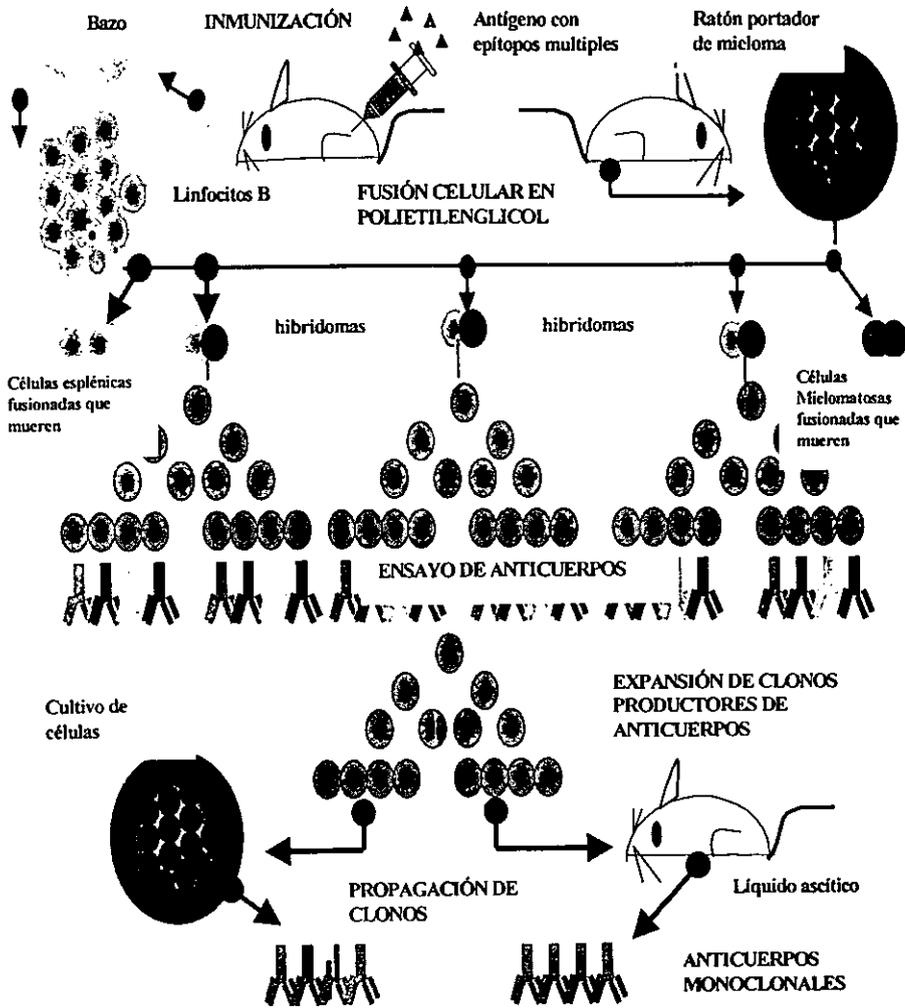


FIGURA 9. Obtención de anticuerpos monoclonales AcMo.

2.4. ANTECEDENTES

El soporte clínico para la idea de que el sistema inmune puede detener el desarrollo del cáncer surgió en el siglo XVII, cuando algunos médicos reportaron que algunas veces los tumores presentaban regresiones en pacientes cancerosos que habían contraído infecciones bacterianas. Por ello, William B. Coley dedicó su vida a crear terapias basadas en ésta observación. Él realizó varios ensayos donde infectaba pacientes cancerosos con bacterias y después hizo una vacuna con las bacterias muertas para promover una respuesta antitumoral en los mismos pacientes. Este tratamiento causaba la regresión de los tumores en algunos individuos. Pero, no fue aceptado porque los resultados eran impredecibles.⁵³

Recientemente, la ciencia de la inmunología ha tenido cambios revolucionarios. Los investigadores han descubierto y aislado las células y los compuestos que hacen posible que el sistema inmune defienda al cuerpo de las infecciones. Investigaciones oncológicas, llevadas a cabo entre los años 70 y 80, mostraron que existen moléculas que el cuerpo produce en respuesta a infecciones virales y bacteriales, éstas moléculas son llamadas ahora citocinas.⁵³

Otro camino, como ya se había mencionado anteriormente, por el cual el sistema inmune puede atacar de manera selectiva a las células tumorales se basa en que éste es capaz de diferenciar a las células por las moléculas, llamadas antígenos, que se encuentran en la superficie celular. Durante mucho tiempo los científicos han especulado sobre la presencia de moléculas en las células cancerosas que señalan su anormalidad (proteínas de membrana, receptores de superficie celular, enzimas intracelulares o alguna secuencia alterada en el genoma) que podrían servir como blancos para el ataque del sistema inmune. La **quimioinmunoterapia** incluye a los acarreadores específicos, AcMo, que han sido unidos a agentes quimioterapéuticos para atacar tumores u otros tejidos blanco.⁶⁷ Desde hace más de 20 años se han realizado sistemas selectivos con drogas (inmunoconjugados), radioisótopos (inmunoisótopos) y tóxicos (inmunotóxicos) de origen bacteriano o vegetal usando anticuerpos como acarreadores (Ver las tablas II, III y IV).^{13,25,60}

Hasta ahora un gran número de drogas y de toxinas han sido conjugadas a anticuerpos. Mathé (1958), observó el incremento de supervivencia de los inmunoconjugados anti-L210 en tumores de mamas de ratón al compararse con ratones no tratados y con ratones tratados con

metotrexate libre (MTX).¹⁶ D'Cavalho (1964) acopló MTX a IgG antileucemicas y normales, el inmunoconjugado retuvo su actividad biológica en los inmunoensayos contra sus respectivos antígenos pero no fue cuantificada.¹⁶

En los años 70, Moolten y Coopeband acoplaron la toxina de difteria (TD) a IgG la inmunotoxina inhibió la síntesis de proteínas en un 50% en células de riñón de mono infectadas con virus y en un 20% en células no infectadas.¹⁶ Más tarde Gilliard y su grupo (1978) formaron enlaces disulfuro entre el fragmento A(TD) e IgG mediante la incorporación de grupos sulfidrilos libres en ambas moléculas obteniendo un inmunoconjugado con un índice de acoplamiento de 1.8 mol de A(TD) por mol de IgG, el cual retuvo la actividad del anticuerpo. Masuho, Hera y Noguchi, en 1979, acoplaron el fragmento A de la toxina de difteria por enlaces disulfuro a fracciones F(ab')-SH de IgG antileucemia. El conjugado inhibió el crecimiento de células de leucemia L1210 en más de un 90%.¹⁶

TABLA II. Isótopos acoplados a AcMo.⁵⁹

GAMMA	BETA	ALFA
Yodo-125,131*	Itrio-90*	Bismuto-212
Tecnecio-99m	Fosforo-32	Astatina-211
Galio-67	Renio- 186,188	
Indio-111	Paladio-109	

*Son los inmunoisótopos con mayor éxito en la regresión de tumores.⁵⁹

Robinson (1973), Chu (1977) y posteriormente Kulkarni (1981) enlazaron la carbodiimida a grupos carboxilos del MTX y a grupos amino de las inmunoglobulinas IgG normales murinos formando un enlace amina entre las dos moléculas y obtuvieron una incorporación >5-6mol por mol de Ig, pero Kulkarni reportó una extensiva pérdida de la actividad de los anticuerpos y precipitación de proteínas. En 1977 Burstein y Knapp trataron el MTX con anhídrido acético y el producto reaccionó con las inmunoglobulinas. Más tarde Latif y colaboradores (1980) reportaron la pérdida de la actividad de los anticuerpos al ser acoplados con MTX-anhidro acético.¹⁶

Linford y su grupo, en 1974, sintetizaron un inmunoc conjugado de trenimon ((2,3,5-tris(1-aziridinyl)-p-benzoquinona) con IgG contra células de sarcoma de cuyo (anti-MCA-D). La droga se incorporó en una proporción de 5 mol por mol de IgG y los inmunoc conjugadosretuvieron tanto su actividad citotóxica como la actividad de los anticuerpos mostrando selectividad hacia MCA-D *in vitro*.¹⁶

O'Neill, Peason y Davies, en 1975, desarrollaron un inmunoc conjugado Ig (anti -Thy)-clorambucil (CBL) mediante la esterificación con el grupo COOH de la inmunoglobulina a un pH alcalino, pero las Ig se polimerizaron y ésto inhibió la incorporación de la droga. El CBL no fue dializable y perdió su actividad alquilante a éste pH.¹⁶ Ross en 1975 y más tarde Tai y su grupo en 1979 sintetizaron un inmunoc conjugado IgGanti EL4-CBL por medio de un enlace covalente para lo cual usaron carbodiimina hidrofílica. Los conjugados retuvieron la actividad antitumoral de la droga durante 24 h a 4°C, con una incorporación >10 mol de CBL por mol de Ig pero ésta cantidad de droga provocó la pérdida de la actividad del anticuerpo.¹⁶

Rowand, Neill y Davies (1975) enlazaron N, N-bis (2-cloro-etil)-p-fenilenediamina (PDM) a Ig normales usando como intermediario el poli(L- α -ácido glutámico) (PGA). Ellos reportaron un índice de acoplamiento de 2 mg de PDM por cada 10 mg de anticuerpos. El inmunoc conjugado retuvo hasta en un 60% su actividad, mostrando ser citotóxico en tumores *in vivo*. Pero también, reportaron la polimerización entre anticuerpos.¹⁶

Hurwitz y su equipo (1975) acoplaron daumicina (DNM) y adriamicina (ADM) al grupo amino de las inmunoglobulinas mostrandose una incorporación de 2-6 mol de la droga por mol de Ig anti-BSA y mostraron una retención aproximada del 55% de la actividad del anticuerpo con células de leucemia de ratón donde hubo remisión de tumores.¹⁶ También, en éste mismo año Hurwitz y su grupo acoplaron DNM y ADM mediadas por glutaraldehído uniendo a los grupos aminos tanto de la droga como el de las IgG normales, y reportaron una incorporación de 7-10 mol por mol de inmunoglobulina, pero se formó un agregado sin actividad biológica por lo que también lo intentaron con la carbodiimida como mediador del enlace amida entre la droga y el anticuerpo y reportaron un índice de acoplamiento de 4 mol de droga por mol de IgG. Arnon y Sela (1979) de mostraron que ADM y DNM unidas covalentemente a un anticuerpo acarreador conservaban su actividad biológica hacia células tumorales. Berstein y Hurwitz, en 1978, con sus respectivos grupos, conjugaron ADM mediante un puente dextran para unir los grupos aminos de la droga y de las IgG, incorporandose 50 mol de ADM por mol de IgG. Los

conjugados realizados con IgG de cabra y de conejo fueron citotóxicos en tumores de ratón en ensayos *in vivo*, pero no fueron específicos. La unión DNM-dextran-IgG redujo la actividad citotóxica *in vitro*.¹⁶

Hirschberg, Rowlan y Thorsby, en 1978, usaron el PGA como intermediario para enlazar melfalan (MEL) a inmunoglobulinas de caballo anti-humano inhibieron totalmente la respuesta proliferativa de los linfocitos en cultivo.¹⁶

En los 80 Youle y Nerville enlazaron la ricina con AcMo antiThy, la inmunotoxina mantuvo la actividad del anticuerpo e inhibió en un 50% la síntesis de proteínas en células que expresaban antígenos Thy.¹⁶ Posteriormente, Raso y Griffin (1980) unieron el fragmento A de la ricina (A(R))-SH a fragmentos F(ab) de conejo anti-humano mediante la formación de un enlace disulfuro, favoreciéndose de esta manera la entrada de la toxina a la célula, la molécula o fragmento de anticuerpo fue más pequeño y por lo tanto se difundió más fácilmente en el tumor. Krolick en 1980, formó un inmunoconjugado AR-IgG de conejo anti-ratón vía grupos sulfidrilos libres introducidos en ambas moléculas formando un enlace disulfuro. El inmunoconjugado inhibió en un 80% la síntesis de proteínas de células murinas *in vitro*. También, Jansen y su grupo (1980), Pau (1980) y Blythman (1981) enlazaron por medio de puentes disulfuro A(R) e IgM anti-Thy. El inmunoconjugado tuvo un índice de acoplamiento de 8 mol por mol de IgM, el conjugado mostró actividad citotóxica de *in vitro* de células que expresaban antígenos Thy al inhibir la síntesis de proteínas y el IgM mantuvo su actividad citotóxica en un 70%.¹⁶

Worzynski, Cochran y Ackermann (1980), introdujeron grupos sulfidrilos en IgG anti-influenza para que reaccionaran con el anillo quinona del trenimon, la cual presenta una incorporación de 7 mol de droga por mol de IgG pero el método provoca la reducción de los enlaces disulfuros intercadena y se pierde la actividad del conjugado.¹⁶

Kimura (1980), reportó la unión de la neocarcinostatina (NCS) a moléculas de IgG murinas dirigidas contra leucemia humana mediadas con carbodiimida. El inmunoconjugado retuvo la actividad tóxica de la droga al inhibir células de leucemia humana y la actividad biológica del anticuerpo, ésta última se probó en un ensayo de inmunofluorescencia que fue positivo.¹⁶ En 1981 Tung y su grupo produjeron el mismo conjugado obteniendo una incorporación de 4-5 mol por mol de IgG normales y los cuales retuvieron la toxicidad de la droga.

Latif y su grupo, en 1980, enlazaron el CBL a IgG de cabra contra mieloma humano acoplándose 14 mol de CBL por mol de IgG y probaron la citotoxicidad del inmunoconjugado en células de mielosarcoma humana K562. El conjugado retuvo la actividad del anticuerpo e inhibió el crecimiento de las células tumorales *in vivo*.¹⁶

TABLA III. Toxinas y enzimas unidas a AcMo.⁵⁹

TOXINAS	ENZIMAS
VEGETALES	
Ricina Abrina Gelonina Saporina. Modecina	Carboxipeptidasa G2 Glucouronidasa Citoidina deaminasa
BACTERIANAS	
Difteria Exotoxinas de pseudomonas	
FUNGICAS	
Amanitina	
ANIMALES	
Factor de veneno de cobra.	

Gilliard en 1980 y después Trowbrige y Domingo en 1981 incorporaron moléculas del fragmento A(TD)-SH a IgG de conejo anti-CoA y a AcMo dirigidos contra carcinomas de colon mediante la formación de enlaces disulfuros. El AcMo mostró una retención parcial de la actividad del conjugado ya que inhibió la síntesis de proteínas en un 50% pero no fue tóxico hacia melanomas a 10^{-7} M.¹⁶ Posteriormente, Gilliard y Collier, en 1980, realizaron un conjugado específico, con el mismo método, y lo probaron contra células 3T3 y exhibieron una mayor citotoxicidad que las inmunotoxinas con IgG.¹⁶

Kimura (1980) y Jung (1981) acoplaron la videsina con inmunoglobulinas anti-CEA

(antígeno cricnoembriogénico) en un medio de dioxano acuoso a pH 9.0 y mostró un índice de acoplamiento de 3.7-4.6 mol de la droga por mol de inmunoglobulina. El inmunoconjugado antiCEA-Ig-vindesina retuvo su actividad citotóxica.¹⁶

El grupo de Kulkarni, en 1981, preparó un ester activo de MTX y éste fue acoplado a moléculas de inmunoglobulina mediante un enlace amida. El aducto mantuvo la actividad biológica (70%) del anticuerpo, pero se perdió considerablemente cuanto más alto fue el índice de incorporación del ester en la inmunoglobulina.¹⁶ Más tarde, en 1985, acopló el MTX a anticuerpos IgG y a sus fragmentos F(ab)₂ anti-BSA y estudiaron el efecto del conjugado en tumores *in vivo*. La incorporación de la droga a los fragmentos fue más baja (6 mol por mol de IgG), sin embargo, el MTX-antiBSA retuvo el 100% de su actividad biológica mientras que el F(ab)₂ antiBSA retuvo sólo el 75%. Los conjugados preparados con IgG antiEL4 (antígeno expresado en linfoma murino) y F(ab)₂ AELG incrementaron de manera significativa su sobrevivencia comparadas con la administración de MTX en forma libre.

En 1990, Schidberger, King y Suypo demostraron el efecto antitumoral de inmunotoxinas (con cadena A de la ricina) con fragmentos Fab y AcMo L6 que reconocen determinantes que se expresan en carcinomas pulmonares, de colon, de mamas y de ovario causando retrocesos completos en dichos tumores de ratón.⁷²

Rowland, McKenzie y Pietersz (1992) demostraron que el uso de la idarubicina inmunoconjugada (antiCD19-idarubicina) daba remisiones de tumores de hasta un 60%.⁵⁹

Beckman y colaboradores (1994) formaron un inmunoconjugado consistente de cis-diamina dicloro platino (II) (CDDP) y de AcMo OC125. La eficiencia de acoplamiento varió entre 1.10+/-0.42 y 2.65+/- 1.60 mol de CDDP por mol de anticuerpo pero no se observó una actividad antiproliferativa significativa en células con cáncer de ovario humano por lo que se propuso la formación de un complejo inmune más soluble.⁴

Rigaut, Scharff y Neville (1995) sintetizaron un inmunoconjugado usando un AcMo antiCD3 y anti-Vbeta unidos a TD, éste conjugado destruyó de manera selectiva a las células T con epítomos Vbeta por lo que se le propuso como posible tratamiento en enfermedades cuyas células T exhiben epítomos V-beta, como es el caso de linfomas de célula T que expresen el receptor celular antiT (TcR).⁶⁴

Johnson y colaboradores (1995) conjugaron el AcMoCC49 a la doxorubicina (CC49-BAMME-CH-DOX) éste conjugado resultó ser menos potente que la DOX no conjugada *in vitro*. Pero cuando se evaluó en un modelo de xenoinjerto de carcinoma de ovario humano el inmunoconjugado prolongó su supervivencia del ratón al compararla con la DOX libre por lo que se consideró para evaluación clínica.³⁴

Pietersz y colaboradores (1995) reportaron la producción y caracterización de un anticuerpo quimérico ratón/humano anti-CD19 y lo acoplaron a la idarubicina. El inmunoconjugado resultó ser específico y fuertemente citotóxico a células CD19 cultivadas *in vitro*. Por lo que se le propuso como tratamiento de linfoma de células B humanas.⁶¹

Sivam y su equipo (1995) conjugaron la DOX a un AcMo425 dirigido contra el receptor del factor de crecimiento epidérmico humano. Obteniendo un índice de acoplamiento de 6-8 mol por anticuerpo y conservaron su citotoxicidad *in vitro* contra células de melanoma humano (M24 mel). Éstos inhibieron el crecimiento de tumores M24 mel en ratones con mayor éxito que la DOX libre, la cual resultó ser inefectiva en cuanto a selectividad se refiere.⁷¹

Hellstrom y su grupo (1995) reportaron la síntesis de un inmunoconjugado BR96 DOX. El BR96 es un anticuerpo quimérico ratón/humano que se enlaza a antígenos Le-y abundantemente expresados sobre la superficie de células de la gran mayoría de los carcinomas humanos y células epiteliales diferenciadas de estómago, esófago, intestino y células ascinares en páncreas. El conjugado destruyó selectivamente células tumorales Le-y positivas *in vitro* e indujo la regresión de carcinomas humanos colonrectales xenotransplantados en ratones desnudos. *In vivo* sólo algunos tumores respondieron a la terapia.²⁶

Pastan (1995) sintetizó un inmunoconjugado con el fragmento A de la exotoxina de Pseudomonas y el AcMo B3 el cual reacciona con glicoproteínas y glicolípidos de varias células cancerosas. El conjugado fue citotóxico y produjo la regresión completa en el crecimiento de xenoinjertos de tumores humanos en ratón. Ésto también ocurrió generalmente en la fase I en pacientes con cáncer de colon, mamas y otros.⁵⁵

El grupo de Myer (1995)⁵² demostró características farmacodinámicas favorables y la actividad antileucémica de inmunotoxinas anti-CD19 AcMo unidas a una proteína antiviral.

TABLA IV. Drogas conjugadas a AcMo⁵⁹.

ANTIMETABOLITOS	AGENTES ANTIMITOTICOS
Metotrexato Aminopterina Citosina arabinosida 5'-fluorodeoxiuridina	Alcaloides vinka Podopfilotoxina Colchicina
AGENTES ALQUILANTES	MISCELANEOS
Melfalan Clorambucil Fenilenediamina de la mostaza Mitomicina C	Bleomicina Macromomicina Neocarzinostina Calcicheamicina
ANTRACICLINAS	
Doxorubicina Daunorubicina Idarubicina	

TABLA V. Ventajas e inconvenientes en el uso de inmunoconjugados.⁵⁹

VENTAJAS	DESVENTAJAS
Especificidad <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .	Acoplamiento difícil
Administración de altas dosis <i>in vivo</i> (la mayoría son no tóxicos)	Disminución de la actividad de la droga
Aumento en la vida media de la droga	Producción media.
No hay daño en tejidos circundantes al tumor	
Buen acceso a los tumores	
Uso de fragmentos Fab y F(ab) ₂	
Uso de anticuerpos quiméricos.	

Con la tabla anterior se deduce que para realizar el acoplamiento de agentes quimioterapéuticos o toxinas con los anticuerpos se deben tomar en cuenta las siguientes consideraciones para obtener un método ideal de conjugación: a) no debe de interferir con la actividad del agente citotóxico o del anticuerpo; b) la droga debe tender a una alta incorporación en el anticuerpo; c) evitar la homopolimerización tanto del agente químico como de los anticuerpos; d) evitar la agregación del conjugado y e) ser técnicamente rápida y reproducible.³⁹

2.5. LACTONAS SESQUITERPENICAS Y LA HELENALINA

El uso de extractos crudos de plantas para el tratamiento del cáncer viene desde la antigüedad. Actualmente, la alta incidencia de la enfermedad y las limitaciones que han presentado las terapias actuales han llevado a la búsqueda de nuevas drogas que puedan resultar exitosas y más específicas para el ataque del cáncer. De las cuales una gran variedad han sido obtenidas de recursos naturales, y otras han sido sintetizadas basándose en la estructura de algún producto natural.¹⁰

Entre los metabolitos secundarios de plantas estudiados con este fin está el grupo de las lactonas sesquiterpénicas ya que muchas de ellas han mostrado tener una marcada actividad citotóxica y algunas más han sido probadas en varios sistemas tumorales tanto *in vitro* como *in vivo*. En México el estudio de las plantas medicinales ha sido un área de interés en el Instituto de Química de la U.N.A.M. donde se han aislado y demostrado las estructuras químicas de diferentes productos naturales, como es el caso de las lactonas sesquiterpénicas de los géneros *Zinnia* y *Helenium*, las cuales han mostrado una importante capacidad antitumoral.³³

Las **lactonas sesquiterpénicas (LSQ)** son un grupo de compuestos estructuralmente interesantes y diversos, que han sido aisladas principalmente de plantas de la familia Compositae (Asteraceae) donde cerca de 3500 estructuras han sido reportadas. Estas son terpenos de 15 carbonos (tres unidades de isopropeno) que se caracterizan por tener en su estructura un anillo lactona de 5 carbonos.^{69,77}

La mayoría han sido clasificadas estructuralmente dentro de cuatro grupos basándose en sus esqueletos de carbono. Estas clases son: las germacranólidas las cuales son el primer tipo de LSQ que se forma por ciclización del farnesol con dobles ligaduras tanto en el C-4 como en el C-1; las eudesmanólidas y las guayanólidas son LSQ del segundo paso biosintético; las primeras se caracterizan por la formación de un anillo y por la presencia de un grupo metil en el C-1 y las segundas poseen un grupo metil en el C-4; y por otro lado se encuentran las pseudoguayanólidas las cuales son el producto de un tercer paso biosintético a partir una guayanólida y la diferencia entre ellas es que el grupo metil emigra del C-4 al C-5. El sufijo "ólida" se refiere a la función lactona. Todos estos compuestos son derivados biosintéticos del *trans, trans*-farnesil pirofosfato, (ver figura 10).⁶⁹

Una especie vegetal generalmente produce un solo tipo de esqueleto. El porcentaje de lactonas sesquiterpénicas por peso seco puede variar del 0.01 al 8 % del peso seco, y generalmente se encuentran en las hojas y las cabezuelas florales. La pérdida de ganado por intoxicación por la ingesta de plantas que contienen las LSQ es bien conocida. Y es una prueba que muestra el amplio rango de actividades biológicas que suelen tener.⁶⁹

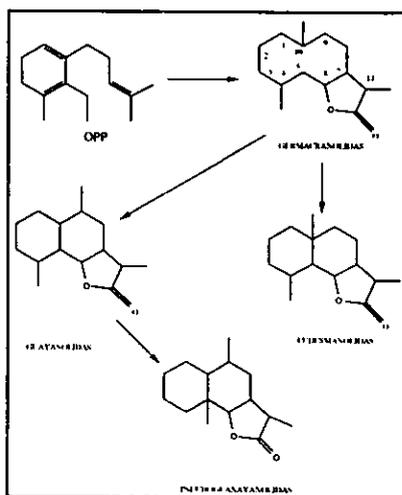


FIGURA 10. Clases de lactonas sesquiterpénicas.⁶⁹

*Pirofosfato.

Una gran mayoría han sido aisladas y evaluadas como citotóxicas y una pequeña cantidad han mostrado actividad *in vivo* contra la leucemia P-388, carcinoma epidermoide humano y cáncer de mamas.^{14,15} La actividad de estos compuestos deriva de la presencia de uno o más grupos los cuales pueden ser sujetos a ataques nucleofílicos, resultando en la alquilación de biomoléculas esenciales y finalmente en la muerte celular. Los grupos reactivos esenciales son usualmente enonas, incluyendo α,β -lactonas insaturadas, cetonas- α,β -insaturadas y los esters o epóxidos- α,β -insaturados. Uno de los grupos más comunes que se ha encontrado es el α -metileno exocíclico- γ -lactona el cual puede conjugarse por adición a un tiol o a un grupo nucleófilo (reacción de Michael, ver figura 11).^{9,10,22,44}

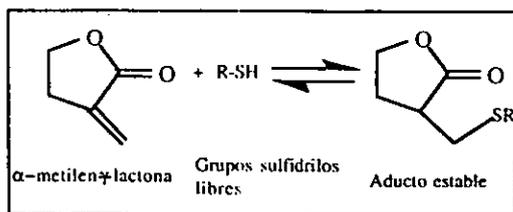


FIGURA 11. Reacción de Michael.¹⁰

Kupchan y colaboradores, en 1971, demuestran la reactividad de las α -metilen exocíclico γ -lactonas y otros inhibidores tumorales electrofílicos con cisteína (Cys).^{5,25,26} Otros modelos de nucleófilos biológicos y enzimas que contienen sulfidrilos apoyan la hipótesis de que la inhibición de crecimiento tumoral resulta de la alquilación selectiva de grupos sulfidrilos en enzimas claves dentro de la división celular.^{9,10,22}

Uno de estos compuestos es la **helenalina** una lactona sesquiterpénica pseudoguayanólida que ha sido extraída de varias especies de los géneros *Zinnia* y *Helenium* como: *H. autumnale* L., *H. amarum* (Raf), *H. roch*, *H. microcephalum* D.C. y *H. mexicanum*, H.B.K. Se obtiene de las partes aéreas de la planta por extracción con cloroformo o con acetato de etilo, es un compuesto cristalino $C_{15}H_{18}O_4$, de p.f. 167 °C, incoloro, ópticamente activo y amargo, con rendimientos de 0.36% (de 27.5 kg de planta se obtienen 97.7g de helenalina)^{28,33,41,58}. R. Adams y W. Hertz la aislaron de *H. microcephalum* y empezaron a tratar de dilucidar su fórmula estructural y a conocer más de la química de este compuesto.³³

En 1956, Buchi y Rosenthal proponen una primera representación estructural de este producto natural como I (ver figura 12), utilizando las técnicas espectroscópicas de infrarrojo y ultravioleta y de RMN recién desarrollada.³³

En México, Romo del Vivar y Romo describen por primera vez su aislamiento⁶⁹ en 1959 de *Helenium mexicanum*. HBK (de nombre común Chapúz) el cual es un arbusto muy difundido en el territorio nacional, es usado como estornutatorio y además es conocida su toxicidad.²

Pero no fue hasta que en 1963, un equipo de investigadores mexicanos y americanos

establecieron la fórmula estructural correcta de la helenalina como **II**. Posteriormente se confirmó su estructura por estudios de Resonancia Magnética Nuclear (RMN), de rayos X (R-X) y de Espectrometría Masas (EM). Se le han hecho estudios de análisis conformacional y de otras características físicas. También sobre su reactividad química y se le han fabricado numerosos derivados.⁶⁹

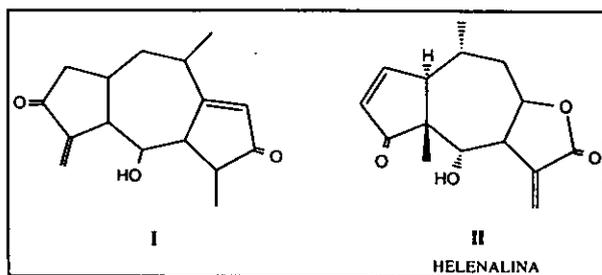


FIGURA 12. Estructura de la helenalina.³³

En los últimos años se le han encontrado a este compuesto importantes actividades biológicas como: vermífugo⁶⁹, antimicrobiano⁵⁴, antiinflamatorio²¹, cardiotónico³⁰, antialimentario⁶⁹, inotrópico⁶⁹, citoprotector gástrico¹⁸, pero la más significativa para este estudio es su **citotoxicidad**, lo que indujo a Kuo-Hsiung Lee y colaboradores^{41,42,43,46,47} a estudiar su acción como agente antitumoral, ya que muestra actividad inhibitoria del crecimiento de tumores. Se prepararon numerosos derivados de la helenalina y concluyeron que para que exista esa actividad es necesaria la presencia de los grupos funcionales **α -metilén exocíclico** y **γ -lactona** así como de la **cetona α - β no saturada** en la molécula. Y que reaccionan con las funciones **R-SH** de las proteínas.^{23,28,29} Lo que motivó que se probara un número elevado de lactonas sesquiterpénicas con este propósito, pero hasta el momento no se ha llegado a utilizar ninguna en la fase clínica.

Hall en 1977 y Lee en 1977 con sus respectivos grupos de investigación, extendieron este punto en sus estudios con la helenalina y la tenulina.^{23,45} En estos compuestos una ciclopentenona parece ser esencial para la actividad antitumoral. Ambas sustancias atacaron a los grupos nucleófilos del glutatión y de la cisteína, dirigiéndose a la alquilación por **adición**

conjugada de los sistemas enonas. Estos compuestos también inhiben las enzimas hexoquinasa y fosfofructoquinasa glicolíticas, el proceso respiratorio y la síntesis de ADN. El mecanismo más aceptado de la acción de los agentes alquilantes antitumorales clásico es que existe una interacción directa con el ADN.

En 1981 el grupo de Lee describe la síntesis de ésteres bis(helenalinilo), y otros derivados relacionados, y demuestra que dichas sustancias eran potentes agentes antileucémicos en células con leucemia P-388 *in vitro*.⁴⁸

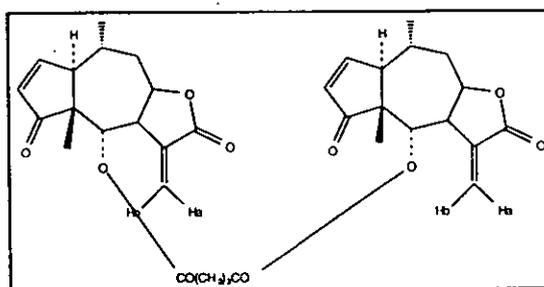


Figura 10. Molécula del éster de glutarato de bis(helenalinilo).⁴⁸

El equipo de Williams, en 1988, reportan la inhibición de síntesis de proteínas y ácidos nucleicos de la helenanina (obtenida de la planta *Helenium microcephalum*) y de su dímero el malonato de bis(helenalinilo) demostrando una marcada actividad antineoplásica en ensayos *in vivo* en ratones machos de la cepa BDF1 e inoculados con células de leucemia P-388. Así el valor de T/C% fue de 261 para el dímero y de 162 en la forma monomérica los cuales muestran una marcada reducción de actividad enzimática para la síntesis de *ново* de ácidos nucleicos y proteínas.⁸⁵

Grippe y colaboradores, en 1992, comprobaron que la helenanina y sus ésteres mono y difuncionales poseían mecanismos para reducir la síntesis de ácidos nucleicos mediante la inhibición de la actividad de ADN polimerasa y por lo tanto provocaban la muerte de células con leucemia L1210.¹⁹

Powis y su grupo en 1994, demostraron que la helenanina y sus análogos causaban el incremento de Ca^{2+} intracelular, inhibiendo de esta manera la proliferación de fibroblastos 3T3

de ratón.⁶³

Chen y colaboradores, en 1994, evaluaron la actividad antitumoral citotóxica en blastocitos periféricos de los ésteres glutarato de bis (helenalínolo) y glutarato de bis (isoalantodiol-B) de un paciente con leucemia aguda y observaron que eran potentes inhibidores de la ADN topoisomerasa II humana.¹¹

Estudios *in vivo* con animales de laboratorio realizados en Estados Unidos de Norteamérica han demostrado una importante **hepatotoxicidad** de lactonas sesquiterpénicas, así como en reportes de hepatotoxicidad en consumidores de productos naturales como el "chaparro amargoso", que contiene como principio activo lactonas sesquiterpénicas. Esta limitación ha impedido el uso de derivados de lactonas sesquiterpénicas en la clínica como en el caso del equipo de Grippo (1992).¹⁷

La estrategia terapéutica sería el uso de cantidades menores de esta lactona *in vivo* y de su ester pero de alta efectividad terapéutica mediante el uso de moléculas biológicas acarreadoras que permitan atacar a las células cancerosas de una manera selectiva. Por esta razón, se propone la síntesis de un inmunocombinado: IgG-helenalina.

III. HIPÓTESIS

Es necesario desarrollar nuevas terapias contra el cáncer, la inmunoterapia se presenta como una alternativa. Por lo que el acoplamiento del sistema α -metileno exocíclico γ -lactona de la helenalina y de su derivado mediante la reacción de Michael a anticuerpos es posible, para la síntesis de sus respectivos inmunocombinados.

IV. OBJETIVO GENERAL

Mediante el acoplamiento químico de la helenalina y de su éster de glutarato de bis (helenalinilo) vía grupos sulfidrilos libres generados en el anticuerpo se formará el inmunocombinado en condiciones suaves de reacción y conocerá su rendimiento y pureza.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Obtención de helenalina.
- b) Obtención del dímero de helenalina [glutarato de bis (helenalinilo)].
- c) Obtención, purificación y cuantificación de anticuerpos policlonales de ratón.
- d) Acoplamiento de la helenalina y de su dímero a anticuerpos policlonales IgG.
- e) Evaluación del rendimiento de los inmunocombinados, pruebas de isotipificación, y análisis espectroscópicos.

VI. MATERIAL Y MÉTODO

6.1. OBTENCIÓN Y SÍNTESIS DE LOS AGENTES CITOTÓXICOS.

6.1.1. OBTENCIÓN DE HELENALINA

Para el desarrollo del presente trabajo, se colectó la parte aérea de *Helenium mexicanum*, HBK en el estado de Hidalgo, los ejemplares de colecta, se identificaron con el apoyo del Instituto de Biología, de la U.N.A.M. (ver apéndice No.1).

El material, se dejó secar a temperatura ambiente y se molió. Posteriormente, de 1.470 kg de planta molida se realizaron extracciones con solventes de polaridad ascendente (hexano, diclorometano, acetona, acetato de etilo, metanol y agua). Se analizaron cualitativamente con placas cromatográficas de 5 x 5 cm, con una capa de 0.25 mm de sílica gel 60 con indicador fluorescente (Machery-Nagel, E.U.A.), en un sistema de acetato de etilo-hexano 8:2 y reveladas con sulfato cérico (apéndice No. 2), para determinar la presencia de helenalina.

A partir del extracto de acetato de etilo fue purificada la helenalina mediante una columna cromatográfica de adsorción semilíquida, de 9.5 cm de diámetro y 23.5 cm de largo, con sílica gel 60 GF 254 para capa fina (Merck, E.U.A.), usando como eluyente hexano y acetato de etilo en diferentes concentraciones (hexano y hexano-acetato de etilo de 9:1 a 1:1). Se colectaron fracciones de 100 y 150 ml los cuales se concentraron en un rotavapor (Büchi, Suiza) y detectar la presencia de helenalina mediante cromatoplasmas de aluminio, utilizando una muestra estándar como referencia, en un sistema hexano-acetato de etilo 8:2, las cuales también fueron reveladas con sulfato cérico. Las muestras que contenían la lactona fueron colectadas en un frasco.

Para eliminar las clorofilas que se encontraban con la lactona, ésta última fue disuelta en acetona-etanol 1:1 caliente en baño María y se le adicionó 1 g de carbón activado (Sigma, E.U.A.). Para después filtrarla al vacío en un matraz kitazato de 50 ml con papel filtro No. 2

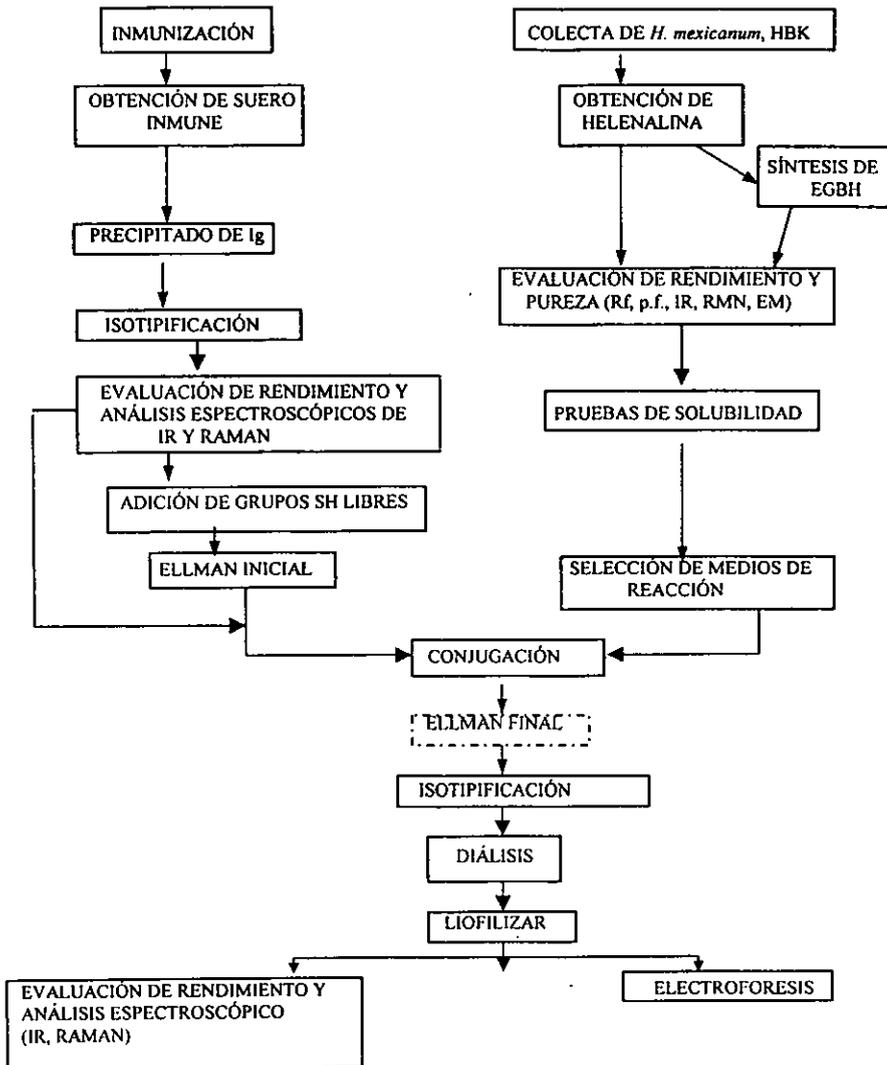


FIGURA 14. Metodología realizada para la obtención y análisis de los inmunocombinados Ig-HEL e Ig-EGBH.

(Whatman, E.U.A.) y sílica gel. Posteriormente, se procedió a la cristalización de las aguas madres con acetona. Una vez obtenidos los cristales se evaluó el rendimiento por diferencia de pesos en una balanza analítica (Ohaus, E.U.A.), se les tomó su punto de fusión en un aparato Fisher Johns y su factor de retención (R_f) en un sistema cloroformo-acetona 4:1.

Por último se realizó la identificación de la estructura de la lactona mediante los métodos espectroscópicos de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y de masas (EM).

6.1.2. SÍNTESIS DEL ESTER DE GLUTARATO DE BIS (HELENALILO).

Un gramo de helenalina fue disuelta en 10 ml de benceno (Baker, México) y se le adicionó 1 ml de dicloro de glutarilo (Aldrich, E.U.A.). La mezcla fue sometida a reflujo durante 12 h, y en agitación constante con ayuda de un agitador magnético. Posteriormente, se lavó con 5 ml de agua destilada y 5 ml de bicarbonato de sodio (NaHCO_3) acuoso al 5 %. La fase orgánica se saturó con una 1g de cloruro de sodio (NaCl) y se secó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4). Se filtró por gravedad, con papel filtro No.2, para desechar los residuos y la solución resultante se concentró por destilación simple. El aceite obtenido se aplicó en una placa preparativa de capa fina de 10 x 20 cm (Machery-Nagel, E.U.A.), para la separación de los compuestos, usando como eluyente una mezcla de cloroformo-acetona 4:1⁴⁸.

Se evaluó el rendimiento de los compuestos aislados y se identificó la estructura del ester con los métodos espectroscópicos IR, RMN y EM.

Una vez identificado el dímero se le tomó su R_f en un sistema cloroformo-acetona 4:1 y su punto de descomposición (p.d.).

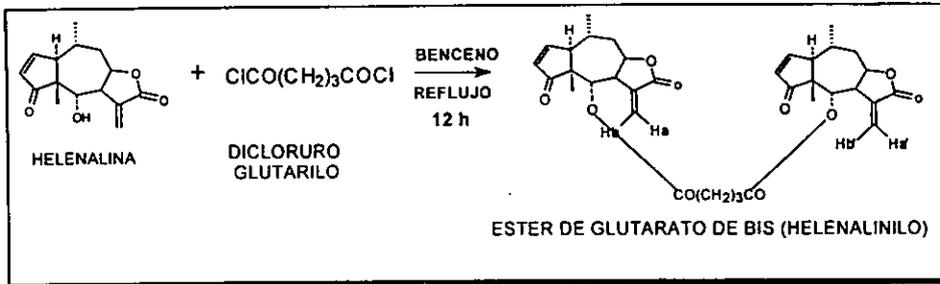


FIGURA 15. Reacción (1), síntesis del Ester de glutarato de bis (helenaliniilo).

6.2. OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS POLICLONALES DE RATÓN

6.2.1. INMUNIZACIÓN Y OBTENCIÓN DEL SUERO HIPERINMUNE

Se realizó un esquema de inmunización usando tres inmunógenos (suero albúmina bovina (SAB) (Sigma, E.U.A.), suero fetal bovino (SFB), y SFB con tuberculina derivada de proteínas purificadas (Mantoux-Connaught, E.U.A.) a una proporción de 0.1:12.5) y comparar la mejor producción de anticuerpos.

Primero, se inmunizaron 4 ratones hembras de la cepa BALB/c, de 6-8 semanas con dosis de 100 μ l por ratón de SAB al 1 % y adyuvante completo de Freund (Gibco, E.U.A.) a una proporción 1:1, por vía intraperitoneal con una jeringa para insulina. Posteriormente se administraron dos refuerzos más los días 18 y 26 con la misma dosis pero sin adyudante. El mismo procedimiento fue realizado con las otras sustancias inmunógenas salvo que fueron inmunizados 10 ratones en cada uno de estos casos.

Una semana después del último refuerzo los animales fueron desangrados a blanco con capilares heparinizados (Marienfield, E.U.A.) por punción retro-orbital. La sangre fue

colectada en tubos de 2 ml (Eppendor, E.U.A.) y centrifugada a 7×10^3 r.p.m. durante 10 min, para la obtención del suero hiperinmune.

6.2.2. PRECIPITACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS

Posteriormente, se procedió a precipitar las Ig con sulfato de amonio (NH_4SO_4) al 45% de saturación (2.7 g de NH_4SO_4 por cada 10 ml de muestra), durante 2 h 30 min en agitación y a 4°C . La solución fue centrifugada durante 15 min a 3×10^3 r.p.m. y se descartó el sobrenadante. El precipitado resultante se disolvió con una solución amortiguadora de fosfatos (SSAF) a pH 8.0 (ver apéndice No.3), resuspendiendo repetidamente con una micropipeta de 200 μl (Labsystem, Francia) y se dializó dentro de una membrana de diálisis de 3500 unidades de exclusión (Spectra/Por, E.U.A.) contra 100 veces su volumen con SSAF pH 8.0 a 4°C durante 24h.

6.2.3. AISLAMIENTO DE INMUNOGLOBULINAS

Las Ig una vez dializadas fueron purificadas mediante una columna de afinidad utilizando como absorbente proteína sefarosa A (Pierce, E.U.A.) y como eluyente una solución de citratos 0.1 M a pH 3.0. Se colectaron fracciones de 1 ml en tubos Eppendor que contenían 120 μl de TRIS base (Tris-hidoximetil amino-metano) (THMAX, E.U.A) 2M a pH 10. Las fracciones colectadas se leyeron a 280 nm (A_{280}) en un espectrofotómetro (Milton Roy, E.U.A.), en las que se obtuvieron las lecturas más altas fueron colectadas y dializadas con una membrana de diálisis de 3500 unidades de exclusión con SSAF a pH 7.0 durante 24 h.

6.2.4. ISOTIPIFICACIÓN

Se realizó la caracterización de anticuerpos totales de ratón mediante el estuche de isotipificación Iso-1 (Sigma, E.U.A.), para subclases e isotipos.

Para ello, se colocó una tira de isotipificación dentro de un tubo de ensayo con rosca, se adicionaron 50 μl de anticuerpos y 2 ml de SSAF-Tween 20 al 0.05 %, se incubaron durante 30

min sobre una plataforma oscilatoria, se decantó el sobrenadante y se lavó la tira con 4 ml de SSAF-Tween durante 5 min en agitación y se decantó cualquier residuo del buffer.

En otro tubo de ensayo se colocaron 2 ml de SSAF-Tween se adicionó una gota de anticuerpos purificados y biotitulados para inmunoglobulinas de ratón (vial No.2), se colocó la tira y se incubó durante 5 min en agitación oscilatoria. Después, la solución se decantó y la tira fue lavada con 4 ml de SSAF-Tween durante 5 min en agitación.

En el otro tubo de ensayo se colocaron 2 ml de SSAF-Tween, se le adicionó una gota de Ext Avidin-Peroxidasa (vial No. 3), se colocó la tira y se incubó durante 5 min en agitación. Posteriormente, se decantó la solución amortiguadora y la cinta fue lavada con 4 ml de SSAF-Tween y SSAF durante 5 min en cada uno y se decantaron los residuos del tubo de ensayo.

Mientras tanto, en otro tubo de ensayo se adicionaron 4 ml de agua destilada, 2 gotas de buffer de acetato a 2.5 M y pH 5.0 (vial No. 4a), una gota del sustrato cromógeno (vial No. 4b), una gota de peróxido de hidrógeno al 2 % (vial No. 4c). Esta mezcla se agitó, se le colocó la tira y se incubó en agitación hasta observar una señal "+" (control positivo). Una vez que apareció la marca isotipo la cinta fue removida, secada entre hojas de papel absorbente y se guardó para su conservación.

6.2.5. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO DE Ig.

La cuantificación de los anticuerpos se realizó por diferencia de peso de 1 ml de anticuerpos hasta peso seco previamente dializados contra agua durante 24 h a 4°C.

6.3. ADICIÓN DE GRUPOS SULFIDRILOS MEDIANTE EL MÉTODO DE SATA.

Posteriormente, se adicionaron grupos sulfidrilos libres (SH) en las inmunoglobulinas por medio del reactivo de SATA (éster de N-hidroxisuccimida del ácido S-acetil tioacético) (Pierce, E.U.A.). Por cada 1.5 mg de anticuerpos se adicionaron 10 µl de la

solución de SATA [13-15 mg de SATA en 1 ml de dimetilsulfóxido (DMSO)] en un tubo de ensayo con rosca. Se hizo la mezcla y se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 30 min. El producto de la reacción fue dializado contra EDTA-SSAF a pH 7.0 durante 24 h. La solución de anticuerpos resultante fue almacenada a -70°C hasta su acoplamiento con los agentes citotóxicos.

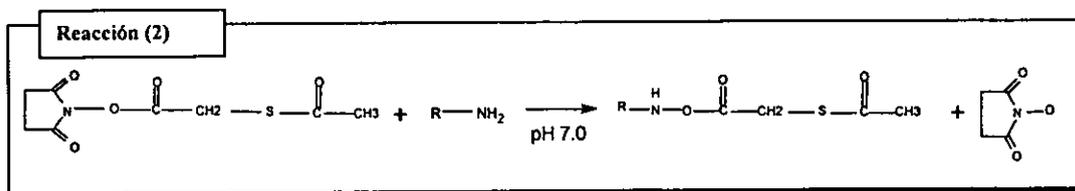


FIGURA 16. Reacción (2) de SATA (ester N-hidoxisuccimida (NHS) del ácido S-acetil tioacético) con una amida primaria.

6.4. PRUEBAS DE SOLUBILIDAD DE LOS AGENTES CITOTÓXICOS.

Para favorecer la reacción de acoplamiento fue necesario realizar pruebas de solubilidad para elegir los disolventes y/o soluciones más adecuados para la obtención de un medio homogéneo de reacción.

Cada una de las pruebas de solubilidad fueron realizadas con aproximadamente 2 mg de cada uno de los compuestos citotóxicos. Los disolventes y soluciones que se usaron en este ensayo fueron: dimetil sulfóxido (DMSO), dimetil formamida (DMF), SSAF a pH 7.0, agua destilada, DMSO-SSAF 1:3.3, DMF-SSAF 1:3.3, SSAF-Tween 20 al 0.05 % y al 0.1 %, carbowax 600 (Química ELE, México) al 0.05 %, con etilenglicol-SSAF (1.5:2) y glicerina.

Cada una de las soluciones se adicionaron de 50 en 50 µl con una micropipeta hasta disolver las drogas a temperatura ambiente y posteriormente se les adicionó SSAF de la misma

forma. En los ensayos donde la solubilidad fue muy baja o nula se aumentó la temperatura a 37°C y 60°C.

Los disolventes y las soluciones más efectivos fueron elegidos como medios de reacción para realizar los ensayos de acoplamiento de los agentes citotóxicos con los anticuerpos policlonales de ratón.

6.5. LIBERACIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE GRUPOS SULFIDRILOS LIBRES.

Con el fin de dejar libres los grupos sulfhidrilos presentes en las inmunoglobulinas, antes de cada una de las reacciones de acoplamiento (ver figura 16), se siguieron las siguientes instrucciones: se tomaron siete muestras con 9 mg de Ig en solución a las cuales se les adicionó 225 µl de la solución de desacetilación (ver apéndice No. 4) en un tubo de ensayo, el cual se cubrió con parafilm, se mezcló en un vortex y se dejó reaccionando durante 2 h a temperatura ambiente.

Después se cuantificaron los grupos sulfhidrilos libres en la solución de inmunoglobulinas con el reactivo de Ellman (Pierce, E.U.A.). Para lo cual se prepararon una serie de tubos Eppendor los cuales contenían 50 µl de la solución de Ellman (4 mg del reactivo de Ellman en 1 ml de SSAF a pH 8.0). Posteriormente se adicionaron 250 µl de cada solución de anticuerpos, se mezclaron y se incubaron a temperatura ambiente durante 15 min y se les midió su absorbancia a 412 nm (A_{412}).

También, se realizó una curva standard con 250 µl de soluciones de cisteína (Cys) a diferentes concentraciones (1.5 mM, 1.25 mM, 1.01 mM, 0.75 mM, 0.5mM y 0.25 mM) para poder extrapolar los resultados, cuantitativa y/o cualitativamente la presencia de grupos sulfhidrilos libres en las Ig.

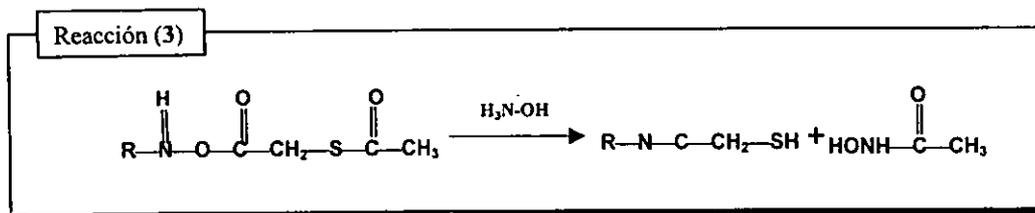


FIGURA 17. Reacción (3) desprotección de los grupos sulfidrilos de la amida con hidroxilamida.

6.6. ACOPLAMIENTO DE LA LACTONA Y DE SU DÍMERO A ANTICUERPOS POLICLONALES DE RATÓN

Para establecer las condiciones de acoplamiento Ig-helenalina e Ig-EGBH se hicieron siete reacciones con diferentes medios de reacción y temperatura, éstas fueron numeradas como (4), (5), (6), (7), (8), (9) y (10) (ver tabla V).

En cada uno de los ensayos se disolvió primero el agente citotóxico en el medio de reacción seleccionado y luego se fueron adicionando lentamente (de 50 en 50 μl) los anticuerpos previamente desacetilados, en agitación constante. Inmediatamente después de la adición de los Acs, se tomaron 250 μl de muestra para realizar la reacción de Ellman y observar de manera cualitativa la disminución de grupos sulfidrilos libres en la reacción.

Las reacciones se llevaron a cabo a temperatura ambiente a excepción de la reacción (10) que se realizó a 4°C y a pH 7. Todas fueron monitoreadas al inicio y al final de la reacción con el reactivo de Ellman a las 9-12 h y 24 h y cuando éste fue negativo la reacción fue suspendida. Al término de las cuales se tomó una muestra de 50 μl para realizar la prueba de isotipificación.

Los productos resultantes de las reacciones fueron dializados contra agua destilada durante 24 h entre 4-5°C y liofilizados finalmente. Posteriormente, fueron analizados por IR y

Raman para comprobar, de manera cualitativa, la disminución de grupos sulfidrilos libres en los anticuerpos y la incorporación de la lactona y su dímero.

Las aguas resultantes de las diálisis fueron plaqueadas para detectar la presencia de los agentes citotóxicos no acoplados y constatar de ésta manera la eliminación de los agentes citotóxicos no acoplados.

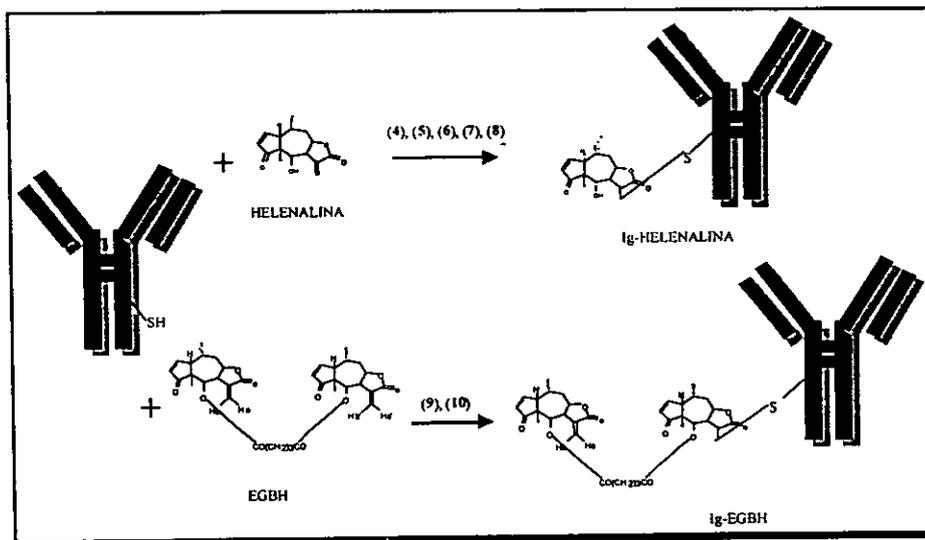


FIGURA 17. Síntesis de los conjugados Ig-helenalina e Ig-EGBH (ver tabla V).

TABLA V. Condiciones de reacción para llevar a cabo el acoplamiento de los agentes citotóxicos con las Ig policlonales murinas.

REACCIÓN	4	5	6	7	8	9	10
AGENTE CITOTÓXICO (mg)	HEL* 36.6	HEL* 18	HEL* 18	HEL* 18	HEL* 18	EGBH** 26.9	EGBH 26.9
Ig (mg)	18	9	9	9	9	9	9
MEDIO DE REACCIÓN (ml)	5 de SSAF	1.25 de DMSO-SSAF 1:1.5	1ml de EG-SSAF 1:2	1ml de EG-SSAF 1:2	2ml de EG-SSAF 1:2	1.7 de DMF	3.9 de DMF
pH	6	7	7	7	7	7	N.D.***
T (°C)	amb	amb	amb	amb	amb	amb	4°
T (h)	24	24	24	24	24	19	24

*Helenalina . ** Ester de glutarato de bis (helenalilo). ***No determinado.

6.7. ELECTROFORESIS

Para demostrar la formación de inmunoconjugados IgG1-HEL en la octava reacción, se tomaron muestras de 2 µg, 4 µg y 8 µg del conjugado, 2 µl de AcMo CD5 (Sigma, E.U.A.) y 2.5 µl de proteínas marcadoras de P.M. (Gibco,E.U.A.). Las muestras del conjugado y del AcMo se mezclaron con un volumen igual del buffer muestra (ver apéndice No.5.) y se calentaron en baño María a ebullición durante 4 min. Todas las muestras se corrieron en un gel de acrilamida al 10% de 0.750 mm de espesor, a 40 volts durante 30 min y a 200 volts durante 1 h. El gel fue teñido con azul de Coomassie durante 2 h sobre una plataforma oscilatoria, se aclaró con la solución de desteñido y se secó entre hojas de celofán previamente mojadas y calentadas para su conservación (ver apéndice 5.).

VII. RESULTADOS

7.1. RENDIMIENTO Y CARACTERÍSTICAS FÍSICAS Y QUÍMICAS DE LOS AGENTES CITOTÓXICOS.

La tabla VI muestra los rendimientos obtenidos de la helenalina a partir de la extracción con acetato de etilo de *H. mexicanum* y del dímero obtenido de acuerdo al método de Lee.⁴⁸ En la tabla se puede observar que la obtención de la helenalina fue un 0.11% menos eficiente que la extracción clorofórmica de Pettit.⁵⁷ Por otra parte la obtención del éster de glutarato de bis (helenalinilo) (EGBH) resulto ser muy cercana a la reportada por Lee.⁴⁷

TABLA VI. Rendimiento de los agentes citotóxicos utilizados.

AGENTES CITOTÓXICOS	RENDIMIENTO OBTENIDO (g)	RENDIMIENTO OBTENIDO (%)	RENDIMIENTO REPORTADO (%)
HEL*	1.85	0.12	0.23
EGBH**	0.291	29.1	30

*Helenalina. **Ester de glutarato de bis (helenalinilo).

La tabla VII muestran los resultados del punto de fusión, punto de descomposición y del factor de desplazamiento de la helenalina y del EGBH donde se observa que el punto de fusión de la helenalina es muy cercano a lo reportado lo cual confirma su pureza. Por otro lado, la helenalina tiene un R_f mayor al del EGBH lo que nos indica que es más polar que su dímero.

TABLA VII. Puntos de fusión (p.f.), de descomposición (p.d.) y factor de desplazamiento en cromatografía en placa (R_f) descritos y obtenidos⁵⁸.

AGENTES CITOTÓXICOS	p.f. o p.d. OBTENIDO (°C)	p.f. o p.d. DESCRITO (°C)	R_f OBTENIDO	R_f REPORTADO
HEL	165-167	167	0.4150	0.5
EGBH	85-95	N.R.**	0.6226	N.R.*

*No reportado.

En cuanto a los espectros de IR, RMN y EM de cada uno de los agentes citotóxicos (ver figuras 18-22, pág. 47-51) se muestran los grupos estructurales importantes de cada compuesto que nos permiten identificarlos, comprobar su pureza, y en el caso del EGBH su síntesis, por la presencia del enlace éster. En el IR de helenalina (ver figura 18, pág. 47) se identificaron los siguientes grupos: hidroxilos, lactona, la ciclopentenona y el doble enlace carbono-carbono (C=C) característicos de la molécula. El espectro de RMN de la helenalina (ver figura 19, pág. 48) registró las señales de los grupos metilos 5 y 10 (Me-5 y Me-10), de los hidrógenos del α -metilén (Ha y Hb), del OH presente en el C-6 y otros hidrógenos presentes en la molécula. La señal más importante en el espectro de IR del dímero sintetizado (figura 20, pág. 49) fue del éster ya que con ello se prueba la síntesis de dicho dímero, también se observa la presencia de los grupos lactona, ciclopentenona y C=C. El espectro de EM (figura 21, pág. 50) reportó el peso molecular del dímero que fue de 620 Da. Y por último el espectro de RMN del EGBH (ver figura 22, pág. 51) confirmó la formación del enlace éster y la desaparición de los grupos OH.

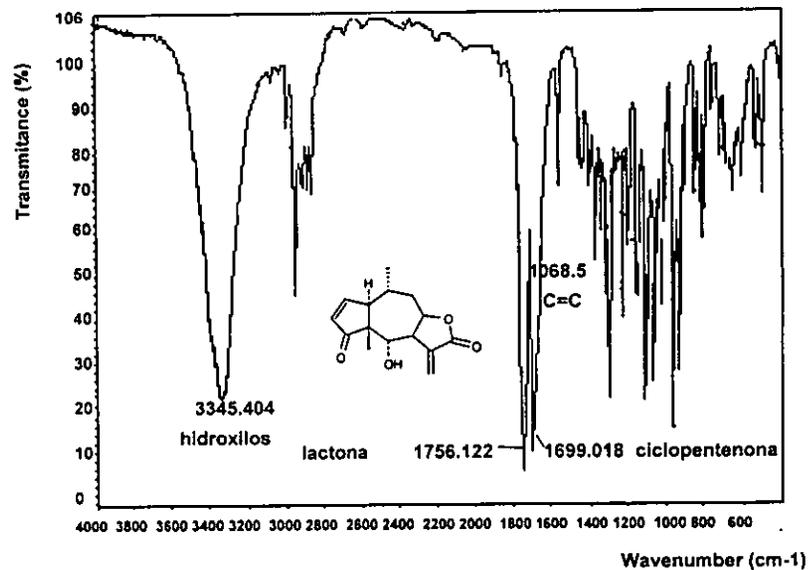


FIGURA 18. Espectro de IR de la helenalina purificada en pastilla de KBr donde se observan las siguientes señales: 3345.404 (hidroxilos), 1756.122 (lactona), 1699.08 (ciclopentenona) y 1068.5 (C=C).⁴²

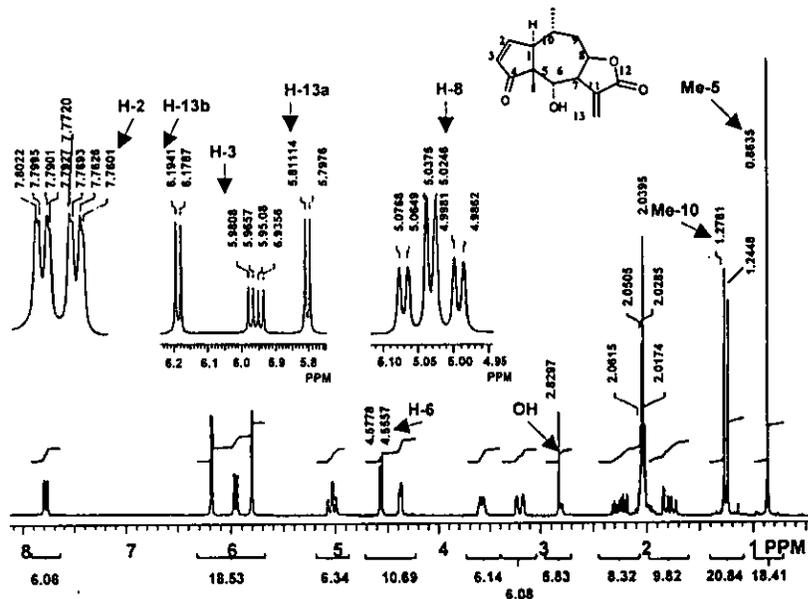


FIGURA 19. Espectro de RMN (acetona) de la helenalina purificada determinada en acetona donde se muestran las siguientes señales: 0.8635 (Me-5), 1.2781 (Me-10), 2.8297 (OH), 4.5557 (H-6), 5.0246 (H-8), 5.8114 (H-13a), 5.9808 (H-3), 6.1941 (H-13b) y 7.7601 (H-2).⁸⁶

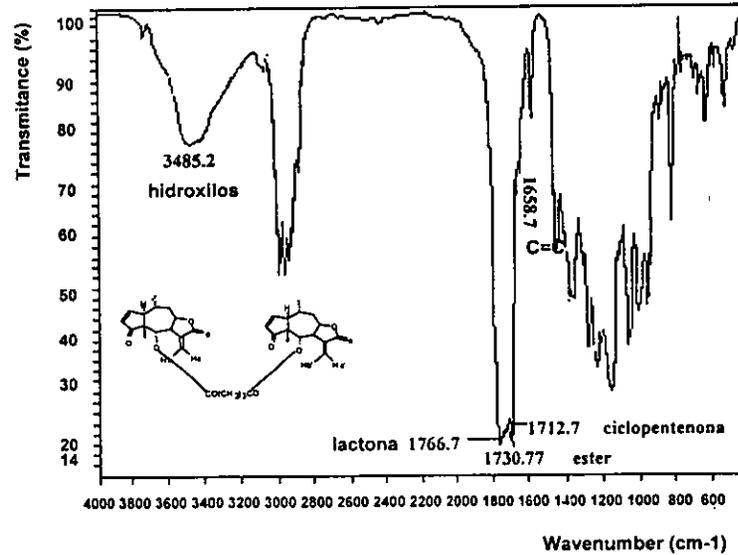


FIGURA 20. Espectro de IR (KBr) del dímmero sintetizado (EGBH) donde se observan las siguientes señales de la molécula: 1766.7 (lactona), 1730.77 (éster), 1712.7 (ciclopentenona) y 1658.7 (C=C) cm^{-1} .³⁶

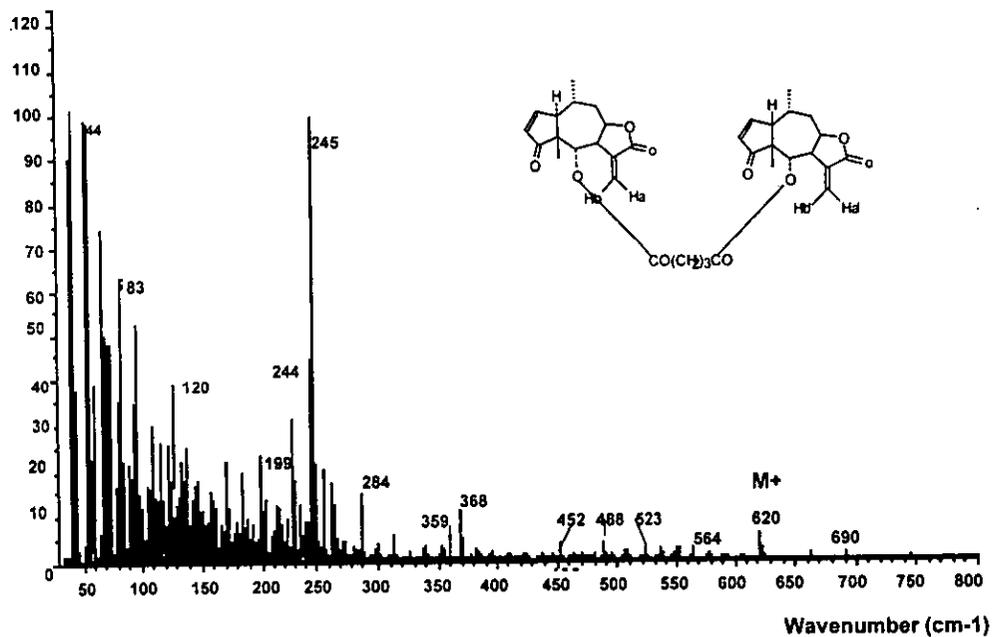


FIGURA 21. Espectro de EM donde se reporta el peso molecular (M⁺) del dímmero sintctizado (EGBH): 620 (C₃₅H₄₀O₁₀).⁴²

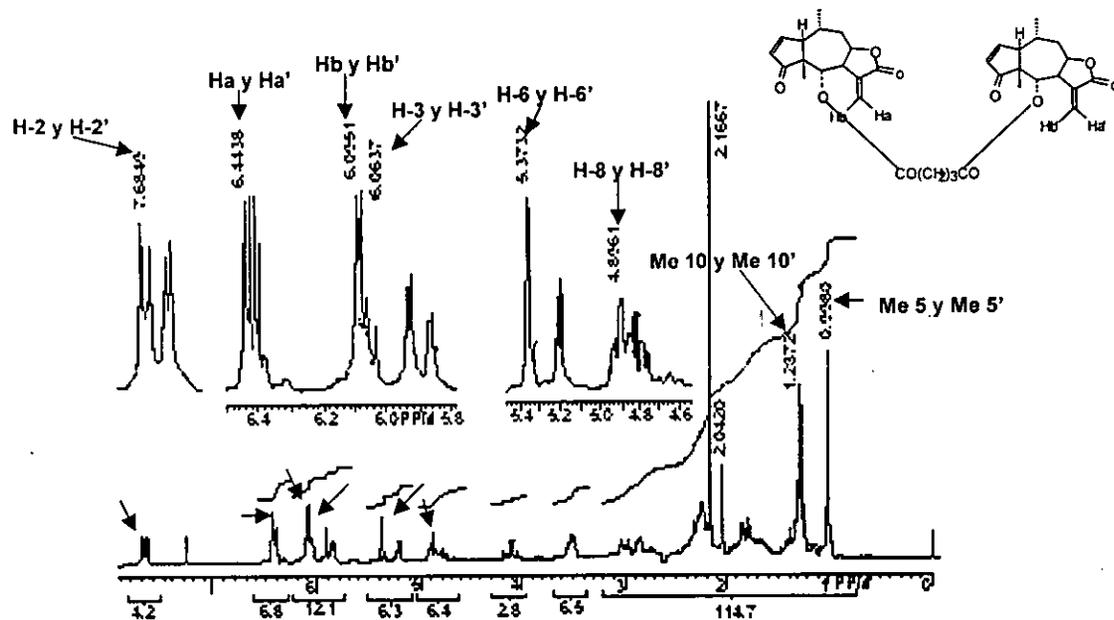


FIGURA 22. Espectro de RMN (Me₂CO) del dímero sintetizado (EGBH): 87.6849 (2H, dd, H-2 y H-2'), 6.4438 (2H, d; Ha y Ha'), 6.0951 (2H, d, Hb y Hb'), 6.0637 (2H sobrelapada, H-3 y H-3'), 5.3732 (2H, br s, H-6 y H-6'), 4.8961 (2H, m, H-8 y H-8'), 1.2872 (6H, d, Me-10 y Me-10'), 0.9980 (6H, s, Me-5 y Me-5').³⁶

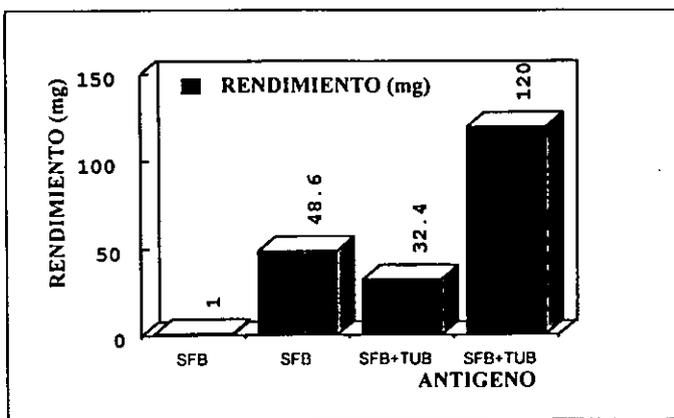
7.2. RENDIMIENTO E ISOTIPIFICACIÓN DE LAS Ig OBTENIDAS

La tabla VIII muestra el rendimiento de inmunoglobulinas murinas y de las subclases obtenidas después de purificarlas por medio de una columna de afinidad sefarosa A, donde se puede observar que el antígeno con mayor rendimiento fue el de suero fetal bovino y tuberculina (SFB+TUB).

TABLA VIII. Rendimiento e isotipificación de Ig obtenidas.

ANTÍGENO	SAB	SFB	SFB + TUB	SFB + TUB
SUERO (ml)	1	2	2	3
RENDIMIENTO (mg)	1*	48.6	32.4	120
ISOTIPOS DESPUES DE PURIFICARLAS CON SEFAROSA A	IgGa, IgG2b e IgG3	IgGa, IgG2b e IgG3	IgGa, IgG2b, IgG3, IgG1 e IgA	IgGa, IgG2b, IgG3, IgG1 e IgA

*en este ensayo se inmunizaron 4 ratones.



GRAFICA I. Rendimiento de Ig con los diferentes antígenos.

7.3. SOLUBILIDAD DE LOS AGENTES CITOTÓXICOS.

La tabla IX muestra la solubilidad de los agentes citotóxicos donde se observa mayor hidrosolubilidad con la helenalina que con el dímero ello también concuerda con los valores de R_f obtenidos anteriormente.

TABLA IX. Pruebas de solubilidad de los agentes citotóxicos.

SOLUCIÓN:	DMSO -SSAF 1:3.3	DMSO	DMF- SSAF 1-3.3	DMF	SSAF pH 7.0	H ₂ O	PEG- SSAF 0.05%	TWEEN 20- SSAF 0.05%	TWEEN 20- SSAF 0.1%	TWEEN 80 -SSAF 0.1%	GLICERINA
HEL	sí	sí	p.p.*	sí	PARCIAL s/p.p.*	p.p.*	sí	sí	sí	sí	no
EGBH	sí	sí	no	sí	no	no	p.p.*	p.p.*	p.p.*	p.p.*	p.p.*

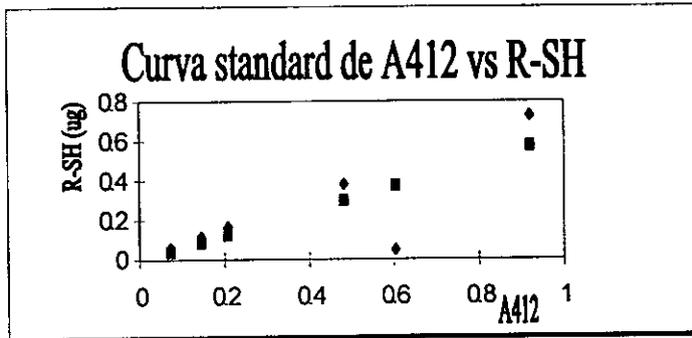
*. p.p. precipitado. En éstos casos también se probó la solubilidad a 37°C y a 60°C, pero el resultado fue el mismo.

7.4. CUANTIFICACION DE GRUPOS SULFIDRILOS LIBRES ESTÁNDAR

Se realizó la curva estándar de absorbancia (A_{412}) contra concentración de grupos calculados R-SH [R-SH] presentes en los anticuerpos IgG para poder cuantificar la [R-SH] antes y después de cada una de las reacciones de acoplamiento pero sólo se cuantificó [R-SH] inicial debido a problemas de solubilidad que presentaron los inmunocnjugados durante y después de las reacciones. Tanto la tabla IX como la gráfica III muestran que la absorbancia A_{412} es proporcional a [R-SH].

TABLA X. Concentración de la cisteína [Cys] y A₄₁₂ vs la concentración de grupos SH libres [R-SH].

[Cys] (mg)	0.625	1.25	2.5	5	10	15
A ₄₁₂	0.0605	0.073	0.145	0.2085	0.482	0.9205
[R-SH] (μ moles/ml)	0.048	0.057	0.115	1.165	0.381	0.728



GRAFICA III. Curva estándar de R-SH vs A₄₁₂, donde ■ es la regresión lineal y ◆ los datos obtenidos.

7.5. RESULTADOS DE LAS REACCIONES DE ACOPLAMIENTO.

También se realizó el seguimiento experimental de las reacciones de acoplamiento (4) a (10), cuyos resultados se muestran en la tabla XI donde se puede observar de manera cualitativa la disminución en la concentración de R-SH al final de cada una de las reacciones mediante la reacción de Ellman, así como la conservación de algunas subclases de inmunoglobulinas después de cada una de las reacciones. Se observó que medio EG-SSAF 1:2 provocó la desnaturalización de subclases IgG e IgA a excepción del subtipo IgG1 en las reacciones (6), (7) y (8). Por el contrario, las

reacciones con el dímero (9) y (10) provocaron la desnaturalización de las inmunoglobulinas.

TABLA XI. Resultados del seguimiento experimental con diferentes medios de reacción para el acoplamiento con las Ig.

No. REACCIÓN	4	5	6	7	8	9	10
AGENTE CITOTÓXICO	HEL	HEL	HEL	HEL	HEL	EGBH	EGBH
ELLMAN INICIAL	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)
ELLMAN INICIAL [R-SH] (µg)	0.0145	0.0346	0.0253	0.0256	0.0209	0.0135	0.0211
ELLMAN FINAL	(-)	±*	N.D.**	N.D.**	±*	(-)	(-)
ISOTIPOS	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3 e IgA	IgG1	IgG1	IgG1	(-)	(-)
RENDIMIENTO (mg)	22.6	9.5	4.4	4.1	1.5	36.2	12.2

*ligeramente positivo. **No determinado.

7.6. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE LAS REACCIONES DE ACOPLAMIENTO.

Al principio, la prueba de Ellman final se tenía contemplada tanto cualitativa como cuantitativamente, pero debido a la heterogeneidad de las reacciones de acoplamiento las lecturas de absorbancia no eran confiables, por lo que se optó por obtener y cuantificar, mediante extracción, los agentes antitumorales que habían quedado en las aguas de diálisis pero el método no fue eficiente ya que se perdían los agentes citotóxicos no acoplados durante el procedimiento. Por ello, se recurrió a los espectros de IR y de Raman para identificar las señales características de la lactona, del dímero y de la inmunoglobulina con y sin grupos sulfhidrilos libres antes de realizar las reacciones de acoplamiento (ver tablas XII y XIII y figuras 23-27 del apéndice 6), además, la literatura reporta que los espectros Raman tienen una alta resolución para las señales de grupos sulfhidrilos libres cercana a 2575 cm^{-1} y el enlace C-S ha sido reportado entre $650\text{-}730\text{ cm}^{-1}$.⁶ Por lo tanto, al observar el aumento o disminución de dichas señales se podría confirmar la reacción de Ellman y el acoplamiento de los agentes citotóxicos a la inmunoglobulina mediante la reacción de Michael. Pero, el análisis espectroscópico sólo se realizó con las reacciones (4), (5), (9) y (10) (ver tablas XIV y XV y figuras 27-30 del apéndice 6, pág. 86-89) ya que en las otras el rendimiento fue menor a 5 mg, el mínimo necesario para realizar dichos estudios.

TABLA XII. Señales representativas de los espectros de IR y Raman de las inmunoglobulinas antes (Ig) y después de la reacción con SATA (Ig-SH) y de la cisteína L-Cys.

Ig, Ig-SH y L-Cys	AMIDA I (cm^{-1})	AMIDA II (cm^{-1})	AMIDA III (cm^{-1})	SH (cm^{-1})	C-S (cm^{-1})
Ig IR	1655.443	1538.864	1398.3	N. E.*	N. E.*
Ig Raman	1651.52	1542	1451	N. E.*	N. E.*
Ig-SH IR	1598.9	—	1275	2400-2625	—
L-Cys IR	N. E.*	N. E.*	N. E.*	2561.3	—
L-Cys Raman	N. E.*	N. E.*	N. E.*	2566	683

*N. E. no existe en la molécula.

TABLA XIII. Señales representativas de los agentes citotóxicos en los espectros de IR y Raman.

AGENTES CITOTOXICOS Y ESPECTRO	OH (cm^{-1})	ESTER (cm^{-1})	LACTONA (cm^{-1})	CICLOPENTENONA (cm^{-1})	C=C (cm^{-1})
HEL IR	3345.404	N. E.*	1756	1699.08	1068.5
HEL Raman	3048	N. E.*	1756	1685	—
EGBH IR	3485.2	1730.77	1766.7	1712.7	1055.0
EGBH Raman	3077.992	—	1756	1723.995	—

*N. E. no existe en la molécula.

Las tablas XIII y XIV muestran los resultados de los espectros de IR y Raman, los cuales se pueden observar que la espectroscopia Raman es mucho más sensible en el registro de las señales del enlace C-S y de los grupos sulfidrilos libres SH. Después de la reacción de acoplamiento se registraron dichas señales pero fueron muy débiles lo que nos indica que hubo acoplamiento de los agentes citotóxicos mediante la reacción de Michael entre el grupo α -metileno γ -lactona de la helenalina y de su dímero y los grupos sulfidrilos libres. Sin embargo la espectroscopia Raman fue menos sensible en la identificación del doble enlace perteneciente a la lactona y su dímero y al enlace éster del dímero por lo que los espectros de IR brindaron dichos resultados y ambos resultados fueron complementarios.

TABLA XIV. Señales representativas de los espectros de IR y Raman de los inmunoconjugados de helenalina (Ig-SH-HEL) sintetizados.

REACCIONES	LACTONA (cm^{-1})	CICLOPEN- TENONA (cm^{-1})	C=C (cm^{-1})	AMIDA I (cm^{-1})	AMIDA II (cm^{-1})	AMIDA III (cm^{-1})	SH (cm^{-1})	C-S (cm^{-1})
Reacción 4 Ig-SH-HEL IR	1763.488	1725.645	1064.870	1656.438	1540.797	1458.1	—	—
Reacción 4 Ig-SH-HEL Raman	1750	1690.48	—	1657	—	1455.9996	2575	672.62
Reacción 5 Ig-SH-HEL IR	1763.650	1726.103	1065.055	1654.946	1540.380	1456.2	—	—
Reacción 5 Ig-SH-HEL Raman	1745	1680.72	—	1657	1548.19	1450	2544	722

TABLE XV. Señales representativas en los espectros de IR y Raman de los inmunocombinados del dímero sintetizados (Ig-SH-EGBH).

REACCIONES	ESTER (cm ⁻¹)	LACTONA (cm ⁻¹)	CICLOPEN- TENONA (cm ⁻¹)	C=C (cm ⁻¹)	AMIDA I (cm ⁻¹)	AMIDA II (cm ⁻¹)	AMIDA III (cm ⁻¹)	SH (cm ⁻¹)	C-S (cm ⁻¹)
Reacción 9 Ig-SH-EGBH IR	N. E.*	1747.4	—	1076.2	1662.6	1533.3	1452.3	2300- 2550	—
Reacción 9 Ig-SH-EGBH Raman	N. E.*	1748	1715.91	—	1655	—	1453	2547.999	727.27
Reacción 10 Ig-SH-EGBH IR	1751.308	1761.64	1723.08	1055.0	1660.6	1535.3	1456.2	—	—
Reacción 10 Ig-SH-EGBH Raman	—	1764.999	1713.999	—	1658	—	1453	2749.999	683

*no existe en ésta molécula.

7.8. ELECTROFORESIS

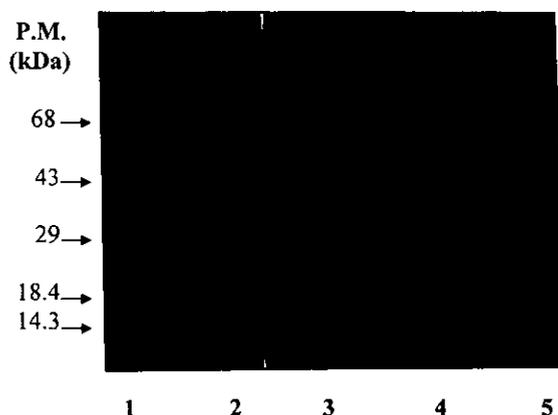


FIGURA 31. Placa de electroforesis, teñida con azul de Coomassie, donde se muestran los carriles: **1.** marcador de P.M. 68 kDa SAB, 43 kDa ovoalbúmina, 29 kDa anhidrasa carbónica, 18.4 kDa β -lactoglobulina y 14.3 kDa lisozoma; **2.** AcMo antiCD5 no acoplados que muestran las bandas pertenecientes a las cadenas pesadas (50 kDa) y ligeras (22 kDa); **3, 4 y 5** inmunocombinados de la reacción (8) (IgG1-SH-Hel) (ver página 49) a diferentes concentraciones, 2 μ g, 4 μ g y 8 μ g respectivamente, donde también se observan las cadenas pesadas (50 kDa) y ligeras (22 kDa).

VIII. DISCUSIÓN

8.1. COLECTA DE *Helenium mexicanum*, HBK.

El éxito en la obtención de los metabolitos secundarios puros a partir de plantas silvestres radica en: la identificación correcta de la especie, en la abundancia y distribución de la planta en la naturaleza y en el método de extracción y purificación, por ello fue importante la colecta y determinación de *Helenium mexicanum*, HBK^{1, 70}, esto último se realizó en el Instituto de Biología de la U.N.A.M. Además, se realizó una segunda colecta de la planta en las cercanías de Texcoco que nos permitió observar que a pesar de que se tiene reportada una amplia distribución de ésta especie dentro del territorio nacional, su abundancia es bastante pobre, a pesar de que se buscó y colectó en época de lluvias cuando sus capítulos florales son evidentes. También se observó que su hábitat está siendo destruido debido a la necesidad de viviendas y de tierras de cultivo, y *H. mexicanum*, HBK es considerada una mala hierba. Por ello es necesario recalcar la importancia de conocer nuestra biodiversidad y de promover el cultivo y la propagación de nuestras especies vegetales, así como su estudio biológico, etnobotánico y químico ya que muchas de ellas tienen propiedades curativas hasta ahora poco estudiadas o conocidas y que podría ser una alternativa para la cura de diversas enfermedades que hasta ahora el hombre no ha podido atacar con éxito.

8.2 OBTENCIÓN DE LOS AGENTES CITOTÓXICOS.

La helenalina es un metabolito secundario presente en el género *Helenium* que tiene varias propiedades biológicas (vermífuga, antimicrobiana, cardiotónica, citotóxica, etc.^{10,17,21,30,38,45,63,66,69,76}) y debido a su alta toxicidad se le ha probado como agente anticancerígeno en diferentes líneas celulares tumorales como son la leucemia linfocítica P388, carcinomas epidermoides humanos y el cáncer de mamas⁵, pero debido a su alta toxicidad no ha sido usado en la clínica. Sin embargo, en el campo

químico ha sido de gran interés y se han sintetizado varios derivados como es el caso del éster de glutarato de bis (helenalinilo) (EGBH) y otros derivados helenalinilos^{9,11,43,49}. También se ha demostrado que los grupos α -metileno- γ -lactona y la cetona α - β insaturada, presentes en la estructura de ambas moléculas, presentan una alta afinidad por los grupos SH libres^{9,11,42,48} (reacción de Michael) y son altamente afines al aminoácido cisteína (Cys), presente en varias proteínas claves dentro del metabolismo celular como son: la hexoquinasa, la polimerasa y la topoisomerasa, éstas dos últimas enzimas intervienen en la replicación del material genético y su inhibición activa el suicidio celular. Por ello en ésta tesis se propuso aprovechar la afinidad y la citotoxicidad de ambos compuestos para acoplarlos a una inmunoglobulina que presentara en su estructura grupos sulfidrilos libres³⁵ y de ésta manera obtener un conjugado de ataque más selectivo y, por lo tanto, menos tóxico y con una mayor selectividad que la helenalina o el EGBH solos.

La helenalina ha sido aislada y purificada a partir del extracto clorofórmico de *H. microcephalum* y de *H. mexicanum* y se han reportado rendimientos de hasta un 30%⁵⁸, pero debido al alto costo de éste disolvente se realizaron varios extractos con otros disolventes (hexano, diclorometano, acetona, acetato de etilo, metanol y agua), y mediante placas cromatográficas se observó que aquel que tenía mayor cantidad de helenalina era el extracto de acetato de etilo, así que la helenalina se purificó a partir de dicho extracto, pero en los resultados que se muestran en la tabla VI (ver página 45) se observa que el rendimiento de la helenalina fue aproximadamente un 50% más bajo de lo reportado esto nos indica que el disolvente usado para la extracción de la lactona (acetato de etilo) fue menos eficiente que el cloroformo. Sin embargo, el acetato de etilo puede ser usado como disolvente alternativo. A pesar del bajo rendimiento obtenido, los datos de punto de fusión (p.f.), el factor de desplazamiento de los compuestos en cromatografía en placa fina (R_f) y los análisis espectroscópicos de infrarrojo (IR)

(figura 20, pág. 49) y de resonancia magnética nuclear (RMN) (figura 22, pág. 51) mostraron una alta pureza de la lactona obtenida ⁵⁷.

Por otro lado, se preparó el EGBH del cual también se han hecho ensayos de citotóxicidad y se ha demostrado que conserva su afinidad hacia grupos tioles, el EGBH se obtuvo siguiendo el método descrito por Lee⁴². En dicha reacción se enlazan dos moléculas de helenalina mediante un enlace éster que puede confirmarse mediante IR (figura 20, pág. 20) y se obtuvo un 29.1% del producto puro, a partir de un gramo de helenalina, contra un 30% del obtenido por Lee *et. al.*⁴² (ver tabla VII, pág. 46). La pureza fue confirmada por los valores del R_f, IR y EM (tabla VII y figuras 20, 21 y 22, pág. 49-51), y los resultados fueron muy semejantes a los reportados comprobándose de ésta manera la formación del enlace éster y la pureza del producto. El objetivo de obtener la helenalina y de sintetizar el EGBH fue el de comparar la probabilidad de enlace existente entre ambas moléculas hacia Ig-SH libres y el hecho de que el EGBH es más citotóxico, lo hace ser una molécula atractiva como potente agente antitumoral y posible componente de un inmunoconjugado.

8.3. ENSAYOS DE SOLUBILIDAD DE LOS AGENTES CITOTÓXICOS.

Para realizar la reacción de acoplamiento y favorecer la formación de los conjugados de la helenalina y del EGBH fue importante determinar el medio de reacción donde se llevaría a cabo. Ya que al obtener un medio homogéneo las moléculas tendrían una mayor probabilidad de acoplamiento y con ello la reacción se vería favorecida. Partiendo del hecho de que los anticuerpos son moléculas hidrofílicas (afines al agua), fue necesario realizar ensayos de solubilidad con los agentes citotóxicos en medios acuosos. La selección de algunos disolventes hidromiscibles se basó en los estudios de toxicidad *in vitro* con los agentes citotóxicos reportados en la literatura ^{11,23,38,44,85}. En la tabla VII se muestran los valores del R_f y

en la tabla IX (pág. 53) se muestran las pruebas de solubilidad de los agentes citotóxicos, los cuales evidencian que la helenalina es un compuesto más polar y, por lo tanto, más hidrofílico que su derivado helenalinilo. De éste ensayo fueron seleccionadas las siguientes soluciones para la helenalina: DMSO-SSAF 1:3.3, DMF-SSAF 1:3.3, SSAF pH 7.0 y el EG-SSAF 0.05% (el etilenglicol, EG, también es conocido como carbowax). Las soluciones con Tween 20 y 80 fueron descartadas ya que a pesar de que la solubilidad de la lactona fue satisfactoria son detergentes que podrían ocasionar la desnaturalización de los anticuerpos, y con ello, la pérdida de su actividad biológica, es decir, el reconocimiento. En cambio, el dímero fue soluble sólo en dos soluciones: DMSO-SSAF 1:3 y DMF-SSAF 1:3.3. La baja solubilidad del dímero se debe a que su estructura posee 35 átomos de carbono y su peso molecular es mayor al de la helenalina lo que le confiere características hidrófobas, pero éste problema podría solventarse con la síntesis de otro derivado de la helenalina que fuese más hidrosoluble y que a la vez conservara o incrementara su actividad citotóxica, con respecto a la lactona. También, se ha reportado la síntesis de otros derivados (epóxidos⁴³, alquilo substituidos²⁹, aductos aminados⁴¹) cuya actividad citotóxica ha sido probada mediante ensayos *in vitro* y que podrían ser opciones para la síntesis de nuevos conjugados, además la molécula de la helenalina puede ser acoplada a azúcares o bien se podría sintetizar una sal sódica o potásica de la lactona.

8.4 RENDIMIENTO E ISOTIPIFICACIÓN DE LAS Ig OBTENIDAS.

En cuanto al rendimiento de los anticuerpos policlonales murinos (de ratón) obtenido en el ensayo de inmunización con diferentes antígenos fue muy variable dependiendo del antígeno administrado y del volumen de suero obtenido en cada población de ratones (ver tabla VIII y gráfica I, pág. 52). El rendimiento más bajo se registró con el suero albúmina bovina (SAB) porque en este ensayo sólo fueron inmunizados cuatro ratones y la cantidad de suero obtenido fue de 1ml. Los otros dos inmunógenos

(suero fetal bovino (SFB) y tuberculina-SFB) observaron un rendimiento semejante, ya que el volumen de suero fue de aproximadamente 2ml por cada población de 10 ratones, y en el último ensayo realizado con tuberculina-SFB el rendimiento se optimizó debido a que se obtuvo 3 ml de suero murino del sangrado a blanco. Debido a que éste último presentó un mayor rendimiento de las inmunoglobulinas para la realización de los ensayos de acoplamiento. En cuanto a los subtipos de inmunoglobulinas obtenidas se observaron los siguientes: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA e IgM. Pero sólo se aislaron y acoplaron, mediante la columna de sefarosa A, las clases de IgG y las IgA.

8.5. INCORPORACIÓN DE GRUPOS SH LIBRES EN Ig Y SÍNTESIS DE LOS CONJUGADOS Ig-SH-HELENALINA E Ig-SH-EGBH.

Además, para aumentar la probabilidad de enlace de la reacción de Michael se adicionaron grupos sulfidrilos libres (R-SH) a las moléculas de inmunoglobulina mediante el reactivo de SATA (éster N-hidroxisuccinimida del ácido S-acetil tioacético) el cual forma enlaces covalentes al reaccionar con las aminas primarias presentes en la proteína. Los grupos sulfidrilos se encontraban protegidos (acetilados), para dejarlos libres se hicieron reaccionar con una solución de desacetilación que contiene hidroxilamida⁵⁸ (reacción (2) y (3), ver figuras 16 y 17, pág. 40 y 42).

Posteriormente se realizó la reacción de Ellman para confirmar que la presencia de R-SH en la muestra de Ig, ésta en todos los casos fue positiva.

Una vez obtenidos los agentes citotóxicos, de haber seleccionado los medios de reacción, de haber obtenido las inmunoglobulinas y de haberles adicionado los grupos sulfidrilos libres, se procedió a acoplarlos bajo condiciones diferentes de temperatura y tiempo, y de ésta manera poder establecer las condiciones ideales de acoplamiento.

Para el acoplamiento de la helenalina se usó primeramente SSAF a pH 7.0 (4), en el cual el rendimiento fue alto (22.6 mg) debido a que se duplicaron las cantidades de Ig-SH y de helenalina. Por otro lado, la reacción de Ellman fue negativa y la isotipificación fue positiva, lo que implica que hubo acoplamiento y que las inmunoglobulinas se encuentran presentes en el producto de la reacción. En la reacción (5) se usó como medio de reacción DMSO-SSAF 1:1.5, cuya reacción de Ellman fue ligeramente positiva y los isotipos de las inmunoglobulinas fueron identificados, sin embargo, el rendimiento fue de 9.5 mg, probablemente debido a que no todos los R-SH reaccionaron con la lactona. Las reacciones (6), (7) y (8) se realizaron en un medio de Carbowax-SSAF 1:2, donde la reacción de Ellman fue ligeramente positiva y a pesar de que se usó la misma solución para estas tres reacciones el rendimiento fue muy bajo en la (8). Una característica que compartieron estas tres últimas reacciones y que llamó la atención, fue la determinación de un único isotipo: la IgG1 después de la reacción. El bajo rendimiento y la ligera positividad de la prueba de Ellman conlleva a pensar que el medio de reacción es altamente selectivo ya que sólo sobreviven éstas Ig, probablemente las otras Ig se fragmentan por lo tanto solo se forman conjugados IgG1-SH-HEL. Es importante recalcar que en todos los ensayos realizados las reacciones siempre fueron heterogéneas y que al principio se creyó que era debido a la precipitación de por la desnaturalización de las mismas pero al obtener los resultados de isotipificación se observa la presencia de los anticuerpos y probablemente su estructura no se ve afectada, pero todavía faltarían realizar ensayos *in vitro* e *in vivo* para observar la selectividad y la citotoxicidad del inmunoconjugado.

En cuanto a las reacciones (9) y (10) correspondientes al acoplamiento del EGBH y que se realizaron en DMF pero a diferentes temperaturas (temperatura ambiente y 4°C respectivamente), tanto las prueba de Ellman como la isotipificación fueron negativas lo que nos indica que se lleva a cabo la reacción de Michael, es decir, hay acoplamiento pero los anticuerpos se desnaturalizan o se fragmentan perdiéndose de ésta manera dominios antigénicos importantes para su reconocimiento.

8.6. ANÁLISIS ESPECTROSCÓPICO DE LAS REACCIONES DE ACOPLAMIENTO.

Para la obtención de los espectros patrones e identificación de las señales características de las moléculas se usaron muestras puras de helenalina (figura 18 y 23, pag. 47y 80), EGBH (figuras 19 y 24, pag 49 y 81), de L-Cisteina (figuras 28 y 29, pag. 85 y 86) y de los anticuerpos antes y después de la reacción con SATA (figuras 25, 26 y 27 pag. 82, 83 y 84 respectivamente). Los espectros de Raman y de IR mostraron valores pertenecientes a los grupos OH, lactona y ciclopentenona de los grupos citotóxicos y de las señales amidas I, II y III pertenecientes a los anticuerpos. Sin embargo, algunas señales sólo fueron registradas por una u otra técnica espectroscópica como fueron el doble enlace C=C y el enlace éster del dímero las cuales fueron detectadas solo en IR. En cuanto a los grupos sulfidrilo libres R-SH fueron detectados solamente en IR, cuando la concentración era muy alta, como una zona de señales débiles entre los 2400-2625 cm^{-1} , pero la señal fue más clara y fuerte en Raman, y por último, con ésta técnica también fue detectada la señal perteneciente al enlace C-S presente en la L-Cys.

Por otra parte, los espectros de IR de las reacciones (4) y (5), donde se sintetizaron conjugados Ig-SH-HEL (ver tabla XIV y figuras 30-34, pág. 58, 87-90), se observaron señales características tanto de la lactona (OH, lactona, ciclopentenona y C=C) como de la Ig (Amidas I, II y III), así como la desaparición de la zona de señales de los grupos SH libres en IR (que en el anticuerpo habían sido incorporados mediante la reacción de SATA), las señales débiles de los SH libres y del enlace C-S en Raman nos dan evidencias de la conjugación mediante la reacción de Michael.

En cuanto a los espectros de IR de los conjugados Ig-SH-EGBH, resultantes de las reacciones (9) y (10) (tabla XV, pág. 59 y figuras 34-37, pág. 91-94), se observaron las señales características del dímero y de los anticuerpos lo que nos indican

su presencia. También fueron observadas las señales propias de los grupos R-SH, C-S y OH, aún después de la reacción (ya que se esperaba la disminución de la señal R-SH). En el espectro de Ellman se observa una señal de R-SH mayor a la presentada por las otras reacciones estudiadas, lo cual es significativo, ya que probablemente durante reacción las Ig se desnaturalizan y ello explicaría el resultado negativo de la reacción de Ellman, otra posibilidad es que la tasa de reacción fuera muy baja o poco significativa como para ser registrado en el espectro, probablemente el factor desnaturalizante fue el DMF que fue usado como medio en ambas reacciones.

8.7. ELECTROFORESIS

El gel de electroforesis del conjugado resultante de la reacción (8) (ver figura 31, pág. 60), cuyo rendimiento fue muy bajo, fue realizado para observar algún cambio en el peso molecular (P.M.) tomando como muestra blanco un anticuerpo monoclonal antiCD5 que es también una inmunoglobulina IgG1, pero no se observa ningún cambio significativo en la electroforesis en el P.M. del conjugado IgG1-SH-Hel. Probablemente se debe a que la molécula de helenalina tiene un P.M. muy pequeño, de 262 Da, a comparación de la inmunoglobulina que es de 150,000 Da y al sumarse al P.M. del Ac no afecta considerablemente el corrimiento electroforético.

IX. CONCLUSIONES

- * El acetato de etilo se sugiere como un solvente alternativo para la extracción de helenalina a partir de *Helenium mexicanum*, HBK.
- * El EGBH es un compuesto altamente hidrófobo, pero la síntesis es sencilla y relativamente rápida (12 h) y el rendimiento fue cercano al reportado.
- * La incorporación de grupos SH libres mediante el reactivo de SATA favorece el acoplamiento de la helenalina con los anticuerpos.
- * De las reacciones realizadas las condiciones de la reacción (4) fueron, en cuanto a rendimiento, las más favorables para el acoplamiento de la helenalina hacia las inmunoglobulinas: pH neutro, SSAF como medio de reacción y temperatura ambiente, durante 24 h de reacción.
- * Las reacciones (6), (7) y (8) donde se usó Carbowax-SSAF favorecieron sólo el acoplamiento de inmunoglobulinas del tipo IgG1 con la helenalina, por lo que podemos decir que éste medio fue altamente selectivo.
- * En las reacciones (9) y (10) la DMF usada como medio de reacción provocó la desnaturalización de las inmunoglobulinas incrementándose la exposición de grupos R-SH propios de las moléculas y también desfavoreció el acoplamiento entre el dímero y las inmunoglobulinas.

- * Los espectros de IR y Raman son herramientas útiles para la identificación de señales características en reacciones de acoplamiento para la síntesis de inmunoconjugados como fueron las reacciones (4), (5), (9) y (10) realizados en éste trabajo. Por lo que el empleo de dichas técnicas sería muy útil para el análisis de posteriores síntesis de inmunoconjugados mediante la reacción de Michael.
- * Por los resultados anteriormente discutidos se deduce que el sistema α -metilen- γ -lactona se acopla a los grupos sulfhidrilos libres presentes en la molécula de inmunoglobulina mediante la reacción de Michael por lo que el acoplamiento de la helenalina y de otras lactonas a anticuerpos es factible para la formación de nuevos inmunoconjugados.

X. PROPUESTAS A FUTURO

- * Aumentar la solubilidad de la helenalina mediante otras soluciones como medio de reacción o mediante medios físicos que aumenten la homogeneidad de la reacción, pero que no provoquen alteraciones en la estructura y función de los anticuerpos.
- * Síntesis de un derivado de helenalina más hidrofílico como una sal o un azúcar.
- * Formación de un inmunocombinado helenalina altamente selectivo con anticuerpos monoclonales humanos o a fracciones F(ab), para favorecer la selectividad de ataque y /o difusión en el tejido canceroso.
- * Cristalización del inmunocombinado para estudios por R-X para confirmar una vez más el acoplamiento de ambas moléculas.
- * Formación de otros combinados con moléculas citotóxicas que contengan en su estructura el grupo α - metileno- γ -lactona.
- * Ensayos *in vitro* e *in vivo* con animales de laboratorio que desarrollen alguna enfermedad neoplásica o autoinmune.

XI. GLOSARIO

Ácido nucleico. Molécula de carácter ácido que contiene ácido fosfórico, azúcar y bases purínicas y pirimídicas; dos ejemplos son: el ácido ribonucleico (RNA) y el ácido desoxirribonucleico (ADN).

Adyuvante. Sustancia que aumenta de manera no específica la respuesta inmunitaria contra un antígeno. Por ejemplo, el adyuvante de Freund es una mezcla de minerales y de microbacterias muertas que es muy utilizado en laboratorio.

Adueto. Compuesto químico formado por la adición de dos especies químicas.

Amida. Clase de compuestos orgánicos que tiene el radical CONH_2 .

Amina. Clase de compuestos orgánicos que es considerada derivada de amonios por sustitución de uno o más hidrógenos por radicales orgánicos.

Aminopterinas. $\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{N}_8\text{O}_5 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Ácido cristalino y amarillo, el cual es similar al ácido fólico y es usado clínicamente como antagonista del ácido fólico.

Anticancerígeno. Agente que ataca o inhibe el crecimiento o la división celular tumoral.

Anticuerpo. Glicoproteínas compuestas de una o más unidades producidas en respuesta a la presencia de un agente extraño.

Anticuerpo monoclonal. Son anticuerpos producidos por una única línea celular y que sólo reconoce a un solo determinante antigénico (epitopo), dentro de un complejo antigénico.

Anticuerpo policlonal. Anticuerpos producidos por diferentes líneas celulares los cuales reaccionan con diferentes epitopos contra el mismo antígeno.

Antígeno. Molécula que identifica a una bacteria o invasor como extraño.

Antimicrobiano. Que inhibe el crecimiento microbiano.

Apoptosis. Desencadenamiento de la muerte celular programada.

Aquenio. Fruto pequeño, seco e indehiscente formado por un ovario simple y una única semilla.

Blastocitos periféricos. Célula embrionaria indiferenciada.

Carbodiimida. Compuesto usado comúnmente como agente enlazante en la síntesis de inmunocombinados, ya que su reacción involucra la conjugación de grupos carboxilos a pH neutro.

Cardiotónico. Propiedad de algunas sustancias para aumentar el tono muscular cardíaco (contracción).

Célula mielomatosa. Linfocito B maligno e inmortal.

Citocinas. Término genérico que designa las moléculas mensajeras solubles que permiten las interacciones intercelulares o que median ciertos efectos biológicos.

Citotoxicidad. Capacidad de algunos compuestos de inhibir de alguna manera el metabolismo celular y provocar la muerte de la célula.

Complemento. Grupo de proteínas séricas cuya activación en cascada se traduce por la aparición de sustancias implicadas en la inflamación, la activación de células fagocitarias y la lisis de membranas celulares.

Conjugación. Unión covalente entre dos moléculas.

Dehiscencia. Abertura espontánea de un órgano o estructura a lo largo de ciertas líneas o en una dirección definida.

Determinante antigénico. Ver epítopo.

Dextran. Es un polímero de glucosa que se encuentra naturalmente en varios alimentos y brebajes. Este polisacárido ramificado está compuesto de unidades de glucosa formadas por la acción de una bacteria *Leuconostoc mesenteroides*.

Dominio. Es la región de una proteína que presenta un pliegue en el espacio caracterizado.

Enlace covalente. Enlace en el cual cada átomo de un par enlazado contribuye con un electrón par formar un par de electrones.

Enona. Grupo de estructuras químicas que se caracterizan por presentar un doble enlace *eno* y un grupo metil en *ona*.

Epítopo. Una región específica del antígeno que puede ser reconocido por un anticuerpo.

Epóxido. Función constituida por el enlace de dos átomos de carbono pertenecientes a una cadena con un átomo de oxígeno ajeno a la misma.

Ester. Producto de la reacción entre un alcohol y un ácido, formado por la salida de agua del grupo carboxilo y el grupo hidroxilo de un ácido.

Flabeladas. Con proyecciones en forma de abanico.

Gene. Unidad básica de la herencia mediante la cual las características hereditarias se transmiten de padres a hijos.

Glabro. Sin vellosidades en su superficie.

Hibridoma. Un mieloma híbrido formado por la fusión de células de mieloma con linfocitos que producen un anticuerpo específico, las células pueden ser clonadas y producir grandes cantidades de anticuerpos idénticos (monoclonales).

Hipoxantina (HPGRT). Enzima hipoxantina guanina fosforibosil transferasa que interviene en la síntesis de ácidos nucleicos.

Índice de acoplamiento. Número de moles de un agente citotóxico acoplados por molécula de inmunoglobulina.

Inmunología. Rama de la ciencia biológica que estudia la resistencia nativa o adquirida de las formas animales y vegetales contra las infecciones por microorganismos.

Inmunoquimioconjugado. Agente citotóxico unido a una molécula de inmunoglobulina.

Inmunoradioisótopo. Conjugado compuesto de un isótopo y una molécula de inmunoglobulina.

Inmunotoxina. Conjugado de una toxina (proteína tóxica) con una molécula de inmunoglobulina.

Inotrópico. Propiedad que poseen algunas sustancias de aumentar la frecuencia cardiaca en un organismo.

Involucro. Círculo de brácteas en la base de una cabezuela compacta.

γ -lactona. Ester interno de los γ hidroxíácidos, es decir, de los ácidos que tienen un grupo oxhidrilo en γ con respecto al carboxilo y forman un heteroanillo de 4 átomos de carbono y un oxígeno.

Leucemia. Desorden maligno de células blancas en la sangre cuyos precursores proliferan y dejan de diferenciarse.

Lígula. Crecimiento membranoso unido a la hoja y a la hoja envainada; corola en forma de lengua.

Linfoma. Tumor de tejidos linfoides (bazo, ganglios, etc.)

Lisis. Disolución de una célula o tejido por la acción de enzimas llamadas lisinas.

Lobadas. Hojas que tienen el margen cortado en divisiones redondeadas que no llegan hasta la base.

Melanoma. Lunar hiperpigmentado sobre la piel, algunos de los cuales son altamente invasivos (melanoma maligno).

Mercaptan o tiol. Son un grupo de compuestos organosulfurados que derivan de un sulfuro hidrogenado, tienen olor desagradable característico y se han encontrado en otros compuestos sulfurados en el petróleo crudo: un ejemplo es el mercapto metilo.

Mieloma. Tumor primario de la médula ósea.

Neoplasia. Proliferación celular descontrolada que produce un tejido adicional. Este término es usado para referirse a la proliferación maligna de células cancerosas.

Opsonización. Es el reconocimiento de un microorganismo, extraño al cuerpo, mediante moléculas que dirigen su destrucción por fagocitosis.

Pedúnculo. Tallo que sostiene a la flor.

Pubérulo. Cubierto por finas y pequeñas vellosidades.

Purinas. Compuesto heterocíclico que contiene una pirimidina fusionada y anillos de imidazol; la adenina y la guanina son los componentes purinas de los ácidos nucleicos y coenzimas.

Radiosótopos. Dícese de los átomos cuyos núcleos tienen el mismo número de protones y electrones, pero diferente número de neutrones y que tienen la capacidad de que al desintegrarse el núcleo de manera espontánea emita partículas o radiaciones electromagnéticas.

Receptáculo. Punto final de un pedicelo o péndunculo y es una de las partes donde las flores crecen.

Reflejo. Propiedad de girar abruptamente hacia atrás.

Replicación. Duplicación o copia de un patrón determinado.

Sarcoma. Tumor maligno en tejido conectivo.

Toxina. Sustancia venenosa de origen microbiano, animal o vegetal la cual induce la formación de una antitoxina en el cuerpo animal

Xenoinjerto. Injerto de tejido en el cual el donador y el receptor no pertenecen a la misma especie.

XII. APÉNDICES

APÉNDICE 1. *Helenium mexicanum*, HBK.

CLASIFICACIÓN

La clasificación botánica de la especie es como sigue:

Reino: Vegetal.

División: Fanerógamas.

Clase: Dicotiledoneae.

Orden: Sinandreae.

Familia: Compositae (Asteraceae).

Género: *Helenium*.

Especie: *Helenium mexicanum*, HBK.

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA

Planta anual o bienal, erecta, hasta de 1.5 m de largo simple o ramificada; tallo estriado, pubérulo en la parte superior, glabro en la inferior, alado; hojas lineares a linear-oblancoeladas, las inferiores de hasta 10 cm de largo y 1 cm de ancho. Las hojas superiores más cortas y angostas, glabras o esparcidamente pubérulas; cabezuelas varias o muchas sobre pedúnculos hasta de 15 cm de largo, pubérulos; involucreo reflejo en la floración, sus brácteas más o menos unidas entre sí, de 3-5 mm de largo, linear oblongas, agudas, pubérulas receptáculo y disco subsférico; flores liguladas fértiles, amarillas, sus láminas de 7 a 18 mm de largo, flabeladas, profundamente lobadas, reflejas en la floración; flores del disco más o menos 300, sus corolas de 1.5 a 2.5 mm de largo, amarillas con los lóbulos café o morados y pubescentes; aquenio de 1 a 1.5 mm de largo, sericeros, vilano de \pm 6 escamas, de 0.5 a 1.2 mm de largo, apiculadas o aristadas.

Se le conoce con los nombres comunes de "amargosa", "cabezona", "hierba de las ánimas", de Huehuetoca a Texcoco, Cd. de México e Ixtacalco.

Originaria de México. Se le ha encontrado en hábitats subacuáticos principalmente como en orillas de canales, charcos y lugares de suelo húmedo, en climas cálidos, semicálidos y templados entre los 2250-2600 m.s.n.m.

APÉNDICE 2. Revelador cérico.

300 g de hielo

12 g de sulfato cérico.

22 ml de ác. Sulfúrico.

Mezclar y calentar a disolución.

APÉNDICE 3. Soluciones usadas para la obtención de Ig

SSAF

NaCl 16.0 g

Na₂HPO 4 5.8 g

KH₂PO₄ 0.4 g

KCl 0.4 g

Aforar a 2 l y ajustar el pH con NaOH

APÉNDICE 4. Soluciones usadas para la desacetilación de Ig.

EDTA-SSAF pH 7.0

50 mM de fosfato de sodio dibásico.

1mM de EDTA.

Ajustar el pH

Solución de desacetilación.

Preparar 1.74 g de hidroxilamina*HCl y 0.475 g de EDTA como sales de tetrasodio en 40 ml de fosfato de sodio 62.5 mM a pH 7.0 con NaOH y aforar a 50 ml con agua destilada.

La composición final del éste buffer es de 50 mM de fosfato de sodio, 25 mM de EDTA, 0.5 M de hidroxilamina*HCl, a pH 7.0.

APÉNDICE 5. Soluciones usadas en electroforesis.

Acrilamida al 30%

Pesar 30 g de acrilamida o 0.8 g de bis-acrilamida, aforar a 100ml con agua destilada. Filtrar la solución usando una membrana de 0.45 protegiéndola de la luz a 4°C. Guardarlo no más de 1 mes.

SDS al 10 %

Pesar 10 g de SDS y aforar a 100 ml con agua destilada. Filtrar después de ajustar el volumen y guardar a temperatura ambiente.

Buffer de TRIS-HCl (1.5 M y pH 8.8)

Pesar 18.17 de TRIS y aforar hasta 100 ml con agua destilada. Ajustar el pH a 8.8 con HCl concentrado y aforar a 100 ml filtrar con Whatman No. 1 y guardar a 4 °C, no más de un mes.

Buffer TRIS-HCl (0.5 M y pH 6.8)

Pesar 6.057 g de TRIS y aforar a 100 ml con agua destilada.

Gel separador (10 % Acrilamida, TRIS 0.375 M)

	5ml
H ₂ O	2.0
30% de la sol. de acrilamida	1.7
1.5 M TRIS (pH 8.8)	1.3
10% SDS	0.05
10% APS	0.005
TEMED	0.002

Buffer muestra.

Glicerol	2 ml
SDS 10%	2 ml
TRIS pH6.8, 0.5 M	2 ml
Mercapto etanol	100 µl
Azul de branofenol	una pizca.

Gel concentrador

	5 ml
H ₂ O	3.40
Acrilamida 30 %	0.85
TRIS 1.0 M a pH 6.8	0.65
SDS 10 %	0.05
APS 10 %	0.05
TEMED	0.005

Azul de Coomasie

Adicionar 50 ml de metanol a 0.025 g de azul brillante de Coomassie y agitar durante 10 min. Posteriormente verter 45 ml de agua destilada y 5ml de ácido acético glacial. Usar sólo una vez.

Solución de desteñido.

Mezclar 7.5 ml de ácido acético glacial con 5 ml de metanol y aforar a 100 ml con agua destilada Guardar a temperatura ambiente.

APÉ NDICE 6. Espectros de infrarojo y Raman realizados durante el seguimiento experimental.

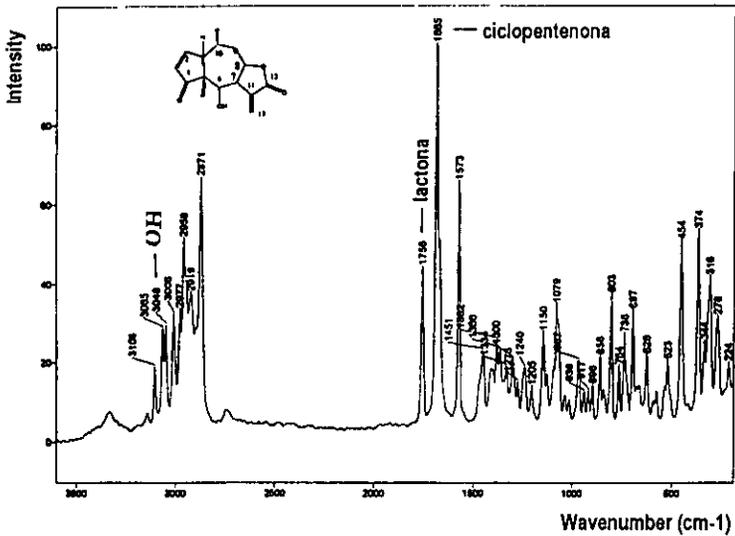


FIGURA 23. Espectro de Raman (KBr) de la helenalina pura donde se muestran las siguientes señales: 3048 (hidroxilos), 1756 (lactona) y 1685 cm⁻¹ (ciclopentenona).

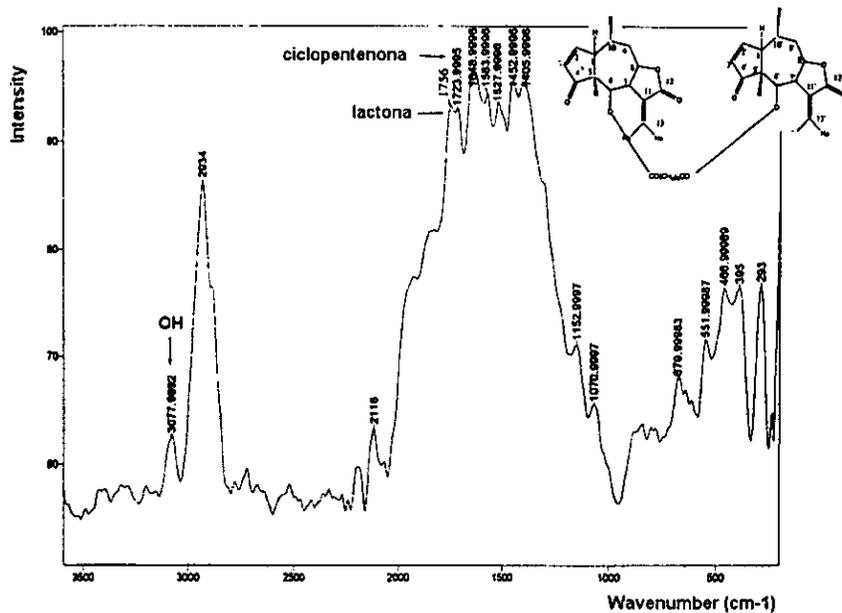


FIGURA 24. Espectro de Raman (KBr) del dímero sintetizado (EGBH). Donde se muestran las siguientes señales: 3077.992 (hidroxilos), 1756 (lactona) y 1723.995 cm^{-1} (ciclopentenona).^{6,58}

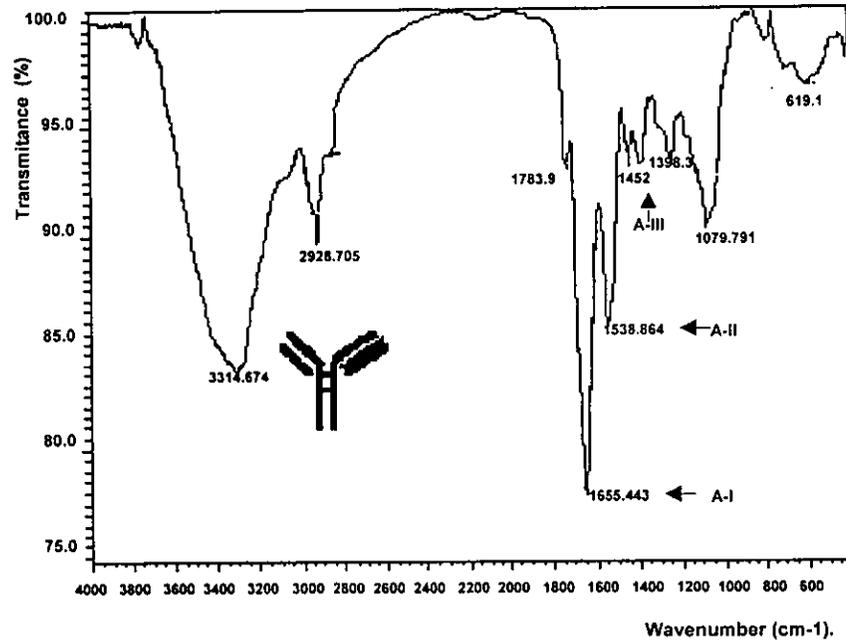


FIGURA 25. Espectro de IR (KBr) del anticuerpo antes de la reacción de SATA. Donde se muestran las siguientes señales: 1655.443 (Amida I, A-I), 1538.864 (Amida II, A-II) y 1398.3 (Amida III, A-III).^{6,25}

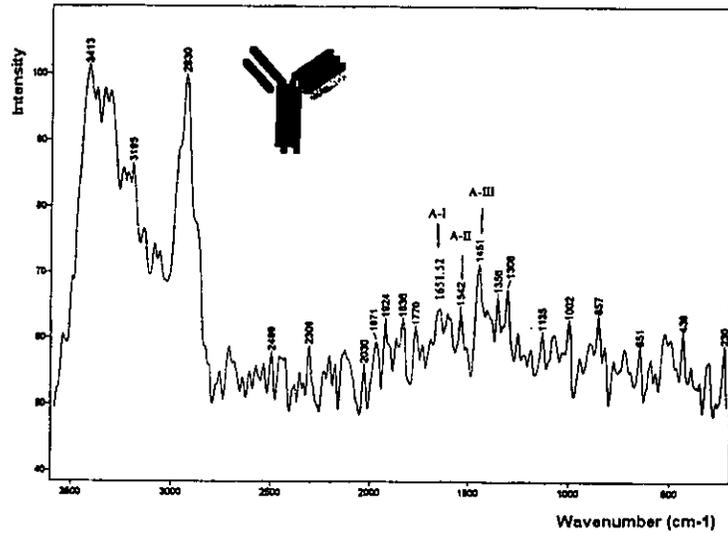


FIGURA 26. Espectro de Raman (KBr) del anticuerpo antes de la reacción de SATA donde se muestran las señales siguientes: 1651.52 (Amida-I, A-I), 1542 (Amida-II, A-II), 1451 (Amida-III, A-III).^{6,25}

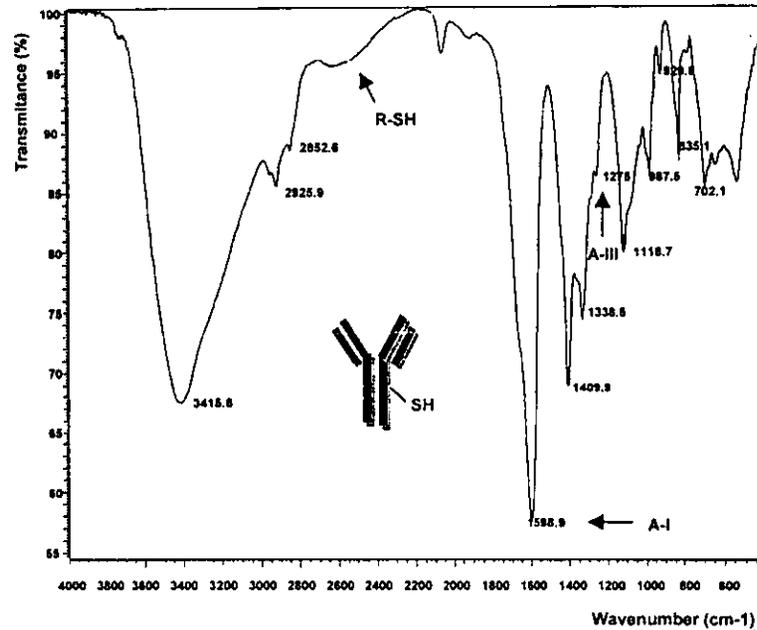


FIGURA 27. Espectro de IR (KBr) de la inmunoglobulina después de la reacción con SATA y de desacetilación. A continuación se dan las señales observadas: 1598.9 (Amida I, A-I) y 1275 (Amida III, A-III), también se observa que entre los 2400 y 2625 cm⁻¹ existe una zona de señales débiles que pertenecen a los grupos R-SH adicionados durante la reacción.

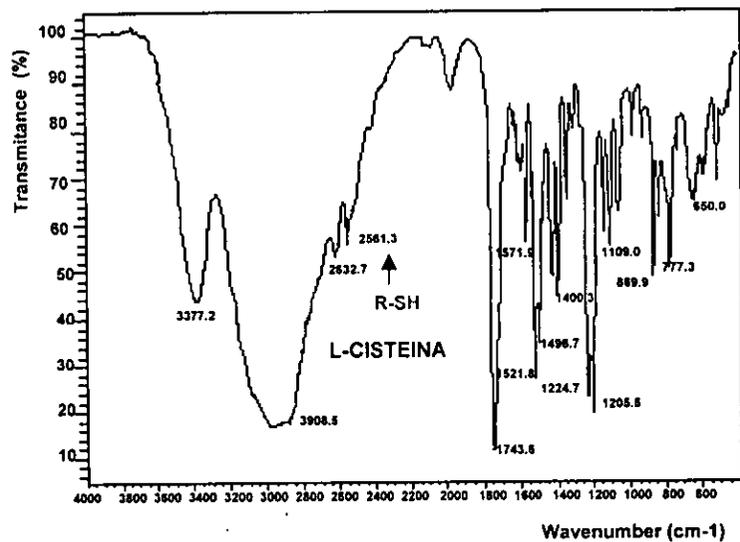


FIGURA 28. Espectro de IR (KBr) de L-Cisteina donde se identificaron la señal perteneciente a los grupos R-SH a 2561.3 cm^{-1} .

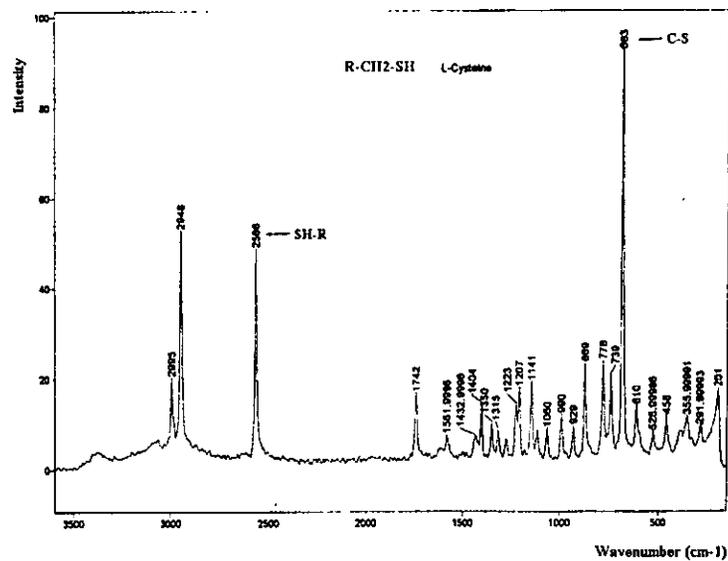


FIGURA 29. Espectro de Raman (KBr) de L-Cisteina donde se identificaron las señales pertenecientes a los grupos R-SH a 2566 y al enlace C-S a 683 cm⁻¹.⁶

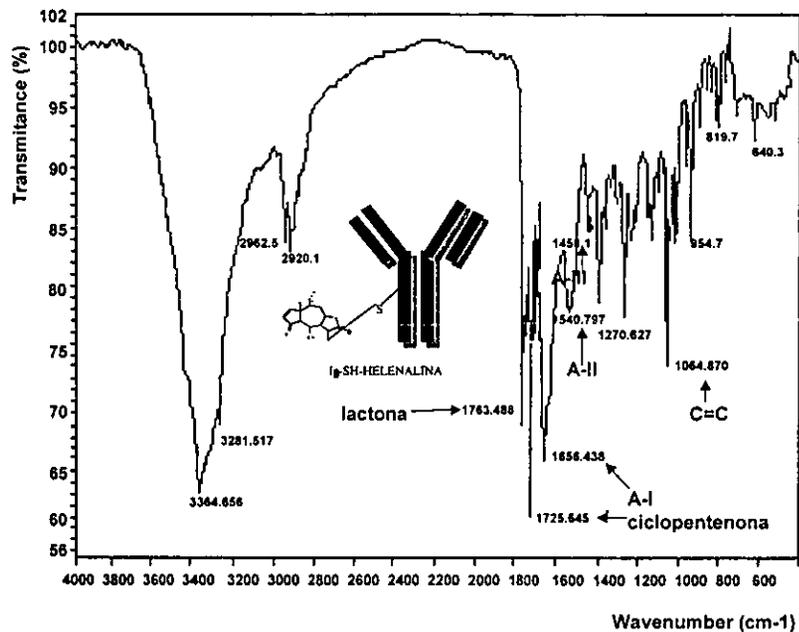


FIGURA 30. Espectro de IR (KBr) del conjugado Ig-SH-HEL de la reacción (4), donde se observan las siguientes señales: 1763.488 (lactona), 1725.645 (ciclopentenona) y 1064.870 cm^{-1} (C=C) pertenecientes a la helenalina y 1656.438 (Amida I, A-I), 1540.797 (Amida II, A-II) y 1458.1 cm^{-1} (Amida III, A-III) del anticuerpo.

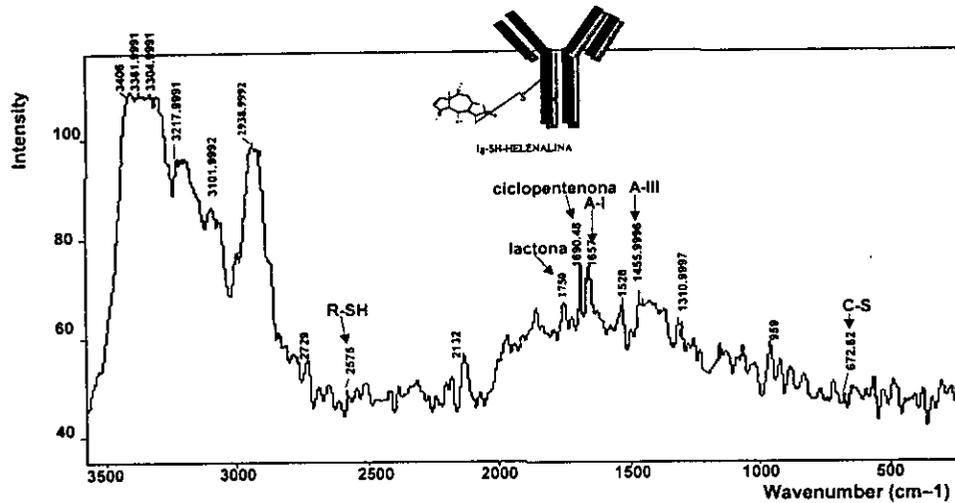


FIGURA 31. Espectro de Raman (KBr) perteneciente al conjugado helenalina producto de la reacción (4) donde se observan las siguientes señales: 1750 (lactona) y 1690.48 (ciclopentenona) de la helenalina; 1657 (Amida I, A-I) y 1455.9996 (Amida III, A-III) del anticuerpo; y 2575 (R-SH) y 672.62 (C-S) del conjugado Ig-SH-helenalina.⁶

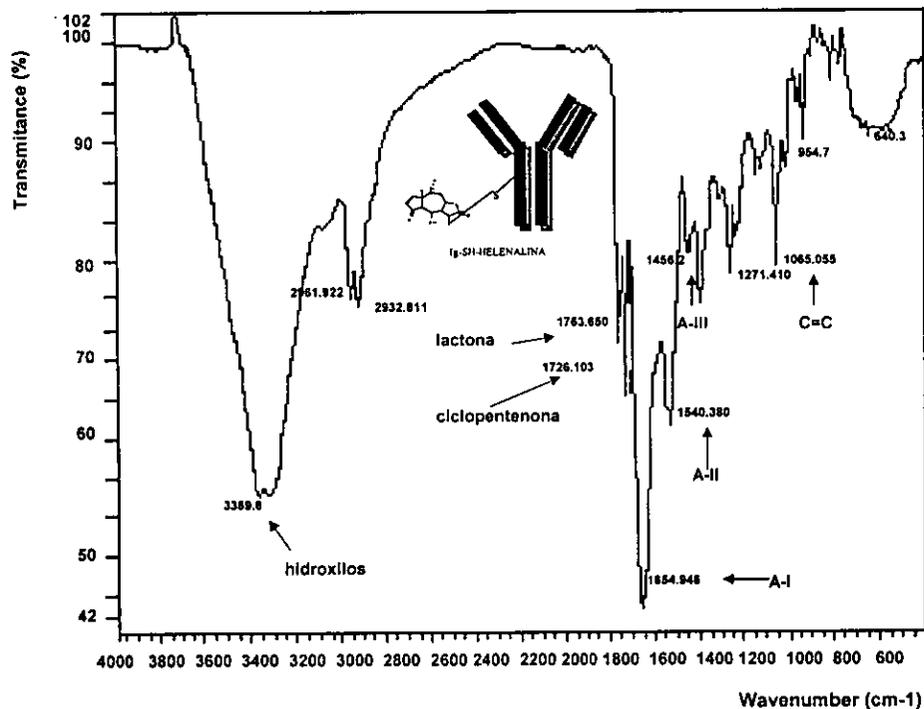


FIGURA 32. Espectro de IR (KBr) del conjugado Ig-SH-HEL de la reacción (5), donde se muestran las siguientes señales: 1763.650 (lactona), 1726.103 (ciclopentenona) y 1065.055 (C=C) pertenecientes a la helenalina; 1654.946 (Amida I, A-I), 1540.380 (Amida II, A-II) y 1456.2 (Amida III, A-III) pertenecientes al anticuerpo.

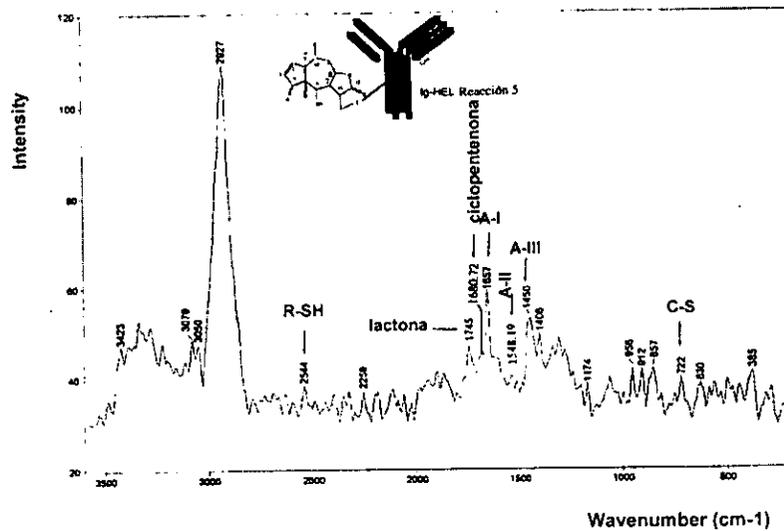


FIGURA 33. Espectro de Raman (KBr) del conjugado Ig-SH-HEL de la reacción (5), donde se muestran las siguientes señales: 2544 (R-SH), 1745 (lactona), 1680.72 (ciclopentenona), 1657 (Amida I, A-I), 1548.19 (Amida II, A-II), 1450 (Amida III, A-III) y 722 (C-S).

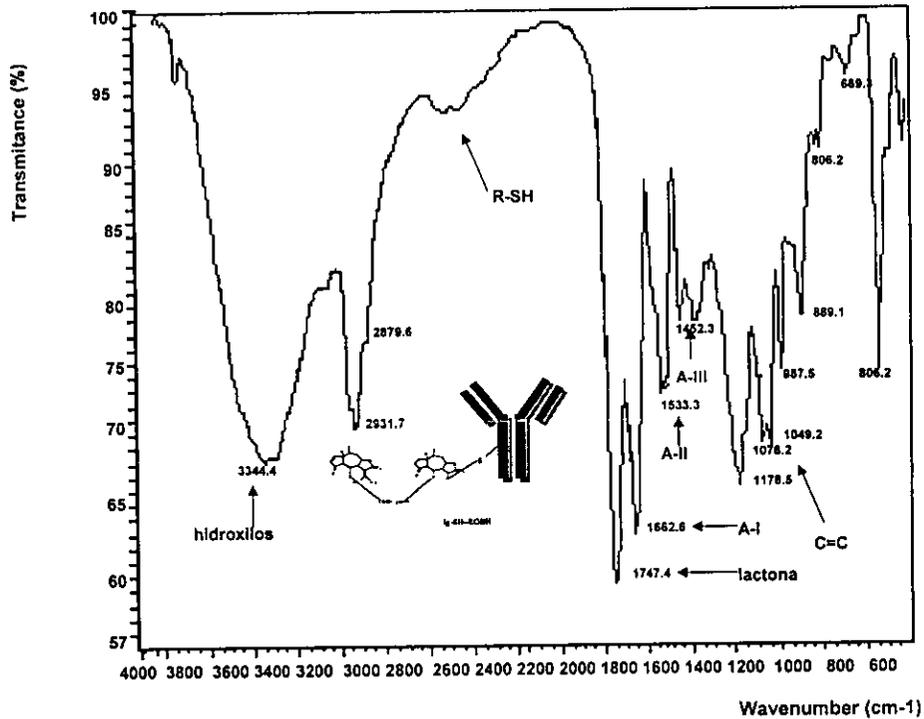


FIGURA 34. Espectro de IR (KBr) donde se observan las señales del conjugado Ig-SH-EGBH resultante de la reacción (9): 1747.4 (lactona) y 1076.2 (C=C) pertenecientes al EGBH y 1662.6 (Amida I, A-I), 1533.3 (Amida II, A-II) y 1452.3 (Amida III, A-III) pertenecientes al anticuerpo.

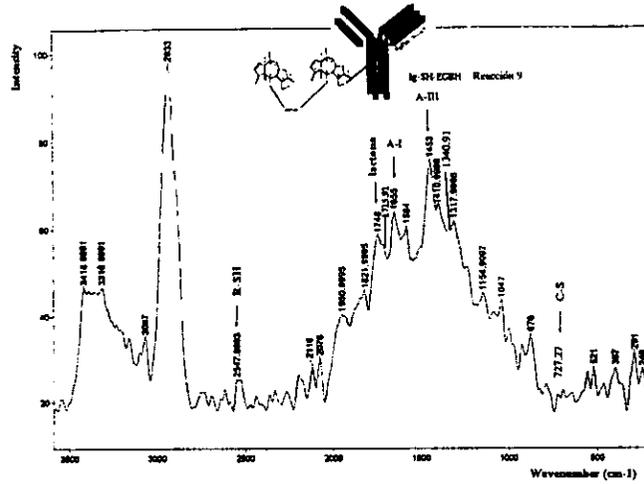


FIGURA 35. Espectro de Raman (KBr) donde se observan las señales resultantes del conjugado Ig-SH-EGBH de la reacción (9): 2547.9993 (R-SH), 1748 (lactona), 1715.91 (ciclopentenona), 1655 (Amida I, A-I), 1453 (Amida III, A-III) y 727.27 (C-S).

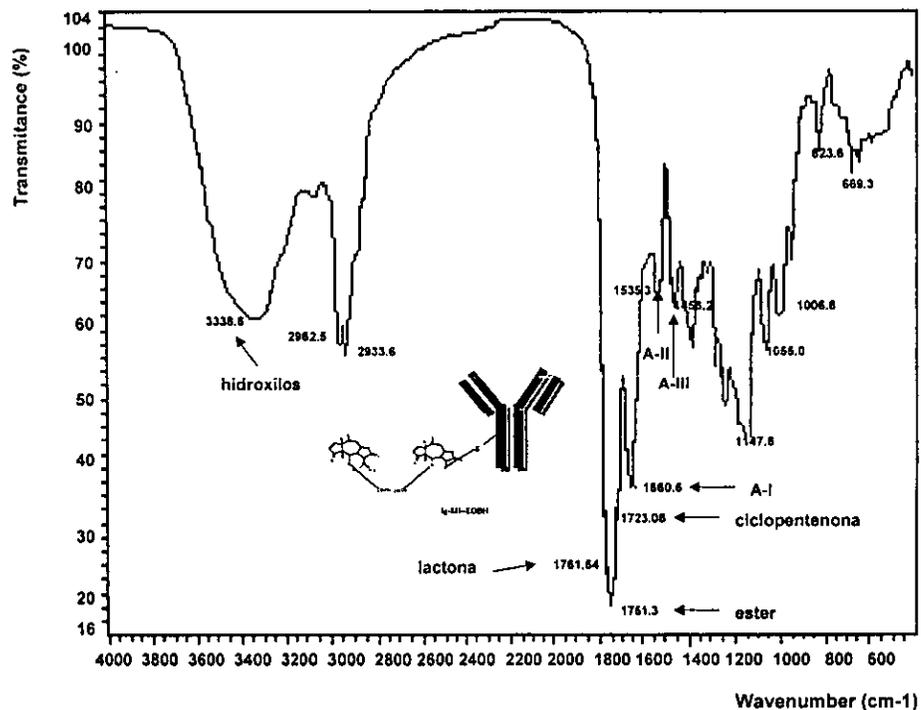


FIGURA 36. Espectro de IR (KBr) del conjugado Ig-SH-EGBH de la reacción (10), donde se observan las siguientes señales: 1761.64 (lactona), 1751.3 (ester), 1723.08 (ciclopentenona) y 1055.0 (C=C) pertenecientes al EGBH y las señales 1660.6 (Amida I, A-I), 1535.3 (Amida II, A-II) y 1456.2 (Amida III, A-III) pertenecientes al anticuerpo.

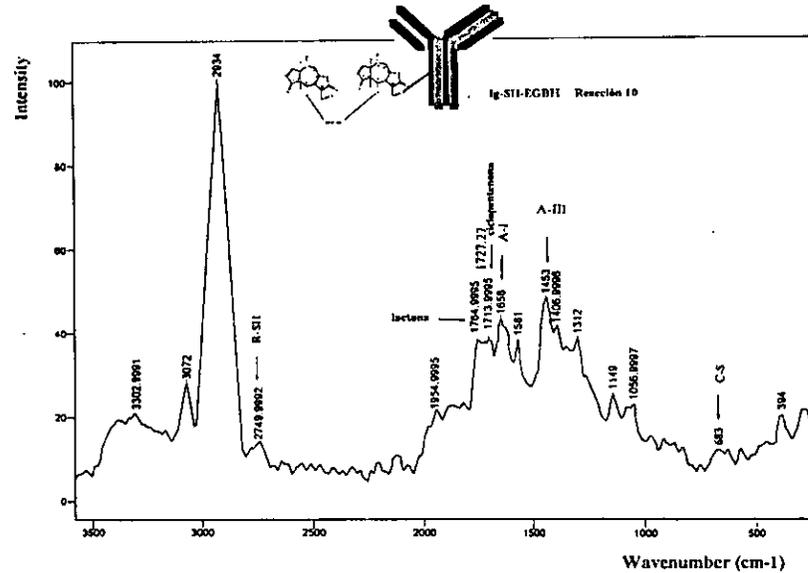


FIGURA 37. Espectro de Raman (KBr) del conjugado Ig-SH-EGBH de la reacción (10), donde se observan las siguientes señales: 2749.9992 (R-SH), 1764.9995 (lactona), 1713.9995 (ciclopentenona), 1658 (Amida I, A-I), 1453 (Amida III, A-III) y 683 (C-S).

XIII. BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, A.K., Lichtman, A. H. and Pober, J. S. 1994. *Celular and molecular immunology*. Saunders. Philadelphia, U.S.A.: 34-50.
2. Arueta. V.A., A.L.M. Cano y M.E. Rodarte. 1994. *Atlas de plantas de la medicina tradicional mexicana. Vol. I*. Inst. Nac. Indig. México. D.F.:256-57.
3. Bach, J.F. 1989. *Inmunología*. Limusa, México D.F.: 87-116.
4. Beckman E., *et al.* 1994. *In vitro* activity of immunoconjugates between cisplatin and an anti-CA125 monoclonal antibody on ovarian cancer cells lines. *Cells Biophys.* 124-125:163-73.
5. Boon, T. 1993. Inmunoterapia contra el cáncer. *Invest. Cienc.* :20-27.
6. Brame, E.G., N.J.G. Grasselli. 1977. *Infrared and Raman Spectroscopy. Vol.1*. Decker, New York: 775.
7. Burrows, F., J.P. Overholser and P.E. Thorpe. 1994. Potent antitumor effects of an antitumor endothelial cell immunotoxin in a murine vascular targeting model. *Cell Biophys.* 24-25:15-25.
8. Cassaza, A.M., P.A. Trail, and K.E. Hellström. 1994. Drug immunotargeting for carcinomas: A reality at last?. *Annals of oncology.* 5:703-708.
9. Cassady, J.M. *et al.* 1978. Potencial Antitumors Agents. Synthesis, Reactivity, and Cytotoxicity of α - Methylene Carbonyl Compounds. *J. Med. Chem.* 21(8): 815-819.
10. Cassady J.M. and J.D., Douros. 1980. *Anticancer agents based on natural products models*. Academic Press. New York, E.U.A.: 201-211,219.
11. Chen, Ch. H. *et al.* 1994. Antitumor Agents-CLI. Bis (helenaliny)l Glutarate and Bis (Isoalantodiol-B) Glutarate, Potent Inhibitors of human DNA Topoisomerase II. *Bioorganic & Med. Chem.* 2(2): 137-145.
12. Engert, A. *et al.* 1990. Antitumor effects of ricin A chin immunotoxins prepared from intact antibodies and Fab' fragments on solid human Hodkin's disease tumors in mice. *Cancer Res.* 50(10): 2929-35.
13. Diamen, B.A., d.e. Yelton and M.D. Scharff. 1981. Monoclonal Antibodies. A new technology for producing serologic reagements. *New Eng. J. Med.* 304: 1344-49.

14. Dolphin, D. and A. Wick. 1977. *Tabulation of infrared spectral data*. Wiley Interscience, New York. :
15. Fridman, W-H. 1991. L'immunothérapie des cancers. *Sup. Rech.* (237): 46-53.
16. Ghose, T. I., Blair, H., and P.D. Kulkarni. 1993. Preparation of Antibody-Linked Cytotoxic Agents. *Met. Enz.* 93: 280-333.
17. Giordano, O.S. *et al.* 1990. The gastric cytoprotective effect of several sesquiterpene lactones. *J. Nat. Prod.* 53(4): 803-09.
18. Goldenberg, D.M. 1989. Targeted cancer treatment. *Immunol. Today.* 10(9): 286-288.
19. Grippo, A.A., *et al.* 1992. The citotoxicity of helenalin, its mono and difunctional esters, and related sesquiterpene lactones in murine and human tumors cells. *Drug. Des. Discov.* 8(3): 191-206.
20. Haisma, H.J. *et al.* 1994. Comparison of two anthracycline-based prodrugs for activation by a monoclonal antibody-beta-glucuronidase conjugate in the specific treatment of cancer. *Cell Biophys.* 24-25: 185-92.
21. Hall, I.H., K.H. Lee, and H.C. Sykes. 1987. Anti-Inflammatory Agents, IV. Structure Activity Relationships of sesquiterpene Lactone Esters Derived from Helenalin. *Plant. Med.* :153-155.
22. Hall, I.H. *et al.* 1989. Role of Thiol Agents in Protecting Against the Toxicity of Helenalin in Tumor-Bearing Mice. *Plant. Med.* 55:513-17.
23. Hall, L.H. *et al.* 1977. Antitumor Agent. 21. A proposed Mechanism for Inhibition of Cancer Grwth by Tenulin and Helenalin and Related Cyclopentenone. *J. Med. Chem.* 20(3): 333-37.
24. Haskells, M. Ch. 1985. *Cancer Treatment Saunders*. Phidadelphia, E.U.A.: 44-5, 53-6, 61-8, 88-90.
25. Hellman, S. and E.E. Vokes. 1996. Advancing Current Treatments for the Cancer. *Scien. Amer.* 275(3): 84-89.
26. Hellstrom, I., K.E. Hellstrom, and P. Trail. 1995. Monoclonal antibodies for drug targeting to carcinomas. *Cancer Detect Prevent.* 19(1): Nescape.
27. Herecker, B. *et al.* 1970. *Physical principles and Techniques of protein chemistry*. Academic Press, New York, E.U.A.: 214-268.

28. Heywood, V.K., J.B. Harbone and B.L. Turner. 1997. *The biology and chemistry of the Compositae, Vol. I*. Academic Press. London: 350-51.
29. Howie, G.A., P.E. Manni and J.M. Cassady. 1974. Synthesis of Alkyl-Substituted α - β -Unsaturated γ -Lactones as Potential Antitumor Agents. *J. Med. Chem.* 17(8): 840-46.
30. Iorgawa, M. *et al.* 1987. Mode of cardiotoxic action of helenaline, a sesquiterpene lactone, on guinea pig ventricular myocardium. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 9(2): 193-201.
31. Iwahashi T. *et al.* 1989. Selective killing of carcinoembryonic-antigen (CEA) producing cells *in vitro* by the immunoconjugate cytochrome-S and CEA-reactive cytochrome-S antibody CA208. *Cancer Immunol. Immunother.* 30(4): 239-46.
32. Janeway, Ch. A. and P. Travers. 1996. *Immunobiology*. Current Biology & Garland. Singapore, 8:25-26.
33. Jimenez, E.M. 1993. Búsqueda de aplicaciones para los productos naturales. *Folium.* 2(5): 5-6.
34. Johnson, D.A., *et al.* 1995. Anti-tumor activity of CC49-doxorubicin immunoconjugates. *Anticancer Res.* 15(4): 1387-93.
35. Krüger, M. *et al.* 1997. Synthesis and Stability of Four Maleimide Derivatives of the Anticancer Drug Doxorubicin for the Preparation of Chemoimmunoconjugates. *Chem. Pharm. Bull.* 45(2): 399-401.
36. Kulkarni, P. N., *et al.* 1985. Conjugation of methotrexate to IgG antibodies and their f(ab)₂ fragments and the effect of conjugated methotrexate on tumor growth *in vivo*. *Cancer Immunol. Immunother.* 19: 211-214.
37. Kupchan, S.M., *et al.* 1970. Reaction of Endocyclic α , β - Unsaturated γ -lactones with thiols. *J. Org. Chem.* 35(10): 3539-43.
38. Kupchan, S.M., M.A. Eakin and A.M. Thomas. 1971. Tumor Inhibitors. 69. Structure-Cytotoxicity Relationships among the sesquiterpene Lactones. *Cancer Res.* 31: 1649-54.
39. Kuzel, T.M. and T.R. Steven. 1994. Antibodies in the treatment of human cancer. *Curr. Op. Onc.* 6: 622-26.
40. Lee, K.H. *et al.* 1971. Cytotoxicity of the Sesquiterpene Lactones. *Cancer Res.* 31: 1649-54.
41. Lee, K.H. and H. Furukawa. 1972. Antitumor Agents. 3. Synthesis and Cytotoxicity Activity of Helenalin Amine Adducts and Related Derivatives. *J. Med. Chem.* 15(6): 609-11.

42. Lee, K.H., R. Meck and C. Piantadosi. 1972. Antitumor Agents. 4. Cytotoxicity and *In Vivo* Activity of Helenalin Esters and Related Derivatives. *J. Med. Chem.* 16(3): 299-301.
43. Lee, K.H. *et al.* 1975. Antitumor Agents. 11. Synthesis and Cytotoxic Activity of Epoxides of Helenalin Related Derivatives. *J. Med. Chem.* 18(1): 59-63.
44. Lee, K.H. *et al.* 1975. Antitumor Agents. 16. Steroidal α -Methylene γ -lactones. *J. Med. Chem.* 18(8): 812-16.
45. Lee, K.H. *et al.* 1977. Structure-Antimicrobial activity relationships among the sesquiterpene lactones and related compounds. *Phytochemistry.* 16: 1117-18.
46. Lee, K.H. *et al.* 1978. Antitumor Agents. 31. Helenalin *sym*-Dimethylethylenediamine Reaction Products and Related Derivatives. *J. Med. Chem.* 21(7): 698-701.
47. Lee, K.H. *et al.* 1978. Antitumor Agents, 32. Synthesis and Antitumor Activity of Cyclopentenone Derivatives Related to Helenalin. *J. Med. Chem.* 21(8): 819-22.
48. Lee, K.H. *et al.* 1981. Antitumor Agents. 44. Bis (helenalyl) Esters and Related Derivatives as Novel Potent Antileukemic Agents. *J. Med. Chem.* 24(8): 924-27.
49. Liu, J., S. Abid, and M.S. Lee. 1995. Analysis of monoclonal antibody chimeric BR96-doxorubicin immunoconjugate by sodium dedecyl sulfate-capillary gel electrophoresis with ultraviolet and laser induced fluorescence detection. *Anal. Bioch.* 229(2): 221-8.
50. Luo, Y., and B.K., Seon. 1990. Maked difference in the *in vivo* antitumor efficacy between two immunotoxins to different epitopes of common acute lymphoblastic leukemia antigen (CD10). *J. Immunol.* 145(6): 1974-82.
51. Mueller, B. M., W.A. Wrasidlo, and R.A. Reisfeld. 1990. Antibody conjugates with morpholinodoxorubicin and acid-cleavable linkers. *Bioconjug. Chem.* 1(5): 325-30.
52. Myers, D. *et al.* 1994. Favorable Pharmacodynamic Features and Superior Anti-leukemic Activity of b43 (Anti-CD19) Immunotoxins Containing Two Pokeweed Antiviral Protein Molecules Covalently Linked to each Monoclonal Antibody Molecule. *Leuk. And Lymph.* 18: 93-102.
53. Old, L.J. 1996. Immunotherapy for cancer. *Scien. Amer.* 275(3): 102-9.
54. Olsnes, S. *et al.* 1989. Immunotoxins-entry cells and mechanisms of action. *Immunol. Today.* 10(99): 291-95
55. Pastan, I. 1995. Immunotoxins and oncotoxins. *Cancer Detect Prevent.* 19(1): Nescape.
56. Paul, W.E. 1993. *Fundamental Immunology.* Raven, New York: 837-56.

57. Pettit, G.R., *et al.* 1973. Antineoplastic Agents. 34. *Helenium autumnale* L. *J. Med. Chem.* 17(9): 1013-16.
58. Pierce. *Catalog & Handbook*.1994. Pierce Chem. Comp. E.UA.: T-1-T-8,T-35-T-36, T-39, T-49,T-59-T-61.
59. Pietersz, G.A., K. Krauer, and I.F.C. McKenzie. 1994. The use of Monoclonal Antibody Immunoconjugates in Cancer Therapy. *Antigen and Antibody...* 353: 169-179.
60. Pietersz, G.A., *et al.* 1994. Chemoimmunoconjugates for the Treatment of Cancer. *Adv. Immunol.* 56: 301-83.
61. Pietersz, G.A., *et al.* 1995. *In vitro* and *in vivo* antitumor activity of a chimeric anti-CD19 antibody. *Cancer Immunol. Immunother.* 41(1): 53-60.
62. Porro G., *et al.* 1993. *In vitro* and *in vivo* properties of an anti-CD5 momordin immunotoxin on normal and neoplastic t lymphocytes. *Cancer immunol. Immunother.* 36(5): 346-50.
63. Powis, G., *et al.* 1994. Increased intracellular Ca²⁺ signaling caused by the antitumor agent helenalin and its analogues. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 34: 344-50.
64. Rigaut, K.D., Scharff, J.E., Nad D.M. Neville. 1995. Selective killing of T cells by immunotoxins directed at distinct V beta epitopes of the cell receptor. *J. Immunol.* 25(7): 2077-82.
65. Roberts, G.B. *et al.* 1995. An Integrated Strategy for Structural Characterization of the Protein and Carbohydrate Components of Monoclonal Antibodies: Application o Anti-Respiratory Syncytial Virus Mab. *Anal. Chem.* 67: 3613-25.
66. Rodríguez, E., G.H.N. Towers and J.C. Mitchell. 1976. Biological activities of sesquiterpene lactones. *Phytochem.* 15: 1573-80.
67. Roitt, I., Bostoff, J. And Male D. 1996. *Immunology*. Mosby, London, U.K.: 4.1-4.12.
68. Rojas, E.C. y L. B. Vega. 1992. Retrospectiva del cáncer, cinco décadas de esfuerzo. *Rev. Soc. Mex. Hist. Nat.* (43):
69. Romo de Vivar, A. 1985. *Productos naturales de la flora mexicana*. Limusa. México, D.F.: 79-82.
70. Rzedowki, J. 1983. *Vegetación de México*. Limusa. México, D.F.: 346.

71. Sivam, G.P. *et al.* 1995. Therapeutic efficacy of a doxorubicin immunoconjugate in a preclinical model of spontaneous metastatic human melanoma. *Cancer Res.* 55(11): 2352-6.
72. Schidberger, *et al.* 1990. Antitumor Activity of L-6-ricin immunotoxins against the H2981-T3 lung adenocarcinoma cell line and *in vivo*. *Cancer Res.* 50(11): 3249-56.
73. Schultz, P.G. 1989. Catalytic Antibodies. *Ange. Chemic.* 28(10): 1283-1444.
74. Schwarz, L. 1996. El cáncer se resiste a la ciencia. *Mud. Cien.* 167: 340-6.
75. Stryer, L. 1995. *Biochemistry*. Freeman. E.U.A.: 361-90.
76. Takeya, K., M. Etoigawa, and H. Furokawa. 1983. Positive inotropic effect of helenalin, a sesquiterpene lactone on guinea pig myocardium. *Chem. Pharm. Bull.* 31(5): 859-61.
77. Teiz, L.Z. 1991. *Plant physiology*. Benjamin/cummings: 321-28.
78. Tesic, M., K.M. *et al.* 1995. Labelling small quantities of monoclonal antibodies and their F(ab')₂ fragments with technetium-99m. *Nucl. Med. Biol.* 22(4): 451-7.
79. Vidales, G.T.I. 1987. *Estudio de la citotoxicidad in vitro de 2 lactonas sesquiterpénicas con posible actividad anticancerosa*. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo. Universidad la Salle Escuela de Química, Incorporada a la U.N.A.M.
80. Vitteta, E.S., P.E. Thorpe, and W.U. Jonathan. 1993. Immunotoxins: magic bullets or misguided missiles?. *Imm. Today.* 14(6): 252-59.
81. Vitteta, E.S. and J.W. Uhr. 1994. Monoclonal Antibodies as Agonists: An Expanded Role for Their Use in Cancer Therapy. *Cancer Res.* 54: 5301-9.
82. Watson, W.H. and R.P. Kashyap. 1990. The structures of Two Sesquiterpene Lactones. *Acta Cryst.* C46: 1524-8.
83. Wawrzynczack, E.J. *et al.* 1991. Cytotoxic activity of ricin A chain immunotoxins recognising cluster 1, W4 and 5^a antigens associated with human small cell lung cancer. *J. Cancer Suppl.* 14: 71-3.
84. Wilcox, Ch. F. and M.F. Wilcox. 1995. *Experimental Organic Chemistry*. Prentice Hall. New Jersey, E.U.A.: 84-96, 103-9, 122-25, 127-28.
85. Williams, W.L. *et al.* 1988. Inhibition of Nucleic Acid Synthesis In P-388 Lymphocytic Leukemia Tumor Cells by Helenalin and Bis(helenaliny) Malonate *In Vivo*. *J. Pharma. Scienc.* 77(2): 178-84.

86. Yashika, H., T.J. Mabry, and B. Nimmermann. 1973. *Sesquiterpene lactone*. University of Tokyo Press. :