

201
120



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

Facultad de Ciencias

**PRUEBAS DE QUIMIOSENSIBILIDAD
EN CANCERES DE CAVIDAD ORAL Y
OROFARINGE in vitro.**

TESIS PROFESIONAL

para obtener el Título de:

B I O L O G O

p r e s e n t a

HIPOLITO ANGEL MANJARREZ HERNANDEZ



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 está 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.

I N D I C E

INTRODUCCION

Características generales de las neoplasias- -	1
Biología del cáncer- - - - -	4
Cáncer de cavidad oral y orofarínge- - - - -	15
Cultivo de tejidos animales- - - - -	19
Quimioterapia del cáncer- - - - -	24
Pruebas de quimiosensibilidad <u>in vitro</u> - - -	35
METODOLOGIA- - - - -	39
RESULTADOS- - - - -	43
DISCUSION- - - - -	62
CONCLUSIONES- - - - -	69
APENDICES- - - - -	70
BIBLIOGRAFIA- - - - -	74

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

La humanidad ha tenido relación con las enfermedades neoplásicas durante toda su historia. La ciencia dispone de hechos que confirman la existencia de tumores malignos en nuestros antepasados lejanos.

Así el estudio de restos egipcios antiguos de la necrópolis, situada cerca de Gizeh, demostró que hace unos 5000 años se registraron tumores óseos (1).

Las neoplasias han sido reportadas virtualmente en todos los vertebrados, algunos invertebrados como los insectos, y plantas superiores (2). Se puede inferir por lo tanto, que el proceso puede ser esencialmente universal entre los organismos multicelulares. La presencia de lesiones neoplásicas en huesos de dinosaurios y otros fósiles prueba que la neoplasia hace su aparición tempranamente en la escala evolutiva.

En el desarrollo de la oncología antigua el mayor aporte se debe a los representantes de la medicina clásica: Hipócrates y Avicena (Abu Alí Ibn-Sina) (1). A Hipócrates se le considera como el primero en describir lesiones tumorales a las cuales dio el nombre de carcinos y carcinoma (cáncer - proviene de una palabra latina que significa cangrejo, la cual fue usada en el contexto médico por Cato el Elder aproximadamente 200 años A.C.) (3). Al observar la semejanza de

algunos tumores con la carne de pescado, Hipócrates propuso denominarlos: sarcomas (tumores carnosos). A los tumores que por su distribución recordaban el despliegue de las patas de un cangrejo, sugirió llamarlos carcinomas.

El proceso por el cual surgen los cánceres (carcinogénesis) empieza a ser entendido. La conversión de una célula normal a célula cancerosa es llamada transformación neoplásica. De todos los procesos patológicos generales que afectan a la célula, quizá el más dramático sea la transformación neoplásica. En muchos sentidos, la célula cancerosa plenamente desarrollada, es un microcosmos biológicamente muy distinto de la célula normal. Una célula transformada produce solo progenie transformada, de esta forma se le da origen a un clon de células cancerosas. El desarrollo preclínico de un cáncer, el cual ocurre por un largo período antes del diagnóstico, probablemente comprende una transformación progresiva, dando origen a subclones de malignidad incrementada. Muchos cánceres parecen ser monoclonales, es decir, como si fueran derivados a partir de una sola célula. Por lo tanto, si ocurre una transformación progresiva, cada una puede dar origen a una subclona particular con una ventaja competitiva tal que puede crecer para originar un tumor (5).

Existen muchas definiciones de neoplasia, lo que indica que ninguna es totalmente satisfactoria. Sin embargo, se -

considera que una neoplasia es una masa anormal de tejido, - cuyo crecimiento excede y no se coordina con el de los tejidos normales, y que persiste de la misma manera excesiva - después de que cesa el estímulo que la ha producido (6). - Según el comportamiento de las neoplasias clínicamente se - consideran dos grandes grupos: malignas y benignas (4). Estos dos términos representan en realidad los extremos de un espectro de características de crecimiento neoplásico. La - neoplasia maligna es un sinónimo del término cáncer, el tejido no se encapsula y sus bordes no están definidos: hay - proyecciones de células del tumor que se extienden desde la masa central a los tejidos vecinos invadiendo las estructuras circundantes. Las células están menos diferenciadas que las de origen, y muestran aumento de la actividad mitótica. Si el tumor invade vasos sanguíneos o linfáticos, las células transportadas a otras partes del organismo pueden proliferar y formar tumores secundarios, a lo cual se le llama - metástasis. Estas características son comunes para las células cancerosas en general, varían en detalle entre los diferentes tipos de cánceres y en el mismo cáncer de un estado de desarrollo a otro.

Los tumores clasificados como benignos proliferan localmente y están compuestos de células diferenciadas semejantes a las del tejido de origen y no producen metástasis. Además - el borde del tumor es muy preciso y la presión sobre los te

jidos vecinos suele hacer que reaccionen formando una cápsula fibrosa alrededor del tumor. Su ritmo de crecimiento suele ser lento, y finalmente puede cesar. Los trastornos clínicos producidos por tumores benignos dependen principalmente de efectos mecánicos, como obstrucción visceral y obstrucción de nervios (4).

Biología del Cáncer

Normalmente la tasa de división celular en los tejidos - esta controlada por mecanismos que permiten a las células - dividirse únicamente, si se necesitan nuevas células. Por ejemplo, las células quiescentes del hígado son estimuladas para dividirse rápidamente después de que se quitó una parte del hígado, y dejan de dividirse tan pronto como la masa normal del hígado se ha restaurado. El mismo tipo de división celular limitada se ve en la piel que ha sufrido algún daño. Sin tal mecanismo de control por retroalimentación de la división celular, la forma y consecuentemente la función de un animal multicelular sería destruida rápidamente, ya sea por una división celular excesiva (como ocurre en el cáncer) o por una falla para reemplazar las células muertas en los tejidos que normalmente experimentan una pérdida continua de células (como el tejido epitelial). Mecanismos reguladores similares también son importantes para el desarrollo ordenado de células y tejidos durante la embriogénesis (7).

Las células del cáncer muestran un número de propiedades

que las hacen peligrosas para el huésped incluyendo a menudo una habilidad para invadir otros tejidos y para inducir crecimiento interno vascular (lo cual asegura que las células proliferantes del cáncer tengan un suministro adecuado de sangre) (8). Sin embargo, una de las características que definen a las células cancerosas es que responden anormalmente a los mecanismos de control que regulan la división de las células normales, y que continúan dividiéndose de una manera incontrolada hasta que matan al huésped.

Hasta hace poco, la diferencia fundamental entre las células normales y tumorales se proponía que radicaba en cambios en los niveles de nucleótidos cíclicos celulares, fluidez de la membrana plásmatica, proteínas secretadas, el citoesqueleto y el flujo de iones, por mencionar unos cuantos (9). Mientras que los mecanismos moleculares involucrados en la carcinogénesis permanecen ocultos, es claro que las células cancerosas están menos sujetas a la mayoría de los mecanismos de retroalimentación que controlan la división celular normal, tanto in vivo como in vitro. Por ejemplo, las células cancerosas continuarán dividiéndose en cultivo más allá del punto en el que las células normales se detienen por inhibición por contacto, proliferando y apilándose una sobre otra (10). Además, las células cancerosas requieren menor cantidad de factores de crecimiento que las células normales para poder sobrevivir y dividirse en cultivo (en algu

nos casos puede ser porque producen sus propios factores de crecimiento) (11).

Una segunda diferencia fundamental importante entre las células normales y cancerosas es que las células cancerosas, como población pueden dividirse indefinidamente (12). En contraste, casi todas las células normales en mamíferos mueren después de un número limitado de divisiones. Por ejemplo, cuando los fibroblastos normales de mamífero crecen en cultivo, se dividirán entre 20 y 50 veces promedio, dependiendo del animal del que fueron extraídos. Conforme avanza el cultivo, las células individuales tardarán cada vez más tiempo para dividirse, es decir alargan su ciclo celular, y eventualmente toda la población cesará de dividirse y morirá. En general, las células tomadas de animales viejos se dividirán menos veces en cultivo que el mismo tipo de células tomadas de un animal joven, sugiriendo esto que las células viejas ya han tenido muchas de sus divisiones asignadas mientras formaban parte del tejido en el animal íntegro. Tales observaciones han llevado a creer que las células diferenciadas están programadas para morir después de cierto número de divisiones. Esta muerte celular programada podría ser de gran valor para el organismo como un seguro adicional contra el crecimiento desenfrenado de una célula en particular. Esto significa que la mayoría de las células que escapan de los controles normales de la división celular, -

podrían dar lugar solamente a pequeñas clonas de progenie celular antes de que muera totalmente la población (7).

Las células cancerosas proliferan más fácilmente con niveles bajos de suero y son en muchas ocasiones capaces de crecer mientras están suspendidas en gel agar; además, en general no detienen su proliferación cuando ya han cubierto el plato de cultivo, como lo hacen las células normales, sino que continúan apilándose hasta que alcanzan una gran densidad. Las diferencias en el potencial de crecimiento entre las células cancerosas y las células normales en cultivo, están asociadas a menudo con cambios citoesqueléticos conspicuos (13). La reorganización del citoesqueleto que acompaña estas alteraciones en el comportamiento se refleja en dos cambios: las células cancerosas son generalmente más redondeadas y las fibras tensoras se reducen en número, o están ausentes. Estos y otros cambios, conocidos colectivamente como transformación neoplásica, pueden producirse en células normales por infección con virus de tumor, tal como el virus de sarcoma Rous (14). Este virus simple que causa cáncer en tejidos de pollo solo tiene cuatro genes, uno de ellos (gene src) es la causa única de la transformación: cuando este gene se activa, las células son transformadas y se forman los tumores; cuando es inactivo, las células parecen ser normales. Recientemente se ha demostrado que el producto del gene src es una quinasa con una especificidad

poco común. La quinasa cataliza la fosforilación de residuos tirosina en un subgrupo particular de proteínas celulares, siendo la más interesante desde el punto de vista del citoesqueleto la vinculina. Esta proteína está asociada con las placas de adhesión y se piensa que es importante en el anclaje de los filamentos de actina a la membrana plasmática. Esta modificación por el producto del gene src puede causar los cambios en el citoesqueleto observados después de la transformación celular por el virus de sarcoma de Rous. Algunas observaciones sugieren que el crecimiento celular y la división pueden ser regulados normalmente por señales recibidas vía un citoesqueleto celular organizado (15,16).

Por otro lado, una vez que surge la célula cancerosa en un animal, no forma necesariamente un tumor: la mayoría de ellas son destruidas por reacciones inmunológicas mediadas por anticuerpos de la célula (vigilancia inmunológica) (17). Se cree que estas respuestas inmunológicas están dirigidas contra antígenos tumor-específicos que se hallan sobre la superficie de las células cancerosas. El cambio al estado canceroso aparentemente da como resultado casi invariablemente una reorganización drástica de la superficie celular exterior, la cual crea nuevos antígenos superficiales que son reconocidos como extraños por el sistema inmunológico del huésped (18). Muchos tumores no son susceptibles al ataque por anticuerpos solos o con complemento, pero son

susceptibles al ataque de células de origen linfoide llamadas asesinas. Estas células son de defensa ya que reconocen y eliminan rápidamente diferentes tipos de células parásito y células cancerosas. Tres tipos de células asesinas pueden estar involucradas en la inmunidad mediada por células a los tumores: las células T_C , células K (las células responsables de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos), y las células asesinas naturales y citotóxicas naturales (NK-natural killer, NC-natural citotóxic)(5). No está claro por qué escapa ocasionalmente a la vigilancia una célula cancerosa que pasa a generar un tumor. Los mecanismos de escape son numerosos, pero aún hipotéticos. Estos mecanismos postulan que algunos tumores no representan neoantigenicidad detectable; que la mayoría de los antígenos tumorales provocan reacciones de rechazo de escasa intensidad (antígenos débiles), si el tumor prolifera rápidamente supera la reacción de rechazo. También se cree que los antígenos tumorales desaparecen de forma pasajera al reaccionar con anticuerpos específicos (fenómeno de modulación antigénica), o que pueden modificarse cualitativa y cuantitativamente en el curso de la progresión cancerosa (19,20).

Para explicar el origen del cáncer se han propuesto muchas teorías, todas ellas de distinta manera estudian los cambios fenotípicos que tipifican a las células cancerosas. Estos cambios incluyen: tendencia a la proliferación relativa

vamente incontrolada e ilimitada, generalmente a expensas - del huésped; transmisión de la anormalidad proliferativa de una célula neoplásica a las generaciones sucesivas de células hijas, como un fenotipo relativamente estable y heredable; tendencia de la anormalidad proliferativa a progresar con el tiempo hacia un incremento de marcadas alteraciones en la morfología de la célula, el cariotipo, especificidad-antigénica, metabolismo y otras propiedades (21).

Aunque muchas teorías de la carcinogénesis han fallado y ninguna por sí sola ha tomado en cuenta todos los aspectos observados en la neoplasia, varias teorías forman las bases para los conceptos contemporáneos. Estas teorías pueden ser agrupadas bajo los principales mecanismos a que se refieren: mutación somática, diferenciación aberrante y activación - por virus (2,22).

Teoría de la mutación somática. La teoría de la mutación somática atribuye la neoplasia a las anormalidades en uno o más de los genes que regulan el crecimiento y la diferenciación. De acuerdo a esta teoría (23), dichas anormalidades - genéticas pueden ocurrir en cualquier momento durante la vida. Hasta donde una o más de las mutaciones requeridas sea heredada via el cigoto, la persona afectada se vuelve más - susceptible al cáncer, ya que pocas etapas mutacionales son necesarias para completar el proceso carcinogénico en una - célula somática. La acción carcinogénica de agentes tales -

como la radiación ionizante y los agentes alquilantes se debe a sus efectos mutagénicos en las células expuestas. Las evidencias que apoyan la teoría de la mutación somática incluyen: la influencia de la constitución genética sobre la susceptibilidad al cáncer; la correlación entre mutagenicidad y carcinogenicidad; y la frecuente ocurrencia de aberraciones cromosómicas en las células cancerosas.

Teoría de la diferenciación aberrante. En contraste con la hipótesis de la mutación somática, la cual atribuye la carcinogénesis a las anomalías de genes o cromosomas, la teoría de la diferenciación aberrante supone que dichos cambios no necesitan suceder (24). En su lugar, postula que los disturbios en la regulación de los genes, debido a una falla en la represión o desrepresión, puede causar un desajuste de crecimiento y diferenciación expresado en forma de cáncer, ya que el efecto involucra principalmente cambios en la regulación de los genes y no cambios en su estructura, se puede considerar epigenética más que genética. Ya que se sabe que se presentan patrones estables de expresión de los genes durante la diferenciación, y ya que los mecanismos teóricos posibles que existen muestran que los carcinógenos pueden causar cambios estables en la expresión de los genes a través de medios epigenéticos por sí solos - sin alterar necesariamente el material genético en sí, la distinción entre los mecanismos de diferenciación aberrante

y los mecanismos mutacionales necesitan evidencias especiales tales como: la totipotencialidad del genoma de la célula cancerosa; la reversibilidad del fenotipo neoplásico in vitro; la diferenciación de las células cancerosas in vivo; asociación del cáncer con disturbios en el desarrollo y una alta tasa de transformación in vitro.

Teoría viral. Finalmente la teoría de la tumorigénesis por ADN viral esta acompañada característicamente por la integración de genes virales en el genoma de la célula huésped. Después de esto, los genes virales son transmitidos verticalmente y pueden ser expresados sin la producción de virus infeccioso. (25).

Con la excepción del virus verrugoso, los agentes virales han sido implicados en la patogénesis de neoplasias en humanos. Sin embargo, la susceptibilidad de células humanas a virus que inducen transformación neoplásica in vitro está ampliamente documentada (26). Evidencias indirectas que implican a los virus en neoplasias humanas también se tienen; por ejemplo, la presencia frecuente de partículas características de virus en las células de ciertas malignidades; la asociación de antígenos específicos, posiblemente virales o mediados por virus, con las células de algunas neoplasias; la presencia de transcriptasa reversa; y la presencia de ciertas células cancerosas de secuencias de bases de ADN complementarias a las secuencias de bases de virus de tumor

conocidos. Estos y otros descubrimientos que son análogos - a los asociados con virus que inducen neoplasias en animales, sugieren fuertemente la participación de virus como co factores en la etiología de ciertos tipos de cáncer en humanos (27).

Hay evidencias que favorecen el punto de vista de que los - virus ejercen sus efectos oncogénicos a través de la inte-gración de información genética codificada en sus ácidos nucléicos en el genoma de la célula huésped infectada. En el caso de los ADN virus, la integración y la transcripción - subsecuente de ácidos nucleicos virales pueden ser análogo--gos al proceso que mejor se ha caracterizado en los bacte--riofagos lisogénicos. Por otro lado, en el caso de los ARN-virus, el proceso de integración, se piensa que involucra - un ADN intermediario, sintetizado a partir de ARN viral a - través de la acción de virus específicos ARN dirigido, ADN-polimerasa o la transcriptasa reversa (28).

La información viral integrada en el genoma de la célula - huésped es vista en cada una de las dos últimas hipótesis - como una parte constitutiva de la herencia normal de la cé--lula en donde los genes derivados del virus estarían suje--tos a la regulación por mecanismos de represión y desrepre--sión similares a los que controlan los genes normales. Es--tas hipótesis se conocen como la del oncogen y la del protovirus. Vista en este contexto, la teoría viral de carcino--

génesis y la teoría genética de carcinogénesis se funden en un trabajo unificado (29).

La hipótesis del oncogen postula que el genoma del ARN viral del tipo-C consiste de virogenes que codifican para la replicación del virus, y los oncogenes que codifican para la transformación neoplásica de la célula huésped. Dichos genomas virales estan ampliamente extendidos en los vertebrados, siendo transmitidos verticalmente en la línea germinal y jugando un papel funcional en el crecimiento celular normal y en la diferenciación codificando aloantígenos, o en la diferenciación de antígenos, o en la superficie celular. De acuerdo con esta hipótesis, se piensa que el cáncer es el resultado de la desrepresión de oncogenes virales, ya sea a través de la acción de carcinógenos externos, o a través de la ocurrencia de eventos mutacionales espontaneos. La desrepresión de virogenes que llevan a la producción de virus, no es considerada necesaria para la inducción de neoplasia (30).

La hipótesis del protovirus postula que la información genética puede ser transmitida dentro, o entre las células somáticas del ADN en las regiones protovirus del genoma a los intermediarios ARN. Entonces, via transcriptasa reversa, es transmitido de nuevo a las secuencias de ADN reinsertandose en el genoma. A través de este mecanismo, existen genes que se piensa son amplificados y nuevas secuencias de -

ADN evolucionaron en la diferenciación sin afectar la estabilidad de la línea germinal. En consecuencia, la evolución de los protovirus, ya sea por mutación de sus secuencias de bases, o de su falta de integración en los sitios equivocados en el genoma, da como resultado la transformación neoplásica de la célula afectada (2,31).

Cáncer de Cavidad Oral y Orofaringe

El cáncer de la cavidad oral y orofarínge es una enfermedad que se presenta en las etapas adultas de prevejez y vejez, ya que la mayoría de los casos se presentan entre la 5a, 6a, y 7a. década de vida, es más frecuente en hombres que en mujeres (32). La incidencia de cáncer oral en el mundo depende de las regiones geográficas y sus costumbres, según la Organización Mundial de la Salud (OMS), India es el país con mayor incidencia en cáncer oral debido a su costumbre de masticar nuez de betel. La ciudad de Malta presenta una alta incidencia de carcinoma de labio debido a la exposición solar, al igual que Polonia y España (33,34).

Los factores etiológicos que producen cáncer oral son entre otros, los hábitos como el alcoholismo, tabaquismo, consumo de alimentos muy condimentados y la temperatura alta, así como deficiente higiene oral, traumatismos (mordedura de carrillo, rosaduras de prótesis mal ajustadas y piezas cariaadas). Otro factor es la radiación solar, Spitzer y col. reportan una alta mortalidad por cáncer oral entre pescadores

de Canadá (35).

La mayoría de los cánceres de cabeza y cuello son de tipo epitelial, ya sea de revestimiento o glandular, y pueden estar precedidos de lesiones blancas de tipo infeccioso (si filis terciaria, candidiasis), dérmicas (líquen plano, glo-sitis media romboidea, etc) o de verdaderas leucoplasias - (queratinización de un epitelio pavimentoso normalmente no-queratinizante) con potencial de transformación a la malignidad, por mecanismos de diferenciación celular que dan lugar a una lesión displásica que pronto puede mostrar un carcinoma in situ (36).

Los carcinomas invasores pueden ser clasificados como: - bien diferenciados, pobremente diferenciados y moderadamente diferenciados. El comportamiento del tumor lo dá el grado de diferenciación celular, existiendo una correlación en tre el grado de diferenciación y la malignidad, así que entre más diferenciado sea un tumor tiene mejor pronóstico pa ra el paciente. Es muy difícil reconocer el tipo histológico de los tumores indiferenciados (glandular o epitelial, - el melanoma y el linfoma son los parámetros de diagnóstico diferencial). Pueden existir además diseminaciones locales y a distancia de un tumor primario, de acuerdo a su grado - de invasividad (37).

Entre los carcinomas hay que distinguir: carcinomas glan dulares, llamados también adenocarcinomas (el aspecto glan-

dular puede ser más o menos claro según el grado de diferenciación) carcinomas no glandulares y carcinomas indiferenciados. Entre los carcinomas no glandulares (epidermoides) hay que distinguir los carcinomas espinocelulares, basocelulares y transicionales.

Los tumores de las glándulas salivales pueden ser de muchos tipos celulares, tal como: adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma mixto, carcinoma adenoideo quístico (38). El carcinoma epidermoide (de célula escamosa) es el proceso maligno que más frecuentemente se presenta en la boca, histológicamente suele aparecer formando masas, laminas, islotes o cordones de células escamosas malignas que proliferan hacia abajo penetrando en el tejido conectivo y en las capas musculares. El carcinoma mucoepidermoide esta formado por tres tipos celulares principales: células secretoras de moco, células de tipo epidermoide, y células intermedias.

Las células secretoras de moco predominan en el carcinoma mucoepidermoide. El carcinoma adenoideo quístico está compuesto de pequeñas células que se tiñen uniformemente, dispuestos en cordones anastomosados, o en imágenes a modo de conductos cuya porción central puede contener material mucoso o hialino. El resultado final es un aspecto de panal. El tumor mixto maligno, representa cerca del 60% de las neoplasias de las glándulas salivales, está formado por epitelio escamoso que a veces presenta zonas de queratinización.

Además podemos encontrar epitelio glandular, lo mismo que material mucoide, que es un producto de degeneración del epitelio (39).

Los melanomas malignos representan del 1 al 2% de todos los cánceres. Representan un 20% de cánceres cutáneos para los países que poseen una incidencia elevada de tumores malignos cutáneos. Son particularmente frecuentes en Australia, donde individuos rubios y pelirrojos viven al sol y donde la tasa de incidencia de melanoma es de ocho a diez veces superior que en el resto de los países. Es una neoplasia rara de la boca, ya que se trata de una de las enfermedades más fatales y de más rápida evolución. Todo melanocito, célula del sistema pigmentario situada entre los queratinocitos y la capa germinativa de la epidermis, puede dar lugar a un melanoma (40).

Los tumores de tiroides son relativamente raros (1% del conjunto de los cánceres). Su distribución según el sexo, las poblaciones, la edad, el tipo evolutivo y el pronóstico difieren radicalmente según el tipo histológico.

El cáncer de tiroides es dos veces más frecuente en la mujer que en el hombre y se observan sobre todo entre los 50 y los 70 años de edad, aunque pueden raramente observarse en la primera infancia. Los cánceres de tiroides presentan a su vez diversos aspectos histológicos, siendo el más frecuente (60% de los casos) el adenocarcinoma papilar y en se

guida el folicular (que a veces tiene disposición alveolar). Además existen otros cánceres, igualmente epiteliales, de las células gigantes y raramente de tipo escamoso (40).

Cultivo de tejidos animales

La necesidad de mejorar los estudios experimentales en cáncer ha hecho del cultivo de células neoplásicas la principal herramienta de ésta investigación, debido a que el cultivo de células fuera del organismo permite la observación de las células vivientes en condiciones muy favorables. Constituye esto un sistema más simple que el de un tejido o un órgano, de manera que puede estudiarse bajo condiciones bien controladas (41).

Las técnicas de cultivo de tejido desarrolladas a finales del siglo pasado tuvieron un gran impacto sobre la biología celular, la citogenética, la virología y otras disciplinas relacionadas (42). Las primeras evidencias en forma de observaciones detalladas de la supervivencia y división celular fueron proporcionadas por Jolly (43) en 1903. Posteriormente Harrison en 1909 (44), demostró que las células nerviosas embrionarias podían crecer y diferenciarse in vitro, dando lugar con sus trabajos a las técnicas de cultivo de tejido que aún son utilizadas. Otra aportación de gran importancia fue la proporcionada por Carrel (45) en 1912, el cual pudo hacer crecer explantes de corazón embrionario-

de pollo durante 34 años a través de miles de generaciones celulares. La técnica de cultivo utilizada, fue un progreso notable y consistía en hacer un explante de un pequeño trozo de tejido, de preferencia embrionario, en un medio formado por suero sanguíneo, extracto embrionario y solución salina. Este sistema era sumamente complejo desde el punto de vista químico y evidentemente no se podía observar el efecto de una sustancia en particular sobre las células, por lo que se consideró necesario para este fin la creación de medios químicamente definidos.

El desarrollo de la técnica de cultivo de tejido que permitiría el mantenimiento en cultivo en general de células eucariontes provenientes de diferentes especies por un largo período de tiempo, fue logrado desde 1941 por Fischer (46) quien además propuso el uso de un medio de cultivo sintético. En 1955 Eagle (47) desarrolló un medio sintético (medio mínimo esencial), que consiste de 13 aminoácidos diferentes, 8 vitaminas y una mezcla de sales inorgánicas, además de -- glucosa como fuente de energía, el cual era capaz de sostener la supervivencia y proliferación activa de ciertas células de mamífero sin ningún tipo de suplemento. A veces surgen requerimientos adicionales (v.g. serina, inositol, piruvato) sobre todo cuando las células proliferan a baja densidad (48). Los medios sintéticos aunque proporcionan los elementos básicos para el desarrollo celular, son en general

suplementados con una pequeña cantidad de sueros, principalmente de caballo y fetal de bovino, y en ocasiones de humano. La necesidad de suero es casi universal para todas las líneas celulares de vertebrados, debido a que éstos contienen importantes promotores (hormonas factores y cofactores) de la multiplicación de células in vivo. Uno de los medios de cultivo más utilizado en la actualidad es el medio ideado por Eagle (49), cuyo contenido en iones inorgánicos a concentración isoosmótica, en número de aminoácidos y en vitaminas es suplementado al momento de su uso con sueros heterólogos, homólogos o autólogos. Se suele agregar bicarbonato de sodio, como regulador de pH cuya acción se ejerce en forma conjunta con el alto nivel de CO_2 existente en la incubadora. Los medios de cultivo en consecuencia proveen condiciones físicas indispensables para la sobrevivencia de las células in vitro (presión osmótica y pH). Además proporcionan las sustancias químicas requeridas por las células y que éstas no pueden sintetizar.

El cultivo de tejidos consiste en transferir porciones de tejidos a un medio de cultivo adecuado, donde las células pueden adaptarse y proliferar en forma autónoma, manteniendo las condiciones de cultivo semejantes a las del cuerpo del animal del cual se extrajo dicho tejido (50). Cuando el cultivo de tejido a partir del explante se lleva a cabo con éxito, se le denomina cultivo primario y de él -

es posible obtener líneas celulares, que son subcultivos obtenidos a partir de muchas generaciones celulares, en los cuales las células pueden permanecer diploides y retener muchas características del explante inicial. Dichas células pueden propagarse indefinidamente (41). Las características de las células en líneas establecidas, son diferentes a las de las células del cultivo primario (cinética de proliferación, requerimientos nutritivos y morfología entre otras), y en general se dice que las líneas establecidas son células transformadas, las cuales han sido adaptadas a un crecimiento prolongado in vitro (51,52,53).

El metabolismo de células in vitro, es en general similar al de las células in situ (54,55). En éstas, los caminos energéticos más importantes en el metabolismo de carbohidratos son la glicólisis y el ciclo de Krebs. En ocasiones estas células producen un aumento de ácido láctico y ácidos cetónicos en el medio (48). En el metabolismo de proteínas, se conocen unos 12 aminoácidos esenciales, los restantes se sintetizan por transaminación, desaminación hidrolítica o desaminación oxidativa. Algunas células no pueden usar proteínas en el medio, por falta de enzimas proteolíticas, y por lo general la síntesis de lípidos la realizan a partir de precursores sencillos, como el acetato, lo mismo sucede con los ácidos nucleicos, aunque si estos se proveen en el medio son usados preferencialmente (54,56).

Anteriormente se pensaba que la mayoría de los tumores - eran incultivables, hasta que en 1951 Gey, Coffman y Kubicek cambiaron esta idea (57). Gey ensayó cultivos de células normales y cancerosas, en su mayoría estas células no presentaron proliferación. Sin embargo, a partir de un cáncer cervical, Gey obtuvo una población celular de rápido crecimiento a la cual le llamo HeLa, y fue la primera línea celular de tipo epitelial derivada de tejido humano y mantenida continuamente durante cultivos sucesivos. Esta línea fue aislada a partir de un carcinoma de cervix de una mujer negra de 31 años de edad (58). Es importante mencionar que desde su origen esta línea celular ha sido una de las más ampliamente estudiadas. Aunque no todos los explantes provenientes de tejidos tumorales han dado lugar a líneas, hoy en día - existe una gran cantidad de este tipo de líneas celulares para investigación (58). Con la finalidad de poner a la disposición de investigadores en todo el mundo las células tanto de tejidos normales como de tumores de diferentes especies, se ha creado un banco de referencia en el cual se pueden adquirir estas células para los distintos experimentos. Para el cultivo de células tumorales, además de medios líquidos se han desarrollado medios semisólidos utilizando principalmente agar a concentraciones muy bajas (59,60, 61), pero en general, no todas las células que proliferan en medios líquidos pueden hacerlo en medio semisólido. Sin embar

go, se ha encontrado que en muchas ocasiones existe una correlación entre el grado de malignidad de una línea celular y su capacidad para proliferar en agar (62,63). Recientemente se han encontrado factores capaces de hacer proliferar células normales en agar y así mismo células que aún siendo malignas no proliferan en otros medios (64). Debido al control que se puede tener de las líneas celulares in vitro, la mayoría de la información sobre las alteraciones que tienen las células malignas respecto a las normales (diferentes receptores de membrana, diferentes niveles enzimáticos, etc.) han podido ser estudiadas (58). La colección de líneas celulares fue establecida a través de los esfuerzos cooperativos de la American Type Culture Collection y un grupo de colaboradores de laboratorio. En 1980 la colección contenía 400 líneas celulares caracterizadas derivadas de aproximadamente 40 especies diferentes, incluyendo 202 líneas de fibroblastos de piel humana derivada aparentemente de individuos normales y de pacientes con varias enfermedades (incluyendo desordenes genéticos). Todas están preservadas en nitrógeno líquido con el cual se mantiene la temperatura constante de -190°C (58).

Quimioterapia del cáncer

Desde tiempos muy remotos (3) hasta hace poco la cirugía fue la técnica empleada para tratar el cáncer. Sin embargo, en los últimos 20 años y debido al avance de la medicina se

han desarrollado otras técnicas como son la radioterapia, - quimioterapia, inmunoterapia, entre otras (65,66,67). De -- estas técnicas las más empleadas son la radioterapia y la - quimioterapia. Mientras que la radioterapia tiene aplica- ción para un número reducido de tumores y sobre todo cuando estan bien localizados, la quimioterapia tiene un mayor radio de acción. Los prospectos más brillantes para el futu- ro involucran el uso de cirugía o radiación para controlar la enfermedad local y el uso temprano de drogas para contro- lar la enfermedad metastásica (68).

La quimioterapia es un tratamiento general, sistemático, capaz de alcanzar a casi todas las células malignas del organismo. La excepción es el caso particular de las localiza- ciones inaccesibles, como el sistema nervioso central, para las drogas no capaces de atravesar la barrera "cerebromenín- gea" (20). El ideal de la quimioterapia es el de encontrar una o más drogas que, actuando a través del organismo, ten- gan un grado de selectividad que les permita lesionar a la célula cancerosa con daño mínimo a las restantes normales. Este es un hecho de importancia fundamental si se recuerda que el proceso maligno radica en la célula misma (69).

En los años cuarentas, desde que se dió la primer quimio- terapia citotóxica (70), literalmente miles de agentes quí- micos han sido probados por su actividad en destruir células cancerosas. Relativamente pocas de estas drogas alcanzan la

etapa de pruebas clínicas en animales, y pocas aún son suficientemente seguras, o efectivas para ser probadas en humanos. Un pequeño número de estos fármacos que han sido probados en humanos establecieron el criterio para uso de rutina clínica. Puesto que existe un gran número de estos fármacos, es difícil para los clínicos determinar el modo de acción, dosis requerida y la toxicidad (71). Para cada caso en particular en los pasados 10 años han ocurrido mejoras notables en el tratamiento exitoso de unos cuantos tipos de cáncer, que en el pasado fueron generalmente fatales. En su mayor parte estas mejoras se desarrollaron en tumores poco comunes, generalmente en los niños, adolescentes y adultos jóvenes como en linfoma histiocítico, leucemia linfoblástica aguda y linfoma de Burkitt, entre otros (72). El nuevo factor en el control del cáncer es la habilidad para curar el cáncer que no se localiza fácilmente (metástasis), una mejora proporcionada por el desarrollo de drogas antitumorales. Estos agentes quimioterapéuticos tienen la propiedad de poder controlar el cáncer distante o metastásico.

En una investigación utilizando un modelo tumoral, la leucemia L1210 del ratón, Skipper y colaboradores, establecieron varios principios importantes que han guiado y orientado la moderna quimioterapia del cáncer (69). Los mismos pueden resumirse brevemente así: 1) una sola célula maligna clonógena puede dar lugar a una progenie suficiente para -

matar al huésped; para lograr una cura es necesario eliminar a todas estas células, 2) a diferencia de la quimioterapia antimicrobiana, en donde casi siempre se constatan importantes contribuciones de los inmunomecanismos y de defensa del huésped, éstos últimos tienen un papel insignificante en la terapia de la enfermedad neoplásica, a menos que sólo exista un pequeño número de células malignas, 3) la muerte celular causada por los agentes antineoplásicos sigue la cinética de primer orden, es decir que un porcentaje constante, y no un número constante de células se mata con una maniobra terapéutica determinada. Este hallazgo ha tenido un efecto profundo sobre la quimioterapia clínica del cáncer: por ejemplo, un paciente con leucemia linfocítica aguda avanzada puede alojar 10^{12} células, o sea alrededor de 1 kg de células malignas y una droga capaz de matar 99.99% de estas células reduciría la masa tumoral a 100 mg, teniendo la apariencia de una remisión clínica completa, pero en realidad quedarían 10^8 células malignas, cualquiera de las cuales podría causar una recidiva (69). Por otra parte, el conocimiento de la cinética del ciclo celular es esencial para el uso correcto de la actual generación de agentes antineoplásicos. Muchos de los agentes citotóxicos más potentes actúan en fases específicas del ciclo celular y por ello sólo son activos contra las células que se encuentran en proceso de división. De esta forma, los cánceres humanos actualmente -

más susceptibles al tratamiento quimioterapéutico son aquellos con una gran proliferación, es decir con un alto porcentaje de células en proceso de división. Desgraciadamente los tejidos normales que también proliferan rápidamente (médula ósea, folículos pilosos y epitelio intestinal) están sujetos a daños por estas potentes drogas antineoplásicas, y la toxicidad resultante suele limitar la utilidad del tratamiento (71,73).

La división de células normales y neoplásicas ocurre en una secuencia de eventos referido como ciclo celular. El ciclo celular está dividido en varias fases diferentes. La fase G_1 referida como el primer espacio del ciclo, donde se presenta la síntesis de ARN y proteínas. Cuando las células permanecen en G_1 por períodos prolongados de tiempo, se dice que están en una fase de resistencia llamada G_0 . La fase S (síntesis) es el período durante el cual ocurre la síntesis de ADN. El tiempo que las células normales emplean en esta fase en comparación con las células malignas es usualmente diferente. Siguiendo la fase S está el segundo espacio del ciclo, llamado G_2 . Durante éste, la síntesis de ADN se detiene, mientras la síntesis de ARN y proteínas continúa. El paso final de replicación de cromosomas y segregación ocurre durante la fase llamada M, cuando ocurre la mitosis. La tasa de síntesis de ARN y proteínas disminuye durante esta fase (71,74).

Muchas de las drogas natineoplásicas están clasificadas con base en su actividad en una fase específica del ciclo celular. La acción citotóxica de varias drogas que están siendo utilizadas en quimioterapia, depende de la tasa de división celular, mientras más rápido se dividen las células, éstas son eliminadas más rápidamente. Estos agentes citotóxicos dependientes de la proliferación son principalmente de dos tipos: los agentes "fase-específicos", donde la acción de la droga está limitada efectivamente a una etapa del ciclo celular, y los agentes "ciclo-dependientes" o "fase-no específicos", donde la droga puede afectar a las células en todas las etapas del ciclo celular. El uso de estos agentes permite facilitar una muerte selectiva de las células que se están dividiendo rápidamente dentro de los tejidos (75,76).

Los agentes quimioterapéuticos que inhiben el crecimiento de las células se pueden clasificar como sigue: compuestos inhibidores del crecimiento; antimetabolitos antagonistas del ácido fólico, análogos de la purina, análogos de la pirimidina y antagonistas de la glutamina; agentes alquilantes polifuncionales; hormonas esteroides; compuestos diversos como antibióticos, alcaloides vegetales, L-asparaginasa; otros depresores hemopoyéticos (69,70,71,76).

Antimetabolitos. Los antimetabolitos son análogos estructurales de sustancias que ocurren fisiológicamente, llamados metabolitos, los cuales pueden producir mediante com-

petencia por el receptor respectivo signos de deficiencia - en un sistema biológico. Esto no implica que todos los análogos estructurales sean antimetabolitos, pues algunos son metabólicamente inertes y otros pueden llegar a substituir al correspondiente metabolito. Esta definición también requiere que el análogo interfiera con la función de la sustancia fisiológica correspondiente.

Agentes alquilantes. Estos agentes son muy reactivos, - transfiriendo grupos alquílicos o importantes constituyentes celulares, combinándose con grupos amino, sulfhidrilo, carboxilo y fosfato. No son específicos del ciclo celular, pueden combinarse con las células en cualquier fase del mismo. Se cree que alquilan el ADN, y más específicamente, la guanina. Esta acción básica puede explicar la toxicidad preferente de estos compuestos por las células en rápida multiplicación.

Hormonas esteroides. En contraste con otros agentes - quimioterápicos que actúan indiscriminadamente sobre las células en rápida proliferación, las hormonas esteroides son mucho más específicas en sus efectos sobre las mismas. Cada hormona actúa sobre un tejido específico y, según el tejido atacado, estimula o inhibe su crecimiento. La importancia - de las hormonas esteroides en la quimioterapia del cáncer - radica en el hecho de que el cáncer que se origina en tejidos modificables por las hormonas esteroides puede conser--

var algo de la reactividad hormonal de su tejido de origen. Así, las alteraciones en el ambiente hormonal pueden aumentar el ritmo de crecimiento o hacer que el cáncer regrese, según el sitio primario del cáncer y las propiedades que re tenga de su tejido de origen. Las hormonas esteroides guardan una relación compleja entre si, con hormonas producidas por otros órganos efectores, y con hormonas secretadas por la glándula pituitaria. Las de interes clínico son los andrógenos, estrógenos, progestinas y esteroides adrenocorticoides. Todas estas son estructuralmente similares, aunque sus efectos biológicos sean completamente diferentes.

Compuestos diversos: Antibióticos. Son sustancias químicas producidas por diferentes especies de microorganismos (bacterias, hongos, actinomicetos) que suprimen el crecimiento de otros microorganismos. Recientemente un buen grupo de agentes antitumorales han sido aislados de microorganismos, y estos antibióticos antineoplásicos han demostrado tener aplicación en la quimioterapia citotóxica. Los antibióticos con actividad antitumoral parecen afectar la función o síntesis (o ambas) de ácidos nucleicos. No se conoce completamente el efecto citotóxico de los antibióticos pero se cree que son una consecuencia directa de su interferencia con la función del ADN. Los efectos antimetabólicos y de superficie celular pueden ocurrir con estos agentes, que parecen ser fase-no específicos del ciclo celular.

Alcaloides vegetales. Un grupo de inhibidores mitóticos (vinblastina y vincristina) fueron encontrados durante el desarrollo de estudios dirigidos hacia agentes antidiabéticos. A sus propiedades hipoglicémicas no les encontraron utilidad, pero a sus efectos citotóxicos sí. Estos agentes son derivados de la planta pervinca (Vinca rosea Linn). Químicamente ambas moléculas son muy complejas y difieren una de otra, sólo en un lado simple de la cadena molecular. Estos agentes ejercen su efecto citotóxico uniéndose a la proteína microtubular (tubulina) la cual es un componente clave de los microtúbulos celulares causando detención de la división celular en la metafase. También se ha visto la inhibición de síntesis de ácidos nucleicos y proteínas a alta concentración. Estos agentes son fase-específicos y su mecanismo de acción y metabolismo son similares, pero el espectro antitumor, dosis y toxicidad clínica son muy diferentes.

L-Asparaginasa. El desarrollo de la L-asparaginasa se efectuó luego de la observación hecha por Kid en 1953 de que una sustancia en el suero del cobayo inhibía el crecimiento de ciertos tumores transplantados en el ratón. Se descubrió que el componente activo era la L-asparaginasa y que su actividad es debida a que ciertas células neoplásicas dependen de la L-asparagina exógena, un aminoácido no esencial. La exposición a la enzima L-asparaginasa elimina la L-asparagina exógena in vivo y da como resultado la inhi

bición del crecimiento de estas células dependientes. En -
contraste, las células normales, que son capaces de sinteti-
zar su propia asparagina, no son influidas por la presencia
de la asparaginasa. Además de sus implicaciones prácticas
inmediatas, esta observación es importante debido a que re-
presenta una diferencia bioquímica específica entre las cé-
lulas normales y ciertas células neoplásicas.

Otros depresores hemopoyéticos. En 1939 se encontró -
que los embriones de las semillas expuestas al etil-fenil--
carbamato se desarrollaban anormalmente. Esto condujo al es-
tudio general de los ésteres arilcarbamato y compuestos re-
lacionados en las plantas, y se encontró que el isopropil--
fenilcarbamato era el más activo en tanto que el uretano -
era inactivo. Haddow y Sexton examinaron la capacidad de -
los carbamatos para inhibir el crecimiento de tumores mama-
rios transplantados en el ratón y la rata, y en estos anima-
les resultaron activos el uretano y el feniluretano. En con-
secuencia, se ensayó el uretano en los carcinomas mamarios
humanos. Aunque no se obtuvo respuesta terapéutica, los pa-
cientes desarrollaron leucopenia, y esta observación llevó
a Paterson y col. a ensayar el producto en la leucemia cró-
nica.

A pesar de que la experiencia con terapia de drogas para
carcinoma de células escamosas avanzadas o recurrentes de -
cabeza y cuello es limitada, varios agentes han producido -

una regresión del tumor convincente y reproducible en esos pacientes (77).

Los agentes químicos más utilizados en cánceres de cabeza y cuello son los siguientes (66,71):

Actinomicina D. Es un antibiótico antitumoral que se une a la porción guanina del ADN y evita la síntesis de ARN y ADN. También inhibe tanto a la ARN polimerasa dependiente del ADN (la llamada mensajera) como la ADN polimerasa.

Adriamicina. Es un antibiótico antitumoral que se intercala entre los pares de bases de ADN e inhibe la síntesis de ARN y ADN.

Bleomicina. Es un grupo de 13 glicopéptidos antitumorales que se une al ADN llevando al rompimiento de enlaces simples y dobles. La síntesis de ADN es dañada y en menor grado son inhibidas la síntesis de ARN y proteínas.

Cisplatino. Tiene similitudes con agentes alquilantes y metales pesados. Inhibe la síntesis de ADN por formación de enlaces cruzados intracadenas y extracadenas de ADN y desnaturaliza la doble hélice. No es fase-específico del ciclo celular.

5-Fluorouracilo. Es un antimetabolito pirimidico que bloquea la reacción de metilación del ácido dioxiurídico interfiriendo con la síntesis de ADN. También se incorpora al ARN e interfiere con su función.

Metotrexate. Es un antimetabolito que inhibe la conver

sión de ácido fólico en ácido tetrahidrofolico por unión a la enzima dehidrofolato reductasa. Esto inhibe la síntesis de timidina y purinas, las cuales son esenciales para la síntesis de ADN. Es fase-específico del ciclo celular y actúa en la fase S.

Mitomicina C. Un antibiótico antitumoral que actúa como agente alquilante e inhibe la síntesis de ADN y ARN. Causa entrecruzamiento de ADN proporcional a su contenido de guanina y citosina. No es fase-específico del ciclo celular.

Vinblastina y Vincristina. Derivados alcaloides que causan detención en metafase por unión con las proteínas de los microtubulos utilizados para la formación del huso mitótico. Además, puede inhibir el transporte de uridina y síntesis de proteínas, ADN y ARN. Es fase-específico con actividad principalmente en las fases M y S.

Pruebas de quimiosensibilidad in vitro

Aunque el incremento en el éxito del uso de quimioterapia sobre el cáncer es real, las características fisiológicas de los humanos y sus tumores varían tan ampliamente que no es sorprendente que la sensibilidad de tumores hacia las drogas quimioterapéuticas también varíe, aún dentro de tumores aparentemente idénticos fenotípicamente (78).

La mayoría de los tumores constan de una población heterogénea de células madre del tumor (las cuales poseen una habi-

lidad proliferativa extensiva, sino es que indefinida) y - otras células que muestran poca o ninguna actividad proliferativa. Probablemente representan estados más diferenciados o poblaciones genéticamente estériles (78). Además del uso de animales para la investigación de agentes quimioterapéuticos efectivos contra el cáncer que tienen grandes problemas de costo, espacio y cuidado, los resultados no siempre son paralelos con los resultados obtenidos clínicamente -- (79,80). Claramente una indicación del posible espectro de sensibilidad de una población celular de un tumor humano es pecífico, hacia ciertos agentes antitumorales podría ayudar a decidir el tratamiento quimioterapéutico requerido.

Un objetivo importante en la investigación en cáncer ha sido el de desarrollar técnicas simples para predecir la - sensibilidad de cánceres humanos hacia diferentes drogas. Para este fin, muchos investigadores han intentado establecer sistemas in vitro para el análisis de poblaciones celulares del tumor y, en particular, la respuesta de las células tumorales de pacientes individuales a la variedad de - agentes quimioterapéuticos disponibles (81,82,83,84,85). Es recomendable tomar en cuenta ciertos criterios: la prueba debe distinguir entre la proliferación de células normales y tumorales y los resultados necesitan obtenerse lo suficientemente rápido para permitir a los clínicos utilizar los datos. Dicho método no tomará en cuenta diferencias en

el cambio del huésped y eficiencia de destoxificación para la droga, acumulación específica en el tejido, efectos de actividad inmunosupresora y muchos otros parámetros asociados con el huésped, pero dichas pruebas in vitro deberían al menos dar una indicación inicial de efectividad relativa contra una población celular de tumor humano específico (78).

El mayor problema de la eficacia de los sistemas in vitro para determinar la respuesta del tumor a las drogas quimioterapéuticas, ha sido la baja eficiencia de crecimiento observada en muchas células tumorales (86,87,88). En consecuencia varios métodos de cultivo de tejidos en medio líquido han sido usados desde los cincuentas para ensayar el efecto de drogas sobre células normales y neoplásicas y favorecer la proliferación celular (89,90). Estos estudios han sido realizados principalmente sobre líneas celulares ya establecidas, tales como las HeLa y la 72J. Eagle y Foley (90) encontraron que las drogas que son citotóxicas bajo concentración de 1×10^{-7} g/ml son también activas contra tumores in vivo. Por otro lado, se han obtenido resultados interesantes midiendo la inhibición por diferentes agentes antineoplásicos de la proliferación celular en líneas celulares de tumores ya establecidas (91,92). Sin embargo, el establecimiento de líneas celulares tumorales requiere de un largo período de adaptación, y cuando finalmente se realizan los experimentos, las células por lo general han experimentado

muchos cambios en sus características originales (93, 94).

Otro sistema de pruebas in vitro que generó considerable entusiasmo fue el ideado en 1977 por Hamburguer y Salmon (95). Teóricamente este sistema llamado "ensayo clonogénico" provee la atractiva posibilidad de desarrollar quimioterapia - para pacientes individuales y se basa en el efecto de agentes quimioterapéuticos sobre células formadoras de colonias en agar blando a partir de células tumorales derivadas directamente de biopsias. Sin embargo, tiene varias fallas, - principalmente asociadas con la disgregación enzimática del tumor en células solas, y la imposibilidad, en muchos casos, para hacerlas proliferar en medio semisólido (87, 96). Otros ensayos se basan en cambios morfológicos o bioquímicos después de que las células han sido expuestas a drogas y algunos más han utilizado precursores radioactivos para medir - cambios en el metabolismo celular (97, 98). Sin embargo, a - la fecha no hay una técnica confiable para estos fines.

Tomando en cuenta que las células tumorales cultivadas - en medios líquidos presentan una alta eficiencia de proliferación celular, en este trabajo se cultivaron diferentes - biopsias de varios carcinomas de cabeza y cuello en medio - líquido, para evaluar la inhibición a la proliferación celular causada por diferentes agentes antineoplásicos, contribuyendo de esta forma al establecimiento de una técnica que en el futuro podría ser útil para predicciones individuales de drogas anticancerosas.

M E T O D O L O G I A

Condiciones de cultivo

El medio de cultivo que fue utilizado es conocido como - Medio Mínimo Esencial de Eagle o Medio de Eagle (ME) (Micro lab, Mex., D.F.) (Apéndice I) (99), suplementado con 20% de suero fetal de bovino (SFB) (Microlab, Mex., D.F.), previamente desactivado a 56°C en baño de agua durante 30 min. A este medio se le adicionaron tanto 100 U/ml de penicilina G (Sigma Chem Co., USA.), como 100 µg/ml de estreptomycin - (Sigma Chem Co., USA.) como medida preventiva para una posi ble contaminación bacteriana, así como 3.7 g/l de bicarbona to (J.T. Baker, México) para mantener mediante el CO₂ de la atmósfera un pH fisiológico en los cultivos.

Para dar las mejores condiciones al cultivo, fue utilizada una incubadora de bióxido de carbono, la cual tenía una tem peratura constante de 37°C con humedad a saturación y una - atmósfera de 10% de bióxido de carbono en aire. (100).

Obtención de las biopsias

Las biopsias de neoplásias malignas fueron obtenidas cuan do se practicó la cirugía a los pacientes en el Hospital de Oncología del Centro Medico Nacional, IMSS. La muestra fue tomada dentro del quirófano y se depositó en un tubo de plás tico conteniendo 15 ml de medio de cultivo con 10% de SFB.

Posteriormente, la muestra se colocó en una hielera para ser transportada al Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer de la E.N.E.P. Zaragoza, U.N.A.M., donde se procesó (sembró) siempre dentro de las doce horas después de su obtención.

Sembrado de la biopsia (Método de adherencia por contacto)

La biopsia fue colocada en una caja Petri y se le disecionó áreas de degeneración y necrosis. Se lavó por inmersión en solución salina amortiguadora de fosfatos (SAF) (Apéndice II). Posteriormente el tejido se cortó con tijeras de punta fina en pequeñas porciones de aproximadamente 1 mm^3 , colocándose 9 porciones de tejido en cada caja de cultivo de 60 X 15 mm (Lux Scientific Corporation, USA.) dejándose secar al aire durante 15 min (esto se hizo con el fin de que el tejido se adhiriera al sustrato de cultivo), después de lo cual se le agregaron 5 ml de medio de cultivo en forma cuidadosa, para evitar el desprendimiento de los trozos (101).

Prueba de quimiosensibilidad

La prueba de quimiosensibilidad se realizó cultivando los explantes en presencia de diversos agentes antineoplásicos: Actinomicina D (Sigma Chem Co., USA.), Adriamicina (Adriablastina, Farmitalia Carlo Erba, México), Bleomicina (Bleomoxan, Bristol Labs., USA.), Cisplatino (Platinol, Bristol Labs., USA.), 5-Fluorouracilo (5-FU, Roche, México), Metotre

xate (Lederle Labs., USA.), Mitomicina C (Sigma Chem Co., - USA.), Vinblastina (Eli Lilly and Co., USA.) y Vincristina- (Sigma Chem Co., USA.), empleando concentraciones de 0.1, - 1.0 y 10.0 µg/ml una vez que la biopsia fue sembrada. Como- control se sembraron cultivos a los que no se les agregó - ningún agente químico. La selección de determinados agentes antineoplásicos para cada tumor se basó en los protocolos - hospitalarios de tratamiento, y el número de ellos en el ta- maño de la biopsia obtenida y se procedió a su cultivo.

Los cultivos fueron revisados cada tercer día al micros- cópico invertido, para observar la superficie que ocupaban - las células. Al finalizar el período de incubación (el tiem- po de incubación dependió de la rapidez de proliferación), - se procedió a teñir el área ocupada por los explantes median- te la técnica de May-Greenwald-Giemsa: se desechó el medio de cultivo y se "lavaron" las células 3 veces con SAF, me- diante la adición de 3 ml y una ligera agitación. A conti- nuación fueron fijadas con una solución saturada de May -- Greenwald (Harleco Div. de ASH, México), en alcohol metíli- co puro durante dos min. Al término de este tiempo, las cé- lulas adheridas a la caja de cultivo fueron lavadas con - agua destilada agregándoseles posteriormente una solución - de Giemsa (Sigma de México, México), al 10% en agua bidesti- lada durante 10 min (102,103,104). Los cultivos fueron siem- pre sembrados por duplicado y para evaluar el efecto inhibi

dor de los agentes químicos se midió con un vernier bajo el microscopio estereoscópico el área de proliferación celular ocupada por las células tanto en ausencia como en presencia de los diferentes fármacos.

Datos clínicos

Con fines comparativos se obtuvieron datos clínicos como son: tamaño del tumor, tiempo de evolución, sitio del tumor, diagnóstico histopatológico, edad y sexo.

R E S U L T A D O S

Se hicieron cultivos celulares in vitro en medio líquido a partir de distintas biopsias procedentes de pacientes con tumores de cabeza y cuello en presencia de varios agentes -antineoplásicos. En la primer serie de experimentos se cultivaron 8 biopsias y se evaluó la capacidad inhibitoria sobre los explantes resultantes. El número de fármacos utilizados dependió de la cantidad de tejido tumoral disponible tratando de utilizar principalmente los agentes más comúnmente usados en el tratamiento de dichas neoplasias. Las distintas biopsias fueron mantenidas en cultivo de 5 a 18 días dependiendo de la rapidez de proliferación de cada explante. El explante más rápido creció en sólo 5 días, mientras que otros duraron hasta 17 y 18 días en cultivo. En tres ocasiones los cultivos se detuvieron cuando se empezó a desarrollar una contaminación después de 6, 11 y 13 días. En los demás explantes la proliferación fue muy lenta y los cultivos se detuvieron después de 15, 17 y 18 días, ya que las -células solo cubrían aproximadamente 20% del sustrato de cultivo. Con el propósito de tener un valor promedio de velocidad de proliferación celular de los explantes individuales, dividimos el área cubierta por las células entre el número de días que se cultivaron las biopsias. Esta tasa de proliferación celular (TPC) varió de $12 \text{ mm}^2/\text{día}$ para el explante

de proliferación más lento hasta de $158 \text{ mm}^2/\text{día}$ para el más rápido (Tabla 1).

En general, no se encontró correlación entre la TPC y algunos datos clínicos como edad, sexo, etc. (Tabla 1). No obstante, es interesante hacer notar que el tumor más agresivo, de tamaño más grande y con tiempo de evolución más corto, tuvo la tasa de proliferación más alta en cultivo, de $158 \text{ mm}^2/\text{día}$ mientras que el tumor menos agresivo, con el tiempo de evolución más largo, tuvo la segunda TPC más pequeña en cultivo de sólo $12 \text{ mm}^2/\text{día}$.

Inhibición de la proliferación celular de explantes cultivados en medio líquido por diferentes agentes antineoplásicos

Para poder evaluar la inhibición causada por diferentes drogas antineoplásicas sobre la proliferación del explante in vitro, se cultivaron las diferentes biopsias en presencia de Actinomicina D, Adriamicina, Bleomicina, Cisplatino, 5-Fluorouracil, Metotrexate, Mitomicina C, Vinblastina y Vincristina a concentraciones de 0.1, 1.0 y 10.0 $\mu\text{g/ml}$ durante el mismo período de tiempo que los cultivos sin fármaco (controles). El porcentaje de inhibición se calculó como el radio de área cubierta por el cultivo inhibido sobre el área cubierta por el no inhibido, multiplicado por 100.

En general todos los explantes fueron inhibidos en forma diferente cuando se usó la concentración de 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de los

distintos fármacos (fig. 1). Esta variabilidad en la sensibilidad fue muy marcada en el explante 2, en el cual Metotrexate inhibió 72% la proliferación celular mientras que Vincristina sólo 10%. Algo igualmente notorio ocurrió en el explante 8 donde Metotrexate inhibió sólo 35% la proliferación en tanto que 5-FU más del 80%. Además encontramos que no todos los explantes tienen la misma inhibición ante los fármacos, observamos que el explante 1 fue muy sensible a los distintos fármacos empleados con más de 70% de inhibición, en tanto que el explante 4 de sólo 25%, a pesar de ser el de proliferación más rápida, ya que sólo en 5 días de cultivo las células proliferantes cubrieron 854 mm^2 del plato de cultivo o sea una TPC de $158 \text{ mm}^2/\text{día}$. En general en nuestros resultados no hubo una relación muy directa entre la velocidad de proliferación de los explantes, y el efecto que tuvieron los fármacos. Sin embargo, la efectividad de Metotrexate estuvo asociada a la TPC, puesto que fue más efectivo en los explantes de crecimiento rápido con TPC de 107,28 y $24 \text{ mm}^2/\text{día}$ y menos efectivo en los dos explantes de proliferación más lenta con TPC de $12 \text{ mm}^2/\text{día}$. Por el contrario, Bleomicina tuvo mayor poder inhibitorio en los explantes de crecimiento lento con TPC de 12, 14 y $16 \text{ mm}^2/\text{día}$ que en los explantes de TPC alta de 24 y $107 \text{ mm}^2/\text{día}$. Vale la pena hacer notar que algunos fármacos que no se utilizaron en todos los casos resultaron muy activos, tal es el caso de 5-FU que

fue el agente más efectivo inhibiendo 85% la proliferación celular (explante 1 y 8). Por último Adriamicina y Vinblastina inhibieron más de 50% (explante 5), Vincristina (explante 2), Mitomicina C (explante 2) y Actinomicina D (explante 4) no fueron muy efectivos a pesar de que los explantes fueron de crecimiento rápido.

Al igual que cuando se utilizó 0.1 $\mu\text{g/ml}$ de los distintos fármacos, al emplear 1.0 $\mu\text{g/ml}$ (fig. 2) la diferencia de inhibición entre los explantes por los fármacos llegó a ser muy importante como en los explantes 4 y 8 en donde hubo 70 y 64% de diferencia cuando se usaron Mitomicina C y Actinomicina D, y Metotrexate y 5-FU respectivamente. Solo con Metotrexate se encontró una relación entre su efecto inhibidor y la TPC, ya que este fármaco fue más efectivo inhibiendo los explantes de crecimiento rápido con TPC de 107, 28 y 24 $\text{mm}^2/\text{día}$ que los explantes de proliferación lenta con TPC de 12 y 14 $\text{mm}^2/\text{día}$. Vale la pena hacer notar que en los explantes en donde Metotrexate fue poco inhibidor (explantes 6 y 8), los otros fármacos empleados fueron muy efectivos, llegando a 95 y 97% de inhibición por Bleomicina y 5-FU en el explante 8. En la mayoría de los explantes los fármacos fueron altamente inhibidores (más del 70%) a excepción de Metotrexate en los casos ya descritos, y de Mitomicina C y Cisplatino para el explante 4 (con menos de 30% de inhibición). Cabe hacer notar que en este alto explante (fig. 2)

el tercer fármaco empleado (Actinomicina D) fue altamente - inhibitorio (90%). Estos resultados confirman una vez más - la gran heterogeneidad de sensibilidad que tienen los explantes para ser inhibidos por diferentes fármacos.

En general al emplear la concentración de 10.0 $\mu\text{g/ml}$ de los distintos fármacos (fig. 3), los explantes fueron inhibidos más del 80% excepto en los explantes 4 y 6 en los cuales se presentó una alta resistencia a los efectos inhibidores de Mitomicina C (menos del 70%) y Metotrexate (menos - de 61%) respectivamente. Nuevamente encontramos que cada explante tenía un patrón de inhibición característico diferente al de los demás, ya que en algunos casos, como en el explante 1, la inhibición a la proliferación fue muy potente - con los tres fármacos utilizados (Cisplatino, Bleomicina y 5-FU) con valor de más del 97%, mientras que en otro caso, - la inhibición fue mucho menor, de menos del 85% (Metotrexate, Adriamicina y Vincristina). Por otro lado, en general - Metotrexate fue el inhibidor menos efectivo en los explantes que se utilizó. Finalmente se observó que Bleomicina junto con Cisplatino fueron los inhibidores más efectivos con 99% de inhibición (explantes 1, 2 y 8). A esta alta concentración el efecto inhibitorio de los distintos fármacos no estuvo asociado a la TPC.

Puesto que en nuestros experimentos obtuvimos una gran - diferencia en la sensibilidad de los explantes a ser inhibi

dos en su proliferación por distintos fármacos y una alta eficiencia en el crecimiento de éstos al cultivarlos en medio líquido consideramos que contábamos con un ensayo útil para pruebas de quimiosensibilidad in vitro. En consecuencia decidimos cultivar 5 biopsias más para evaluar nuevamente la capacidad inhibitoria de agentes antineoplásicos, en condiciones más uniformes. Para ello se utilizaron sólo tres fármacos: Bleomicina, Cisplatino y Metotrexate, ya que fueron inhibidores muy potentes de la proliferación celular en nuestros ensayos anteriores y por ser los agentes antineoplásicos que mejores resultados han dado en la quimioterapia de pacientes con carcinomas de cabeza y cuello. Las distintas biopsias fueron mantenidas en cultivo de 27 a 45 días. En dos casos la proliferación fue detenida cuando las células cubrieron aproximadamente el 70% del sustrato de la caja de cultivo (1300 mm^2) (Tabla 2). En dos ocasiones más los cultivos se detuvieron cuando se empezó a desarrollar una contaminación con hongos a los 35 y 45 días (explante 1 y 3). Y como en general los explantes crecieron lentamente, en uno la proliferación se detuvo después de 45 días y cuando las células cubrían aproximadamente el 50% del sustrato de cultivo. Nuevamente, calculamos la TPC y ésta varió de $6 \text{ mm}^2/\text{día}$ para el explante de proliferación más lenta, hasta $48 \text{ mm}^2/\text{día}$ para el más rápido (Tabla 2). Al igual que en los ensayos anteriores, no encontramos ninguna correla-

ción entre la TPC y los datos clínicos (Tabla 2). Sin embargo, es interesante hacer notar que el tumor menos agresivo y con un tiempo de evolución largo, tuvo la TPC más pequeña en cultivo ($6 \text{ mm}^2/\text{día}$), mientras que el tumor más grande -- dio lugar al explante con la proliferación más rápida ($48 \text{ mm}^2/\text{día}$).

Inhibición de la proliferación celular de explantes cultivados en medio líquido por Bleomicina, Cisplatino y Metotrexate

Quando se utilizó la concentración de 0.1 µg/ml de los fármacos (fig. 4), los cinco explantes fueron inhibidos en forma diferente. El explante 1 fue el más resistente a los efectos inhibidores de los tres agentes antineoplásicos -- (aproximadamente el 50%), mientras que los explantes 3 y 4 fueron los más sensibles (más del 85%). Además, en general encontramos variabilidad en la sensibilidad de los explantes ante los diferentes fármacos, aunque ésta no fue muy grande. Es interesante notar que Metotrexate y Cisplatino tuvieron en general una actividad inhibitoria similar y fueron más efectivos en los explantes de crecimiento rápido -- (TPC de 22, 33 y $48 \text{ mm}^2/\text{día}$) y menos efectivos en los explantes de proliferación lenta (TPC de 6 y $12 \text{ mm}^2/\text{día}$). En consecuencia podemos decir que hubo una asociación entre la inhibición causada por estos dos fármacos y la TPC de los ex-

plantes y que este tipo de asociación no se observó con Bleomicina. Aunque es importante mencionar, que Bleomicina fue el más efectivo en el explante más lento (explante 1) y el menos efectivo en el más rápido (explante 5).

En general cuando se utilizó la concentración de 1.0 µg/ml de los tres fármacos (fig. 5), los explantes fueron inhibidos más del 90% excepto el explante 1 el cual fue mucho más resistente al efecto inhibitor de Metotrexate con sólo un 70% de inhibición. Al igual que en la concentración anterior, cuatro explantes se comportaron en forma diferente ante los tres fármacos al ser inhibidos en proporciones distintas, mientras que en el explante restante (4) la inhibición fue casi igual. No encontramos una clara asociación entre el efecto inhibitor de los tres fármacos y las TPC, sin embargo, es importante señalar que Metotrexate fue mucho más efectivo en el explante con proliferación más rápida (TPC de 48 mm²) que en explante de proliferación más lenta (TPC de 6 mm²/día). Finalmente, Bleomicina y Cisplatino produjeron una casi total inhibición (99%) en los explantes 3 y 5.

En general al utilizar la concentración de 10.0 µg/ml de los tres fármacos (fig. 6), los explantes fueron inhibidos más del 95% y sólo el explante 1 fue más resistente a los efectos inhibidores de Metotrexate y Cisplatino (88 y 91% de inhibición). También observamos que únicamente el explante 5 tuvo el mismo comportamiento ante los tres fármacos, -

mientras que el resto de los explantes fueron inhibidos de manera diferente. Es importante mencionar que a excepción del explante 5, Bleomicina y Cisplatino fueron los de mayor poder inhibidor en dos explantes (3 y 4) y en los dos explantes restantes (1 y 2) el mejor inhibidor fue Bleomicina. - Metotrexate fue el menos efectivo en cuatro explantes (1,2,3,4). Finalmente hay que notar que el explante con crecimiento - más lento (explante 1) fue el menos inhibido por los tres - fármacos, mientras que el explante más rápido (explante 5) - fue el más inhibido.

TABLA 1. DATOS CLINICOS DE LOS DIFERENTES TUMORES DE CABEZA Y CUELLO
Y SUS CARACTERISTICAS DE PROLIFERACION IN VITRO

Número de Tumor	Tipo de Tumor	Edad (años)	Sexo	Tamaño de Tumor (cm)	Tiempo de Evolución (meses)	Tiempo de Cultivo (días)	Area de Proliferación (mm ²)	TPC* (mm ² /día)
1	T. Mucoepidermoide	73	Fem.	5.0 x 5.0	132	15	241	16
2	Ca. Epidermoide	66	Masc.	3.0 x 4.0	4	11	1176	107
3	Ca. Adenoescamoso	40	Masc.	2.0 x 3.0	2	11	403	24
4	Melanoma	52	Fem.	7.0 x 8.0	2	5	790	158
5	T. Mixto Maligno	72	Masc.	4.0 x 5.0	8	13	177	14
6	Ca. Epidermoide	75	Masc.	3.0 x 4.0	2	17	130	12
7	Ca. Epidermoide	59	Masc.	2.5 x 3.0	3	6	169	28
8	Ca. Adenoideo Quístico	45	Masc.	2.0 x 3.0	6	18	220	12

* TPC: Tasa de Proliferación Celular

TABLA 2. DATOS CLINICOS DE LOS DIFERENTES TUMORES DE CABEZA Y CUELLO
 Y SUS CARACTERISTICAS DE PROLIFERACION IN VITRO

Número de Tumor	Tipo de Tumor	Edad (años)	Sexo	Tamaño de Tumor (cm)	Tiempo de Evolución (meses)	Tiempo de Cultivo (días)	Area de Prolifera- CION (mm ²)	TPC* (mm ² /día)
1	Ca. Adenoescamoso	47	Fem.	3.0 x 2.5	24	35	206	6
2	Ca. Adenoideo Quístico	76	Masc.	4.0 x 4.5	7	43	508	12
3	T. Mucoepidermoide	27	Masc.	2.5 x 1.5	10	45	979	22
4	T. Mucoepidermoide	29	Masc.	3.0 x 2.0	8	40	1300	33
5	Ca. Papilar	49	Masc.	6.0 x 6.0	60	27	1300	48

* TPC: Tasa de Proliferación Celular

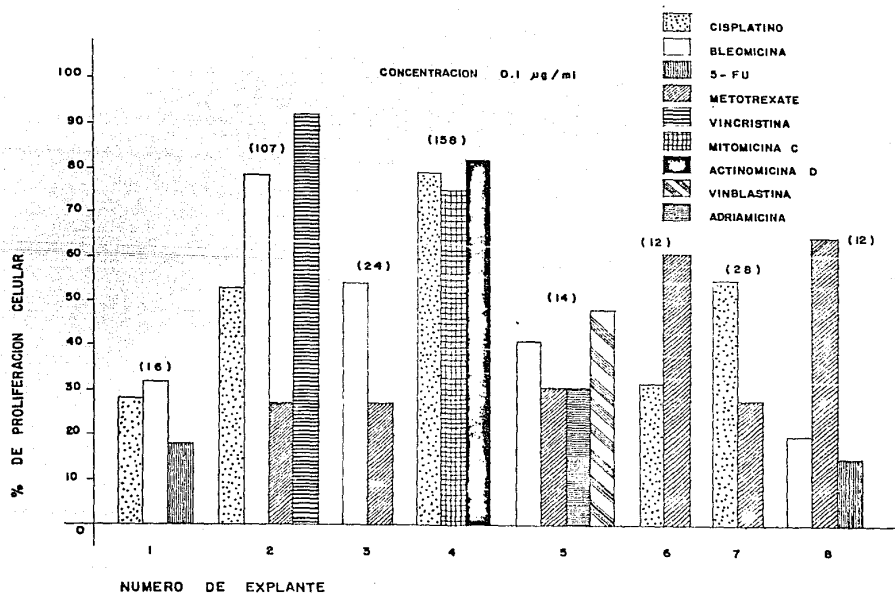


FIGURA 1

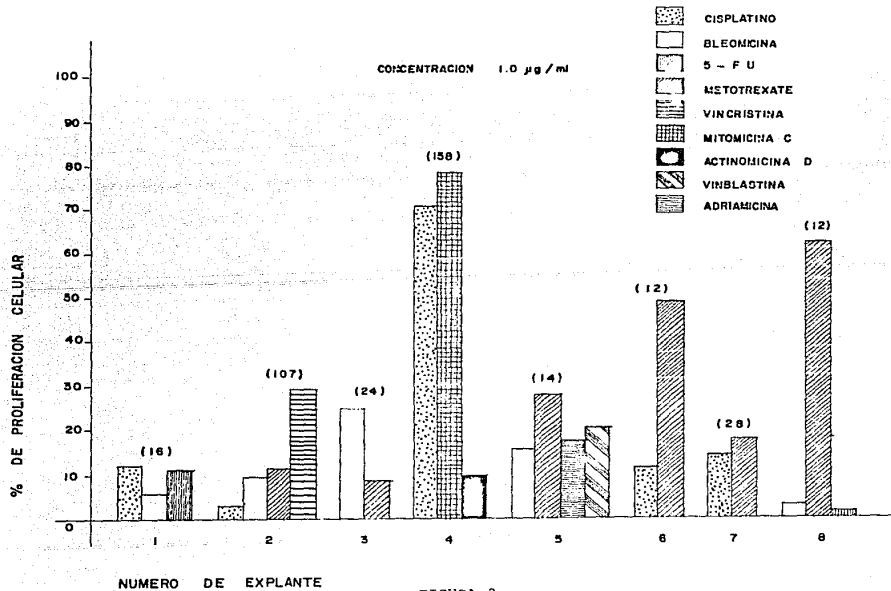


FIGURA 2

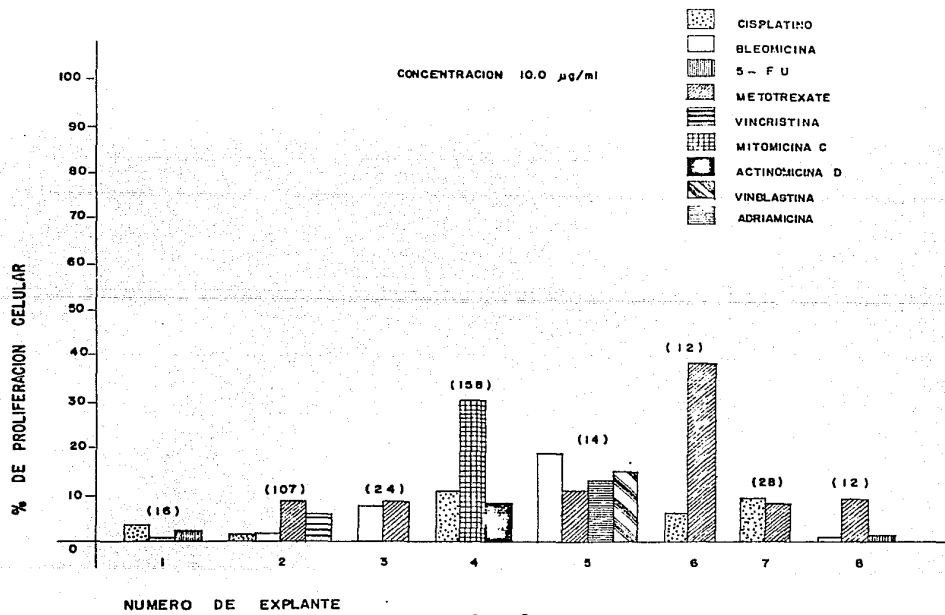


FIGURA 3

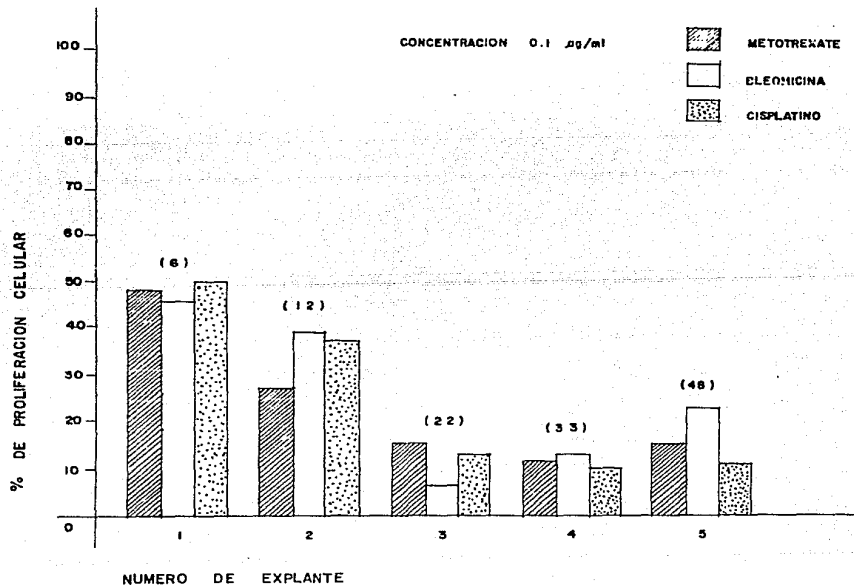


FIGURA 4

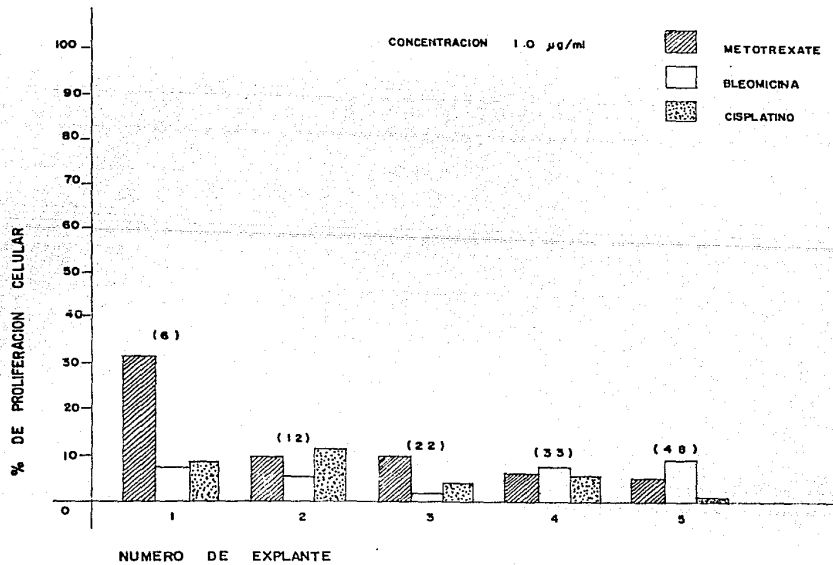


FIGURA 5

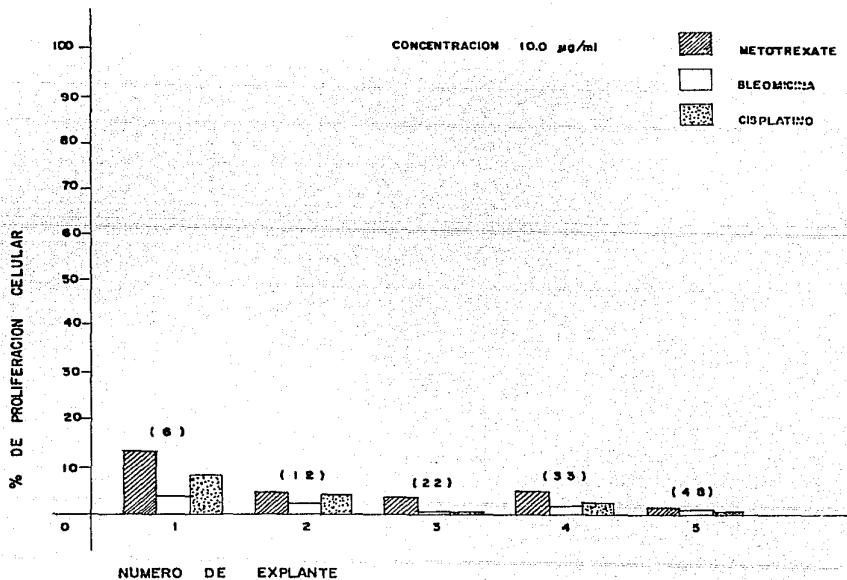


FIGURA 6

LEYENDA DE FIGURAS

Figura 1 .- Inhibición de la proliferación celular in vitro, causada por diferentes agentes antineoplásicos en ocho biopsias procedentes de tumores de cabeza y cuello, a una concentración de 0.1 µg/ml. Las barras representan el porcentaje de proliferación celular para cada fármaco con respecto al cultivo no inhibido. La tasa de proliferación celular se localiza en los paréntesis de la parte superior de las barras.

Figura 2 .- Inhibición de la proliferación celular in vitro, causada por diferentes agentes antineoplásicos en ocho biopsias procedentes de tumores de cabeza y cuello, a una concentración de 1.0 µg/ml. Las barras representan el porcentaje de proliferación celular para cada fármaco con respecto al cultivo no inhibido. La tasa de proliferación celular se localiza en los paréntesis de la parte superior de las barras.

Figura 3 .- Inhibición de la proliferación celular in vitro, causada por diferentes agentes antineoplásicos en ocho biopsias procedentes de tumores de cabeza y cuello, a una concentración de 10 µg/ml. Las barras representan el porcentaje de proliferación celular para cada fármaco con respecto al cultivo no inhibido. La tasa de proliferación celular se localiza en los paréntesis de la parte superior de las barras.

Figura 4 .- Inhibición de la proliferación celular in vitro, causada por diferentes agentes antineoplásicos en cinco biop

sias procedentes de tumores de cabeza y cuello, a una concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las barras representan el porcentaje de proliferación celular para cada fármaco con respecto al cultivo no inhibido. La tasa de proliferación celular se localiza en los paréntesis de la parte superior de las barras.

Figura 5 .-

Inhibición de la proliferación celular in vitro, causada por diferentes agentes antineoplásicos en cinco biopsias procedentes de tumores de cabeza y cuello, a una concentración de 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las barras representan el porcentaje de proliferación celular para cada fármaco con respecto al cultivo no inhibido. La tasa de proliferación celular se localiza en los paréntesis de la parte superior de las barras.

Figura 6 .-

Inhibición de la proliferación celular in vitro, causada por diferentes agentes antineoplásicos en cinco biopsias procedentes de tumores de cabeza y cuello, a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Las barras representan el porcentaje de proliferación celular para cada fármaco con respecto al cultivo no inhibido. La tasa de proliferación celular se localiza en los paréntesis de la parte superior de las barras.

D I S C U S I O N

La quimioterapia del cáncer ha mejorado substancialmente a partir de la década pasada, y se han desarrollado algunos procedimientos para pruebas in vitro por varios grupos de estudio para poder determinar la sensibilidad o resistencia de tumores malignos a los agentes citistáticos. Sin embargo, no se ha logrado aún la selección de una quimioterapia efectiva para pacientes individuales (105,106,107,108). Se ha generado entusiasmo considerable por el desarrollo de técnicas para el crecimiento de colonias en agar suave a partir de células de tumor humano derivados directamente de biopsias. Teóricamente, este sistema proporciona una atractiva posibilidad de desarrollar una quimioterapia para pacientes individuales. Sin embargo, ciertos tipos de tumores son definitivamente más difíciles de manejar que otros en agar semisólido y además se observa una proliferación inadecuada in vitro que dificulta la evaluación de al menos, 60 o 70% de los casos evaluados (85,87). Entre los problemas técnicos asociados con el ensayo clonogénico se pueden señalar dos: 1) La dificultad de disgregación de los tumores sólidos 2) Las bajas eficiencias de clonación experimentadas con la técnica de agar suave(86,88). Por otro lado, se han utilizado métodos de cultivo en medios líquidos, desde 1956 para ensayar el efecto de drogas sobre células normales y neoplásicas. Estos estudios se han realizado en líneas celulares

ya establecidas tales como las HeLa y la cepa L, pero los resultados obtenidos no son muy confiables debido a que las células han sufrido cambios o transformaciones al estar en cultivo por largos períodos (89,90,101). En el presente trabajo mostramos que los cultivos en medio líquido de tejidos primarios provenientes de tumor, también pueden ser útiles en la evaluación de la quimiosensibilidad in vitro. Al cultivar directamente biopsias procedentes de distintos tumores de cabeza y cuello obtuvimos una alta eficiencia de proliferación celular, lo que representa cierta ventaja sobre los ensayos en agar blando. Además como trabajamos directamente con biopsias de tumor sin necesidad de disgregar enzimáticamente el tejido, creemos haber evitado un posible daño celular (93,110). Por último, la evaluación del efecto inhibitorio de los fármacos sobre los cultivos primarios en un período de tiempo relativamente corto, evita los cambios celulares encontrados en líneas establecidas.

Para desarrollar el trabajo, escogimos el cáncer de cabeza y cuello, debido a que ha aumentado su frecuencia de aparición en los últimos años, y por ser particularmente resistente a la quimioterapia (111,112). Este aumento en frecuencia puede ser consecuencia del incremento de sustancias carcinógenas que se consumen en productos elaborados, alcohol y tabaco (113,114), mientras que la resistencia a la quimioterapia puede deberse al hecho de ser un cáncer de crecimiento lento. Por otra parte la elección de los fármacos anti-

neoplásicos en pacientes con estos padecimientos es muy crítica, ya que el estado nutricional de los pacientes se encuentra por lo general muy deficiente (111).

Creemos que los distintos comportamientos observados en las gráficas pueden confirmar las numerosas observaciones clínicas, en las cuales, se ha mostrado un amplio rango de respuesta a tratamientos particulares, aún entre pacientes con cáncer de tipo histológico idéntico (78,84). También es muy importante hacer notar que en nuestros resultados, la respuesta inhibitoria dentro de un mismo explante varió ante los distintos fármacos (figs. 1,2,4,5). Por lo tanto podemos decir que tenemos indicios de que la efectividad de la terapia citotóxica varia de tumor a tumor.

Se sabe que la acción citotóxica de un número de drogas que son utilizadas en quimioterapia depende de la tasa de división celular, esto es, mientras más rápido se dividen las células más rápido son inhibidas (73,75). Sin embargo, este concepto no fue comprobado por nuestros experimentos, ya que no hubo una relación directa entre la TPC de los explantes y el efecto inhibitor que tuvieron los fármacos. A nuestro juicio, esta relación pudo haber sido alterada porque al calcular la TPC tomamos en cuenta los días que tardaron las biopsias en adaptarse a las nuevas condiciones de cultivo, y cada biopsia tuvo diferentes tiempos de adaptación, algunas tardaron dos o tres días mientras que otras hasta semanas. Una vez adaptadas las biopsias al ambiente -

de cultivo in vitro empiezan a proliferar. Sería interesante que en futuros experimentos se calculara la TPC considerando a partir del día en que comience la proliferación celular.

Se observó que los explantes celulares provenientes de los diferentes tumores de cabeza y cuello tuvieron una amplia variación en las tasas de proliferación a pesar de ser cánceres del mismo tipo histológico. Esto tal vez se debe al grado de malignidad o diferenciación de cada neoplasia y a las características biológicas particulares de cada uno de los pacientes. En consecuencia, estos resultados sugieren que es necesario efectuar pruebas de quimiosensibilidad in vitro para pacientes individuales.

El hecho de que en nuestros resultados hayamos encontrado que los explantes con proliferación lenta correspondieron al tumor con el tiempo de evolución más largo, y el tumor más grande correspondió al explante con proliferación más rápida, nos da una indicación de que la población celular de los explantes es de origen maligno, ya que el comportamiento celular fue similar tanto in vivo como in vitro.

Además, la amplia variación en la tasa de proliferación celular de los distintos explantes apoya el hecho de que trabajamos con células malignas, ya que en general la tasa de división celular de tejidos normales sigue un cierto patrón de proliferación celular en un mismo tipo histológico.

Como se puede observar en los resultados, en general no encontramos ninguna correlación entre la tasa de prolifera-

ción de los explantes y los datos clínicos tales como edad, tiempo de evolución, tipo histológico y sexo. Pero hay que mencionar que el dato de tiempo de evolución del tumor no se obtiene clínicamente sino que es proporcionado verbalmente por el paciente y no es por tanto muy confiable ya que - en ocasiones el paciente no se da cuenta que tiene un tumor hasta que este es grande y doloroso, o simplemente porque - se le olvida el tiempo que lleva con tal lesión, por lo tanto posiblemente esta evaluación subjetiva del tiempo de evolución del tumor podría ocultar cualquier correlación existente entre la TPC y la agresividad del tumor. Es necesario tratar de obtener datos más precisos acerca del tiempo de evolución en futuros trabajos mediante investigaciones más profundas en la interrogación y seguimiento de los pacientes, para poder mejorar este punto.

Por otro lado, notamos que los patrones de inhibición - dentro de un mismo explante cambiaron en su mayoría al aumentar las concentraciones de los diferentes fármacos. Pensamos que esto se puede atribuir a la farmacodinámica de cada droga, ya que en general los fármacos que utilizamos tienen mecanismos de acción distintos y un origen diverso (antibióticos, alcaloides, antimetabolitos y alquilantes), además cada droga tiene un potencial característico, esto es, la concentración a la cual son más activas (115). A pesar - de que los explantes se comportaron de manera diferente en nuestros experimentos, hubo ciertas tendencias que en ge

neral se conservaron. Con dosis baja e intermedia, Bleomicina tuvo mayor poder inhibitor en los explantes de crecimiento lento, y por el contrario fue menos activo en los explantes de crecimiento rápido. También observamos que Metotrexate fue más activo al inhibir los explantes de proliferación rápida, mientras que fue menos efectivo en los lentos. Lo anterior nos induce a pensar que hay agentes antineoplásicos que son buenos inhibidores para los explantes de proliferación lenta y otros para los de proliferación rápida, ya que existen principalmente dos tipos de agentes citotóxicos los fase específicos y los ciclo dependientes o no fase específicos. Así mismo, vimos que los mejores inhibidores para los explantes de proliferación rápida fueron los peores para los de proliferación lenta y viceversa. Si las drogas que son activas in vitro resultan ser activas in vivo, entonces en este trabajo se ha desarrollado un ensayo que puede contribuir al mejoramiento de la selección de agentes antineoplásicos para el tratamiento de pacientes individuales, ayudando de esta manera a evitar exposiciones innecesarias de drogas inefectivas. Optimamente vemos la posibilidad de predecir la respuesta del tumor individual a los agentes quimioterapéuticos específicos, además mediante este ensayo se podría evaluar la actividad de nuevos agentes antineoplásicos.

Finalmente, pensamos que este sistema de pruebas en medio líquido ofrece la promesa de facilitar la selección de una

droga para la quimioterapia del cáncer ya que estas condiciones de cultivo proveen un ambiente favorable para la proliferación celular permitiendo de esta manera evaluar el efecto inhibitor de los fármacos antineoplásicos. Evidentemente, es necesario hacer muchas pruebas extensivas de un amplio espectro de tumores, antes de que se pueda establecer la eficiencia del ensayo.

C O N C L U S I O N E S

- 1.- Al cultivar las biopsias procedentes de los distintos - tumores en medios líquidos se obtuvo una alta eficiencia de proliferación celular.
- 2.- En general, la proliferación celular in vitro de los - distintos explantes, tuvo diferente comportamiento.
- 3.- Cada uno de los explantes presentó un patrón de inhibición por fármacos antineoplásicos característico y diferente al de los demás.
- 4.- La respuesta inhibitoria dentro de un mismo explante explante varió ante los diferentes fármacos.
- 5.- Hay agentes antineoplásicos que al parecer son buenos - inhibidores para los explantes de proliferación lenta y otros para los de proliferación rápida.
- 6.- Es necesario hacer pruebas de quimiosensibilidad en pacientes individuales, ya que cada individuo es biológicamente distinto a los demás y cada paciente responde - de manera diferente a la quimioterapia aún en canceres del mismo tipo histológico.
- 7.- Este sistema de pruebas en medio líquido ofrece la promesa de facilitar la selección de una droga para la - quimioterapia del cáncer.

A P E N D I C E I

Medio Mínimo Esencial de Eagle

Este medio se utiliz6 para mantener a los cultivos celulares en condiciones normales in vitro. El medio esta constituido de los siguientes componentes químicos:

AMINOACIDOS	CONCENTRACION (mg/l)
L-arginina	84.0
L-cistina	62.57
L-glutamina	584.0
Glicina	30.0
L-histidina HCL.H ₂ O	42.0
L-isoleucina	105.0
L-leucina	105.0
L-lisina.HCL	146.0
L-metionina	30.0
L-fenilalanina	66.0
L-serina	42.0
L-treonina	95.0
L-triptofano	16.0
L-tirosina (sal dis6dica)	104.2
L-Valina	94.0

VITAMINAS	CONCENTRACION (mg/ml)
D-Ca pantotenato	4.0
Cloruro de colina	4.0
Acido fólico	7.2
Inositol	7.2
Nicotinamida	4.0
Piridoxal. HCL	4.0
Riboflavina	0.4
Tiamina	4.0

SALES INORGANICAS

Cloruro de calcio anhidro	200.0
Nitrato de hierro III nonhidratado	0.1
Cloruro de potasio	400.0
Sulfato de magnesio anhidro	97.67
Cloruro de sodio	6400.0
Fosfato monosódico monohidratado	125.0

OTROS COMPUESTOS

L-Glucosa	4500.0
Rojo fenol	15.0

Preparación de Medio de Eagle:

Se mide un volumen de agua bidestilada 5% menor al volumen de medio total deseado, utilizando para ello 2 matraces. Se adicionan 13.4 g/l del medio de Eagle en polvo (Gibco - Laboratorios, U.S.A.), agitándose suavemente, se agregan 3.7 g de bicarbonato de sodio, 100U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomina. Se complementa el volumen deseado con agua bidestilada, se ajusta el pH entre 0.2 y 0.3 menos del que se desea, que es de 7.2 (ésto se hace con ácido clorhídrico) y se esteriliza por filtración con bióxido de carbono, pasándolo a través de una membrana con poro de 0.22 µ.

A P E N D I C E II

Preparación de solución amortiguadora de fosfatos (SAF):

- SAF con calcio y magnesio;

En 1 litro de agua bidestilada, se disuelven las siguientes sustancias:

Cloruro de calcio-----	0.10 g
Cloruro de sodio-----	8.00 g
Fosfato de sodio monobásico-----	2.16 g
Fosfato de potasio monobásico-----	0.20 g
Cloruro de magnesio-----	0.10 g
Cloruro de potasio-----	0.20 g

Una vez disueltas estas sustancias, se ajusta el pH a 7.2 con ácido clorhídrico y se esteriliza la solución por filtración en una membrana milipore cuyo poro es de 0.22 μ .

- SAF sin calcio y sin magnesio;

Se prepara la solución anterior, pero sin adicionar las sales de calcio y magnesio, siendo su esterilización por medio de autoclave.

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

- 1.- Peterson, B., *Oncología*. Ed. Mir Moscú, Moscú, 1980, pp.7-8.
- 2.- De Vita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A., *Cancer principles and practice of oncology*. Ed. J.B. Lippincott Co., Philadelphia, U.S.A., 1982, pp. 34
- 3.- Rather, L.J., *The genesis of cancer*. Ed. The Johns Hopkins - University Press, Baltimore and London, 1978, pp. 9-10.
- 4.- Pérez, T.R., *Patología molecular subcelular y celular*. Ed. La Prensa Médica Mexicana, México D.F., 1975, pp. 555-556.
- 5.- Hood, L.E., Weissman, I.L., Wood, W.B., Wilson, J.H., ---- *Immunology*. Ed. The Benjamin Cummings Publishing Co., Califor
nia, 1984, pp. 496.
- 6.- Robbins, S.L., *Patología estructural y funcional*. Ed. Inter-
americana, México D.F., 1975, pp. 81-110.
- 7.- Bruce, A., Bray, D., Watson, I.D., Lewis, J., Raff, M., ---
Roberts, K., *Molecular biology of the cell*, Ed. Garland --
Publishing, New York, 1983, pp. 618.
- 8.- Medrano, E.E., Pardee, A.B., *Prevalent deficiency in tumor -
cells of cycloheximide-induced cycle arrest*. Proc. Natl. Acad.
Sci., 77:4123-4126, 1980.
- 9.- Abelson, J., *RNA procession and the intervening sequence pro-
blem*. Annu. Rev. Biochem., 48:1035-1069, 1979.
- 10.-Stoker, M.G., *Role of diffusion boundary layer in contact --
inhibition of growth*. Nature, 246:200-203, 1973.
- 11.-Pierce, G.B., Shikes, R., Fink, L.M., *Cancer: A problem of -
developmental biology*. Ed. Englewood Cliffs, N. Jersey, 1978.
- 12.-Ponten, J., *The relationship between in vitro transformation
and tumor formation in vivo*. Biochem. Biophys. Acta, 458:397-

422, 1976.

- 13.- Barendsen, G.W., Janse, H.C., Deys, B.F., Hollander, C.F., - Comparison of growth characteristics of experimental tumors and derived cell cultures. *Cell Tissue Kinet.*, 10:469-475, 1977.
- 14.- Hunter, T., Proteins phosphorylated by the RSV transforming function. *Cell*, 22:647-648, 1980.
- 15.- Dustin, P., Microtubules. *Sci. Amer.*, 243:59-69, 1980.
- 16.- Byers, B., Porter, K.R., Oriented microtubules in elongating cells of the developing lens rudiment after induction. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 52:1091-1099, 1964.
- 17.- Alexander, P., Foetal antigens in cancer. *Nature*, 235:137-145, 1972.
- 18.- Watson, J.D., Molecular biology of the gene. Ed. Benjamin, New York, U.S.A., 1977, pp. 646-647.
- 19.- Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H., Wells, V.J., - *Inmunología básica y clínica*. Ed. El mundo moderno, México, D.F., 1985, pp. 226-237.
- 20.- Amiel, J.L., Rovessé, J., Machover, D., *Manual de Oncología*, Ed. Toray-Masson, Barcelona, 1978, pp. 75.
- 21.- Pilot, H.C., *Fundamentals of oncology*. Ed. Marcel Dekker, New York, 1978.
- 22.- Dawe, C., *Comparative neoplasia*. Ed. In Holland J.F., Frei E. *Cancer Medicine*, Lea and Fabiger, Philadelphia, 1973, - pp. 193-240.
- 23.- Heidelberger, C., Chemical carcinogenesis. *Annu. Rev. --- Biochem.*, 44:79-121, 1975.
- 24.- Weinstein, I.B., Yamaguchi, N., Gebert, R., Use of epithelial cell cultures for studies on the mechanism of transformation by chemical carcinogens. *In vitro*, 11:130-141, 1975.

- 25.- Pilot, H.C., Heidelberger, C., Metabolic regulatory circuits and carcinogenesis. *Cancer Res.*, 23:1694-1700, 1963.
- 26.- Szmuness, W., Hepatocellular carcinoma and the hepatitis B-virus: evidence for a causal association. *Prog. Med. Virol.*, 24:40-69, 1978.
- 27.- Tooze, J., DNA tumor viruses. Ed. Coldspring Harbor Laboratory, New York, 1980, pp. 771-780.
- 28.- Huebner, R.J., Todaro, G.J., Oncogenes of RNA tumor viruses as determinants of cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 64:1087-1094, 1969.
- 29.- Haseell, J.A., Topp, W.C., Rifkin, D.B., Moreau, P.E., --- Transformation of rat embryo fibroblasts by cloned polyoma virus DNA fragments containing only part of the early region. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 77:3978-3982, 1980.
- 30.- Houweling, A., Van Den Elsen, P.J., Van Der Eb, A.J., --- Partial transformation of primary rat cells by the leftmost 4.5% fragment of adenovirus s DNA. *Virology*, 105:537-550, - 1980.
- 31.- Smith, A.E., Smith, R., Paucha, E., Characterization of - different tumor antigens present in cells transformed by - simion virus 40. *Cell*, 18:335-346, 1979.
- 32.- Binnie, W.H., Rankin, K.V., Mackenzie, I.L., Etiology of - oral squamous cell carcinoma. *J. Oral. Pathol.*, 12:11-29, 1983.
- 33.- Son, H.Y., Kapp, S.D., Oral cavity and oropharyngeal cancer in a younger population. *Cancer*, 55:441-444, 1985.
- 34.- Wynder, E.I., Bross, I.J., Felman, R.M., A study of the -- etiological factors in cancer of the mouth. *Cancer*, 10:1300-1323, 1957.
- 35.- Schmidt, W., Popham, R., The role of drinking and smoking -

- in mortality from cancer and other causes in male alcohol--
ics. *Cancer*, 47:1031-1041, 1981.
- 36.- Decroix, Y., Ghossein, N.A., Experience of the Curie ---
Institute in treatment of the movable tongue. *Cancer*, 47:496-
502, 1981.
- 37.- Holm, L.E., Lundquist, P.G., Histological grading of ----
malignancy in squamous cell carcinoma of the oral tongue.
Acta Otolaryngol., 94:185-192, 1982.
- 38.- Zegarelli, E.V., Kutscher, A.H., Hyman, G.A., Diagnóstico -
en patología. Ed. Salvat, Barcelona España, 1979, pp.258-295.
- 39.- Kramer, L., Scientific foundations in dentistry, New York, -
1980, pp. 200-290.
- 40.- Lynch, M.A., Medicina bucal, Ed. Interamericana, México D.F.,
1977, pp. 538-539.
- 41.- De Robertis, E.D.P., De Robertis, E.M.F., Biología Celular
y molecular. Ed. El Ateneo, Buenos Aires, 1980, pp. 44-45.
- 42.- Adams, R.L.P., Cell culture for biochemist. Ed. Elsevier, -
North Holland Biomedical Press, New York, 1980, pp. 23-65.
- 43.- Jolly, J., Sur la durée de la vie et de la multiplication -
des cellules animales en dehors de l'organisme. *C.R. Soc. -*
Biol., 55:1266, 1903.
- 44.- Carrel, A., Harrison, J., Hugles, A., History of cytology.
Ed. Abelard Schuman, London, 1959, pp: 11-37.
- 45.- Parker, R.C., Methods of tissue culture. Ed. Paul B. Heber,
New York, 1961, pp. 160-163.
- 46.- Fischer, A., Die bedeutung den aminosäuren vor die - ----
gewebezellen in vitro. *Acta Physiol. Scand.*, 2:143, 1941.
- 47.- Eagle, H., Nutrition needs of mammalian cells in tissue --
culture. *Science*, 122:501-504, 1955.

- 48.- Paul, J., Cell and tissue culture. Ed. Churchill Livingstone, London, 1973, pp. 14-79.
- 49.- Davis, V., Dulbecco, R., Tratado de microbiología. Ed. Salvat Editores, España, 1978, pp. 1144-1145.
- 50.- Parker, P.C., Methods and tissue culture. Ed. Paul B. Hoeber, New York, 1961, pp. 10-29.
- 51.- Lu, K.T., Winnick, T., The correlations of growth with --- incorporation of radioactive metabolites into nucleic acids in embrionic tissue culture. Exp. Cell. Res., 7:238, 1954.
- 52.- Hayflick, L., Moorhead, P.S., The serial cultivation of -- human diploid cell strains. Exp. Cell. Res., 25:585-621, - 1961.
- 53.- Pastan, I., Cell transformation, en Methods in Enzimology, Vol LVIII, Academic Press, New York, 1979, pp. 1203.
- 54.- Lehninger, A., Biochemistry. Ed. Omega, New York, 1975.
- 55.- Lieberman, M., Mauligt, G., Progresos recientes en Oncolo-- gía. I.M.S.S., México D.F., 1978, pp. 25-95.
- 56.- Ham, R., Mckeehan, N., Media and growth requirements, en - Methods in Enzimology, Vol LVII, Academic Press, New York, 1979.
- 57.- Gey, G.O., Coffman, W.D., Kubicek, M.T., Tissue culture -- studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. Cancer Res., 12:264-265, 1952.
- 58.- The american type culture collection, Catalogue of Strains, 2da. ed., Maryland, U.S.A., 1979, pp. 5-8.
- 59.- Hamburguer, A.W., Salmon, S.E., Primary bioassay of human - tumor stem cells. Science, 197:461-463, 1977.
- 60.- Lieber, M.M., Kovoeh, J.S., Soft agar colony formation -- assay for chemotherapy sensitivity testing of human solid - tumors, Laboratory Med., 57:527-528, 1982.

- 61.- Niell, H.B., Soloway, S., Wood, C.H., McCallum, L.W., - - Webster, K., The use of a tumor colony assay in predicting chemotherapeutic drug response in murine bladder cancer. *Cancer*, 52:619-625, 1983.
- 62.- Freedman, H.V., Cellular tumorigenicity in nude mice; correlation with cell growth in semi-solid medium. *Cell*, 3:355-359, 1974.
- 63.- Jones, P.A., The relationship between tumorigenicity growth in agar and fibrinolytic activity in line of human osteosarcoma cells. *Int. J. Cancer*, 16:616-621, 1975.
- 64.- Macpherson, I., Montagnier, L., Agar suspension culture for the selective assay of cells transformed by polyoma virus. *Virology*, 23:291-294, 1964.
- 65.- Bylinsky, G., Science scores a cancer breakthrough. *Fortune*, 112:14-19, 1985.
- 66.- Clarysse, A., Kenis, Y., Mathe, G., Cancer chemotherapy. -- Ed. Springer Verlag, New York, 1976, pp. 511-528.
- 67.- Herberman, R.B., Friedman, H., The reticuloendothelial --- system. Ed. Plenum Press, New York, 1983, pp. 660-671.
- 68.- Goth, A., Farmacología médica, Ed. Interamericana, México - D.F., 1975, pp. 457-465.
- 69.- Goodman, L. S., Gilman, A., Bases farmacológicas de la terapéutica. Ed. Interamericana, México D.F., 1984, pp.1047-1098.
- 70.- Bergevin, P.R., Blom, J., Tormey, D.C., Guide to therapeutic oncology. Ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1980, pp.809-850.
- 71.- Knopf, T., Fischer, S., McCaffrey, W.D., Cancer chemotherapy, Ed. G.K., Hall Medical Publishers, Boston, 1984, pp.103-106.
- 72.- Zubrod, C.G., Successes in cancer treatment. *Cancer*, 36: - 267, 1975.

- 73.- Meyers, F., Jawetz, E., Golfien, A., Farmacología clínica. Ed. El manual moderno, México D.F., 1982, pp. 467-518.
- 74.- Prescott, D.M., Advances in Genetics. Ed. E.W. Caspari, -- Academic Press, New York, 1976, pp. 99-175.
- 75.- Lamerton, L.F., Cell proliferation and the differential -- response of normal and malignant tissues. Brit. J. Radiol., 45:161-170, 1972.
- 76.- Drill, Farmacología médica. Ed. La prensa médica mexicana, México D.F., 1978, pp. 1570-1609.
- 77.- Bertino, J.R., Boston, B., Capizzi, R.L., The role of chemo -- therapy in the management of cancer of the head and neck: a review. Cancer, 36:752-758, 1975.
- 78.- Fox, B.W., Dexter, T.M., Cancer chemotherapy: in vitro test. Nature, 274:315-316, 1978.
- 79.- Bogden, A.E., Cobb, W.R., Lepage, D.J., Haskell, P.M., -- Gulkin, T.A., Ward, A., Kelton, D.E., Esber, H.J., Chemothe -- rapy responsiveness of human tumor as first transplant -- generation xenografts in the normal mouse: six-day subrenal capsule assay. Cancer, 48:10-20, 1981.
- 80.- Griffin, W.T., Bogden, A.E., Reich, D.S., Antonelli, D., - Hunter, R.E., Ward, A., Yu, D.T., Greene, H.L., Costanza, - M.E., Initial clinical trial of the subrenal capsule assay as a predictor of tumor response to chemotherapy. Cancer, - 52:2185-2192, 1983.
- 81.- Dendy, P., ed., Human tumors in short term culture, Tech - and clinical applications. London, Academic Press, 1976.
- 82.- Holmes, H.L., Little, J.M., Tissue culture microtest for - predicting response of human cancer to chemotherapy. Lancet, 2:985, 1974.
- 83.- Knock, F.E., Galt, R.M., Oester, Y.T., Sylvester, R., In --

- in vitro estimate of sensitivity of individual human tumours -
to antitumor agents. *Oncology*, 30:1, 1974.
- 84.- Salmon, S.E., Hamburguer, A.W., Sohnlen, B., Durie, B.G., -
Alberts, D.S., Quantitation of differential sensitivity of
human tumor stem cell to anticancer agents. *N. Engl. J. Med.*
298:1321, 1978.
- 85.- Wright, J.O., Walker, D.A., A predictive test for the - -
selection of cancer chemotherapeutic agents for the treat-
ment of human cancer. *J. Surg. Oncol*, 7:381, 1975.
- 86.- Kern, D.H., Campbell, M.A., Cochran, A.J., Burk, M.W., --
Morton, D.L., Cloning of human solid tumors in soft agar. -
Int. J. Cancer, 30:725, 1982.
- 87.- Mattox, D.E., Von Hoff, D.D., Aufdemorte, T.B., Factors --
that influence growth of head and neck squamous carcinoma -
in the soft agar cloning assay. *Cancer*, 553:1736-1740, 1984.
- 88.- Schlag, P., Flentje, D., Chemosensitivity testing of human
neoplasms using the soft agar colony assay. *Cancer Treat. -*
Rev., 11:131-137, 1984.
- 89.- Cobb, J.P., The comparative cytological effects of several
alkylating agents on human normal and neoplastic cells in -
tissue culture. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 84:513-542, 1960.
- 90.- Ambrose, E.J., Andrews, D.R., Drug assays on cultures of -
human tumor biopsies. *The Lancet*, 6:24-25, 1962.
- 91.- Sato, M., Yoshida, H., Yanogawa, T., Yura, Y., Urata, M., -
Sensitivity of a neoplastic epithelial duct line from a -
human leukocyte interferon as assessed by an in vitro semi--
solid agar technique. *Int. J. Surg.*, 11:183-189, 1982.
- 92.- Kobayashi, S., Hoshino, T., Combined cytotoxic effect of -
low-dose 5-fluorouracil and hidroxyurea on 9 L cells in -
vitro. *Cancer Res.*, 43:5309-5313, 1983.

- 93.- Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P., In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J. Nat. Cancer Inst.*, 51:1417-1423, 1973.
- 94.- Ponten, J., Saksela, E., Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. *Int. J. Cancer*, 2:434-447, 1967.
- 95.- Hamburguer, A.W., Salmon, S.E., Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*, 197:461-463, 1977.
- 96.- Bertelsen, C.A., Sondak, V.K., Mann, B.D., Korn, E.L., Kern, D.H., Chemosensitivity testing of human solid tumors. *Cancer*, 53:1240-1245, 1984.
- 97.- Group for sensitivity testing of tumors (KSST)., In vitro short-term test to determine the resistance of human tumors to chemotherapy. *Cancer*, 48:2127-2135, 1981.
- 98.- Zenner, H.P., Herrmann, I.F., Bremer, W., Stahl-Mauge, C., Head and neck carcinoma models, *Acta Oto-laringol*, 95:371-381, 1983.
- 99.- Eagle, H., Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. *Science*, 122:501-504, 1955.
- 100.-Adams, R.L., Cell culture for biochemist. Ed. Elsevier, North Holland Biomedical Press, New York, U.S.A., 1980, pp. 23-65.
- 101.-Eisenger, M., Human Lymph nodes in tissue culture. Ed. Krusse and Patterson, American Press, San Francisco, U.S.A., 1973, pp. 65-69.
- 102.-Hayflick, L., and Moorhead, P.S., The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp. Cell Res.*, 25:585-621, 1961.

- 103.- Sethi, J., Growing human sarcomas in culture. *Cancer*, 40:-
744-755, 1977.
- 104.- Takahashi, M., Color atlas of cancer cytology. Japan, 1981,
pp. 32-56.
- 105.- Smith, H.E., Wolman, S.R., Hackett, A.J., The biology of -
breast cancer at the cellular level. *Bioch. et Bioph. Acta*,
738:103-123, 1984.
- 106.- Martin, C.T., Rosenbaum, E., Prediction of in vivo cito- -
toxicity of chemotherapeutic agents by their in vitro -
effect on leukocytes from patients with acute leukemia. -
Cancer Res., 28:2516-2521, 1968.
- 107.- Sondak, V.K., Bertelsen, C.A., Kern, D.H., Morton, D.L., -
Evolution and clinical application of a rapid chemosens- -
itivity assay. *Cancer*, 55:1367-1371, 1985.
- 108.- Schwarzmeier, J.D., Paietta, E., Prediction of the - --
response to chemotherapy in acute leukemia by a short-term
test in vitro. *Cancer*, 53:390-395, 1984.
- 109.- Wright, J.C., Cobb, J.P., Investigation of the relation -
between clinical and tissue-culture response to chemo- -
therapeutic agents on human cancer. *N. Engl. J. Med.*, 257:
1207-1211, 1957.
- 110.- Shrivastavi, S., Bonar, R.A., Stone, K.R., An in vitro - -
assay procedure to test chemotherapeutic drugs on cells -
from human solid tumors. *Cancer Res.*, 40:4438, 1980.
- 111.- Khanna, N.N., Mams, P.K., Intensive combination chemo- -
therapy for cancer of the oral cavity. *Cancer*, 52:790-793,
1983.
- 112.- Andrew, T., Huang, M.D., Adjuvant chemotherapy after - -
surgery and radiation for stage III and IV head and neck -
cancer. *Ann Surg.*, 200:195-199, 1984.

- 113.- Elwood, J.M., Pearson, J.C., Alcohol, smoking, social and-
occupational factors in the aetiology of cancer of the -
oral cavity, pharynx and larynx. Int. J. Cancer, 34:603- -
612, 1984.
- 114.- Hinds, M.W., Thomas, D.B., Asbestos, dental X rays, - -
tobacco, and alcohol in the epidemiology of laryngeal --
cancer. Cancer, 44:1114-1120, 1979.
- 115.- Bevan, A.J., Farmacología, Ed., HARLA, México, D.F., 1978,
pp. 813-890.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al Dr. Benny Weiss Steider y a la C.D.M.O. Julia Urdiales, por la excelente asesoría y apoyo brindado para la realización de este trabajo.

Asimismo, agradezco el apoyo de la M. en C. Judith Márquez, así como a la Dra. Ma. Teresa Benítez, al M. en C. - Alfredo Echegaray y al M. en C. Ignacio Vázquez, por la revisión de la tesis y por sus acertadas observaciones y consejos.

De la misma manera, agradezco al Dr. Sergio Rodríguez - Cuevas, Dr. Fernando Gómez Acosta y Dr. Héctor Santiago Payán del Servicio de Cabeza y Cuello del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional del I.M.S.S., por el material humano facilitado y su valiosa orientación clínica brindada.

Finalmente, manifiesto mi gratitud a los Srs. Ranulfo - Pedraza y José Chavarría por su colaboración técnica, y a todas las personas que trabajan en el Laboratorio de Diferenciación Celular y Cáncer.