

Detección de los metabolitos de la toxina T-514 (Peroxisomicina A1) del género *Karwinskia* *in vivo* e *in vitro*

Magdalena Gómez Silva*, Lourdes Garza Ocañas*, Noemí Waksman de Torres**, Alfredo Piñeyro López*

A través de la historia se ha descrito el uso de extractos de plantas para el tratamiento de diversas enfermedades. Particularmente en la última década se ha incrementado el interés por el estudio del potencial terapéutico de productos naturales de origen vegetal y la evaluación de su posible aplicación farmacológica. Dentro de los estudios primordiales para el manejo adecuado y racional de cualquier sustancia con potencial uso terapéutico en el humano, se encuentra la evaluación de su farmacodinamia o mecanismo de acción y de su farmacocinética, la cual incluye como punto básico el metabolismo. El conocimiento del metabolismo de un compuesto nos permite establecer si éste ejerce su acción en el organismo como tal, o bien a través de metabolitos activos formados a partir de la molécula original.

El metabolismo es un proceso que se lleva a cabo principalmente en el hígado, el cual contiene altas concentraciones de sistemas enzimáticos que son capaces de utilizar a los compuestos exógenos como sustrato y generalmente transformarlos a compuestos más fácilmente excretables. Este proceso se lleva a cabo en dos fases: la fase I o degradativa que incluye la oxidación, la reducción y la hidrólisis y la fase II o sintética que incluye la acilación, la alquilación y la conjugación con compuestos endógenos tales como el ácido glucurónico.

En términos generales, las reacciones metabólicas o de biotransformación generan metabolitos más polares, y más fácilmente excretables^{1,2,3}. Sin embargo, en algunos casos la biotransformación de un compuesto puede llevar a la producción de metabolitos con potente actividad biológica o con

propiedades tóxicas, los cuales en el caso de algunos fármacos son los responsables de la acción farmacológica o de la toxicidad de los mismos. Al respecto, algunos fármacos utilizados actualmente en la quimioterapia del cáncer como la Adriamicina, Daunorrubicina, Doxorrubicina y Mitomicina C son metabolizados en el organismo a metabolitos activos, los cuales son productos intermediarios responsables de su efecto antitumoral y de algunos de sus efectos tóxicos.

La evaluación del metabolismo de un compuesto puede llevarse a cabo *in vivo* e *in vitro*. Por su tiempo, costo y menor complejidad en el análisis de los resultados, los estudios *in vitro* generalmente preceden a los estudios *in vivo*. Entre los sistemas utilizados con mayor frecuencia para el estudio del metabolismo *in vitro* se encuentran los microsomas hepáticos obtenidos de diversas especies y el cultivo primario de hepatocitos; la preservación de la capacidad metabólica de ambos sistemas ha sido ampliamente demostrado^{4,5,6,7}.

Por otro lado, es sabido que los resultados del estudio del metabolismo de un compuesto *in vitro* no son directamente extrapolables al fenómeno de metabolismo *in vivo*, por tal motivo dichos estudios generalmente brindan información que precede a los estudios *in vivo*.

Para la evaluación del metabolismo de un compuesto *in vivo* se han utilizado animales de diferentes especies: el ratón, la rata, el cobayo, el conejo,

* Departamento de Farmacología y Toxicología, Facultad de Medicina, UANL.

** Departamento de Química Analítica, Facultad de Medicina, UANL.

el perro y el mono, entre otros.

En general, se acepta que entre más cercana sea la especie al humano, mayor será la posibilidad de extrapolar conclusiones del proceso metabólico.

Al género *Karwinskia* pertenecen plantas que se encuentran distribuidas prácticamente en todo el territorio mexicano, en el suroeste de los Estados Unidos de Norteamérica y en parte de Centroamérica. En 1975 se aislaron del endocarpio de la *Karwinskia humboldtiana* cuatro compuestos antracenónicos diméricos, a los que llamaron por su peso molecular T-496, T-514, T-516 y T-544⁸. Posteriormente se han hecho modificaciones a las técnicas originales de aislamiento para la obtención de éstas y otras antracenas.^{9, 10}

De todos los compuestos aislados a la fecha, la originalmente descrita como T-514 y renombrada como Peroxisomicina A1¹¹ (figura 1) ha resultado de particular interés por su actividad citotóxica

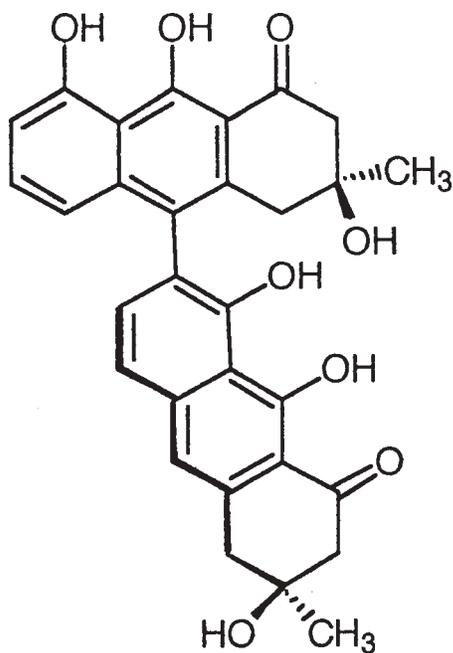


Fig. 1. Estructura química de la T-514 (Peroxisomicina A1).

selectiva hacia células de origen tumoral. Dicha toxicidad selectiva se estudió inicialmente *in vitro* en células de hígado, pulmón y colon de origen neoplásico y benigno. Al comparar los resultados de selectividad obtenidos con este compuesto y los de otros agentes antineoplásicos, se observó un mayor índice terapéutico para la T-514, lo cual hizo suponer

que esta sustancia podría ser un potencial medicamento antineoplásico¹² y fue motivo de una patente para su uso.

Por lo anterior, se inició, en el Departamento de Farmacología y Toxicología de la Universidad Autónoma de Nuevo León, una línea de investigación con el propósito de conocer la farmacodinamia y farmacocinética de este compuesto, así como la posible toxicidad selectiva de compuestos estructuralmente semejantes.

Ya que a la fecha no se conoce si la T-514 es metabolizada por el hígado, y considerando que ésta se relaciona estructuralmente con compuestos polifenólicos aromáticos con actividad antitumoral ya conocida¹³, los cuales ejercen su acción a través de metabolitos activos producidos en el organismo, se diseñó el presente estudio con el propósito de evaluar el posible metabolismo de la T-514 *in vivo* e *in vitro*, así como de aislar a los metabolitos de la T-514 (si los hubiere) e investigar si éstos poseen el efecto de citotoxicidad selectiva hacia células de origen tumoral.

Material y métodos

Para la realización del estudio se seleccionaron microsomas hepáticos de ratón, rata, cobayo, perro y mono y el cultivo primario de hepatocitos de origen humano y animal (rata) como modelo *in vitro* y se utilizó plasma de perros y de humano para el modelo *in vivo*.

Modelo *in vitro*

Obtención de microsomas y hepatocitos. Los microsomas de rata se obtuvieron de ratas Wistar macho (150-200 g) y los de mono de un mono Macaca mulata macho (1.75 Kg), los cuales fueron sacrificados por dislocación cervical y por medio de inyección intracardiaca de KCl al 10%, respectivamente. Los microsomas hepáticos se aislaron de acuerdo a procedimientos previamente descritos¹⁴. Los microsomas de ratón, de cobayo, de perro y de humano se obtuvieron de In Vitro Technologies, Inc. (Baltimore, MA, EUA). Los hepatocitos de origen animal se obtuvieron de ratas de 10 a 12 días de nacidas de acuerdo al método descrito por Acosta y cols.¹⁵ y los de origen humano se obtuvieron de In Vitro technologies Inc. y fueron cultivados en nuestro laboratorio.

Evaluación de citotoxicidad selectiva. Las líneas

celulares hepáticas de origen humano utilizadas para la evaluación de la citotoxicidad selectiva fueron las siguientes: células de hígado de Chang (CCL 13), origen normal y células de Hepatoma, HepG2 (HB8065), origen neoplásico obtenidas de la American Type Culture Collection ATCC, (Manassas, VA, EUA). Los criterios de citotoxicidad fueron la adhesión a la placa de cultivo, lo cual se evaluó por revisión microscópica y la prueba de reducción del metiltiazoltetrazolio, MTT.¹⁶ La CT50% fue calculada de acuerdo al criterio de Ekwall.¹⁷

Incubación de microsomas hepáticos con la T-514. Se utilizaron tres concentraciones de proteínas microsomales: 12.5, 125 y 250 µg/ml en KCl 0.54 M, pH 7.4, las cuales se expusieron a la T-514 (25µM) disuelta en etanol-KCl en una proporción 1:1. A las muestras control sólo se les agregó el solvente. Todas las muestras se incubaron a 37 °C durante los siguientes tiempos: 0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 horas. Los hepatocitos de origen animal y humano se cultivaron a una densidad de 1×10^6 células/ml en medio Williams E suplementado con suero de ternera 10% v/v. Después de 72 horas en cultivo, los hepatocitos fueron expuestos a la T-514 (25 µM) durante 0, 0.5, 1, 3, 6, 9, 12 y 24 horas a 37 °C. Al llegar al tiempo establecido, las muestras se sacaron de la incubadora y se sometieron a extracción líquido-líquido con acetato de etilo para proceder a su análisis por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR).

Modelo in vivo

Ya que se ha reportado en la literatura para ciertas sustancias, la existencia de una degradación espontánea en condiciones fisiológicas, dependiente tanto del pH como de la temperatura, llamado efecto Hoffmann^{18 22} previo a la administración de la T-514 a los perros Beagle (modelo *in vivo*) se prepararon soluciones amortiguadoras, según Sorensen²³, de fosfatos a pH 7.3, el cual remeda a las condiciones fisiológicas extracelulares, de citratos para el pH 3.5 que semeja las condiciones intracelulares y de fosfatos a pH 5, las cuales se incubaron en presencia de la T-514 a los tiempos ya mencionados.

Obtención de muestras de plasma. Para el modelo *in vivo* se utilizaron perros Beagle y plasma de pacientes del protocolo I /1-5 (pacientes con carci-

noma avanzado sin tratamiento alternativo) inscrito en la Subdirección de Investigación y Estudios de Posgrado de la Facultad de Medicina de la UANL.

Administración de la T-514 a los perros. Se utilizaron cuatro perros machos, a los cuales se les administró la T-514 por vía intravenosa a una dosis única de 2 mg/Kg. Se tomaron muestras de sangre periférica con EDTA como anticoagulante a los siguientes tiempos: 0 (previo a la administración de la T-514), 1, 15, 30 y 60 min y a las 2, 3, 4, 5, 6 y 12 horas. Las muestras se sometieron a precipitación de proteínas y se analizaron por CLAR.

Obtención de muestras de plasma de humano. Para la evaluación del metabolismo de la T-514 en el humano se utilizaron muestras de plasma de dos pacientes del protocolo I 1/5 a los que se les administró la T-514 en solución Haemaccel®, a una dosis de 33 mg/m² por infusión continua durante 4 horas para el primer paciente y durante 8 horas para el segundo paciente, el cual tenía daño renal. Se tomaron muestras sanguíneas con EDTA a los siguientes tiempos: 0 (previo a la administración de la T-514), 0.25, 0.50, 1, 3, 6, 9, 12, 18 y 24 horas. Las muestras se extrajeron por medio de precipitación de proteínas y los extractos se analizaron por CLAR.

Para el procedimiento de la extracción de la T-514 y de sus posibles metabolitos de las muestras del modelo *in vivo* se utilizó el método reportado por Salazar y cols.²⁴ modificado.

Resultados

Evaluación del metabolismo de la T-514 en microsomas hepáticos. En microsomas hepáticos incubados con la T-514 se observó que hubo un decaimiento en su concentración, el cual fue proporcional a la concentración de proteínas microsomales utilizada. Se observó que el decaimiento fue abrupto en los microsomas de todas las especies evaluadas al incubar a la T-514 con 250 µg/mL de proteínas microsomales (figura 2). Este decaimiento ocurrió en una forma más lenta cuando la T-514 fue incubada con la concentración de 12.5 µg/ml de microsomas, en este caso además la T-514 pudo ser detectada aún a las 24 horas (figura 3). Con esta concentración de microsomas se observó además que el decaimiento más lento se produjo en los microsomas de origen humano. Con las concentra-

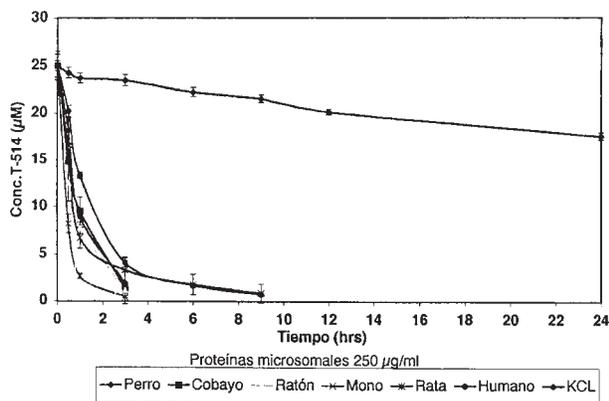


Fig. 2. Gráfica comparativa de la detección de T-514 en microsomas hepáticos de distintas especies expuestas a $25\mu\text{M}$ de T-514. Cada valor representa la media de tres determinaciones + DE.

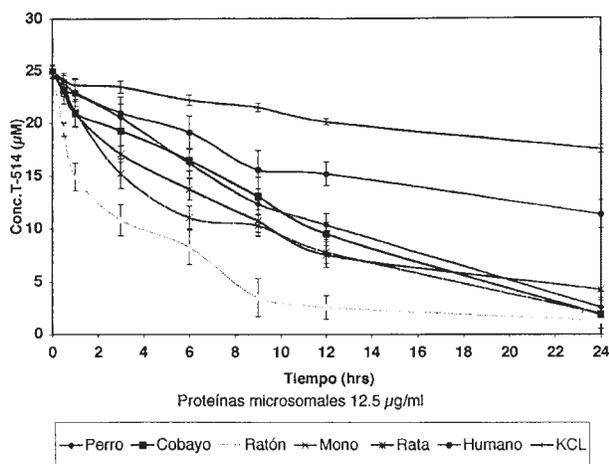


Fig.3. Gráfica comparativa de la detección de T-514 en microsomas hepáticos de distintas especies expuestas a $25\mu\text{M}$ de T-514. Cada valor representa la media de tres determinaciones + DE.

ciones de 125 y $250\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales no se detectaron picos cromatográficos distintos a la T-514 en los microsomas de ninguna de las especies estudiadas. Por otro lado, en la incubación de la T-514 con la concentración de $12.5\mu\text{g/ml}$ de proteínas microsomales se pudieron detectar a las 24 horas de incubación, en los microsomas de rata dos picos cromatográficos a tiempos de retención (T_r) distintos a los de la T-514 y con espectros de UV-Vis parecidos al de la misma, los cuales fueron denominados compuestos M1 y M2. El pico cromatográfico del compuesto M1 también se detectó en los microsomas de mono a la concentración de $12.5\mu\text{g/ml}$.

Evaluación del metabolismo de la T-514 en hepatocitos de origen animal y humano. En las muestras de monocapas celulares expuestas a la T-514, inicialmente se observó un incremento progresivo de la T-514 hasta alcanzar su máxima concentración a las 6 horas (hepatocitos de rata) y 9 horas (hepatocitos de humano), y a partir de ese momento se observó un decaimiento en su concentración para posteriormente entrar en fase de equilibrio. En el medio en el que se mantuvo el cultivo celular se observó un decaimiento de la T-514, el cual fue inversamente proporcional al incremento intracelular de la misma. No se detectaron picos cromatográficos distintos a la T-514 en las monocapas de los hepatocitos de rata ni en los de origen humano. Por otro lado, en las muestras de medio en el que se mantuvieron a los hepatocitos de origen humano se detectaron dos picos cromatográficos, los cuales correspondieron a los de los compuestos M1 y M2 detectados en los microsomas de rata; estos picos también fueron detectados en el medio de cultivo control.

Resultados de la incubación de la T-514 en solución amortiguadora a pH 7.3, pH 5 y pH 3.5. En el análisis cromatográfico de las muestras obtenidas de la incubación de la T-514 en la solución de fosfatos a pH 7.3, se detectaron además de la T-514, dos picos cromatográficos, los cuales aparecieron a partir de la primera hora y se incrementaron con el tiempo. Estos picos correspondieron a los picos M1 y M2 detectados en los microsomas de rata. En las muestras de la solución de fosfatos a pH 5 incubadas con la T-514, se detectó a las 24 horas un pico cromatográfico, el cual correspondió al compuesto M1. El fenómeno de autodegradación en estas soluciones ocurrió de una manera mucho más lenta que la degradación observada en los microsomas.

Monitoreo de la T-514 en plasma de perro. En el análisis de las muestras de plasma de perro se observó una rápida disminución de la concentración plasmática de la T-514, la cual ocurrió en los primeros minutos. En este sistema no se detectaron productos de degradación de la toxina.

Monitoreo de la T-514 en plasma de pacientes. En el plasma de los dos pacientes tratados con la T-514 se observó que hubo un incremento inicial en su concentración, el cual ocurrió en el primer caso a

partir de las primeras tres horas y en el segundo caso a partir de las siete horas, para posteriormente tener un decaimiento. No se detectaron productos de degradación de la T-514 en ninguno de los dos casos.

Debido a que los picos cromatográficos detectados en la solución amortiguadora de fosfatos correspondieron cromatográficamente a los detectados en los microsomas de rata y de mono y considerando que por la rapidez del proceso de degradación se obtuvo poca muestra, se decidió incubar la T-514 en mayor concentración en una solución amortiguadora de fosfatos a pH 7.3, para obtener los productos a mayor escala y aislarlos a partir de esa solución.

Análisis de los productos de degradación de la T-514 obtenidos de la solución amortiguadora de fosfatos. Los productos de degradación de la T-514 obtenidos a partir de la solución de fosfatos a pH 7.3, cuyos picos cromatográficos correspondieron a los compuestos M1 y M2, se analizaron por cromatografía en capa fina y se utilizaron las toxinas T-514, T-510 y T-496 como estándares de referencia. En este sistema se detectaron, por observación bajo luz UV (375 nm), dos compuestos además de las toxinas utilizadas como estándares. La placa se reveló con KOH (utilizado para confirmar la presencia de hidroxiantraquinonas) y el revelado resultó positivo para el compuesto M2. Este compuesto tuvo un R_f comparable al de la toxina T-510 y los resultados del análisis por CLAR mostraron que su Tr y su espectro UV-Vis también fueron comparables al de esta toxina. Por otro lado, al analizar el espectro de ¹H RMN del compuesto M1 se observó que sus señales espectroscópicas fueron similares a las encontradas para un compuesto de peso molecular 510, el cual se genera a partir de la toxina T-496.²⁵ Al analizar ambos compuestos se encontró que sus Tr y espectros de UV-Vis fueron prácticamente los mismos.

Determinación de la citotoxicidad selectiva de los productos M1 y M2. Se evaluaron 12 concentraciones de los compuestos M1 y M2 en tres ocasiones diferentes, en experimentos separados. Ambos compuestos fueron citotóxicos, pero ninguno de ellos fue selectivo hacia las células tumorales, ya que no se encontró diferencia en su citotoxicidad hacia las células de origen benigno y neoplásico.

Discusión y conclusiones

En relación a la evaluación del metabolismo de la T-514 en los dos modelos utilizados en este estudio, en el modelo *in vitro* (microsomas hepáticos y cultivo primario de hepatocitos), se observó que sólo en los microsomas de rata y de mono se pudo detectar además del decaimiento en la concentración de la T-514, dos picos cromatográficos correspondientes a productos de degradación de la misma. La diferencia en los Tr de los dos picos cromatográficos, así como la semejanza de sus espectros de UV-Vis con los de la T-514 y el ligero desplazamiento de estos espectros, indicó que los compuestos formados en este sistema corresponden a intermediarios metabólicos de la degradación de la misma. El origen de los microsomas (especie) y la concentración utilizada fueron dos factores determinantes en la detección de estos productos de degradación. En relación al primer aspecto, se demostró que existe una diferencia interespecie en el fenómeno de biotransformación de la T-514 por el sistema microsomal hepático, ya que los picos cromatográficos distintos al compuesto original sólo pudieron ser detectados en los microsomas hepáticos de rata y de mono. Lo anterior indica que, probablemente, en el resto de las especies el fenómeno de biotransformación de la T-514 se llevó a cabo a una mayor velocidad, lo que impidió la detección de los productos que se pudiesen haber formado. En cuanto a la concentración de enzimas microsomales, utilizada sólo con la menor (12.5 µg/ml) en donde la velocidad con la que ocurrió el proceso de biotransformación fue menor, permitió la detección (en el caso de los microsomas de rata y de mono) de los productos de degradación de la T-514. La rapidez con la que ocurrió el fenómeno de degradación de la T-514 corresponde al comportamiento descrito para compuestos altamente inestables. Al respecto, la capacidad de la T-514 para producir radicales libres ha sido previamente demostrada tanto en cultivo primario de hepatocitos, como en microsomas hepáticos.^{26,27} Lo anterior hace suponer que los productos de degradación de este compuesto, detectados en los microsomas de rata y de mono, corresponden a intermediarios reactivos para los cuales se ha reportado un fenómeno de degradación secuencial rápida, el cual es activado por la presencia de un electrón impar en su molécula.²⁸ Los picos cromatográficos detectados en los hepatocitos de origen humano también fueron detectados en el

medio control, por lo que en este sistema no puede atribuirse su aparición a influencias celulares, sino a una autodegradación de la T-514 en el medio de cultivo. En el caso del modelo *in vivo*, en la cinética de la T-514, en el plasma de perro y de humano se observó que hubo un decaimiento abrupto en la concentración de la misma, el cual ocurrió después de haber alcanzado su pico máximo. Lo anterior demostró que el patrón de degradación rápida de este compuesto *in vivo* es semejante al detectado *in vitro*. En este caso se debe considerar, además, que el plasma es un sistema complejo en el que existen múltiples factores (entre ellos enzimas) que pudiesen haber intervenido y esto pudiera explicar el decaimiento en la concentración sanguínea de la T-514, sin la aparición de picos cromatográficos correspondientes a productos de su degradación; otro factor importante que debe ser considerado en este modelo *in vivo* es el proceso de distribución de la misma y el hecho de que ésta posiblemente tenga un volumen de distribución intracelular. Por otro lado, la desaparición rápida de la T-514, observada con las concentraciones mayores de microsomas, indica que el proceso de autodegradación de la misma se potencia en presencia de este sistema enzimático. Lo anterior también puede explicar, en el caso del modelo *in vivo*, la no detección de los productos de degradación de la T-514.

El análisis de los compuestos M1 y M2 aislados a partir de la solución amortiguadora de fosfatos, donde la T-514 se autooxida a una velocidad menor que en presencia de las enzimas microsomales, permitió establecer que el compuesto M2 obtenido de la degradación de la T-514 corresponde con una muy alta probabilidad a la toxina T-510, obtenida del fruto de *Karwinskia tehuacana*. Por otro lado, el análisis de ¹H RMN del compuesto M1 indicó que sus señales espectroscópicas fueron similares a las encontradas para un compuesto de peso molecular 510 previamente aislado a partir de la degradación de la T-496,²⁵ y la similitud encontrada en sus Tr y espectros UV-Vis indica con una alta probabilidad que ambos compuestos corresponden a uno mismo. Lo anterior pudiera indicar que la formación de la T-496 es un paso intermediario en el metabolismo de la T-514 y que ésta no se haya detectado, debido a la rapidez de su transformación.

El aislamiento de los compuestos M1 y M2 permitió, además, la valoración de la citotoxicidad selectiva, ésta se realizó en células hepáticas huma-

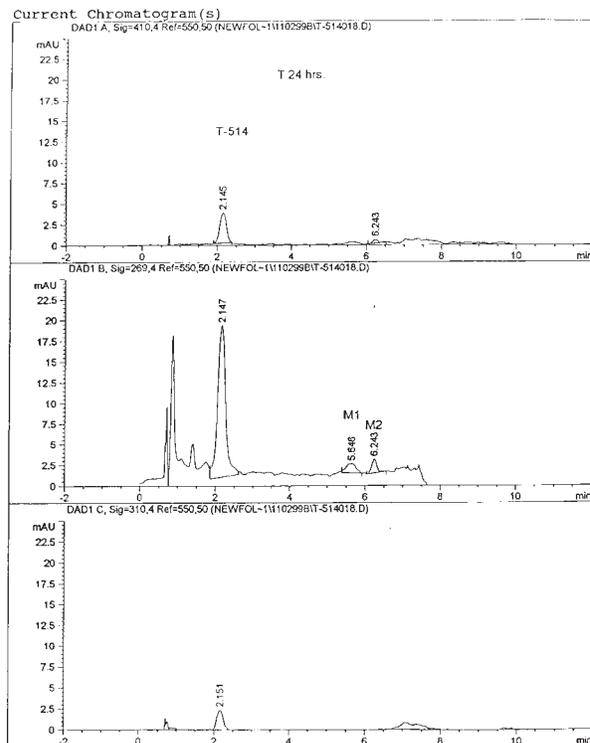


Fig. 4. Cromatogramas obtenidos de las muestras de microsomas hepáticos de rata (12.5µg/mi proteínas) incubados con 25µM de T-514.

nas, tanto de origen benigno como neoplásico, con el propósito de poder comparar la citotoxicidad en ambos tipos celulares y establecer su selectividad. Las líneas celulares se seleccionaron por su origen (humano), por provenir de hígado (que es uno de los órganos blancos de toxicidad de la T-514 en ensayos *in vivo*)²⁹ y por ser estas las líneas celulares utilizadas para el control de calidad en la obtención de la T-514. Al respecto, se estableció que ninguno de los dos compuestos mostró tener citotoxicidad selectiva hacia las células de origen tumoral. En este estudio se demostró que la T-514 se metaboliza y que la degradación de la misma es un proceso que ocurre en forma muy rápida, tanto *in vivo* como *in vitro*.

Agradecimientos

Los autores agradecen el apoyo recibido por parte del CONACYT Proyecto 26254-M y de la Universi-

dad Autónoma de Nuevo León: Proyectos PAICYT SA089-98 y 99, así como a los doctores Rigoberto Vargas Zapata y Rosalba Ramírez Durón, por sus valiosos comentarios a este trabajo.

Resumen

La T-514 es una antracena dimérica obtenida de plantas del género *Karwinskia*. Este compuesto posee toxicidad selectiva *in vitro* hacia células de origen tumoral y es considerado como un potencial agente antineoplásico. En este estudio se evaluó el metabolismo de la T-514 *in vivo* (plasma de perro y de humano) e *in vitro* (microsomas hepáticos y cultivo primario de hepatocitos) Se detectaron dos productos de degradación de la T-514 (M1 y M2) en los microsomas de rata y uno (M1) en los de mono. Los compuestos fueron aislados y la evaluación de su citotoxicidad en células de origen benigno y neoplásico mostró que éstos no poseen toxicidad selectiva hacia células de origen tumoral como el compuesto original.

Palabras clave: *Karwinskia*, T-514, Metabolismo, *In vivo*, *In vitro*.

Abstract

T-514 is a dimeric hydroxyanthracenone with potential antineoplastic effect. In this study we have evaluated the metabolism of this compound *in vivo* (dog and human blood) and *in vitro* (liver microsomes and hepatocytes). Two metabolites (M1,M2) were produced by rat microsomes and one by monkey microsomes. The evaluation of their cytotoxic effect on normal and neoplastic cells showed that the metabolites do not have the selective cytotoxic effect on tumoral cells as the original compound.

Keywords: *Karwinskia*, T-514, Metabolism, *In vivo*, *In vitro*.

Referencias

1. Flores, J. "Farmacología humana". Masson, S.A., México 3ª edición, 1997, pp. 73-80.
2. Katzung, B. G. "Farmacología básica y clínica". Manual Moderno. 7ª edición. 1999, pp. 61-68.
3. Rang, H. P. and Dale, M.M. "Farmacología".

- Churchill Livingstone. 2ª edición, 1995, pp. 98-102.
4. Dallner, G., Siekowits and Palade, G.E. Biogenesis of endoplasmic reticulum membranes. *J. Cell. Biol.*, 1996, 30, pp. 73-95.
5. Van Berkel, T.J.C., Koster, J.F. and Hulsmann, W.C. Distribution of L- and M-Type pyruvate kinase between parenchymal and Kuffer cell of rat liver. *Biochem Biophys. Acta*, 1972, 276, pp. 425-429.
6. Vrignaud, P., Londos-Gagliardi, D. and Robert, J. hepatic metabolism of doxorubicin in mice and rats. *European J. of drug metabolism and pharmacokinetics*, 1986. 11 No. 2, pp. 101-105.
7. Mas-Chamberlin, C., Bromet, N., Olgiati, V., Girardello, R. and Lowenthal, D.T. Metabolism study of Dihidro-alfa-ergocriptina, 9,10 [9,10,3H(N)] in rat and human hepatocyte cultures and rat, monkey, and human microsomes. *Am. J. Ther.*, 1997, 4 pp. 291-9.
8. Dreyer, D., Arai, I., Bashman, C., Andersin, W., Smith, R. and Daves, D. Toxins causing non inflammatory paralytic neurophathy. Isolation and structure elucidation. *J. Am. Chem. Soc.*, 97, 1975, pp. 4985.
9. Waksman, N. and Ramírez, R. Isolation of a new dimeric anthracenone from *Karwinskia humboldtiana*. *Rev. Latinoamer. Quím.* 23/1 y 22/24, 1992, pp. 25-27.
10. Rivas, V., Torres, R. and Waksman, N. "Dimeric Anthracenones from *Karwinskia* species". *Planta Medica*, 1990, 56, pp. 562.
11. Sepúlveda, J., Van der Klei, I., Keizer, I., Piñeyro, A., Harder, W. and Veenhuis. Studies on the effect of toxin T-514 on the integrity of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *M. FEMS Microbiology Letters*, 1992 91, pp. 207-212.
12. Piñeyro López, Alfredo. Toxicidad selectiva *in vitro* de la toxina T-514 de la *Karwinskia humboldtiana*. Tesis doctoral. Facultad de Medicina UANL, Monterrey, N.L., (1990).
13. Michalopoulos, G.K., Strom, S.C. and Jirtle, R.L. Use of hepatocytes for studies of mutagenesis and carcinogenesis, in *Isolated and Cultured Hepatocytes* (Guillouzo, A. and Guguen-Guillouzo, C., Eds.), John Libbey, London and Paris, 1986, pp. 333-352.
14. Guengerich, P.F. Microsomal Enzymes Involved in Toxicology Analysis and Separation. *Principles*

- and Methods of Toxicology, A. Wallace Hayes Ed. 1982, pp. 609-610 Raven Press, New York.
15. Acosta, D., Anuforo, D. C. and Smith, R.V. Preparation of primary monolayer cultures of postnatal rat liver cell. *J Tissue Cult. Meth*, 1980, 6, pp. 35.
 16. Mosmann, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immun. Meth*, 1983, 65, p. 225.
 17. Ekwall, B. and Johanson, A. Preliminary studies on validity of *in vitro* measurement of drug toxicity using hela cells. 1. Comparative *in vitro* cytotoxicity of 27 drugs. *Toxicology Letters*, 1980, 5, pp. 199-210.
 18. Stenlake, B.J., Waigh, R.D., Urwin, J., Dewar, G.H. and Coker, G.G. Atracurium: Conception and Inception. *Br. J. Anaesth.*, 1983, 55, pp. 3-10.
 19. Stiller, R, L., Ryan-Cook, D. and Chakravorti, S. *In vitro* degradation of Atracurium in human plasma. *Br. J. Anaesth.*, 1985, 57, pp. 1085-1088.
 20. Ficher, D.M., Canfell, C., Fahey, M.R., Rosen, I.J., Rupp, M.S., Sheiner, L.B., Miller, R.D. Elimination of Atracurium in Human: Contribution of Hofmann Elimination and Ester Hydrolysis versus Organ-based Elimination. *Anesthesiology*, 1986, 65, pp. 6-12.
 21. Carthy, B.B. and Hill, G.T. Some Aspects of the Analysis and Stability of Atracurium Besylate. *Anal. Proc.*, 1983, 20, pp. 177-179.
 22. Nigrovic, V. and Banoub, M. Pharmacokinetic Modelling of Parent Drug and its metabolite Atracurium and Laudanoside. *Clinic Pharmacokinet*, 1992, 22, pp. 396-408.
 23. Geigy Scientific Tables. Buffer Solutions. Vol.3, Edited by C. Lentner, Ciba-Geigy, 1984, pp. 58-61.
 24. Salazar, M.L., Piñeyro, A. and Waskman, N. A reverse phase HPLC method for quantification of peroxisomicine and other anthracenonic compounds. *Journal of Liquid chromatography & related technologies*, 1996, 19(9), pp. 1391-1403.
 25. Waksman de Torres Noemí, Dra. Comunicación personal.
 26. Garza-Ocañas, L., Acosta, D. and Torres-Alanis, O. "Evaluation of the production of oxidative stress by toxin T-514 of *Karwinskia humboldtiana*." *Toxicology Letters*, 1998, pp. 52-53.
 27. Guerrero de Viader, M. Viader Salvado, J. M., Zanatta Calderón, Ma. T., Piñeyro López, A. Farmacología Molecular de la T-514 Aislada de la *Karwinskia humboldtiana*. Análisis conformacional y generación de anión superóxido en sistemas enzimáticos y no enzimáticos. " IX Encuentro de Investigación Biomédica" Fac. Medicina UANL, 1991.
 28. Birandra, K.S. Free radicals in anticancer drug pharmacology. *Chem. Biol. Interactions*, 1989, 69, pp. 293-317.
 29. Bermúdez, M.V., González Spencer, D., Guerrero, M., Waksman, N. and Piñeyro, A. (1986). Experimental intoxicación with fruit and purified toxins of buckthorn (*Karwinskia humboldtiana*). *Toxicon*, 1986, 24, 1091.