

5
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Escuela Nacional de Estudios Profesionales
"ZARAGOZA"

ENSAYO IN VITRO DE QUIMIOSENSIBILIDAD EN
CÁNCERES DE CAVIDAD ORAL Y OROFARINGE.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
LETICIA BUCIO ORTIZ



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.

CONTENIDO

RESUMEN	
INTRODUCCION	1
MATERIAL Y METODO	18
RESULTADOS	22
DISCUSION	30
TABLAS	38
FIGURAS	43
APENDICES	49
BIBLIOGRAFIA	51

RESUMEN

La quimioterapia es una forma de tratamiento del cáncer de uso frecuente en la clínica. Sus resultados son en ocasiones, poco satisfactorios, debido a que su utilización se realiza en base a protocolos hospitalarios con dosis promedio de aproximación. A pesar de ser de gran ayuda en la terapia del cáncer, tiene efectos tóxicos secundarios importantes, por lo tanto se requiere adecuar dosis selectivas en el tratamiento de cada paciente, ya que cada tumor presenta un comportamiento biológico distinto.

Con la finalidad de desarrollar una técnica *in vitro* que contribuya a la mejor selección de fármacos y dosis de éstos, en el presente trabajo se cultivaron 14 biopsias de diferentes carcinomas de cabeza y cuello en presencia de diferentes dosis de agentes antineoplásicos, para determinar aquellos con mayor poder inhibitorio de la proliferación celular.

Al cultivar las biopsias tumorales se obtuvo un 100% de eficiencia de proliferación celular y presentaron una respuesta muy variable a la acción inhibitoria de los fármacos a los que fueron sometidas, aún en tumores que presentaban un mismo tipo histológico.

Se designó un parámetro al cual se llamo Tasa de Proliferación Celular (TPC) para medir la proliferación celular proveniente de cada biopsia tumoral *in vitro*. Se encontró que aquellos tumores que presentaron una TPC alta eran más sensibles a ser inhibidos por Metotrexate y los de TPC baja a Bleomicina, mientras que Cisplatino fue un inhibidor efectivo en algunas biopsias independientemente de si presentaban una TPC alta o baja.

Solo en determinadas biopsias tumorales, dependiendo del tamaño de la biopsia, se emplearon otros fármacos como Actinomicina, Adriamicina, 5-Fluoruracilo (5-FU), Mitomicina C, Vinblastina. De estos fármacos se encontró que 5-FU inhibía desde dosis más pequeñas, mientras que Mitomicina C y Vincristina fueron muy poco activas.

Debido a la necesidad de establecer una quimioterapia del cáncer más adecuada para cada paciente, en la investigación realizada en este trabajo se representa una aportación para el establecimiento de una técnica predictiva en quimioterapia, la cual en un futuro pueda ser aplicada para determinar la terapia apropiada para cada enfermo de cáncer y no como se practica actualmente, que es resultado de una dosis promedio obtenida en un grupo de pacientes de diferente origen y costumbres a las nuestras.

Finalmente, se discute la posibilidad de emplear esta técnica de quimiosensibilidad en otros tipos de cánceres diferentes a los de cavidad oral y orofaríngea, así como su aplicación en células normales como las epiteliales y de médula ósea, con el objeto de estudiar la toxicidad que un fármaco considerado adecuado para un paciente pueda ejercer sobre él mismo, y de su utilidad en el estudio del comportamiento de nuevos fármacos que surjan en el mercado.

INTRODUCCION

La transformación celular neoplásica forma parte de procesos patológicos que se pueden llevar a cabo por medio de algunos tipos de proliferación celular, que en condiciones normales, implicarían un aumento en número de células a partir de una progenitora pero regulado este aumento por medio de mecanismos normales (1). Este sistema de regulación se altera, si se inicia la adaptación celular que incluye A) la inducción o producción de mayor cantidad de retículo endoplásmico, B) el secuestro de lesiones focales en la célula (Autofagia), C) aumento del tamaño celular (Hipertrofia), D) diseminación del tamaño celular (Atrofia), E) aumento en el número de células en un tejido (Hiperplasia), F) cambios reversibles en células diferenciadas que son sustituidas por otras igualmente diferenciadas pero de distinto clon (Metaplasia), G) alteraciones en células maduras que sufren cambios durante la diferenciación, variando volumen, organización y morfología (Displasia), H) falta de diferenciación celular, variando tamaño y forma nuclear (Pleomorfismo, Anaplasia) y hasta llegar a la Neoplasia (2).

Willis (3) define a la neoplasia como "una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede y es incoordinado con el del tejido normal y persiste en la misma forma excesiva después de haber cesado el estímulo el cual provocó el cambio" (2). Además, se desarrolla a expensas del paciente compitiendo con las células normales por las sustancias alimenticias y amenazando la vida del mismo.

En ocasiones se emplea la palabra tumor para designar una masa

de células originadas por un nuevo crecimiento, aunque hay que tomar en cuenta que no siempre es originado por una proliferación celular, ya que también puede ser causado por una inflamación o infección (4).

Las neoplasias se han clasificado en 2 grupos, dependiendo de las propiedades específicas que presenten. De tal manera que existen neoplasias benignas, las cuales son frecuentemente encapsuladas, no invasivas, bien diferenciadas, presentan crecimiento lento, índice mitótico bajo y no son metastásicas, aunque cabe aclarar que la mayoría de éstas características son relativas en cierto grado para definir una neoplasia benigna, excepto por la propensión a ser invasiva y no metastásica. Las neoplasias malignas, por el contrario, no son encapsuladas, pero sí invasivas, pobremente diferenciadas, de rápido crecimiento, con elevado índice mitótico y metastásicas, y se les conoce como cáncer (2,4).

Ya en los años del 460-370 A.C., Hipócrates define el cáncer con el término "carcino" y "carcinoma", como una enfermedad de pronóstico grave. Galeno antes del Renacimiento concuerda con él y agrega que el cáncer es causado por el exceso de un humor maligno (5).

La palabra cáncer deriva del latín que significa cangrejo, y aunque se han dado muchas definiciones por diferentes autores acerca de lo que es el cáncer, no se ha establecido una definición que represente todos los aspectos de lo que realmente es esta enfermedad. Sin embargo, puede decirse que el cáncer es una neoformación celular maligna, anárquica, persistente, con crecimiento tendiente a la invasividad y a la diseminación, cuya

etiología es atribuida en la actualidad a un sinnúmero de agentes, pero sin establecer las causas que lo producen realmente y que en la mayoría de los casos acaba con la vida del paciente.

A nivel clínico la palabra cáncer es usada para describir un grupo de enfermedades con ciertos rasgos clínicos los cuales si no son tratados, resultan en la muerte del paciente por sobrecrecimiento de células cancerosas (6).

Los tumores o neoplasias malignas son divididos en Carcinomas y Sarcomas según sea su origen. Los carcinomas son derivados de células epiteliales mientras que los Sarcomas derivan de células de tejido conectivo (5,7).

A los tumores se les denomina según el tipo de células que los originan, de tal forma que a la mayoría de los tumores benignos designados histológicamente se les agrega el sufijo -oma, mientras que los tumores malignos son designados mediante el tipo histológico y la terminación de sarcoma o bien nombrando primero la palabra carcinoma, según sea el caso (7) (Tabla 1).

Se ha tratado de explicar cuales son las causas que originan el cáncer, como: la tendencia incontrolada e ilimitada a proliferar a expensas del paciente, la transmisibilidad de la proliferación anormal de una célula neoplásica a generaciones sucesivas de células hijas como un fenotipo relativamente 'estable' y hereditable, y una tendencia de la proliferación anormal a progresar con el tiempo hacia un incremento de la malignidad asociada cada vez con mas alteraciones marcadas en morfología celular, cariotipos, antígenos específicos, metabolismo, etc., Sin embargo, aún no se ha tenido éxito para todos los aspectos observados de las neoplasias malignas (8,9).

TABLA 1.

 CLASIFICACION DE LOS TIPOS MAS COMUNES DE TUMORES

TEJIDO DE ORIGEN	BENIGNOS	MALIGNOS
EPITELIAL		
Estratificado escamoso	Papiloma de cels. escamosas	Carcinoma de Cels. escamosas o epidermoide
Glándulas	Adenoma	Adenocarcinoma
MESENQUIMATOSO		
a) Conectivo y derivados:		
Fibroso	Fibroma	Fibrosarcoma
Mixomatoso	Mixoma	Mixosarcoma
Adiposo	Lipoma	Liposarcoma
Cartilago	Condroma	Condrosarcoma
Hueso	Osteoma	Osteosarcoma
Notocordal	Cordoma	Cordosarcoma
b) Endotelial:		
Vasos sanguíneos	Hemangioma	Hemangiosarcoma
Vasos linfáticos	Linfangioma	Linfangiosarcoma
c) Cels. sanguíneas y afines:		
Cels. hematopoyéticas	-----	Leucemias
Tej. linfoide	-----	Linfoma
d) Muscular		
Musc. Liso	Leiomioma	Leiomiomasarcoma
Musc. Estriado	Rabdomioma	Rabdomiosarcoma

Otros autores mencionan que algunos factores son predisponentes para originar cáncer, o bien, el estar sujetos a ellos aumenta en gran porcentaje la tendencia a presentarlo. Algunos de estos factores son los siguientes:

Herencia: Aunque se han realizado muchos estudios de familias para determinar si la herencia es causa de cáncer humano, las evidencias de la influencia hereditaria son excesivamente raras. Sin embargo, hay familias que tienen un incremento susceptible al cáncer como es en el caso de Retinoblastoma (10).

Raza: La distribución de los cánceres varía según las razas, aunque para ello se acepta la influencia simultánea de factores ambientales y hábitos sociales. No obstante, estudios realizados por Grieve y col. (11), concluyeron que en Sudafrica el cáncer de labio y el cáncer cutáneo, eran más frecuentes en las mujeres y los hombres blancos que en los hombres negros. También se ha encontrado con relativa frecuencia el cáncer de nasofaringe en el sur de China (10).

Infección Viral: Muchos virus son definitivamente cancerígenos a nivel experimental, pero en pocos casos se ha establecido in vivo una relación etiológica objetiva en tumores concretos. Sin embargo, es posible que un virus oncogénico pueda interactuar con el desarrollo celular en 2 posibilidades: a) duplicándose en una célula sin provocar otra alteración que la propia del virus y b) provocando una modificación transitoria o permanente del fenotipo celular (12). Un ejemplo representativo de cáncer asociado con infección viral, es la relación del virus Epstein-Barr o EBV con el tumor de Burkitt (10).

Agentes Químicos: Se ha demostrado que diversos agentes

químicos provocan cáncer a nivel experimental, y en humano se han encontrado casos de cáncer, donde probablemente se deba a la acción de algún agente químico (cancerígeno). Existen 3 tipos fundamentales de cancerígenos, los que son directamente activos, los que son previamente metabolizados y los naturales que alteran los alimentos (13). Dentro de los primeros se encuentran los alquilantes, que tienen capacidad para introducir uno o más radicales alquilo en la cadena del ADN, (14) y en 1964 se demostró eran drogas cancerígenas para el hombre (15). La mayoría de los alquilantes actúan estableciendo puentes de unión entre el nitrógeno en posición 7 de la guanina de ambos haces helicoidales de ADN, impidiendo así la reduplicación celular y produciendo cáncer de pulmón en trabajadores que emplean cromo, níquel y asbestos (10,16,17). Entre los cancerígenos que deben ser metabolizados, un grupo importante es el de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, que forman parte de diversos productos ambientales (petróleo, humo del tabaco, etc.), en 1775 se pudo establecer que había una tendencia a adquirir cáncer entre los deshollinadores por la acción de estas sustancias, también se ha encontrado que aminas aromáticas utilizadas en la preparación de diversas drogas, pesticidas, plásticos y caucho, en su mayoría están relacionadas con la inducción del cáncer de vejiga urinaria (10,16). Los carcinógenos naturales que alteran los alimentos, son un grupo de agentes que añadidos a algunos alimentos se han relacionado con diversos tipos de cáncer. Un ejemplo serían las aflatoxinas que son micotoxinas que contaminan alimentos almacenados por mucho tiempo, como el maíz y cacahuete (18), y cuya capacidad carcinogénica se ha demostrado a nivel hepático.

También se ha demostrado que al masticar nuez de betel se incrementa la posibilidad de presentar cáncer de boca y lengua (10), y que los ciclamatos, agentes edulcorantes de gran difusión aumentan a nivel experimental, la incidencia de cáncer de vejiga urinaria (19).

Radiación: para éste caso, lo mismo que con los otros factores es posible afirmar que la radiación es un factor importante que ayuda a incrementar la incidencia de cáncer. Findley (20) demostró en 1928 la influencia de la radiación ultra-violeta al provocar papilomas y carcinomas en ratón albino. Hueper (20) en 1942 encontró que la prolongada exposición a la luz solar producía cáncer cutáneo en ratón. Ya en 1902 se describió el primer carcinoma epidermoide desarrollado en la mano de un radiólogo y desde 1904 se conoce el efecto de los rayos -X sobre las células sanguíneas. Es significativo que después de la explosión de la bomba atómica en Hiroshima y Nagasaki, en los supervivientes alrededor de 2000 Km² del epicentro de explosión, la leucemia aumento 60 veces en comparación con el resto de la población (10). La radiación ionizante también puede originar osteosarcomas, un ejemplo fue el de los pintores de las esferas luminosas de los relojes, que utilizaban un tipo de pintura la cual contenía radium o torio, que con el tiempo desarrollaba cáncer (21).

Inmunidad: Algunas pruebas de laboratorio han sugerido que las células cancerosas son identificadas como antígenos por los organismos en que se desarrollan, jugando un papel protector la inmunidad. Sin embargo, se ha observado que cuando el sistema el cual forma el anticuerpo es incompetente o su actividad es

suprimida por drogas, existe una mayor predisposición al cáncer (10).

Parásitos: El ejemplo mas interesante es la relación entre el parásito Schistosoma haematobium y el cáncer de vejiga urinaria, enfermedad muy común en Egipto. El Schistosoma invade la pared de la vejiga originando una inflamación que en relación a la duración e intensidad de la infestación progresa hacia el cáncer (22).

Lesiones e inflamación: Hay poca evidencia científica de que una lesión física pueda resultar en enfermedad maligna. El cáncer desarrollado en sitios de inflamación continua, antes de que los antibióticos controlaran absesos de infección crónica con persistente derrame, fueron comunes y podían quedarse sin curar hasta por 30 años o más. En pacientes con colitis ulcerativa en la cual hay ulceración crónica extensiva de el revestimiento mucoso a lo largo del intestino, el riesgo del cambio canceroso en el colon es alto y se incrementa con la duración de la enfermedad y con la extensión en el intestino. Se ha informado que el cáncer puede originarse en una cicatriz, esto se encuentra muy frecuentemente entre los campesinos de la India que llevan una vesija de barro con carbón caliente bajo sus ropas atada a la cintura y en contacto con la piel, la cual se endurece y finalmente ocurre un cambio maligno. También se ha encontrado que se puede desarrollar cáncer del esófago, en la cicatriz resultante de deglutir un líquido corrosivo tal como un lisol (10).

Finalmente, también las protesis bucales mal ajustadas y piezas dentales fracturadas pueden ser causas que originen la

formación de una neoplasia benigna o maligna (23,24).

El cáncer de cabeza y cuello cubre un grupo heterogéneo de carcinomas escamosos alrededor de las fosas nasales, senos paranasales, cavidad oral (labio, lengua, mucosa bucal, encías, piso de la boca, paladar), nasofarínge, orofarínge, hipofarínge y larínge (2,25) Ellos, tienen en común la tendencia a diseminarse localmente hacia los tejidos circundantes y a los nódulos linfáticos regionales, de tal manera, que la extensión local frecuentemente causa la muerte antes de que ocurra metástasis en órganos vitales (26).

Los tumores también pueden involucrar: glándulas con epitelio, melanoblastos, tejidos odontogénicos, tejido linfático, mucosas y hueso o cartilago (27).

El grado de diferenciación tumoral es importante, ya que carcinomas de células escamosas bien diferenciadas muestran una mayor regresión con los fármacos, que otros tumores en los cuales la diferenciación no es pronunciada (28).

La cirugía es la primera forma de tratamiento para el cáncer y fue tempranamente conocida por los egipcios. En torno al presente siglo surgen nuevas formas de tratamiento como son la radioterapia en ciertos tumores (26), la quimioterapia y la combinación de ambas en la búsqueda para tratar de curar el cáncer (6,25). Existen otras terapias como son la inmunosupresión por radiación, la hipertermia y la inmunoterapia, no obstante se encuentran aún en fases iniciales de experimentación (29,30).

La quimioterapia surge en 1876, cuando Ehrlich (31) la define como el uso de un agente químico de composición conocida, para

tratar parasitosis. En los siguientes años Ehrlich dedica más su atención al desarrollo de agentes quimioterapéuticos y descubre el primer agente alquilante que más tarde se emplearía en el tratamiento de neoplasias malignas.

Hacia la Segunda Guerra Mundial se inicia la utilización de la quimioterapia como una forma de terapia del cáncer y actualmente se emplea, basándose en su acción sobre estructuras celulares diferentes o sobre el ciclo celular, sin embargo, su aplicación fue rudimentaria desde los 500 años A.C. y varias veces se usó en los pasados 1500 años, al emplear ácidos concentrados o alquilantes, varios metales o metaloides como arsénico, mercurio, cloruro de zinc, sales de cobre, nitrato de plata y sales de antimonio como agentes apropiados para el tratamiento local del cáncer (26).

La administración sistemática de agentes químicos para el tratamiento del cáncer fue introducida por Lissauer en el año de 1865 (32), sin embargo, los resultados tempranos de la quimioterapia fueron imprecisos. Fue hasta 1930 que varios acontecimientos dieron como resultado la primera quimioterapia efectiva. Algunos de estos acontecimientos fueron: la observación de que la colchicina actúa como un veneno mitótico (33,34), la introducción de estrógenos para cáncer prostático (35), de andrógenos para cáncer de mama (36) y el descubrimiento de la actinomicina (37), de las mostazas nitrogenadas (38) y de alcaloides vinca (39) como posibles agentes antineoplásicos. Subsecuentes progresos han confirmado el valor de esta forma de terapia en oncología clínica y como una herramienta de investigación en biología celular (26), aunque hay que aceptar

que las drogas citotóxicas nunca eliminan un 100% de las células, sino sólo una fracción constante e independiente del número total de células presentes (40). Gran número de agentes antineoplásicos han surgido en los últimos 50 años, y su valor citotóxico ha sido confirmado por la cura obtenida en algunas enfermedades cancerosas, los resultados para tumores sólidos han sido menos satisfactorios (26).

En algunos tumores localizados como inoperables o radioresistentes como son en algunas ocasiones los de cabeza y cuello, el tratamiento a seguir es la quimioterapia, la cual es prescrita con la esperanza de inducir suficiente regresión tumoral para permitir la subsecuente resección (26), también ha sido empleada en cánceres diseminados, ya que es la única forma de eliminar células tumorales en cualquier sitio del cuerpo (41).

Los agentes quimioterapéuticos del cáncer se han clasificado en varios grupos, dependiendo de su estructura, origen, y modo de acción, ya sea en la síntesis de ADN, ARN o bien sobre el ciclo celular. De tal forma que encontremos los siguientes grupos:

Agentes Alquilantes: introducen un grupo alquilo en una molécula, pero además ejercen sus efectos bajo condiciones fisiológicas y tienen actividad antitumoral (42). Como las mostazas nitrogenadas (43), las etilenimidas (44), los ésteres sulfónicos (45), y recientemente se ha empleado cisplatino (46,47,48,49) como un agente más del grupo.

Antimetabolitos: presentan una estructura molecular similar a la de metabolitos naturales, pero interfieren con la función de estos últimos. Entre éstos se encuentra el Metotrexate (47,50,51,52,53), de estructura análogo a la del ácido fólico,

importante coenzima sin la cual algunas sustancias como purinas, timidina, histidina, etc. no pueden ser sintetizadas por la célula. Otro agente que pertenece a este grupo es el 5-fluoruracilo (52,54,55), compuesto sintético muy semejante al uracilo ya que presenta una variación mínima de éste. El cambio de un átomo de hidrógeno en posición 5 en el uracilo por uno de fluor en la misma posición, puede implicar ser letal para la síntesis celular.

Antibióticos: son productos microbianos que inhiben el crecimiento tumoral y tienen características de inhibición de la síntesis de ADN, ARN, proteínas, la función de mitocondrias y además ocasionan alteración de la membrana celular.

Existen seis grupos: a) Los antibióticos aminoácidos, como la azaserina que *in vitro* es un inhibidor de la glutamina. b) Los análogos de las purinas, que aún no proporcionan resultados importantes en clínica humana, entre los cuales se encuentran los que interfieren o reaccionan con el ADN como la Actinomicina D (56), la Mitomicina C (57) y la Mitramicina. c) La Daunorrubidomicina y la Adriamicina (58), los cuales son antibióticos glucósidos que reaccionan fuertemente con el ADN, formando complejos con él y que además son citostáticos S-independientes, ya que son capaces de destruir células situadas en cualquier fase del ciclo. d) La Bleomicina (47,59,60) que es obtenida de un tamizado de Streptomyces vermicillius, interfiere con el ADN produciendo una disminución en la síntesis de ADN, ARN y proteínas, siendo S-independiente. Finalmente la Estreptonigrina que forma parte de los antibióticos antitumorales, no presentó progresos relevantes (61).

Alcaloides o Derivados de Plantas: los alcaloides son las bases nitrogenadas que se derivan primariamente de las plantas y actúan inhibiendo el ciclo celular en mitosis. Las más comunmente empleadas son la Vinblastina y la Vincristina, las cuales son obtenidas de Catharanthus roseus (Vince rosea) e inhiben el ciclo celular en metafase (62,63,64), por lo que se les denomina fase-específicos (46).

Sustancias Diversas: incluyen citostáticos difíciles de clasificar entre los otros grupos, como la procarbazine que in vitro ocasiona una degradación del ADN, pero in vivo se ha demostrado que no es muy activa (65).

Las pruebas in vitro referentes a la acción de agentes químicos sobre cultivos de células neoplásicas tienen sus antecedentes en los primeros intentos de cultivo en medios artificiales. Estos intentos comenzaron en el siglo pasado, cuando F. D. Reckliphansen en 1866 mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio durante 35 días, sometiéndolas a una gran variedad de condiciones (66). Posteriormente, Willhem Roux en 1886, efectuó los primeros experimentos de cultivo de tejidos utilizando un embrión de pollo (66,67).

Leo Loeb a principios de siglo, empleo bloques de agar y plasma coagulados para mantener células sanguíneas, tejido conectivo y de otros tipos por un largo tiempo sin que ellos muriesen, pudiendose decir que con él se establecen las bases y se dan los primeros pasos efectivos en el cultivo de tejidos (66). Años después, se perfeccionó la utilización de frascos especiales para cultivo y se comienza a estudiar neoplasias

malignas in vitro (68,69), a la vez que Fisher (70) observa que las células normales sufrían una transformación in vitro.

Después de la Segunda Guerra Mundial, Earle (71) perfeccionó muchas de las técnicas de cultivo de tejidos para el estudio de neoplasias en la investigación del cáncer y en la actualidad son ampliamente utilizadas para estudiar: cinética celular, inmunología, regulación del crecimiento, bioquímica, diferenciación celular, genética, producción hormonal o celular, virología, transformación celular y citotoxicidad (72).

La técnica de cultivo de tejidos, mas ampliamente usada es la del ensayo clonogénico en agar blando (73,74,75), mediante la cual algunos investigadores han tratado de realizar ensayos in vitro para probar la acción de agentes quimioterapéuticos en colonias de células cancerosas (76,77,78,79,80). Sin embargo, los resultados obtenidos son poco confiables, ya que el medio utilizado para cultivar es restrictivo para el crecimiento, proliferación y diferenciación celular, obteniéndose una baja eficiencia de proliferación (81,82).

Por otro lado se han obtenido resultados interesantes en pruebas de inhibición de proliferación celular por diferentes fármacos, utilizando líneas celulares tumorales establecidas en medios líquidos. Sin embargo, debido a que el establecimiento de una línea celular requiere de períodos largos de adaptación, se podría suponer que las células tumorales hayan perdido algunas de sus características originales (83,84,85), restando de esta forma confiabilidad a este tipo de predicciones in vitro. Algunos investigadores en lugar de emplear líneas celulares, utilizan el tejido tumoral disgregado enzimáticamente, pero este

procedimiento no es adecuado si se desea saber la respuesta que dan las células tumorales ante determinados fármacos, ya que pueden estar afectadas en su membrana a causa de la digestión enzimática y por lo tanto ser más sensibles al fármaco (86).

Ensayos citotóxicos in vitro relacionados con la terapia del cáncer, se han realizado en modelos animales y escasamente se han correlacionado en clínica (87), las pruebas han incluido la revisión del daño del fármaco en cultivo de órganos, la inhibición del metabolismo celular y la incorporación de proteínas celulares al ADN, pero estos métodos son técnicamente difíciles de realizar, subjetivos de interpretación y solo moderadamente efectivos en predicción de efectos in vivo (88).

También se han desarrollado ensayos de quimiosensibilidad empleando ratones atímicos, a los que previamente se les inocula pequeñas porciones de tumor en la cápsula suprarrenal, sin embargo estos estudios se ven alterados por la baja respuesta inmune murina (89,90,91).

Mediante protocolos hospitalarios se ha llegado a establecer cierta relación entre fármacos antineoplásicos y algunos tipos de cáncer (26). Sin embargo, estos protocolos están realizados en base a una respuesta favorable ante ciertos fármacos, obtenida estadísticamente. Por lo que es necesaria la implementación de una técnica mediante la cual se pueda establecer un tratamiento individual para cada paciente, ya que no todos responden en la misma forma a un fármaco administrado. Estas diferencias suelen provenir de ciertas condiciones como raza, nutrición, o forma de vida del paciente e influir en la respuesta favorable o no a un fármaco.

En México en 1922 los tumores malignos no se registraban entre las 10 primeras causas de muerte, mientras que en 1974 aparecen en 6o. lugar y a partir de 1981 la mortalidad por cáncer ocupa el 3er. lugar (92).

Tomando en consideración el creciente número de nuevos casos por año, de este padecimiento y de que aún no se ha podido establecer un tratamiento contra el cáncer que lo elimine en 100%, es necesario continuar investigando diferentes aspectos de este mal, a fin de prevenirlo o eliminarlo. Como una contribución a esto, se propuso en el presente trabajo realizar pruebas de quimiosensibilidad en cánceres de cavidad oral y orofarínge, ya que presentan el 15% de todos los casos nuevos de cáncer actualmente, asimismo por medio de estos ensayos se tendrían nuevos datos sobre la biología de estos tumores. El beneficio social que se aportará a la comunidad se llevará a cabo a nivel hospitalario por medio de la selección del fármaco para cada paciente con tratamiento de quimioterapia, previniendo los riesgos secundarios (mielosupresión, disnea, alopecia, etc) provocados por la alta toxicidad que algunas drogas suelen ocasionar en determinado paciente, así como la disminución del costo del tratamiento.

Así, como es conocido que las células provenientes de tumores malignos pueden ser cultivadas in vitro, y que su proliferación es inhibida por diferentes fármacos, se supuso que si se cultivaban biopsias provenientes de tumores (cavidad oral y orofarínge) en presencia de diferentes fármacos (normalmente los utilizados en la quimioterapia de este tipo de padecimiento), se podría, mediante la determinación de la inhibición a la

proliferación celular, obtener las sustancias a las cuales el tumor fuera más sensible y por consecuencia diseñar un modelo experimental de quimiosensibilidad por paciente.

MATERIAL Y METODO

OBTENCION DE LAS BIOPSIAS

Las biopsias de 14 neoplasias malignas fueron obtenidas en diferentes ocasiones, cuando se practicó la cirugía a los pacientes. La muestra fue tomada dentro del quirófano y se depositó en un tubo de plástico conteniendo 15 ml de medio de cultivo el cual esta constituido de Medio Mínimo Esencial de Eagle (ME) (Microlab, Méx., D.F.) (Apéndice I) al que previamente se le agregó 100 µg/ml de estreptomina (Sigma Chem., Co., U.S.A.), 100 U/ml de penicilina G (Sigma Chem., Co., U.S.A.) y 3.7 g/l de bicarbonato de sodio (J.T. Baker, Méx.); además de un 10% de Suero Fetal de Bovino (SFB) (Microlab, Méx.,D.F.) previamente desactivado a 56°C durante 30 minutos.

Posteriormente la muestra se colocó en una hielera para ser transportada al laboratorio para su procesamiento, siempre dentro de las 12 hrs despues de su obtención.

SEMBRADO DE LA BIOPSIA

La biopsis fue colocada en una caja Petri de cultivo, se le diseccionaron áreas de degeneración y necrosis, y se lavó por inmersión en solución salina amortiguadora de fosfatos (PBS; del inglés Phosphate Buffered Saline) (Apéndice II). Despues de ésto, el tejido se cortó en pequeñas porciones de aproximadamente 1 mm³ que se colocaron en cajas de cultivo de 60 X 15 mm (Lux Scientific Corporation, U.S.A.), para posteriormente agregarles el medio de cultivo.

CONDICIONES DE CULTIVO

Los explantes fueron cultivados en 5 ml de ME con 20% de SFB; en una incubadora con 10% de CO₂ en la atmósfera, a 37°C y con humedad a saturación.

PRUEBA DE QUIMIOSENSIBILIDAD

La prueba de quimiosensibilidad se realizó agregando al medio de cultivo 0.5 ml de solución conteniendo el fármaco (Apéndice III) para obtener una determinada concentración de 0.1, 1.0 y 10.0 µg/ml, teniendo un volumen final de 5 ml. En las primeras 8 biopsias se emplearon de 2 a 4 fármacos (Tabla 2), de los que se mencionan a continuación: Actinomicina D (Sigma Chem. Co., U.S.A.), Adriamicina (Adriablastina, Farmitalia Carlo Erba, Méx.), Bleomicina (Blenoxan, Bristol Labs., U.S.A.), Cisplatino (Platinol, Bristol Labs., U.S.A.), 5-Fluorouracilo (5-FU) (Roche, Méx.), Metotrexate (Lederle Labs., U.S.A.), Mitomicina C (Sigma Chem. Co., U.S.A.), Vinblastina (Eli Lilly and Co., U.S.A.) y Vincristina (Sigma Chem. Co., U.S.A.). Para las restantes 6 biopsias, se empleó Bleomicina, Cisplatino y Metotrexate en todos los casos. También se realizaron cultivos control de cada una de las biopsias obtenidas, a las que no se agregó fármaco y estuvieron sometidas a las mismas condiciones de cultivo in vitro (como es el tiempo de cultivo) que las que tenían fármaco.

El empleo de los agentes antineoplásicos para cada tumor se basó en los protocolos hospitalarios de tratamiento y en el tamaño de la muestra obtenida.

TECNICA DE TINCION

Los cultivos fueron revisados cada 3er. día al microscopio invertido para observar su crecimiento. Una vez que en el sustrato de la caja se encontró una proliferación que cubría entre el 60 y 90% del área de cultivo, se dieron por terminados y se procedió a teñir.

Para teñir las colonias celulares se utilizó la técnica de May Greenwald-Giemsa. Se desechó el medio de cultivo de las cajas y se lavaron las colonias celulares con 4 ml de solución de PBS. Posteriormente se fijaron y tiñeron las células con colorante de May Greenwald (Harleco Div. de ASH, Méx.) en alcohol metílico, durante 2 minutos y después se lavaron con agua común. Enseguida se agregó a las cajas 4 ml de colorante Giemsa (Sigma de Méx.) diluido en agua bidestilada (1:10), por 10 minutos. Finalmente las cajas se lavaron con agua y se dejaron secar para su evaluación.

EVALUACION DE LOS CULTIVOS

El efecto de los agentes químicos se observó midiendo con un vernier, el área de proliferación celular tanto en los controles como en los cultivos que contienen una determinada concentración de fármaco, obteniéndose un porcentaje de proliferación para cada uno de los cultivos de una biopsia. Dicho porcentaje fue determinado al multiplicar el área de un cultivo inhibido por 100 y dividiendo el resultado entre el área del cultivo control. También se determinó un porcentaje de inhibición al restar a 100% el porcentaje de proliferación.

Para tratar de establecer una correlación entre los resultados

obtenidos in vitro de una biopsia tumoral y los datos clínicos, se obtuvo el tamaño de la lesión, tiempo de evolución, sitio y diagnóstico histopatológico del tumor, además de edad y sexo del paciente.

Con el fin de establecer un parámetro más de comparación, se determinó una tasa de proliferación celular (TPC) la cual se calculó dividiendo el área de proliferación celular del cultivo control, entre el número de días que se cultivó la biopsia correspondiente. Obteniéndose así el área en mm^2 que proliferó una biopsia por día, dando una idea de si una biopsia presenta una proliferación rápida o lenta en comparación a las demás.

Por último cabe aclarar que los cultivos se realizaron por duplicado para las primeras 8 biopsias y por triplicado para las restantes.

RESULTADOS

Se cultivaron inicialmente ocho explantes de biopsias de diferentes tumores de cabeza y cuello, in vitro en medio líquido, en presencia de 0.1, 1.0 y 10.0 $\mu\text{g/ml}$ de varios agentes antineoplásicos. Se utilizaron nueve fármacos: Actinomicina D, Adriamicina, Bleomicina, Cisplatino, 5-Fluoruracil (5-FU), Metotrexate, Mitomicina C, Vinblastina y Vincristina empleándose de dos a cuatro, para cada biopsia tumoral (Tabla 2). La elección y número de fármacos se hizo en base al tipo de terapia hospitalaria para cada tumor y de la cantidad de tejido disponible.

Los diferentes cultivos tuvieron tiempos variables de cultivo (Tabla 3), dos cultivos (Biopsias 5 y 6) fueron detenidos cuando las células ocupaban más del 60% del sustrato de cultivo a los 5 y 11 días respectivamente, otros cuatro (Biopsias 1,3,4 y 7) a los 15, 18, 13 y 17 días por presentar una proliferación celular muy lenta y finalmente dos más (Biopsias 2 y 8) cuando se detectó el inicio de contaminación por hongos, a los 11 y 6 días respectivamente. Debido a los períodos de tiempo tan variados en que los explantes fueron mantenidos in vitro, éstos ocupaban diferentes áreas en el sustrato de cultivo, variando desde un porcentaje de proliferación respecto al área total de 10% (Biopsia 7), hasta 91% (Biopsia 6) (Tabla 3). Vale la pena hacer notar que estos extremos correspondieron a explantes procedentes de tumores de la misma estirpe histológica. Con la finalidad de poder comparar los grados de inhibición entre los diferentes explantes, se evaluó la tasa de proliferación celular (TPC) para

cada una de las biopsias tumorales cultivadas. Se encontraron variaciones que iban desde 12 hasta 158 $\text{mm}^2/\text{día}$ correspondientes a los explantes de las biopsias 3 y 5 respectivamente. Es conveniente señalar que las biopsias con TPC más altas correspondieron a tumores clínicamente muy agresivos, pues se tenían masas tumorales elevadas y de crecimiento muy rápido (Tabla 4). Por último es importante mencionar que en ausencia de fármacos todos los explantes tuvieron una eficiencia de proliferación del 100%.

Al emplear la concentración de 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de los fármacos, se encontró que cada tumor presentaba un patrón de inhibición diferente (Figura 1). Se observaron casos en los cuales la inhibición era muy fuerte (Biopsias 1 y 4), mientras otros en donde esta era débil (Biopsias 5 y 6), además se encontró una variabilidad muy grande a la respuesta inhibitoria dentro de un mismo explante, a los diferentes fármacos ensayados (Biopsias 3, y 6). Vale la pena hacer notar que las biopsias con TPC baja (12, 12, 14, 14, 24 y 28 $\text{mm}^2/\text{día}$), mostraron un porcentaje de inhibición mayor al 40%, mientras que en las de TPC alta (107 y 158 $\text{mm}^2/\text{día}$) algunos fármacos presentaron inhibiciones menores al 20% (Figura 1).

En general nuestros resultados mostraron que el 5-FU, seguido del Metotrexate fueron los compuestos con mayor poder inhibitorio, mientras que Blomocina y Cisplatino con menor (Figura 1). Se pudo asimismo observar que Blomocina fue mejor inhibidor en aquellos explantes con TPC baja (12, 14 y 16 $\text{mm}^2/\text{día}$) y peor para aquellos con TPC alta (24 y 107 $\text{mm}^2/\text{día}$). Por su parte el Metotrexate resultó ser mejor inhibidor en aquellos explantes con

TPC alta (24, 28 y 107 mm²/día) y peor en los de TPC baja (12 y 12 mm²/día).

Cuando los explantes fueron cultivados en presencia de 1.0 µg/ml de fármaco (Figura 2), se siguió observando que cada tumor presentaba una respuesta de inhibición diferente, ya que hubo casos donde la inhibición fue muy fuerte (Biopsias 1,2,4,6 y 8), mientras que mucho menos en otros (Biopsias 3 y 5). También se encontró una variabilidad muy grande en la respuesta inhibitoria de algunas drogas hacia una misma biopsia (Biopsias 3, 5 y 7). Es de importancia hacer notar que la respuesta de inhibición para esta concentración, fue mayor en comparación con la que se observó en la concentración de 0.1 µg/ml (Figura 1).

En aquellos explantes con TPC pequeñas de 16, 24, 12, 14, 107, 12 y 28 mm²/día (Biopsias 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 8) se observó una mayor inhibición que en el explante proveniente de la biopsia 5 que presentó la TPC más grande de 158 mm²/día (Figura 2).

Además, algunos agentes antineoplásicos mostraron mayor efectividad en inhibir la proliferación celular de la mayoría de los explantes como Bleomicina (Biopsias 1 y 4), Cisplatino (Biopsias 6, 7 y 8, y Metotrexato (Biopsia 2), mientras que otras originaron una escasa respuesta en la inhibición a la proliferación celular, como Metotrexato (Biopsia 3) y Mitomicina C (Biopsia 5). Asimismo se pudo observar que al emplear Cisplatino en aquellos explantes con TPC lenta de 16, 107, 12 y 28 mm²/día (Biopsias 1, 6, 7 y 8) el porcentaje de inhibición a la proliferación celular fue mayor que en el explante que presentó la mayor TPC de 158 mm²/día (Biopsia 5). Finalmente, Metotrexato mostró mayor inhibición en aquellos explantes con TPC grande de

24, 14, 107 y 28 mm²/día (Biopsias 2, 4, 6 y 8) que en aquellos con TPC pequeña de 12 mm²/día (Biopsias 3 y 7). Es necesario hacer notar que para el caso de Metotrexate la respuesta que dió en esta concentración fue la misma que al emplear la concentración de 0.1 µg/ml (Figura 1 y 2).

En los cultivos que contenían 10.0 µg/ml de fármaco, la inhibición a la proliferación celular siguió mostrando una respuesta variable ante la acción de las diferentes drogas (Figura 3), ya que algunos explantes mostraron una inhibición muy fuerte (Biopsias 1 y 6), mientras que en otros la inhibición no fue tan grande (Biopsias 5 y 7). Se pudo observar asimismo diferencias en la respuesta de inhibición, a los diferentes fármacos en algunas de las biopsias tumorales cultivadas (Biopsias 3, 5 y 7). Además la eficacia de los fármacos para inhibir la proliferación fue mayor cuando se empleó esta concentración (Figura 3), que cuando se utilizaron dosis más pequeñas (Figuras 1 y 2). Bleomicina llegó a inhibir casi el 100% de la proliferación celular (Biopsias 1, 3 y 6), mientras que otros fármacos como Mitomicina C (Biopsia 5) y Metotrexate (Biopsia 7) sólo inhibieron el 72 y 61% respectivamente.

En general no se observó una asociación entre los datos clínicos y los resultados cinéticos obtenidos de los experimentos in vitro (Tabla 4), excepto en el caso de la biopsia tumoral 5, la cual provenía de un tumor muy grande con un tiempo de evolución muy corto y que al cultivarlo presentó una TPC muy alta (158 mm²/día).

Basados en los resultados de la serie de experimentos anteriores en donde se obtuvo una gran eficiencia de

proliferación a partir de explantes primarios y en donde se demostró que en medios líquidos se puede tener una idea de la susceptibilidad de células tumorales a diversos fármacos, se procedió a analizar con esta técnica otra serie de biopsias.

Siendo que el número de fármacos a ser ensayados dependió del tamaño de la biopsia, se decidió reducir a solo 3 el número de fármacos. Se emplearon Bleomicina, Cisplatino y Metotrexate por ser algunos de los agentes anticancerosos recomendados en el tratamiento de la mayoría de carcinomas de cabeza y cuello y por ser los fármacos que ofrecieron mayor respuesta al inhibir en un alto porcentaje la proliferación celular en la mayoría de las biopsias tumorales cultivadas anteriormente. Dichos agentes fueron probados en 6 biopsias tumorales, 4 de tipo epidermoide (3 provenientes de lengua y uno de encía), uno folicular y otro medular (estos dos últimos de tiroides). Se obtuvo nuevamente un 100% en la eficiencia de proliferación celular de las muestras cultivadas en ausencia de fármaco (Tabla 5). Los cultivos tuvieron un tiempo variable de incubación, tres explantes (Biopsias 9, 13 y 14) fueron detenidos cuando la proliferación celular cubría más del 75% del área del sustrato de cultivo a los 21, 30 y 27 días, otro (Biopsia 12) a los 20 días por presentar una proliferación celular muy lenta y finalmente dos más (Biopsias 10 y 11) cuando se observó el comienzo de contaminación por hongos.

Debido al tiempo variable de cultivo in vitro de los explantes y a las características de proliferación propias de cada biopsia tumoral a la cual pertenecen, se obtuvieron porcentajes de saturación del sustrato de cultivo que variaron desde un 29%

(Biopsia 4) hasta un 100% (Biopsias 9 y 14) (tabla 4). También para cada uno de estos explantes (Biopsias 9, 10, 11, 12, 13 y 14) se calculó su TPC, con el fin de comparar el grado de inhibición celular encontrándose variaciones desde 19 $\text{mm}^2/\text{día}$ (Biopsia 12), hasta 62 $\text{mm}^2/\text{día}$ (Biopsia 9).

En los cultivos incubados en presencia de 0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de fármaco (Figura 4) es notable la variación que existe en la respuesta inhibitoria ante la acción de las distintas drogas, ya que en algunos casos (Biopsias 13 y 14) la inhibición fue muy alta y en otros (Biopsias 11 y 12) fue bastante más pequeña. También es importante mencionar las diferentes respuestas en inhibición celular que ofrecen cada una de los explantes a las 3 drogas empleadas, (principalmente en las biopsias 9, 10 y 12). En ésta concentración, Bleomicina fue un fármaco de alta efectividad ya que en todos los casos inhibió más del 50% la proliferación celular y en dos casos hasta 82 y 91% (Biopsias 9 y 13); por el contrario en algunos casos Cisplatino sólo llegó a inhibir un 40% (Biopsia 9) y Metotrexato un 32% (Biopsia 11). Cisplatino inhibió la proliferación celular en mayor porcentaje, en aquellos explantes que presentaron una TPC grande de 62, 44, 33 y 48 $\text{mm}^2/\text{día}$ (Biopsias 9, 10, 13 y 14) que en aquellos con TPC pequeña de 32 y 19 $\text{mm}^2/\text{día}$ (Biopsias 11 y 12).

Los explantes en donde se observó una mayor inhibición celular a los 3 fármacos empleados fueron aquellos que provenían de tiroides (Biopsias 13 y 14), en comparación con los que eran de tipo epidermoide y que presentaron una inhibición variable y menor para las 3 drogas usadas.

En el empleo de 1.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de cada uno de los agentes

antineoplásicos en los cultivos, es muy notable el gran aumento que hay en el porcentaje de inhibición celular (Figura 5) en comparación con dosis menores (Figura 4). Para esta concentración se ve claramente que sigue existiendo una diversidad de respuesta de inhibición celular ante la acción de un fármaco en diferentes explantes como de diferentes fármacos en explante individual. Es interesante observar que en aquellos explantes con TPC grande (Biopsias 9, 10, 13 y 14) la inhibición celular fue mayor que en aquellos explantes que presentaron una TPC pequeña (Biopsias 11 y 12) especialmente para los agentes antineoplásicos Cisplatino y Metotrexate.

Al incubar los cultivos en presencia de 10.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de agente anticanceroso (Figura 6), se observó que algunos explantes provenientes de las biopsias tumorales inhibieron su proliferación celular hasta en un 98% (Biopsias 9, 13 y 14) para algunos de los fármacos. En esta concentración aún se observa la diferencia en respuesta inhibitoria que existe entre los distintos tipos de biopsias tumorales y en cada biopsia particularmente, ante la acción de algunos de los fármacos. También se pudo observar que al emplear Cisplatino y Metotrexate la respuesta de inhibición celular fue mayor en los explantes que presentaron una TPC grande de 62, 44, 32, 33 y 48 $\text{mm}^2/\text{día}$ (Biopsias 9, 10, 11, 13 y 14) que en aquella que presentó una TPC de 19 $\text{mm}^2/\text{día}$ con un porcentaje de inhibición menor (Biopsia 12).

De los resultados obtenidos in vitro se logró establecer algunas relaciones con los datos clínicos del paciente (Tabla 6), como es el caso de la biopsia 14 que presentó in vivo un tamaño y

tiempo de evolución elevado y que in vitro dió una TPC alta de 48 mm²/día, así como las biopsias 12 y 13 que con un tiempo de evolución pequeño (en comparación con los otros casos) proporcionaron una TPC pequeña. No obstante es necesario hacer notar que no siempre los datos clínicos son todo lo confiables, ya que en la mayoría de los casos los pacientes suelen dar datos subjetivos, sobre todo en lo que respecta al tiempo de evolución.

DISCUSION

No obstante el importante desarrollo que han tenido los tratamientos para combatir el cáncer, se tiene en muchos de estos padecimientos una gran cantidad de fracasos, ya que la mayoría de los pacientes mueren finalmente después de pocos años de sobrevida.

Además de los tratamientos clásicos del cáncer como la cirugía y posteriormente la combinación de ésta con la radioterapia, la quimioterapia tiene también una gran aplicación hoy en día, y recientemente son aplicadas la inmunoterapia, la hipertermia y la inmunosupresión por radiación (estas tres últimas aún en fases de experimentación). La quimioterapia presenta la gran ventaja sobre la mayoría de los otros tratamientos, de que al ser suministrada a un paciente actúa en todo el organismo. Esta característica es de gran utilidad principalmente en aquellos tumores que pueden estar diseminados.

Por otro lado, actualmente el tratamiento que se da a un paciente enfermo de cáncer, es aquel al cual han respondido estadísticamente la mayoría de personas enfermas con un semejante tipo de padecimiento. Sin embargo, aquellos pacientes que no forman parte de esa mayoría reciben de todas formas este tratamiento promedio, el cual evidentemente no siempre es el más adecuado para ellos, con la consecuencia de una menor posibilidad de curación. De ahí la necesidad e importancia de establecer un tratamiento individual, según las necesidades de cada paciente para que se le proporcione un tiempo mayor de supervivencia y sobre todo una mejor calidad de vida. A pesar de varios intentos

para predecir in vitro el tipo de fármacos idóneos para el tratamiento de un tumor individual, hoy en día se ha tenido poco éxito al respecto.

Mientras en varios tipos de tumores se han obtenido éxitos mediante la aplicación de los protocolos terapéuticos establecidos, existen otros como son los tumores de cabeza y cuello que presentan una alta resistencia a ser tratados por este tipo de técnica. En consecuencia, se consideró en este trabajo el estudiar éste tipo de tumores con la finalidad doble de diseñar una técnica in vitro para la proyección de quimiosensibilidad, así como para estudiar la posibilidad de dar mayores oportunidades a este tipo de pacientes mediante el suministro de diversos fármacos antineoplásicos. En nuestro trabajo al cultivar explantes primarios de diferentes tumores de cabeza y cuello en medios líquidos, obtuvimos un 100% de eficiencia de proliferación celular, lo cual nos indica que existe un buen punto de partida para desarrollar una técnica que indique, a que fármaco, o fármacos los tumores son más sensibles. Este tipo de cultivo en consecuencia, ofrece gran ventaja sobre la técnica más comúnmente empleada en quimiosensibilidad (el ensayo clonogénico), la cual utiliza agar blando como sustrato de cultivo (73,74), pero los cultivos en agar han mostrado una baja eficiencia de proliferación celular alrededor de 36% (81), lo cual deja una gran cantidad de tumores sin evaluación.

Por otro lado, la gran ventaja de los cultivos en medios semi-sólidos, es la de permitir en la mayoría de las ocasiones la proliferación exclusiva de células malignas, mientras que en cultivos en medios líquidos proliferan tanto las células malignas

como las normales. Esta propiedad del agar ha permitido que este ensayo sea actualmente utilizado para determinar si una línea celular conserva sus propiedades de malignidad. Por desgracia, esta propiedad no es general ya que no todas las células malignas han proliferado en agar, mientras que por otro lado algunas normales sí, pero existen hoy en día, factores capaces de inducir a una célula normal a proliferar en estos medios. Se podría en consecuencia suponer que el cultivo en medios líquidos por nosotros empleado, tiene la desventaja de permitir la proliferación de células normales escondiendo el efecto en las tumorales, pero por observación directa y consideraciones morfológicas se ha podido diferenciarlas entre sí, y evaluar, por lo tanto, exclusivamente el efecto del fármaco sobre las células tumorales. Esta labor de reconocimiento se facilita por el hecho de que en los cultivos con carcinomas, por nosotros empleado, la proliferación de células normales es de tipo fibroblástico, que presentan diferencias morfológicas fácilmente reconocibles al momento de la evaluación, de las células típicamente epiteliales provenientes del tumor. Consideramos que algo semejante ocurrirá cuando se coloque sarcomas en medios líquidos, para una evaluación de la quimiosensibilidad. Es evidente que para estos casos, las células que no se tomarían en cuenta serían las de tipo epitelial.

Un problema importante asociado tanto a la técnica en medios líquidos como en semi-sólidos consiste en que en muchos casos se dispone de muy poco tejido tumoral y en consecuencia son pocos los fármacos que pueden ser evaluados in vitro. Es evidente que técnicas de micro-ensayo deben ser desarrolladas para que éste

tipo de ensayo tenga una aplicación mas general.

Es conveniente mencionar que este problema de falta de tejido tumoral no existe cuando se utilizan líneas celulares previamente establecidas, como células blanco. Por tanto en el pasado, se han realizado pruebas de quimiosensibilizada en medios líquidos mediante la utilización de líneas celulares provenientes de diversos tumores. Creemos que las alteraciones que adquieren las células al ser cultivadas por largos períodos de tiempo, las hacen diferentes a las originales obteniendose en consecuencia, resultados poco representativos (83,84). En nuestros cultivos al utilizar explantes primarios para dichas pruebas, estamos trabajando con células en condiciones menos alteradas y probablemente mas cercanas a las que se presentan in vivo. Cabe mencionar que otra de las ventajas de la utilización de explantes primarios respecto al uso de líneas celulares y cultivos clonogénicos en agar, es la ausencia de un tratamiento de disgregación enzimática que pueda dañar y alterar a las células en estudio (86).

En general, obtuvimos que los explantes de los 14 tumores estudiados respondieron en forma diferente in vitro a ser inhibidos por los fármacos empleados. Esta variabilidad puede ser de una gran utilidad para determinar, en conjunto con el clínico, el protocolo terapéutico a ser utilizado con mayores posibilidades de éxito. Creemos que la respuesta tan variada obtenida en nuestros ensayos puede reflejar el hecho de que cada tipo de tumor proviene de células transformadas en diferentes grados de diferenciación.

Como las células provenientes de las biopsias tumorales tenían

diferentes propiedades de proliferación in vitro empleaban diferentes tiempos en saturar el sustrato de cultivo. Si a esto aunamos el hecho de que algunas proliferaron tan lento que les fue difícil alcanzar la saturación y de que algunos cultivos se contaminaron y tuvieron que ser suspendidos antes de alcanzar su saturación, nos obligó a utilizar un valor comparativo. Consideramos que la tasa de proliferación celular (TPC) definida como el área cubierta por el cultivo entre el número de días que tardó en cubrirle, nos permitiría el comparar nuestros resultados en una base común. Sin embargo, pueden existir los problemas asociados del tamaño celular y tiempos de latencia que obstaculicen la validez de las TPC, no obstante, creemos que esta cantidad es nuestro mejor compromiso y recomendaríamos el tratar de evitar las contaminaciones para poder llegar a tener resultados más uniformes.

Aunque con fines comparativos se obtuvieron los datos clínicos de edad, sexo, tamaño del tumor y su tiempo de evolución no se encontró en general ninguna relación con los datos de TPC obtenidos in vitro. Hay que tomar en cuenta que fueron muy pocos los casos estudiados como para aspirar a un estudio comparativo y es evidente que un número mayor de casos tendrá que ser estudiado con esta finalidad. Sin embargo, vale la pena mencionar que se obtuvo una correlación muy directa entre la TPC y el tiempo de evolución para dos de los tumores estudiados. En un caso tuvimos una TPC de $159 \text{ mm}^2/\text{día}$ (la más grande de todas) para el tumor con el mayor tamaño y el menor tiempo de evolución (2 meses), lo cual indica que tanto in vivo como in vitro las células tumorales proliferan muy rápidamente. En el 2o. caso se encontró la

situación opuesta en la cual el tumor con el mayor tiempo de evolución (132 meses) presentó una de las TPC más bajas de $16 \text{ mm}^2/\text{día}$, lo cual asimismo indica que las células tumorales que proliferan lentamente in vivo también lo hacen in vitro. Aunque la correlación entre tiempo de evolución y TPC no se presentó en todos los casos estudiados, pensamos que puede estar relacionado con el hecho de que en nuestro medio y sobre todo en los pacientes que asisten a sistemas hospitalarios asistenciales, el dato de tiempo de evolución que proporcionar es algo subjetivo y por lo tanto no muy confiable. Se recomendaría en consecuencia el hacer un mayor esfuerzo en la recopilación de datos clínicos para que en un futuro podamos establecer si existe correlación entre estas propiedades.

Al emplear en nuestro experimento Metotrexate, se produjo un gran porcentaje de inhibición celular en explantes de algunas biopsias tumorales que presentaron una alta TPC. Este resultado era de esperarse pues si una biopsia tumoral en cultivo prolifera rápidamente sería más susceptible a la acción de un fármaco citotóxico, ya que al estar en contacto con la droga durante un mayor número de divisiones celulares, su ciclo celular se vería afectado y por lo tanto se inhibiría su proliferación. Sin embargo, Cisplatino actuó produciendo mayor porcentaje de inhibición celular tanto en explantes que presentaron TPC alta como pequeña, lo cual indica que la inhibición de la proliferación celular por este fármaco no sólo depende de la rapidez con que prolifera un explante, sino del sitio de acción del fármaco dentro del ciclo celular. Se puede agregar, que en nuestros ensayos toda respuesta inhibitoria variaba en función del

tejido tumoral de cada paciente y no del tipo de tumor de que se trataba, ya que dos tumores de un mismo tipo histológico pero de diferente paciente, presentan diferentes respuestas ante los agentes antineoplásicos y además no presentaron características morfológicas semejantes al ser cultivadas in vitro.

Bleomicina por su parte fue el fármaco con mayor porcentaje de inhibición a la proliferación celular en biopsias con TPC pequeñas, lo que puede significar que Bleomicina actuó más efectivamente en el ciclo celular, cuando éste presenta grandes intervalos entre cada una de sus fases.

Es evidente que si llegara a existir una correlación entre la respuesta de sensibilidad a los fármacos in vivo con la detectada por nosotros in vitro, se podría recomendar a pacientes con TPC pequeña la utilización de Bleomicina como para aquellos con TPC alta la aplicación de Metotrexate. Asimismo, en los casos en los cuales Cisplatino resultó ser mayor inhibidor su utilización sería recomendable y no en aquellos casos en los cuales el mismo fármaco resultó ser poco efectivo.

No hay que perder de vista que aparte de la elección del fármaco con mayor poder inhibidor se debe tomar en consideración el grado de toxicidad de éste, aunque in vitro se encuentre que un fármaco o combinación de ellos resulte tener la mayor capacidad inhibidora si su toxicidad in vivo es muy elevada perdería su valor terapéutico. En consecuencia, creemos recomendable para la continuación de este trabajo el que se realicen estudios in vitro sobre toxicidad, mediante ensayos de quimiosensibilidad utilizando células de médula ósea y epiteliales normales.

Como se ha mencionado, un mayor número de casos tendra que ser analizado para generalizar la posible aplicación de cultivos en medio líquido de explantes provenientes de tumores de cavidad oral y orofaríngea o de cualquier otro tipo, para fines de predicción a la quimiosensibilidad, sin embargo consideramos que los datos aquí presentados nos dan esperanzas de que este sea el caso.

TABLA 2.

AGENTES ANTINEOPLASICOS EMPLEADOS EN CADA BIOPSIA TUMORAL CULTIVADA

No. de Biopsia	Tipo de Explantes	Agentes antineoplasicos
1	Tumor Mucoepidermoide	Bleomicina, Cisplatino, 5-Fluoruracilo
2	Ca. Adenoideo Escamoso	Bleomicina, 5-Fluoruracilo, Metotrexate
3	Ca. Adenoideo Quistico	Bleomicina, Cisplatino, 5-Fluoruracilo, Metotrexate
4	Tumor Mixto Maligno	Actinomicina, Bleomicina, Cisplatino, Metotrexate, Minblastina
5	Melanoma de Cavidad Oral	Actinomicina, Cisplatino, Mitomicina C
6	Ca. Epidermoide Bien Dif.	Bleomicina, Cisplatino, Metotrexate, Vincristina
7	Ca. Epidermoide Bien Dif.	Cisplatino, Metotrexate
8	Ca. Epidermoide Bien Dif.	Cisplatino, Metotrexate

TABLA 3.

CARACTERÍSTICAS DE PROLIFERACION IN VITRO DE LAS BIOPSIAS TUMORALES CULTIVADAS

No. de Biopsia	Tipo de Explantes	Área de Proliferación Celular* (mm ²)	Porcentaje de Proliferación Celular* (%)	Tiempo de Cultivo (días)	TPC** (mm ² /día)
1	Tumor Mucoepidermoide	241	19	15	16
2	Ca Adenoideo Escamoso	403	31	11	34
3	Ca Adenoideo Quístico	220	17	18	12
4	Tumor Mixto Maligno	177	14	13	14
5	Melanoma de Cavidad Oral	790	61	5	158
6	Ca Epidermoide Bien Dif.	1176	91	11	107
7	Ca Epidermoide Bien Dif.	130	10	17	12
8	Ca Epidermoide Bien Dif.	169	13	6	28

* cultivos que no contenían fármaco (controles)

** TPC: tasa de proliferación celular

TABLA 4.

DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES DE DONDE SE OBTUVO LA BIOPSIA TUMORAL

No. de Biopsia	Tipo de Explantes	Edad (años)	Sexo	Tamaño del Tumor (cm)	Tiempo de Evolución* (meses)
1	Tumor Mucopidermoide	73	femenino	5.0 x 5.0	132
2	Ca Adenoideo Escamoso	46	masculino	3.0 x 2.0	2
3	Ca Adenoideo Quistico	45	masculino	2.0 x 3.0	6
4	Tumor Mixto Maligno	72	masculino	4.0 x 5.0	8
5	Melanoma de Cavidad Oval	52	femenino	7.0 x 8.0	2
6	Ca Epidermoide Bien Dif.	66	masculino	3.0 x 4.0	4
7	Ca Epidermoide Bien Dif.	75	masculino	3.0 x 4.0	2
8	Ca Epidermoide Bien Dif.	59	masculino	3.0 x 2.5	3

* de la masa tumoral

TABLA 5.

CARACTERISTICAS DE PROLIFERACION IN VITRO DE LAS BIOPSIAS TUMORALES CULTIVADAS

No. de Biopsia	Tipo de Explantes	Area de Proliferación Celular* (cm ²)	Porcentaje de Proliferación Celular* (%)	Tiempo de Cultivo (días)	TPC** (n ^o /día)
9	Ca Epidermoide de Lengua	1300	100	21	62
10	Ca Epidermoide de Lengua	567	44	13	44
11	Ca Epidermoide de Lengua	443	34	14	32
12	Ca Epidermoide de Boca	374	29	20	19
13	Ca Folicular de Tiroides	994	77	30	33
14	Ca Papilar de Tiroides	1300	100	27	48

* cultivos que no contenían fármaco (controles)

** TPC: tasa de proliferación celular

TABLA 6.

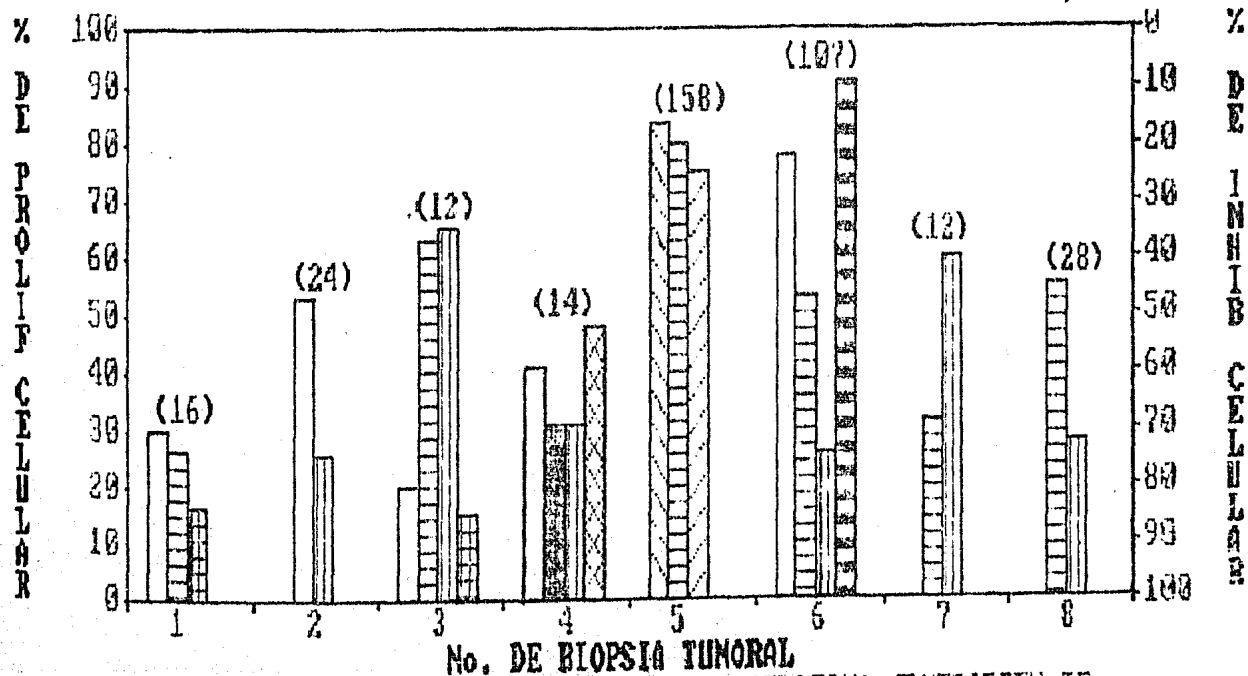
DATOS CLINICOS DE LOS PACIENTES DE DONDE SE OBTUVO LA BIOPSIA TUMORAL

No. de Biopsia	Tipo de Explanas	Edad (años)	Sexo	Tamaño del tumor (cm)	Tiempo de Evolución* (meses)
9	Ca Epidermoide de Lengua	72	masculino	3.0 x 2.0	12
10	Ca Epidermoide de Lengua	56	Femenino	4.5 x 2.0	7
11	Ca Epidermoide de Lengua	42	Femenino	5.0 x 4.5	11
12	Ca Epidermoide de Boca	60	Femenino	5.0 x 3.0	6
13	Ca Folicular de Tiroides	45	Femenino	1.5 x 2.0	5
14	Ca Papilar de Tiroides	49	Femenino	6.0 x 6.0	60

* de la masa tumoral

FIGURA 1.

EFFECTO DE AGENTES ANTINEOPLASICOS EN DIFERENTES BIOPSIAS CULTIVADAS IN VITRO (0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

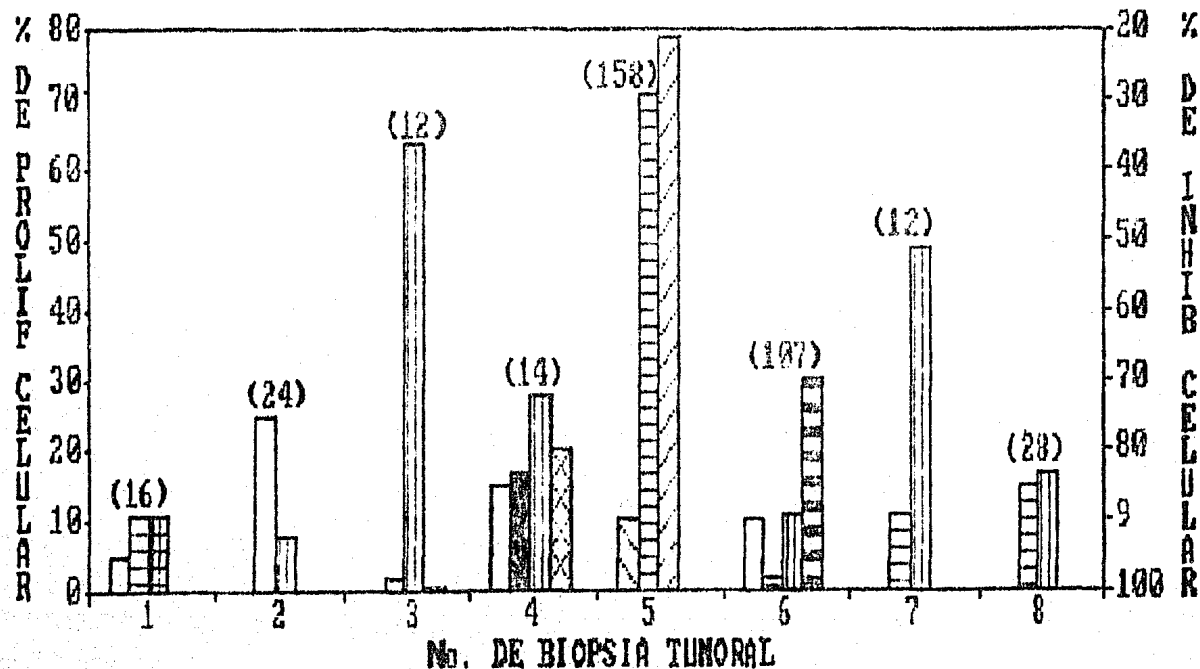


□ ACINOMICINA ■ ADRIAMICINA □ BLEOMICINA □ CISPLATINO □ MEITREXATE
 □ 5-FLUORURACILO □ NITOMICINA □ VINBLASTINA □ VINCRISTINA

() TPC: Tasa de Proliferación Celular

FIGURA 2.

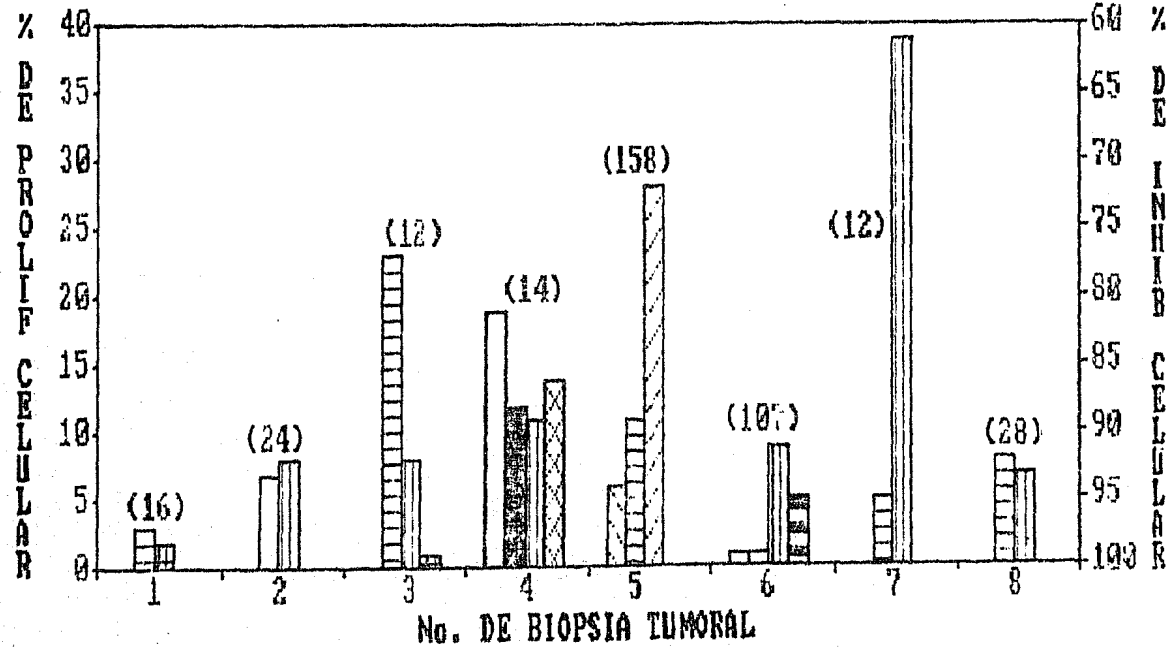
EFFECTO DE AGENTES ANTINEOPLASICOS EN DIFERENTES BIOPSIAS CULTIVADAS *IN VITRO* (1.0 µg/ML).



1 ACINOMICINA 2 ADRIAMICINA 3 BLEOMICINA 4 CISPLATINO 5 METOTREXATE
 6 5-FLUORURACILO 7 MITOMICINA 8 VINBLASTINA 9 VINCRISTINA
 () TPC: Tasa de Proliferación Celular

FIGURA 3.

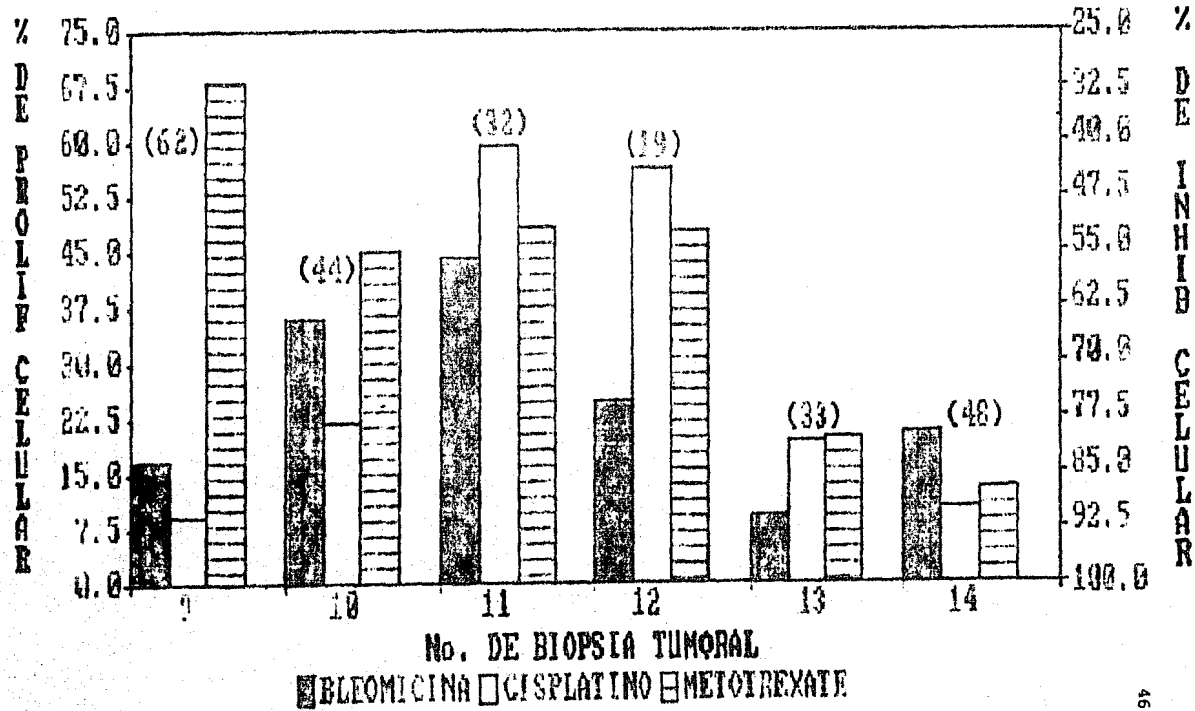
EFFECTO DE AGENTES ANTINEOPLASICOS EN DIFERENTES BIOPSIAS CULTIVADAS *IN VITRO* (10.0 µg/ML).



□ ACIINONICINA ■ ADRIAMICINA □ BLEOMICINA □ CISPLATINO □ METOTREXATE
 □ 5-FLUORURACILO □ MITOMICINA □ VINBLASTINA □ VINCRISTINA
 () IPC: Tasa de Proliferación Celular

FIGURA 4.

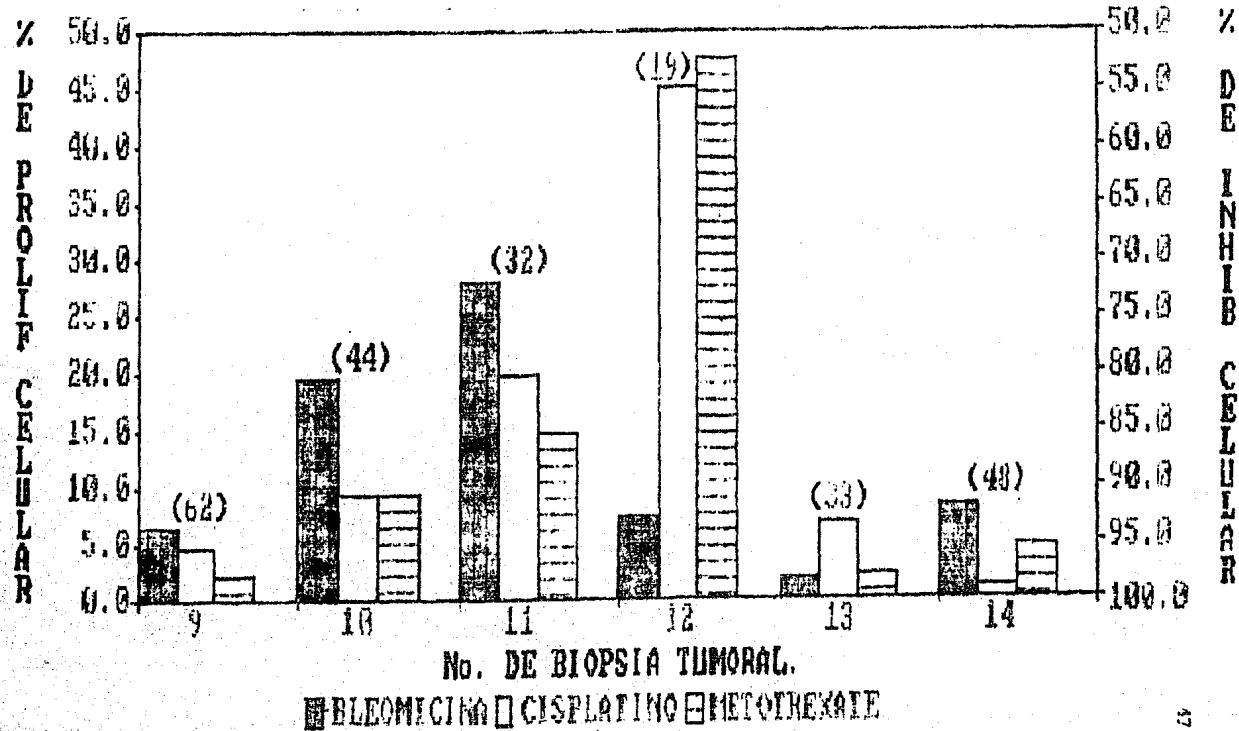
EFFECTO DE AGENTES ANTINEOPLASICOS EN DIFERENTES BIOPSIAS CULTIVADAS IN VITRO (0.1 µg/ML).



() IPC: tasa de Proliferación Celular.

FIGURA 5.

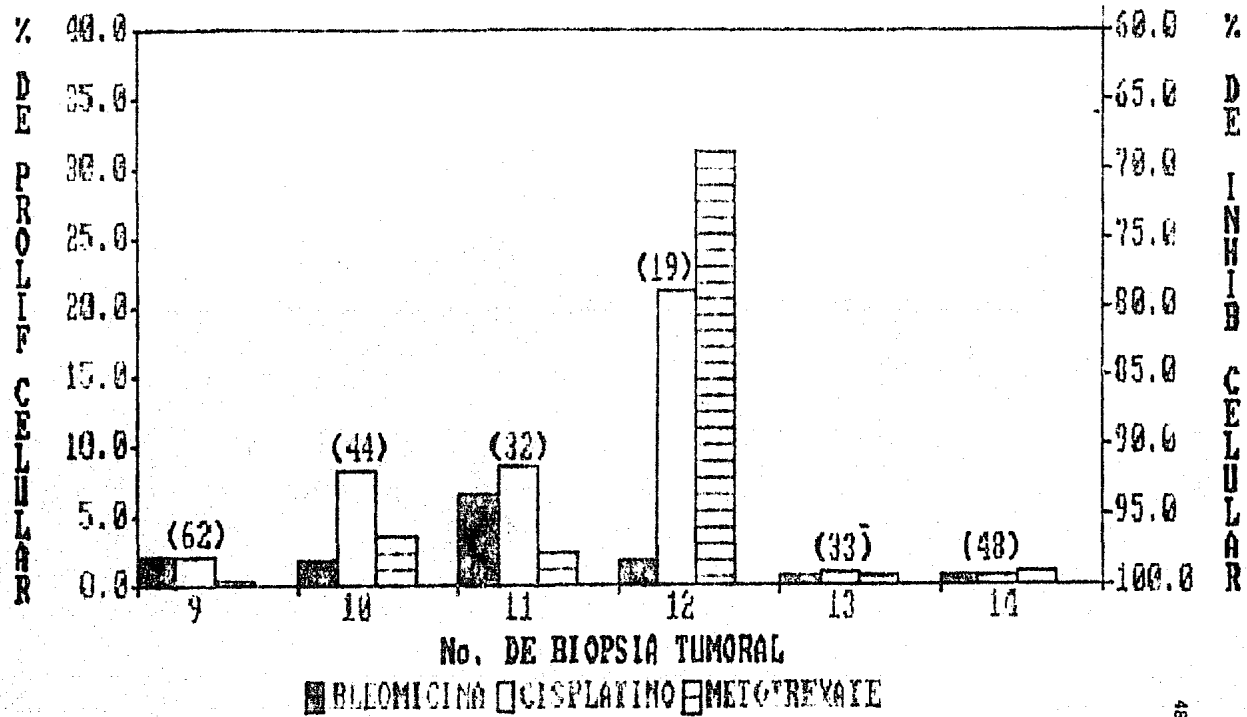
EFFECTO DE AGENTES ANTINEOPLASICOS EN DIFERENTES BIOPSIAS CULTIVADAS *IN VITRO* (1.0 µg/ML).



() TPC: Tasa de Proliferación Celular.

FIGURA 6.

EFFECTO DE AGENTES ANTINEOPLASICOS EN DIFERENTES BIOPSIAS CULTIVADAS IN VITRO (10.0 µG/ML).



() TPC: Tasa de Proliferación Celular.

APENDICE I

Composición del Medio de Eagle (EM)

Sustancia	Cantidad (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-licina.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 disódica)	104.2
L-valina	94.0
D-Ca Pentotenato	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
Glucosa	4500.0
Cloruro de Sodio	6400.0
Cloruro de Potasio	400.0
Cloruro de Calcio Anhidro	200.0
Nitrato de hierro III Nonhidratado	0.1
Sulfato de Magnesio Anhidro	97.67
Fosfato Monosódico Monohidratado	125.0
Rojo Fenol	15.0

Preparación del Medio de Eagle:

Medir un volumen de agua bidestilada 5% menor al volumen de medio total deseado, utilizando para ello 2 matraces. Adicionar 134 g/l del medio de Eagle en polvo (Gibco Lab, USA) agitándose suavemente, posteriormente se agregan 3.7 g de bicarbonato de sodio, 100 U/ml de penicilina G y 100 g/ml de estreptomina. Completar el volumen deseado con agua bidestilada y ajustar el pH entre 0.2 y 0.3 menos del que se desea, que es de 7.2 (esto se hace con ácido clorhídrico) y se esteriliza por filtración con dióxido de carbono, pasándolo a través de una membrana con poro de 0.22 μ .

APENDICE II

Preparación de Solución Amortiguadora de Fosfatos (PBS del inglés Phosphate Buffered Solution).

-PBS sin calcio y sin magnesio.

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

Cloruro de sodio	8.00 g
Fosfato de sodio monobásico	2.16 g
Fosfato de potasio monobásico	0.20 g
Cloruro de potasio	0.20 g

Una vez disueltas las sustancias, se ajusta el pH a 7,2 con ácido clorhídrico y se esteriliza la solución por medio de autoclave (20 minutos a 20 libras de presión).

APENDICE III

Preparación de Fármaco a Diferentes Concentraciones.

- 1.- Disolver 1.0 mg de fármaco en 1 ml de EM.
 - 2.- Diluir 10 veces una porción de la solución anterior en EM.
 - 3.- Repetir el paso 2, con otra porción de la solución anterior.
 - 4.- Repetir el paso 2, con otra porción de la solución anterior.
- El volumen de las soluciones 2,3 y 4 se encuentran a 100.0, 10.0 y 1.0 µg/ml respectivamente. Una vez que cada una de estas soluciones se diluyen 10 veces al ser agregadas al medio de cultivo se obtienen las concentraciones deseadas de 10.0, 1.0 y 0.1 µg/ml.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. 1983. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing, Inc. New York & London, USA. 1146 pp.
- 2.- De Vits VT, Hellman S, Rosenberg SA. 1982. *Cancer. Principles E Practice of Oncology*. JB Lippincott Company. USA. 1926 pp.
- 3.- Willis RA. 1952. *The Spread of Tumors in the Human Body*. London Butterworth & Co.
- 4.- Hood LE, Weissman IL, Wood WB, Wilson JH. 1984. *Immunology*. 2a ed. The Benjamin/Cummings Publishing Co., INC. USA. 558 pp.
- 5.- Rather LJ. 1978. *The Genesis of Cancer*. The Johns Hopkins University Press, USA. 262 pp.
- 6.- Calman KC, Paul J. 1978. *An Introduction to Cancer Medicine*. The Macmillan Press LTD. Hong Kong. 200 pp.
- 7.- Robbins SL. 1975. *Patología Estructural y Funcional*. Interamericana. México. 1516 pp.
- 8.- Pitot HC. 1978. *Fundamentals of Oncology*. Marcel Dekker. New York. 200 pp.
- 9.- Farber EE. 1973. *Cellular-Carcinogenesis Evolution as a Unifying Thread*: Presidential Address. *Cancer Res* 33:2537-2550.
- 10.- Bodley SR. 1979. *Cancer. The Facts*. Oxford University Press. Great Britain 208 pp.
- 11.- Grieve O, Day N, Muir C. 1973. *Aetiological Clues from Epidemiology*. En *Modern Trends in Oncology-I*. Butterworths. Part I. Research Progress. Londres. 29 pp.
- 12.- Williams J. 1976. *Virus-Cell Relationships: Oncogenic DNA Viruses*. En: *Scientific Foundations of Oncology*. Ed for Symington T, Carter R, Heinemann W. Medical Books LTD. Londres 345 pp.
- 13.- Weisburger J. 1973. *Chemical Carcinogenesis*. En: *Cancer Medicine*. Ed for Holland J Frei III E, Lea Febiger. Filadelfia 45 pp.
- 14.- Regelson W, Kim U, Qspina J, Holland J. 1968. *Hamangi endothelial Sarcoma of Liver from Chronic Arsenic Intoxication by Fowler s Solution*. *Cancer* 21:514-521.
- 15.- Estape J, Nomdeleu R, Mills A. 1975. *Aspectos Actuales de la Quimioterapia Antineoplásica*. *Medicina* 7:619-625.

- 16.- Cook J, Haslewood G, Hewett C, Hieger I, Kennaway E, Mayneord W. 1937. Chemical Compounds as Carcinogenic Agents. *Amer J Cancer* 29:219-223.
- 17.- Estape RJ. 1977. *Oncología Médica*. Ed Marín. España. 225 pp.
- 18.- Enomoto M, Salto M. 1972. Carcinogens Produced by Fungi. *Ann Rev Microbiol* 26:279-281.
- 19.- Leading A. 1969. Saccharin in the Balance. *British Med Jour* 3:185-186.
- 20.- Hueper W. 1954. Recent Developments in Environmental Cancer. *Arch Path* 58:360-363.
- 21.- Evans R. 1966. The Effects of Skeletally Deposited Alpha-Ray Emitters in Man. *Brit J Radiol* 39:881-884.
- 22.- Belfand M, Weinberg R, Castle W. 1967. Relation Between Carcinoma of the Bladder and Infestation With Schistosoma haematobium. *Lancet* I: 1249.
- 23.- Renstern B, Smulow JB, Glickman I. 1962. Effect Of Chronic Mechanical Irritation of Chemically, Induced Carcinogenesis in the Hamster Cheekpouch. *Jour of the Am Dental Assoc* 64:770-777.
- 24.- Deckors C, Maisin J. 1961. Le Cancer de la Langue. *Journal de Radiologic et d Electrologic* 42:655-665.
- 25.- Bertino JR, Mosher MB, DeConti RC. 1973. Chemotherapy of Cancer of the Head and Neck. *Cancer* 31:1141-1149.
- 26.- Clarysse A, Kenis Y, Mathe G. 1976. *Cancer Chemotherapy, Its Role in the Treatment Strategy of Hematologic Malignancies and Solid Tumors*. Springer-Verlag, Germany. 366 pp.
- 27.- Totten RS. 1971. Tumors of the Oral Cavity, Pharynx and Larynx. *J Amer Med Ass* 215:454-457.
- 28.- Ohnuma T, Holland JF, Sako K, Shedd DP. 1972. Effects of Combination Therapy With Bleomycin (NSC-125066) and Dibromodulcitol (NSC-104800) on Squamous Cell Carcinoma in Man. *Cancer Chemother Rep* 56:625-629.
- 29.- Mathe G. 1971. Active Immunotherapy. *Advanc Cancer Res*. 14:1-4.
- 30.- Francis LM. 1983. Structure and Biological Malignancy of Tumors. In Gerattini S, Frenchi G (eds): *Treatment of Cancer Dissemination and Metastasis*. New York, Raven Press. 71 pp.
- 31.- Marshall EK Jr. 1964. Historical Perspectives in Chemotherapy. In Goldin A, Hawking IF eds. *Advances in Chemotherapy*. Academic Press. New York. Vol 1, pp 1-8.

- 32.- Lissauer, M. 1865. In Bendorff: Zwei Falle von Leukemia. Berl Klin Wschr 40:403-404.
- 33.- Dustin AP. 1934. Contribution a l'Étude de l'Action des Poisons Caryoclasiques sur les Tumeurs Animales. Action de la Colchicine sur le Sarcome Greffe, Type Crocker, de la Souris. Bull Acad Roy Med Belg 14:487-490.
- 34.- Lits F. 1934. Contribution a l'Étude des Réactions Cellulaires Provoquées par la Colchicine. C R Soc Biol (Paris) 115:1421-1425.
- 35.- Huggins C, Hodges CV. 1941. Studies on Prostatic Cancer I. The Effect of Castration, of Estrogen and of Androgen Injection on Serum Phosphatases in Metastatic Carcinoma of the Prostate. Cancer Res 1:293-299.
- 36.- Loeser AA. 1939. Male Hormone in the Treatment of Cancer of the Breast. Acta UICC 4:375-379.
- 37.- Waksmen SA, Woodruff HB. 1940. Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produced by a Soil Actinomyces. Proc Soc Exp Biol (New York) 45: 609-613.
- 38.- Gilman A. 1973. The Initial Clinical Trial of Nitrogen Mustard. Amer J Surg. 105:574-580.
- 39.- Beer CT. 1955. The Leucopenic Action of Extracts of Vincorosea. British Empire Cancer Campaign, 33rd Annual Report 487 pp.
- 40.- Skipper HE, Schabel Jr FM, Wilcox WS. 1964. Experimental Evaluation of Potential Anticancer Agents XIII. On the Criteria and Kinetics Associated With 'Curability' of Experimental Leukemia. Cancer Chemother Rep 35:1-16.
- 41.- Carter SK, Soper WT. 1974. Integration of Chemotherapy into Combined Modality Treatment of Solid Tumor I. Overall Strategy. Cancer Treat Rev 1:1-7.
- 42.- Tai H, Smith T, Sharp P, Vinograd J. 1972. Sequence Heterogeneity in Closed S V DNA. J Virology 9:317-320.
- 43.- Tattersall MHN. 1978. Pharmacokinetics of Melphalan Following Oral or Intravenous Administration in Patients With Malignant Disease. Eur J Cancer 14:507-513.
- 44.- Murphy WM, Soloway MS. 1980. The Effect of Thiotaps on Developing and Established Mammalian Bladder Tumors. Cancer 45:870-875.
- 45.- Vodopick H. 1969. Metabolic Fate of Tritiated Busulfan in Man. J Lab Clin Med 73:266-276.

- 46.- Knob MKT, Fischer DS, Welch-McCafferey D. 1984. Cancer Chemotherapy, Treatment and Care. 2nd. ed, GK Hall Medical Publishers. Boston. 343 pp.
- 47.- Vogl SE, Kaplan BH. 1979. Chemotherapy of Advanced Head and Neck Cancer With Methotrexate, Bleomycin and Cis-Diamminedichloroplatinum II in an Effective out Patient Schedule. Cancer 44:26-31.
- 48.- Soloway MS, Einstein A, Corder MP, Bonney W, Prout GR, Coombs J. 1983. A Comparison of Cisplatin and the Combination of Cisplatin and Cyclophosphamide in Advanced Urothelial Cancer. Cancer 52:767-772.
- 49.- Arquilla M, Thompson LM, Pearlman LF, Simpkins H. 1983. Effect of Platinum Antitumor Agents on DNA and RNA Investigated by Terbium Fluorescence. Cancer Res 43:1211-1216.
- 50.- Balis FM, Savitch JL, Bleyer WA. 1983. Pharmacokinetics of Oral Methotrexate in Children. Cancer Res 43:2342-2345.
- 51.- Frei E, Rosowsky A, Wright JE, Cocchi CA, Lippke JA, Ervin TJ, Jolivet J, Haseltine WA. 1984. Development of Methotrexate Resistance in a Human Squamous Cell Carcinoma of The Head and Neck in Culture. Proc Natl Acad Sci USA 81:2873-2877.
- 52.- Plasse TF, Ohnuma T, Brooks S, Sapanaro E, Molland J, Biller H. 1984. Bleomycin Infusion Followed by Cyclophosphamide, Methotrexate and 5-Fluorouracil in Advanced Squamous Carcinoma of the Head and Neck. Cancer 53:841-843.
- 53.- Lokiec F, Clavel B, Means L, Turpin F, Goupil A, Tubiana-Hulin M, Gest J. 1984. Cancer Treatment by Methotrexate: Rational Use Following Pharmacokinetic Study. Int J Nucl Med Biol 11:107-108.
- 54.- Kobayashi S, Hoshino T. 1983. Combined Cytotoxic Effect of Low-Dose, 5-Fluorouracil and Hydroxyurea on 9L Cells In Vitro. Cancer Res 43:5309-5313.
- 55.- Israel L, Breau J, Aguilera J. 1984. High-Dose Cyclophosphamide and High-Dose 5-Fluorouracil. A New First-Line Regimen for Advanced Breast Cancer. Cancer 53:1655-1659.
- 56.- Selman T, Waksman A. 1974. Conference on Actinomycins. Their Potential for Cancer Chemotherapy. Cancer Chemother Rep 58:11-121.
- 57.- Ludwig CU, Peng YM, Baudry JN, Salmon SE. 1984. Cytotoxicity of Mitomycin C on Clonogenic Human Carcinoma Cells is not Enhanced by Hypoxia. Cancer Chemother Pharmacol 12:146-150.
- 58.- Vermeer RJ, Pinedo HM. 1979. Partial Remission of Advanced

- Adenoid Cystic Carcinoma Obtained With Adriamycin. *Cancer* 43:1604-1606.
- 59.- Umezawa H, Maeda K, Takenchi T, Okami Y. 1966. New Antibiotics, Bleomycin A and B. *J Antibiot (Tokyo) Ser A* 19:200-209.
- 60.- Wennerberg J. 1984. Bleomycin Induced Changes in Growth and Cell Kinetics of a Heterotransplanted Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. *Anticancer Res* 4:419-424.
- 61.- Mersch W, Garretson A, Wesel E. 1960. Streptomigrin- An Antitumour Agent Produced by Strains of *Streptomyces Flocculus*. *Proc Amer Ass Cancer Res* 31:131-133.
- 62.- Johnson IS. 1960. Antitumor Principles Derived From Vinca rosea Linn. I Vincalencoblastine and Leurosine. *Cancer Res.* 20:1016-1022.
- 63.- Szpirglas H, Harneur M, Vaillant JM. 1965. La Vindesine Dans Les Cancers Stomatologiques. *La Presse Medicale* 14:405-407.
- 64.- Owellen R. 1971. Pharmacokinetics of Vincristine and Vindesine in Humans. *Cancer Res* 37:2603-2607.
- 65.- Henry MC, Marlow M. 1973. Preclinical Toxicologic Study of Procarbazine (NSC-77213). *Cancer Chemother Rep* 4:97-102.
- 66.- Cotte RCA, Essenfeld YE, Calvo LA. 1969. Cultivo de Tejidos y Cancer. Ed Científico Médica. España. 69 pp.
- 67.- Roux W. 1973. Beitrage zur Entwicklngsmechanik des Embrio, en Cell and Tissue Culture. eds Paul J. Ed Churchill, 4a ed Livingstone, London England. 2-4 pp.
- 68.- Carrel A. 1913. Artificial Activation of the Growth In Vitro of Connective Tissue. *J Exp Med* 17:14-19.
- 69.- Carrel A, Baker LE. 1926. The Chemical Nature of Substances Required for Cell Multiplication. *J Exp Med* 44:503-521.
- 70.- Fisher A. 1926. Transformation des Cellules Normales an Cellules Malignes. In Vitro *CR Soc Biol* 94:1217-1218.
- 71.- Earle WR. 1948. Tissue Culture in Laboratory Technique in Biology and Medicines. Ed Coedny Williams and Wilkins. Baltimore Maryland. 250 pp.
- 72.- Adams RLP. 1980. Cell Culture for Biochemists. Ed Elsevier North-Holland Biomedical Press. Netherlands. 291 pp.
- 73.- Hamburger AW, Salmon SE. 1977. Primary Bioassay of Human Tumor Stem Cells. *Science* 197:461-463.

- 74.- Hamburger AW, Salmon SE, Kim MB, Trent JM, Soehnlen B, Alberts DS, Schmidt HJ. 1978. Direct Cloning of Human Ovarian Carcinoma Cells in Agar. *Cancer Res* 38:3438-3443.
- 75.- Hamburger AW, White CP, Tencer K. 1981. Effect of Enzymatic Disaggregation on Proliferation of Human Tumor Cells in Soft Agar. *J Natl Cancer Inst* 68:945-948.
- 76.- Salmon SE, Hamburger AW, Soehnlen B, Durie BGM, Alberts DS, Moon TE. 1978. Quantitation of Differential Sensitivity of Human Tumor Stem Cells to Anticancer Drugs. *N Engl J Med*. 298:1321-1327.
- 77.- Salmon SE. 1980. Application of the Human Tumor Stem Cell Assay in the Development of Anticancer Therapy. *Int Burchenal JH, Dettgen HF eds. Cancer Achievements Challenges and Prospects for the 1980 s.* Ed Grune & Stratton. New York 33 pp.
- 78.- Salmon SE, Alberts DS, Meyskens FL, Durie BGM, Jones SE, Soehnlen B, Young L, Chen HSG, Moon TE. 1980. Clinical Correlations of In Vitro Drug Sensitivity. In: Salmon SE ed. *Cloning of Human Tumor Stem Cells.* Liss, New York. 223 pp.
- 79.- Salmon SE, Meyskens FL, Alberts DS, Soehnlen B, Young L. 1981. New Drugs in Ovarian Cancer and Malignant Melanoma: In Vitro Phase II Screening With the Human Tumor Stem Cell Assay. *Cancer Treat Rep* 65: 1-12.
- 80.- Mattox DE, Von Hoff DD. 1980. In Vitro Stem Cell Assay in Head and Neck. *Am J Surg* 140:527-530.
- 81.- Mattox DE, Von Hoff DD, Clark GM, Aufdesorte TB. 1984. Factors that Influence Growth of Head and Neck Squamous Carcinoma in the Soft Agar Cloning Assay. *Cancer* 53:1736-1740.
- 82.- Schiff LJ, Sugar MA. 1984. Growth of Human Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Stem Cells in Agarose. *Cancer* 53:286-290.
- 83.- Giard DJ, Aaronson SA, Todaro GJ, Arnstein P, Kersey JH, Dosik H, Parks WP. 1973. In Vitro Cultivation of Human Tumors: Establishment of Cell Lines Derived from a Series of Solid Tumors. *J Nat Cancer Inst* 51:1417-1423.
- 84.- Ponten J, Saksela E. 1967. Two Established In Vitro Lines from Human Mesenchymal Tumours. *Int J Cancer* 2:434-439.
- 85.- Shrivastav S, Boner RA, Stone KR. 1980. An In Vitro Assay Procedure to Test Chemotherapeutic Drugs on Cells from Human Solid Tumors. *Cancer Res* 40:4438-4441.
- 86.- Carl BJ. 1979. Correlation of In Vitro Growth Properties and Tumorigenicity of Syrian Hamster Cell Lines. *Cancer Res*

39:1504-1508.

- 87.- Pelevic ZP, Slocum HK, Rustum YH. 1979. Growth of Cell Colonies in Soft Agar from Biopsies of Different Human Solid Tumor. *Cancer* 101:356-368.
- 88.- Voim MW, Kaufman K. 1982. Detection of Tumor Resistance and the Results of Tumor Chemotherapy. *Eur J Can* 197:461-463.
- 89.- Mc Cormick KJ, Panje WR, Seltzer S, Herrick H. 1983. Single Agent Chemotherapy for Head and Neck Cancers. The Murine Subrenal Capsule Assay. *Arch Otolaryngol* 109:715-718.
- 90.- Bogden AE, Cobb WR, Lepsge DJ. 1981. Chemotherapy Responsiveness of Human Tumors as First Transplant Generation Xenografts in the Normal Mouse: Six-day Subrenal Capsule Assay. *Cancer* 48:10-20.
- 91.- Griffin TW, Bogden AE, Reich SD, Antonelli D, Hunter RE, Ward A, Yu DT, Greene HL, Costanza ME. 1983. Initial Clinical Trials of the Subrenal Capsule Assay as a Predictor of Tumor Response to Chemotherapy. *Cancer* 52:2185-2192.
- 92.- Diaz PR, Piña M. 1984. Enfermedades Neoplásicas. Trabajo presentado en el IV Encuentro sobre Investigación Clínica y Prospectivas de la Investigación en Salud. PUIC. México 266 pp.

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi agradecimiento al Dr. Benny Weiss Steider y a la C.D.M.O. Julia Urdiales Ramos por su asesoría y ayuda en la elaboración del presente trabajo.

También agradezco al Biol. Ramiro Ríos Gómez, a la Biol. María Teresa Corona Ortega y a la Biol. Teresita del Niño Jesús María Hernández, por la revisión del manuscrito así como por sus útiles observaciones para mejorar la presentación del mismo.

Asimismo doy las gracias a los señores Ronulfo Pedraza y José Chavarría por su colaboración técnica.