

250

01663

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

"EVALUACION PRECLINICA DE LA ACTIVIDAD
ANTINEOPLASICA DE DOS NUEVOS
COMPUESTOS DE COORDINACION"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS VETERINARIAS

P R E S E N T A :

MARIA ISABEL GRACIA MORA



ASESORES: DR. RAUL VARGAS GARCIA.
DRA. LENA RUIZ AZUARA.
DR. HECTOR S. SUMANO LOPEZ.

MEXICO, D. F.

1999.

TESIS CON
FALLA DE OR. EN

270507



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

A mis padres

A Jorge, por ser mi
mejor y mayor motivo;
por hacer suyas mis
alegrías y mis tristezas.

A los animales a los
que tuve que arrebatar la
vida, con la esperanza de
seguir sintiendo dolor
cada vez que me veo
obligada a hacerlo
durante mi búsqueda de
la verdad.

“El modo de valorar
el grado de educación de
un pueblo y de un
hombre, es la forma en
que tratan a los
animales”

Berthold Auerbach

A Lena por
permanecer junto a mí
siempre, en las buenas y
en las malas, por ser
amiga, con todas las
implicaciones de esta
palabra.

A Jesús, por ese
fraterno amor
incondicional, que me
brinda siempre y que se
siente tan bien.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Francisco Barnés de Castro y al Dr. Ciro Lomelí y Flores, ya que sin su ayuda no hubiera sido posible la realización de estos estudios.

A mis asesores:

Dr. Raúl Vargas García, por la confianza que siempre me ha brindado;

Dra. Lena Ruiz Azuara, por compartir conmigo su laboratorio, equipo, material, etc., pero sobre todo por darme su amistad, sin todo esto, no se hubiera llevado a cabo este trabajo, *GRACIAS*.

Dr. Héctor Sumano López, por enriquecer mi vida académica y personal al brindarme sus conocimientos, su sentido del humor, sus vivencias; *SU AMISTAD*.

Y a los tres por brindarme sus conocimientos, su experiencia y su tiempo.

A mi amiga Ma. Esther de la Rosa, por su amplio apoyo en todos los ámbitos, laborales y personales.

A Mabel Tinoco, por ayudarme en todo siempre e incondicionalmente, anticipando mis solicitudes, pero sobre todo, gracias por su amistad.

A Héctor Rico y Lucía Macías por su paciencia y buen humor. Gracias por aguantarme.

A la M. en C. Graciela Tapia Pérez, en general por su amistad y en particular por sus enseñanzas en estadística.

A mi jurado:

Dr. Francisco Trigo Tavera

Dr. Luis Ocampo Camberos

Dr. Jesús Reynaga Obregón

Dr. Raúl Vargas García

Dra. Nuria de Buen de A.

Por haberse tomado el tiempo de revisar y corregir cuidadosamente este trabajo, dándome así una visión más amplia y certera con sus comentarios.

Al Dr. Andoni Garritz por su ayuda y ejemplo como jefe.

Y porque la mayor riqueza que una persona pueda tener son los amigos, a todos ellos...
gracias.

Agradezco la ayuda económica otorgada para la realización de éste trabajo a través de:

DGAPA Proyectos IN207393, IN209995 e IN201996

CONACyT Proyecto Ref. 25510N

Fideicomiso Universitario N° 634. "Desarrollo de Fármacos Antineoplásicos"

Esta tesis es el resultado de las investigaciones del autor, excepto donde se indique lo contrario, dándose reconocimiento a las fuentes de información consultadas. El autor da consentimiento a la División de Estudios de Posgrado e Investigación de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México, para que la tesis esté disponible para cualquier tipo de reproducción e intercambio bibliotecario.

~~Ma. Isabel Gracia M.~~

Ma. Isabel Gracia Mora

RESUMEN

El desarrollo de las ciencias biomédicas se enfrenta en la actualidad a un problema creciente, el cáncer. Según el reporte de 1995 del Registro Histopatológico de Neoplasias en México, esta enfermedad ocupa ya el 2° lugar como causa de muerte. Así pues, en México, existe una necesidad creciente por dar servicio a la demanda de salud en pacientes con cáncer. Entre los esfuerzos desarrollados para combatir el cáncer tenemos la quimioterapia, no obstante, en nuestro país, la necesidad de importación de estos productos y su costo muy elevado hace inaccesible esta opción a un gran número de pacientes, por lo que, el desarrollo de estos productos adquiere prioridad. Con el fin de contribuir en este camino, el presente trabajo planteó la implantación de modelos tumorales murinos transplantables para la evaluación de actividad antineoplásica y con ellos se probó la actividad de 2 nuevos fármacos de origen inorgánico (casiopéina III y casiopéina IV), patentados y registrados por la UNAM y diseñados y sintetizados por investigadores mexicanos. Los resultados muestran que sólo la casiopéina III cubre los requerimientos de actividad exigidos internacionalmente siendo notablemente activa contra la leucemia linfocítica L1210, lo cual dio la pauta para evaluar su actividad empleando la leucemia viral felina (LVF) como modelo. En los gatos tratados se observó que la casiopéina III es capaz de revertir a números normales todos los parámetros sanguíneos de fórmula blanca. Se concluye que la casiopéina III resulta ser un compuesto prometedor en la clínica veterinaria y quizá a corto plazo, en la clínica humana. Otro aspecto importante es que se logró implantar con éxito los modelos de prueba planteados, lo que permitirá continuar, por primera vez en México, con la búsqueda de nuevos fármacos antineoplásicos.

Palabras clave: Evaluación antineoplásica preclínica, actividad antineoplásica, pruebas de cernimiento antineoplásico

SUMMARY

The development of biomedical research mostly faces a growing problem, cancer. According to the 1995's Histopathological Register of Neoplasias Report in Mexico, this illness takes the second place as mortality cause. In this manner, in Mexico, there is an increasing demand to deliver public health services to patients with cancer. There are different manners to fight cancer, one of the most common is the chemotherapy, however, in our country, the need to import these products and its high cost make this option unreachable to almost all the patients, that's why the development of these product is a high priority need. Therefore, this work achieved the implantation of murine transplantable tumoral models for the purpose of evaluating antineoplastic activity. With these models we evaluated the activity of two metallic complexes (casiopeína III and casiopeína IV), designed and synthesized by Mexican researchers and registered and patented in the name of UNAM. Results showed that only casiopeína III covers the activity requirement internationally demanded been highly active against lymphoid leukemia L1210, which led to evaluate its activity using Viral Feline Leukemia (VFL) as a model. In cats treated with casiopeína III, we observed that it was capable to revert back to normal numbers all the white formula blood parameters. As a conclusion of the whole work: casiopeína III resulted to be a promising compound in veterinary clinics and also may be, in a short period, in the human clinic as a successful implantation of the test models which will allow to continue searching for new antineoplastic drugs.

Keywords: Antineoplastic preclinical evaluation, antineoplastic activity, antineoplastic screening tests

ABREVIATURAS

DGE	Dirección General de Epidemiología
SSA	Secretaría de Salud
ACTH	Hormona Adrenocorticotrópica
INCan	Instituto Nacional de Cancerología, México
LVF	Leucemia Viral Felina
NCI	National Cancer Institute
CCNSC	Cancer Chemotherapy National Service Center
E.U.A.	Estados Unidos Americanos
ARN	Ácido Ribonucleico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
FOCMA	Antígeno en la superficie de la célula asociado a oncovirus felino (Feline Oncona-virus-associated Cell Membrane Antigen)
CMC	Carboximetilcelulosa
DL50	Dosis Letal 50
i.p.	intraperitoneal
i.m.	intramuscular
s.c.	subcutáneo
g	gramo
Kg	Kilogramo
mm ³	milímetros cúbicos
mg	miligramos
dl	decilitros
ILS	Índice de sobrevida
UV-Vis	Ultravioleta-Visible
ATCC	American Type Culture Collection
ELISA	Enzyme Linked Inmunosorbents Assay
I	Tratamiento intermitente
C	Tratamiento crónico
5-FU	5-Fluorouracilo
cis-Pt	cis-diamino-dicloro platino (II)

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Resultados Analíticos de Casiopeínas III y IV	37
Cuadro 2. Dosis Letal 50 Aguda de la Casiopeína III i.p. en Ratones	46
Cuadro 3. Dosis Letal 50 Aguda de la Casiopeína IV i.p. en Ratones	48
Cuadro 4. Reseña de los Gatos con Leucemia Viral Felina	57

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribución de los Casos de Neoplasias Malignas por Sexo	3
Figura 2. Distribución de Casos de Neoplasias Malignas por Edad y Sexo	4
Figura 3. Fármacos Anticancerígenos Aprobados para su Uso en E.U.A.	6
Figura 4. Representación de la Ruta Crítica utilizada para Evaluar Fármacos Anticancerígenos	14
Figura 5. Estructura de la Casiopeína I	16
Figura 6. Mecanismos de Acción propuestos para el <i>cis</i> -Pt	21
Figura 7. Flujograma propuesto para la Evaluación de Actividad Antineoplásica de las Casiopeínas III y IV	23
Figura 8. Espectro Electrónico de Casiopeína III en Agua	38
Figura 9. Espectro Electrónico de Casiopeína IV en Agua	39
Figura 10. Espectro Infrarrojo de la Casiopeína III	40
Figura 11. Espectro Infrarrojo de la Casiopeína IV	41
Figura 12. Parámetros Reproductivos Promedio de la cepa C57BL/6J	42
Figura 13. Parámetros Reproductivos Promedio de la cepa DBA/2J	43
Figura 14. Parámetros Reproductivos Promedio de la cepa B6D2F1	44
Figura 15. Índice de Sobrevida de la Casiopeína III en Leucemia Linfoide L1210	50
Figura 16. Índice de Sobrevida de la Casiopeína III en Melanoma B16	51
Figura 17. Índice de Sobrevida de la Casiopeína III en Sarcoma S180	52
Figura 18. Índice de Sobrevida de la Casiopeína IV en Leucemia Linfoide L1210	53
Figura 19. Índice de Sobrevida de la Casiopeína IV en Melanoma B16	54
Figura 20. Índice de Sobrevida de la Casiopeína IV en Carcinoma de Pulmón Lewis LL	55
Figura 21. Cuenta Leucocitaria Total de Gatos con LVF	59
Figura 22. Hematocrito de Gatos con LVF	61
Figura 23. Hemoglobina de Gatos con LVF	62
Figura 24. Linfocitos de Gatos con LVF	63
Figura 25. Monocitos de Gatos con LVF	64
Figura 26. Alanino Amino Transferasa de Gatos con LVF	65
Figura 27. Fosfatasa Alcalina de Gatos con LVF	66
Figura 28. Urea de Gatos con LVF	67
Figura 29. Creatinina de Gatos con LVF	68

ÍNDICE

	Página
Capítulo 1. INTROUCCIÓN	1
• Quimioterapia del Cáncer	5
• Métodos para Evaluar Actividad Antineoplásica. Transplante de Tumores en Ratón	9
• Uso de Cepas Endogámicas de Ratón Confirmando la Naturaleza Mendeliana de la Susceptibilidad	10
• Genes de Histocompatibilidad y las Leyes de la Transplantación	11
• Cáncer en Medicina Veterinaria	17
• Leucemia y Sarcoma Felinos	18
Capítulo 1. HIPÓTESIS	24
Capítulo 1. OBJETIVOS	25
Capítulo 2. MATERIAL Y MÉTODOS	26
• Fármacos	26
• Animales	26
• Perfil Farmacológico y Toxicidad Aguda	27
• Evaluación Primaria	28
• Leucemia Linfoide L1210	29
• Melanoma B16	30
• Sarcoma S180	31
• Carcinoma de Pulmón de Lewis LL	32
• Evaluación Secundaria. Leucemia Viral Felina (LVF)	34
• Tratamientos y Tamaño de la Muestra	35
• Metodología Estadística	35
Capítulo 3. RESULTADOS	36
• Fármacos	36
• Reproducción de Cepas Singénicas	42
• Perfil Farmacológico y Toxicidad Aguda	45
• Casiopeína III	45
• Casiopeína IV	47
• Crecimiento <i>In Vitro</i> de las Líneas Tumores Murinas	49
• Crecimiento <i>In Vivo</i> de la Líneas Tumores Murinas	49
• Evaluación Primaria con la Casiopeína III	49
• Evaluación Primaria con la Casiopeína IV	53
• Análisis de Sobrevida de Logrank con la Casiopeína III	56
• Análisis de Sobrevida de Logrank con la Casiopeína IV	56
• Evaluación Secundaria empleando como Modelo la LVF	56
Capítulo 4. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	69
Capítulo 5. REFERENCIAS	73

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Distribución de los Casos de Neoplasias Malignas por Sexo	3
Figura 2. Distribución de Casos de Neoplasias Malignas por Edad y Sexo	4
Figura 3. Fármacos Anticancerígenos Aprobados para su Uso en E.U.A.	6
Figura 4. Representación de la Ruta Crítica utilizada para Evaluar Fármacos Anticancerígenos	14
Figura 5. Estructura de la Casiopeína I	16
Figura 6. Mecanismos de Acción propuestos para el <i>cis</i> -Pt	21
Figura 7. Flujoograma propuesto para la Evaluación de Actividad Antineoplásica de las Casiopeínas III y IV	23
Figura 8. Espectro Electrónico de Casiopeína III en Agua	38
Figura 9. Espectro Electrónico de Casiopeína IV en Agua	39
Figura 10. Espectro Infrarrojo de la Casiopeína III	40
Figura 11. Espectro Infrarrojo de la Casiopeína IV	41
Figura 12. Parámetros Reproductivos Promedio de la cepa C57BL/6J	42
Figura 13. Parámetros Reproductivos Promedio de la cepa DBA/2J	43
Figura 14. Parámetros Reproductivos Promedio de la cepa B6D2F1	44
Figura 15. Índice de Sobrevida de la Casiopeína III en Leucemia Linfoide L1210	50
Figura 16. Índice de Sobrevida de la Casiopeína III en Melanoma B16	51
Figura 17. Índice de Sobrevida de la Casiopeína III en Sarcoma S180	52
Figura 18. Índice de Sobrevida de la Casiopeína IV en Leucemia Linfoide L1210	53
Figura 19. Índice de Sobrevida de la Casiopeína IV en Melanoma B16	54
Figura 20. Índice de Sobrevida de la Casiopeína IV en Carcinoma de Pulmón Lewis LL	55
Figura 21. Cuenta Leucocitaria Total de Gatos con LVF	59
Figura 22. Hematocrito de Gatos con LVF	61
Figura 23. Hemoglobina de Gatos con LVF	62
Figura 24. Linfocitos de Gatos con LVF	63
Figura 25. Monocitos de Gatos con LVF	64
Figura 26. Alanino Amino Transferasa de Gatos con LVF	65
Figura 27. Fosfatasa Alcalina de Gatos con LVF	66
Figura 28. Urea de Gatos con LVF	67
Figura 29. Creatinina de Gatos con LVF	68

Capítulo I

INTRODUCCIÓN

El cáncer o neoplasias malignas, constituyen un grupo de enfermedades relacionadas que pueden ocurrir en cualquier tejido corporal y que se caracterizan por una multiplicación desordenada de células anormales que no son susceptibles a las señales de control de las demás células normales del organismo. Este crecimiento sin restricciones como la diferenciación, limitación del tamaño del órgano, regulación hormonal, etc., permite que las células se infiltren a los tejidos adyacentes destruyéndolos y frecuentemente sean capaces de inducir metástasis regionales y/o a distancia.

Actualmente no se conoce la causa de este desarrollo maligno; sin embargo, se han propuesto diversos factores que, solos o en combinación, pudieran iniciar dicho proceso (1). Por ejemplo, la exposición a algunas sustancias potencialmente carcinogénicas que puedan estar presentes en contaminantes ambientales, la dieta, los desechos industriales, la radiación, traumatismos repetidos, la asociación con ciertos virus oncogénicos, la posible predisposición genética y el proceso de envejecimiento (2).

La transformación maligna requiere al menos de 3 pasos: la iniciación, la promoción y la progresión.

- * La iniciación se puede entender como el conjunto de eventos que da lugar a la pérdida de la inhibición del crecimiento celular por contacto con células contiguas (3). La secuencia exacta en que esto ocurre aún está muy lejos de ser esclarecida pero se han generado algunas teorías que pretenden explicar el fenómeno desde 2 perspectivas, la genética y la relacionada con las glicoproteínas de la superficie celular (4).
- * La promoción se refiere a la perpetuación del daño celular, probablemente por la activación de oncogenes o inactivación de los llamados “genes supresores de tumor” (5). A su vez se ha postulado que porciones del genoma, proteínas y enzimas son los oncogenes y los genes supresores de tumor (antioncogenes).
- * La progresión requiere escape de la célula tumoral a los factores inmunes de defensa del organismo lo que implica una libertad mitótica sin límite (5).

La razón por la que no se ha podido encontrar una línea terapéutica general y eficaz contra el cáncer radica en la naturaleza de la enfermedad y su forma de presentación. El organismo puede detectar por medio del sistema inmune agentes extraños como bacterias,

virus o parásitos. Sin embargo estos mecanismos de vigilancia no siempre pueden reconocer células propias que han sufrido transformación maligna (1).

Por otra parte, en los últimos 30 años, la incidencia de algunos tipos de cáncer ha aumentado en tanto que otros han disminuido; las razones de los cambios en estas tendencias no son muy claras, sin embargo, muy probablemente reflejan los patrones de comportamiento del ambiente, por ejemplo, la mayor exposición a sustancias industriales, el cambio en los hábitos dietéticos y el aumento en la esperanza de vida. Dichas tendencias apoyan el argumento del determinismo geográfico y el medio asociado a este, lo cual se ha comprobado al observar que cuando las poblaciones migran, la incidencia del cáncer en estas personas cambia a los tipos endémicos en el lugar de residencia sin importar los padecimientos de más frecuencia de cáncer en su lugar de origen o los tipos de cáncer asociados a su tipo étnico particular (2, 26).

El cáncer constituye hoy día un problema de salud pública no sólo en México, sino en todo el mundo. En nuestro país, ocupó en 1995 el 2º lugar como causa de mortalidad, siendo responsable del 11.2% del total de muertes ocurridas en ese año (48,222). Los tumores malignos exigen cada vez estructuras hospitalarias más complejas, tecnologías de diagnóstico avanzadas y tratamientos cuyos costos sean menos onerosos (28). Los datos sobre la frecuencia de casos nuevos diagnosticados y mortalidad por cáncer son esenciales, porque representan los instrumentos fundamentales para la planeación de las decisiones político administrativas que darán como resultado una mejor asistencia médica y preventiva.

En 1995 en México se notificó un total de 73,299 casos nuevos de neoplasias malignas, con predominio del sexo femenino (64.7%) (Figura 1). Con respecto a la distribución por edad, de acuerdo con el sexo, en los hombres se ubicó en primer lugar el grupo de 75 y más años (20.0%), seguido por el de 60-64 (11.8%); en las mujeres predominó el de 75 y más años, con 11.5%, seguido por el grupo de 45 a 49 (11.2%), y la tercera posición está ocupada por el de 40 a 44 años (10.0%) (Figura 2).

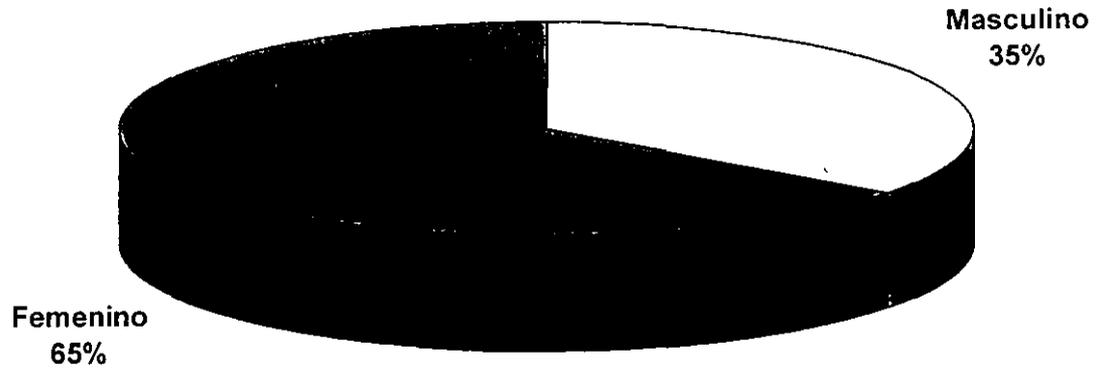


FIGURA 1. Distribución de Casos de Neoplasias Malignas por Sexo.
Fuente: Registro Histopatológico de Neoplasias en México. DGE-SSA. 1995

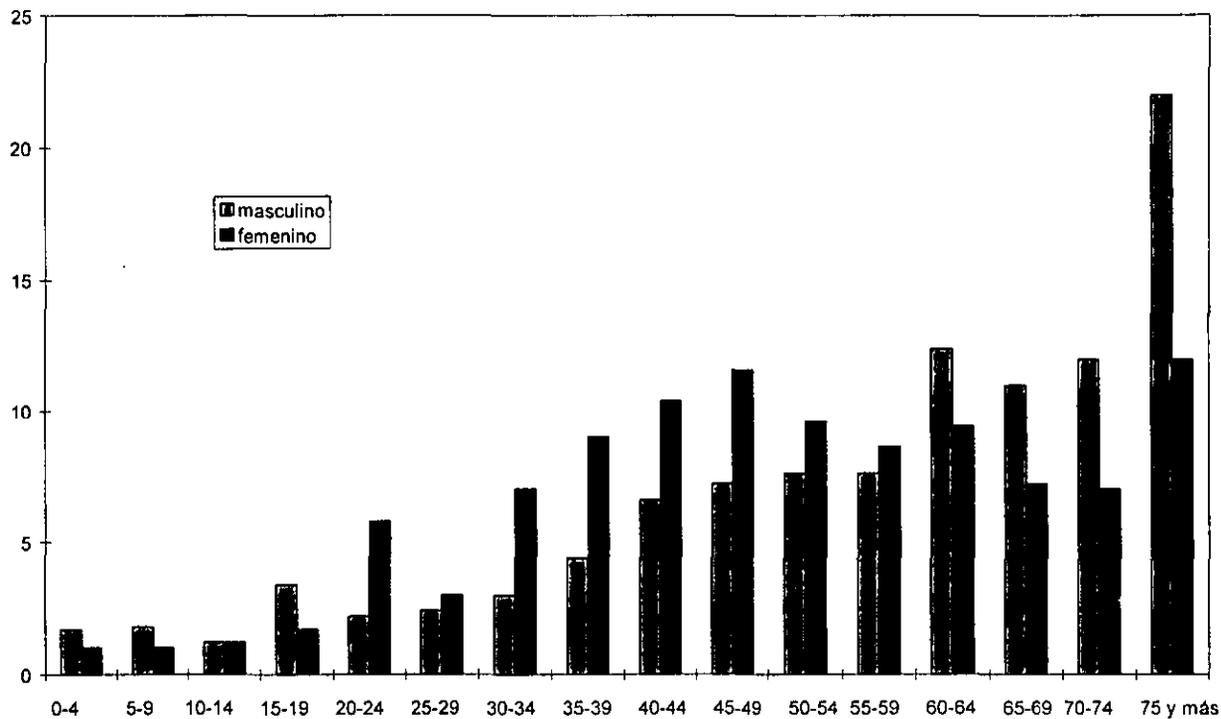


FIGURA2. Distribución de Casos de Neoplasias Malignas por Edad y Sexo.

Fuente: Registro Histopatológico de Neoplasias en México. DGE-SSA. 1995

Entre los esfuerzos desarrollados para encontrar tratamientos útiles contra el cáncer se cuenta con la cirugía, la radioterapia y la quimioterapia, y en un buen número de casos la combinación de éstos. El presente trabajo se enfoca exclusivamente al uso de quimioterapia en el tratamiento de las neoplasias malignas.

QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER

Hace 500 años ya existía el concepto del tratamiento del cáncer con fármacos (6), se sabe que con este propósito se empleaban preparaciones de plata, zinc o mercurio. Sin embargo, no se documentó sino hasta 1865 el uso de un tratamiento sistemático en neoplasias malignas cuando Lissauer (7) administraba arseniato de potasio a pacientes con leucemias y observaba efectos positivos; pese a estos antecedentes, la quimioterapia del cáncer como tal se sistematizó 80 años después.

Actualmente, existen numerosos fármacos disponibles al clínico (véase Figura 3), en su mayoría compuestos orgánicos y sólo unos pocos de origen inorgánico.

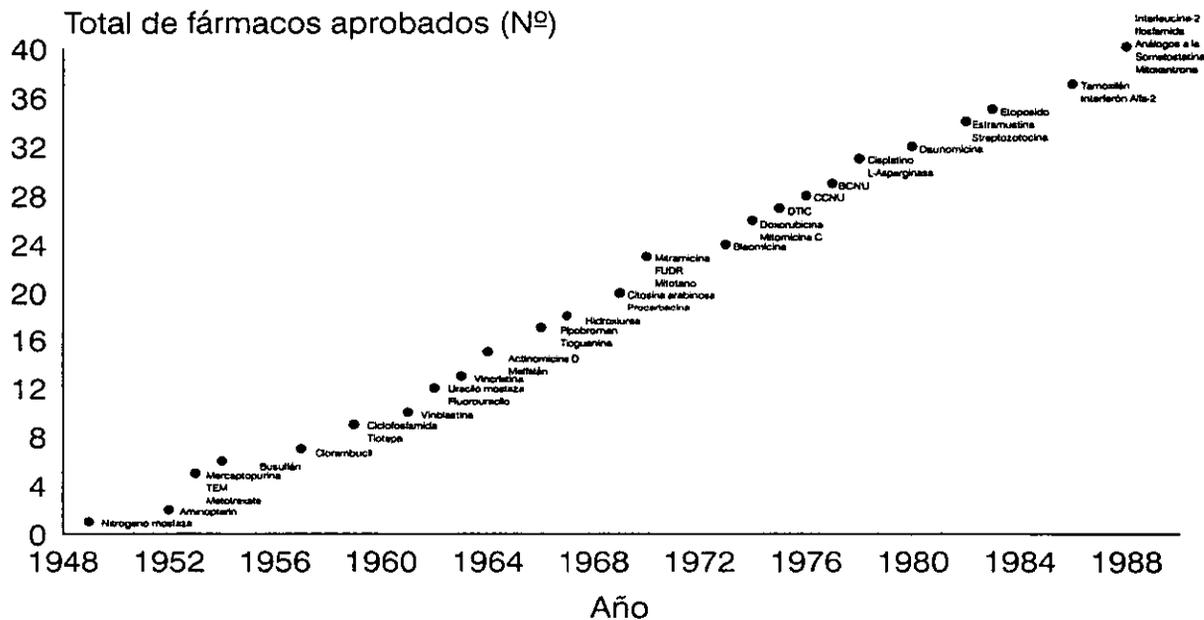


FIGURA 3. Fármacos anticancerígenos aprobados para uso en E.U.A. Esta lista no incluye agentes hormonales como esteroides cortico-aderenales (cortisona y prednisona), andrógenos (testosterona), estrógenos (diétilstilbestrol), progesterona y hormona adrenocorticotrópica (ACTH), que son usados para tratar algunos tumores hormonalmente dependientes.(Powis, G. and Hacker, M. P.: The Toxicity of Anticancer Drugs. Pergamon Press, USA, 1991).

Cabe hacer notar que en 1969 Rosenberg (8) descubrió la actividad citotóxica de un compuesto sintético de origen inorgánico, sintetizado en Alemania desde el siglo XIX, que marcó la pauta de una nueva serie de compuestos con un nuevo enfoque; este compuesto fue el *cis*-diamino, dicloro platino(II), ahora conocido como cisplatino. Aunque el cisplatino ha encontrado un lugar importante en la quimioterapia del cáncer, muchos tumores son totalmente refractarios a él. Este hecho ha estimulado el diseño, la síntesis y la evaluación de muchos nuevos agentes en la búsqueda de compuestos con toxicidad reducida y diferentes propiedades biológicas. De manera ideal la búsqueda pretende encontrar fármacos con las siguientes características:

- a) Ausencia de resistencia-cruzada al cisplatino.
- b) Un espectro más amplio de actividad, particularmente en áreas clínicas donde el cisplatino no ha demostrado efectos terapéuticos significativos.
- d) Disminución de efectos eméticos y renales (tóxicos directos en general).
- e) Sinergismo en terapias combinadas (9).
- f) Bajo potencial oncogénico.

Vale la pena hacer un paréntesis para señalar que en México y en los umbrales del siglo XXI, aún no se genera un solo fármaco de utilización universal. Esto es, existe una dependencia virtualmente absoluta de la industria farmacéutica extranjera. Esta situación es probable que obedezca a la falta de investigación en ciencias básicas, así como a la cuestionable credibilidad que se les da a los desarrollos de investigadores nacionales. Por añadidura en México, la necesidad de importación de estos productos y su costo muy elevado, hace que el desarrollo de productos antineoplásicos adquiera prioridad.

En México, existe una necesidad creciente por dar servicio a la demanda de salud en pacientes con problemas de cáncer. El costo de la quimioterapia como tratamiento primario o adyuvante hace, en ocasiones, inaccesible la opción a un gran número de pacientes con las consecuencias éticas que esto implica (10).

En 1975, la Dra. Ruiz-Ramírez, de la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM, concibió la idea de diseñar compuestos de coordinación con

posible actividad antineoplásica, como el cisplatino y al carboplatino, este último menos tóxico que el cisplatino, se incorpora en la terapia anticancerígena a finales de los años 80's (11). Los compuestos de coordinación sintetizados por Ruiz-Ramírez fueron diseñados para mostrar una actividad biológica potencial. Dichos compuestos poseen en su esfera de coordinación metales de la primera serie de transición (Mn, Fe, Co, Ni, Cu y Zn). A partir de 1980 se inician trabajos de constatación biológica *in vitro* (12), con base en el supuesto de que puedan tener actividad antineoplásica. Esta hipótesis se apoyó en los postulados de Rosenberg (9), que a su vez fueron derivados del conocimiento farmacodinámico del cisplatino en líneas tumorales y que se resumen a los siguientes puntos:

- 1) Estos complejos deben intercambiar rápidamente sólo algunos ligantes en reacciones con moléculas biológicas.
- 2) Los complejos deben ser eléctricamente neutros, aunque la forma activa puede estar cargada después de intercambiar algún ligante dentro del organismo.
- 3) Son necesarios dos ligantes *cis* monodentados (o uno bidentado) como grupos salientes. Los isómeros *trans* son inactivos.
- 4) Las velocidades de intercambio de estos ligantes se encuentran en un intervalo específico de labilidad.
- 5) Los ligantes no intercambiables en la molécula deben estar fuertemente enlazados.

Para seleccionar sustancias en busca de actividades farmacológicas específicas, se utilizan modelos animales con valor predictivo conocido. A continuación se relata la evolución de estos modelos y se intenta dar una perspectiva histórica de su adaptación progresiva en la evaluación de actividad antineoplásica.

MÉTODOS PARA EVALUAR ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA. TRANSPLANTE DE TUMORES EN RATÓN.

El papel que los trasplantes han jugado en el desarrollo de nuevos fármacos quimioterapéuticos está bien documentado. Sin embargo, hay argumentos a favor y en contra para el uso de tumores transplantables en investigación en cáncer.

Los modelos de tumoración espontánea o inducida, probablemente nunca serán capaces de reemplazar a los modelos con tumores transplantables debido al tiempo que involucra su producción, su biología individual y su heterogeneidad interna.

El uso preferencial de tumores transplantables en el sentido de bioquímica tumoral y quimioterapia experimental es debido a la factibilidad de elección del material; es relativamente fácil obtener muestras razonablemente homogéneas de tejido maligno, creciendo a tasas suficientemente predecibles y disponible en grandes cantidades. limitado sólo por el abasto apropiado de animales hospederos.

Sin embargo, obtener el máximo de utilidad de tumores transplantados requiere la apreciación de ciertos principios biológicos básicos de transplantación, los que datan de 1880, los mecanismos simples de las técnicas involucradas en el transplante de tumores de un hospedero a otro y, finalmente la interpretación de los resultados y cómo estos se aplican a la etiología y crecimiento de una neoplasia.

Moreau (1894) fue el primer investigador, durante el periodo de 1891 a 1894, en señalar que la herencia puede jugar un papel importante en el éxito del transplante de tumores. Él pasó algunos epitelomas a través de 17 generaciones de transplante en ratones y encontró un desarrollo más rápido en la progenie de ratones. Sus estudios incluyeron algunos parámetros biológicos como edad y sexo con relación a la predisposición al crecimiento tumoral.

Un sarcoma desarrollado en rata fue transferido a otras ratas en 1892 por Firket, posteriormente Velich en 1898 logró transplantar un carcinoma a través de 8 generaciones de ratas con una disminución en el éxito del mismo hasta que se perdió el tumor cuando se puso en una nueva cepa de ratas. No obstante, estos primeros trabajos con tumores transplantados proveyeron evidencia de que el éxito de la transplantación era de alguna manera determinado por la susceptibilidad o no-susceptibilidad del hospedero. Fue el

trabajo de Loeb (1901, 1902) el que sugirió la naturaleza hereditaria de la susceptibilidad. Los resultados de Loeb logran estimular la experimentación relativa a la susceptibilidad a la transplatación en ratones. A partir de los experimentos de Tyzzer, (1905, 1915), Little (1914) y Little y Tyzzer (1916), empleando ratones bailarinos japoneses, ratones comunes, híbridos F1 y F2, y ratones entrecruzados, se concluyó que la susceptibilidad a los tumores transplantados se debe a la herencia de influencias dominantes múltiples (genes) en un sentido mendeliano. La susceptibilidad depende de la presencia simultánea de genes dominantes derivados de la cepa de ratones en la cual el tumor tuvo origen. Esto sugirió entonces, que la cepa parental podría portar los genes en condiciones homocigóticas (susceptible) y los F1 podrían portar los genes en condiciones heterocigóticas (susceptible). El tumor podría crecer en F2 sólo cuando portara todos los genes dominantes. Little usó la fórmula $f=(3/4)^n$, donde f se refiere a la fracción de animales en los que crece el tumor progresivamente en la generación F2, y n se refiere al número de genes dominantes involucrados. Este estudio establece firmemente el papel de los factores genéticos involucrados en el trasplante de tumores y obliga al experimentador a elegir cuidadosamente la carga genética de los animales que se usen.

USO DE CEPAS ENDOGÁMICAS DE RATÓN CONFIRMANDO LA NATURALEZA MENDELIANA DE LA SUSCEPTIBILIDAD.

Una población amplia de animales de laboratorio asemeja la población humana como un grupo heterogéneo con muchas variaciones genéticas. La endogamia (apareo de hermano con hermana) incrementa el número de pares de genes homocigóticos en la población. Después de 20 ó más generaciones, los animales de un linaje dado, habrán perdido la mayoría de su heterocigosis original, y la sublínea es considerada genéticamente pura (Snell, 1953). Excepto por los cromosomas X y Y, las células germinales de todos los miembros de una línea endogámica tienen el mismo genotipo. La teoría genética de transplatación fue extendida y confirmada por muchos investigadores usando cepas endogámicas y muchos tipos de tumor, estableciendo así su aplicabilidad general.

Los resultados indicaron que si la constitución génica de un tumor es la misma que la del hospedero, hará que crezca en éste, mientras que los otros se desviaron durante el

desarrollo de la condición cancerosa o al menos durante el proceso de transplatación. En resumen, en la actualidad se reconoce que existen genes específicos involucrados en la capacidad para aceptar o rechazar un transplante.

GENES DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y LAS LEYES DE LA TRANSPLANTACIÓN.

Los hechos establecidos en la teoría genética de la transplantabilidad de tumores fueron resumidos por Law (1954):

1. En todos los animales de cepas endogámicas de origen (o sublíneas) el tumor crece progresivamente y mata al hospedero.
2. En cepas no relacionadas, el tumor falla en su crecimiento progresivo.
3. En todos los animales híbridos F1 donde uno de los padres es de la cepa de origen del tumor, el tumor crece progresivamente.
4. En una cierta proporción de ratones F2 (3:1) y ratones retrocruzados (F1 x padre resistente), el tumor crece progresivamente dependiendo de la cepa de ratón y el tumor involucrado.

En otras palabras, todos los ratones que tienen todos los factores mendelianos (genes) específicos en homocigosis o en heterocigosis presentes en la cepa de origen del ratón permitirán el crecimiento progresivo del transplante. Los tumores surgidos en ratones F2 crecen en todos los ratones F1 y en cierta proporción de los F2 y ratones de retrocruza, como fue demostrado por Bittner (1935). Algunos tumores seleccionados de F2 podrán crecer en una u otra de las cepas progenitoras. Los tumores surgidos en híbridos F1 crecen progresivamente en todos los ratones F1 y en una cierta proporción de los F2 y ratones de retrocruza, pero como una regla no muestran crecimiento progresivo en ninguna de las cepas padre. Esta última generalización fue apoyada por el trabajo de Kirshbaum y Strong (1939-1941) y Kirshbaum *et al.* (1940).

Otros tejidos normales tales como cartilago, tiroides, tejido adrenal, hueso, hígado, bazo, y páncreas fueron transplantados entre ratas y cobayos por Loeb y King (1927) y Loeb y Wright (1927), encontrando que el diferencial individual más cercano, entre transplante y hospedero, es mejor para la sobrevivencia del transplante. Ellos también observaron una

correlación de la relación genética entre el hospedero y el donador y la abundancia de los linfocitos y la reacción del tejido conectivo.

Snell (1948) propone que los genes que conciernen a la transplatación fueran llamados "genes de histocompatibilidad", dado que susceptibilidad y resistencia a tejidos tumorales y normales eran determinadas probablemente, por los mismos genes. Los genes de histocompatibilidad entonces están directamente involucrados en la síntesis de antígenos específicos de los individuos, que deben coincidir en el donador y en el hospedero para asegurar la compatibilidad.

Gorer (1937) proveyó evidencia de que en el caso de ciertos tumores transplantados de ratón los genes involucrados tienen unas bases químicas dentro de ciertos iso-aglutinógenos los cuales han sido identificados.

Gorer *et al.* (1948) fueron capaces de identificar y mapear genes individuales de histocompatibilidad (genes H-2) con el uso de marcadores genéticos (genes con efectos visibles): Si las cepas endogámicas difieren en el alelo H-2, la transplatación de tumores entre estas cepas es rara vez exitosa. Sin embargo, si dos cepas endogámicas tienen los mismos alelos H-2, pero al mismo tiempo difieren en muchos otros loci, la transplatación del tumor es exitosa más frecuentemente. Estos otros loci son llamados loci débiles por Snell, dados sus efectos antigénicos débiles que son más que aquellos controlados por el loci fuerte y así se espera que ocurra el crecimiento de ciertos transplantes. Snell *et al.* (1964) han revisado la nomenclatura para el sistema H-2 que incluye los 18 alelos conocidos, más de 25 especificidades antigénicas y las cepas endogámicas de ratones que los desarrollan. Los antígenos H-2 están también presentes en tejidos retículo endoteliales y sus neoplasias así como en algunos otros tipos de neoplasias, Boyse (1960).

Gorer y O'Gorman (1956) y Hellstrom (1959), encontraron que los tejidos de fetos de ratón de 13 días de edad poseen los antígenos H-2 pero en cantidades disminuidas. Moller (1962, 1963, 1964) demostró por medio de estudios de anticuerpos por fluorescencia indirecta que el material H-2 es parte de la membrana citoplasmática externa. Experimentos de algunos investigadores (Brent *et al.* 1962; Davies, 1962; Kantdutsch y Stimpfling, 1962) han sugerido que las especificidades del H-2 están asociadas con una lipoproteína derivada de membranas citoplasmáticas (12).

Como resultado de todos los estudios aquí citados, en 1960 se crea en los Estados Unidos de Norteamérica, el "Cancer Chemotherapy National Service Center" perteneciente al "National Cancer Institute" en Bethesda, Maryland, con la finalidad de establecer un programa capaz de evaluar actividad antineoplásica de nuevos fármacos. Para tal efecto se llegó a la elección de cepas isogénicas para el establecimiento de líneas tumorales murinas siguiendo las leyes de la transplatación, que permitieran una evaluación primaria de actividad antitumoral de nuevos fármacos. De hallarse actividad en este primer estadio de prueba se sugiere continuar con ratones atímicos que permitan el implante de tumores humanos en una evaluación secundaria (véase Figura 4).

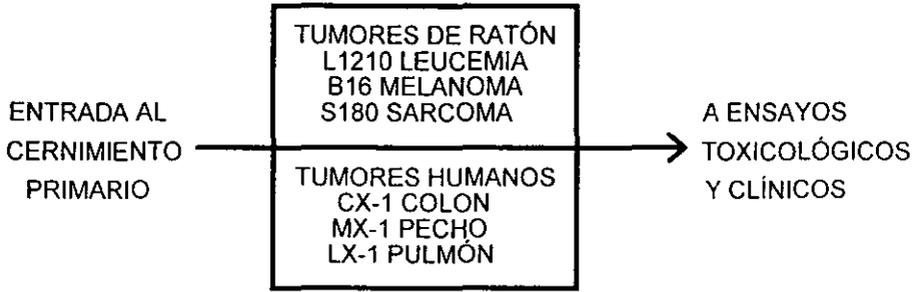
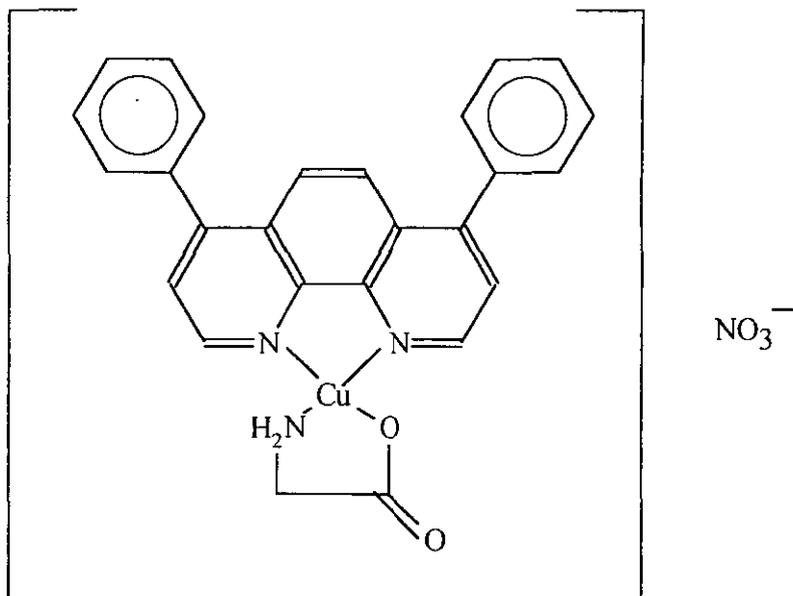


FIGURA 4. Representación de la Ruta Crítica utilizada para Evaluar Fármacos Anticancerígenos.

Recientemente la Universidad Nacional Autónoma de México, representada por su Secretario General, y el Instituto Nacional de Cancerología, México (INCan), firmaron un convenio de colaboración para el desarrollo de la metodología preclínica, pertinente para hacer posible la incorporación de los compuestos sintetizados por la Facultad de Química, basados en el proyecto de Ruíz-Ramírez (1986), a este panel de evaluación y, de encontrar alguno activo, para su empleo en ensayos clínicos dentro del propio INCan. Cabe mencionar que el desarrollo de las investigaciones en torno a estos compuestos está supervisado por el Centro para la Innovación Tecnológica de la UNAM ya que los compuestos recibieron su patente internacional desde 1993 a nombre de la UNAM con la fórmula general $[\text{Cu}(\text{N-N})(\text{N-O})]\text{NO}_3$, el ejemplo de una de estas casiopeínas se puede apreciar en la Figura 5.



Fórmula mínima: C₂₆ H₂₀O₃N₄Cu

FIGURA 5. Estructura de la Casiopeina I

A la fecha se han sintetizado alrededor de 100 compuestos y con base en los experimentos *in vitro* (13) se procedió al desarrollo de los ensayos *in vivo* probando algunos de estos compuestos que, actualmente reciben el nombre de Casiopeínas®. En el presente trabajo se propuso la evaluación de actividad antineoplásica de las casiopeínas III y IV mediante el empleo de los ensayos exigidos dentro del panel de evaluación primaria sugerido por el Cancer Chemotherapy National Service Center del National Cancer Institute (14) de los Estados Unidos Americanos y que contemplan el uso de líneas tumorales murinas transplantables en cepas singénicas (Véase Figura 2). Así mismo, se propone que: si las Casiopeínas III y IV cubren los requerimientos de actividad necesarios sobre las líneas tumorales murinas, se continúe con ensayos clínicos en medicina veterinaria empleando la leucemia viral felina (LVF) como modelo. Se planteó el uso de LVF como un modelo viable para sustituir los modelos de xenotransplatación ya que no se contaba con la infraestructura necesaria para la implantación de estos últimos.

CÁNCER EN MEDICINA VETERINARIA.

Habitualmente el Cancer Chemotherapy National Service Center del NCI estipula en su protocolo para la evaluación de fármacos con potencial antineoplásico, el desarrollo de pruebas de dosis letal aguda en mamíferos superiores como el perro, el gato y el mono (15). Si bien este paso se contempla como esencial para que el medicamento pueda ser sometido a pruebas clínicas controladas en el humano, desde la perspectiva veterinaria resulta congruente pensar que, más que una prueba de toxicidad *per se*, se puede proyectar la utilidad de estos compuestos en animales mediante su evaluación clínica. Esta idea no es original ya que desde los inicios del cernimiento de quimioterapia experimental se ha contemplado a los tumores espontáneos en animales como un modelo viable e idóneo para la evaluación de actividad antineoplásica (16).

Como neoplasias, en medicina veterinaria han destacado por su frecuencia los tumores cuyo agente etiológico es un virus oncogénico. En este sentido este trabajo destaca la leucemia viral felina (LVF), una enfermedad que se transmite horizontalmente por un virus ARN capaz de inducir linfomas y leucemias (17). No obstante, sólo una proporción de los gatos infectados desarrolla una condición persistente y diseminación del virus (18). La

mayoría de ellos se liberan del problema mediante una respuesta humoral estimulada por las glicoproteínas de la cápsida viral (19) y otros antígenos de la superficie viral (20).

En términos globales se puede equiparar la LVF con algunas formas de leucemia y linfomas en el humano como el linfoma de Hodgkin. Esta similitud hace particularmente útil el modelo animal espontáneo de LVF para desafiar el potencial antineoplásico de un nuevo fármaco.

LEUCEMIA Y SARCOMA FELINOS.

Quizá el premio Nobel que se concedió al Dr. Michael Bishop por su investigación en oncogenes, pudiese haber sido compartido por Rouss quien desde 1911 identificó a los virus como causantes de tumores en las gallinas (2). A partir de 1911, se descubrieron otros virus productores de cáncer. A la fecha se conoce que existen 2 familias de virus ARN capaces de inducir tumores, la subfamilia oncoviridae (oncovirus) y la retroviridae (retrovirus) (17). Existen virus oncogénicos endógenos y exógenos. Los primeros se encuentran en los cromosomas de células infectadas como una copia del ADN (provirus) y se transmiten de células progenitoras a células hijas como genes en huevos, óvulos y espermatozoides. Los oncovirus exógenos se transmiten entre individuos de manera horizontal.

Se ha propuesto la hipótesis de que los virus oncogénicos endógenos salen de las células que los hospedaban y en las cuales no inducían enfermedad, para infectar otras células de diferente especie en las que tienen un efecto oncogénico (17). Este es el caso de los retrovirus causantes de la LVF y el sarcoma felino.

Se ha especulado que algunos millones de años atrás un oncovirus endógeno de rata se convirtió en un virus exógeno de gatos para dar lugar a la LVF (17). El virus de la LVF se descubrió en Escocia en 1964 en un gato que presentó un linfoma y que había convivido con otros que también desarrollaron esta patología (17).

En la actualidad se sabe que el virus tiene una sola banda de ARN con genes *gag* (grupo de antígenos específicos), genes *env* (envelope = cubierta) y genes *pol* (polimerasa)

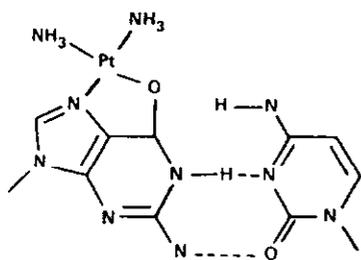
que codifican a la polimerasa ADN dependiente de ARN (transcriptasa inversa); de donde recibe su nombre de retrovirus. La transcriptasa inversa copia al ARN viral en forma de ADN complementario que se puede insertar en el cromosoma de la célula como provirus induciendo leucemia mediante un mecanismo todavía desconocido ya que aún no se identifica un oncogen en el genoma viral.

El vehículo de transmisión del virus de la LVF (FeLV) es la saliva y se ha calculado que cada mililitro contiene aproximadamente 2 millones de partículas infectantes (17). El virus se transmite a través de mordeduras o por el hábito de los gatos de lamerse entre sí. Dentro del organismo infecta linfocitos y nódulos linfáticos inicialmente de la cabeza y cuello. El virus requiere de células de división rápida como las del tejido linfoide y médula ósea; en los gatos que no logran producir una respuesta inmune adecuada, el virus prolifera aceleradamente en estos tejidos produciéndose una viremia con las partículas en forma libre o incluidas dentro de los linfocitos. La viremia puede persistir toda la vida del gato (17). Varias semanas después llega a glándula salival y epitelio respiratorio para continuar la diseminación horizontal. El virus se replica en linfocitos, neutrófilos, megacariocitos, eritroblastos, en células pancreáticas, intestinales, del árbol respiratorio y de la vejiga urinaria. En las células lifoides de gatos, existe un antígeno en la superficie de la célula asociada a oncovirus felino (FOCMA).

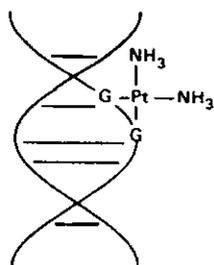
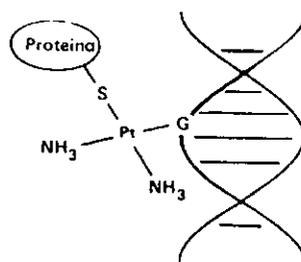
Existen 9 formas clínicas en las que se desarrolla el virus de la LVF. En condiciones naturales se desarrolla una verdadera neoplasia maligna en un porcentaje calculado del 30 %. Se ha señalado que existe aproximadamente un 30 % de gatos que, habiendo sufrido una infección natural quedan como portadores asintomáticos y que este mismo porcentaje pudiera desarrollar una neoplasia maligna si el tamaño del inóculo hubiese sido mayor y la vía de acceso distinta (17).

Así pues la LVF es capaz de producir tumores malignos manifestados por aumentos notables en la leucocitosis de hasta $130,000/\text{mm}^3$. Por lo tanto, puede ser utilizada como un modelo para determinar la eficacia anticancerígena de las casiopeínas, en particular si se considera que el mecanismo de acción de los compuestos de coordinación puede ser útil para evitar la replicación viral ya que estos fármacos pueden ser intercalantes en el ADN.

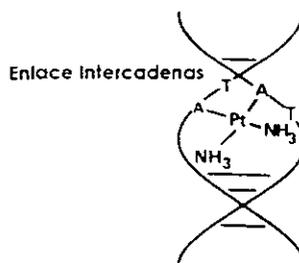
Se piensa que su mecanismo de acción es comparado con el de otros compuestos de coordinación como el cisplatino que se esquematiza en la Figura 6.



Enlace bifuncional a una base de ADN



Enlace Intracadena



Enlace Intercadenas

FIGURA 6. Mecanismos de Acción Propuestos para el *Cis*-diamino-dicloro-platino (II)

Si bien no se ha identificado el mecanismo de acción de las casiopeínas, es posible que no esté muy alejada de lo expuesto en el esquema anterior ya que se tiene evidencia que demuestra que estos fármacos tienen actividad directa sobre el ADN (18, 32). De tal suerte, si las casiopeínas pueden actuar sobre el linfocito infectado con FeLV y provocar un abatimiento en la replicación del virus, se tendrá una base para el tratamiento de esta enfermedad en gatos y un estímulo para el tratamiento del cáncer en humanos.

Para ello, en el presente trabajo se propone que si la(s) casiopeina(s) III y/o IV muestran actividad en una evaluación primaria de actividad mediante el empleo de tumores murinos transplantables, se lleve a cabo un estudio destinado a evaluar su eficacia en casos espontáneos de LVF (Véase Figura 7).

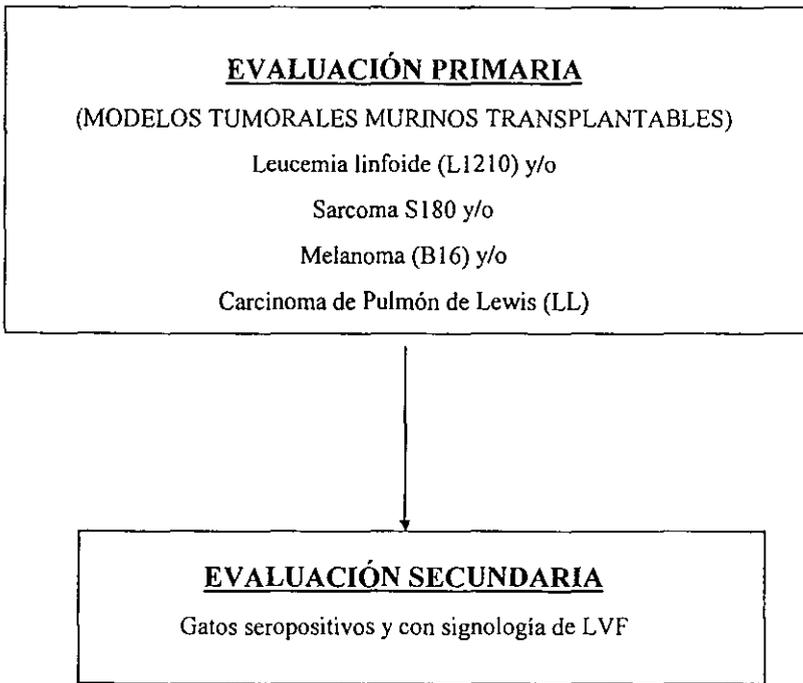


FIGURA 7. Flujograma propuesto para la evaluación de actividad antineoplásica de las casiopeínas III y IV.

Capítulo 1

HIPÓTESIS

HIPÓTESIS

•Las casiopeinas III y IV son compuestos de coordinación pertenecientes a una familia de fármacos que han mostrado poseer propiedades citostáticas y antineoplásicas por lo que estos compuestos tendrán, no sólo la actividad antineoplásica exigida por los protocolos del National Cancer Institute contra tumores murinos sino además actividad contra la Leucemia Viral Felina.

Capítulo 1

OBJETIVOS

OBJETIVOS

- Evaluar si las casiopeínas III y/o IV son capaces de producir sobrevida estadísticamente significativa en los modelos tumorales murinos aceptados internacionalmente.
- Identificar gatos seropositivos y con signología clínica de LVF para evaluar si mediante su tratamiento con casiopeína es posible su recuperación o mejora.

Vale la pena señalar que para alcanzar estos objetivos fue necesario llevar a cabo las siguientes actividades:

- Obtención de las casiopeínas III y IV en cantidades suficientes.
- Confirmación de la obtención y pureza de las casiopeínas III y IV
- Determinación de su solubilidad en disolventes fisiológicamente compatibles.
- Establecimiento del cultivo de las líneas tumorales L1210, B16, S180 y LL y su propagación *in vivo*.
- Determinación las dosis letales 50 agudas de ambas casiopeínas de forma intraperitoneal en ratones.
- Implantar, por 1ª vez en México, los modelos *in vivo* para el cernimiento de fármacos antineoplásicos, mediante la adquisición y reproducción, en condiciones endogámicas, de las cepas isogénicas de ratón C57BL/6J y DBA/2J así como de los híbridos B6D2F1.

Capítulo 2

MATERIAL Y MÉTODOS

Fármacos.

Las casiopeínas III y IV fueron obtenidas por su ruta usual de síntesis (29). Se evaluó la pureza de los fármacos en cada lote en uso, por medio de puntos de fusión, conductividad, así mismo análisis elemental y espectrofotométrico. Conjuntamente se determinaron sus estabilidades en disolventes fisiológicamente aceptables. Los compuestos se disolvieron en solución salina. Cabe mencionar que para compuestos no solubles en agua o en soluciones fisiológicas, es necesario seleccionar un diluyente apropiado. Los diluyentes típicos empleados por el Cancer Chemotherapy National Service Center son:

a) Pequeñas cantidades de ácido (HCl 0.1 N) o un alcali (NaHCO₃, Na₂CO₃, NaOH). Luego se titula a pHs entre 4.5 y 9 si es posible.

b) Alcohol (95 %) o acetona diluidos con solución fisiológica salina o agua destilada. La concentración final del alcohol no debe exceder 2 % y la de acetona no debe exceder el 5 %.

c) Carboximetilcelulosa 0.5 % (CMC) en solución salina. La CMC debe tener una viscosidad promedio de 2,000 centipuas o más. Se puede obtener una suspensión uniforme por molido o uso de homogeneizadores o sonicadores.

d) Pueden ser usados aceite de oliva, aceite de cacahuate u otros vehículos cuando sea necesario. Compuestos inestables deben ser preparados inmediatamente antes de cada periodo de inyección.

Animales

Se adquirieron 20 hembras y 10 machos de la cepa isogénica C57BL/6J y la misma cantidad de animales de la cepa isogénica DBA/2J a los Laboratorios Jackson¹. Se colocaron en áreas de cuarentena dentro de la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química, UNAM, por un periodo de 2 semanas para su acondicionamiento, manteniéndolos en instalaciones convencionales ventiladas mediante la extracción e inyección forzadas de aire con 18 recambios/hora; el aire de recambio se filtra mediante filtros HEPA para partículas hasta de 3 µm. La temperatura se mantiene a 23° C ± 1°C y la

¹ Jackson Laboratories, Bethesda, Maryland, EUA

humedad relativa en 55% (21) Los ciclos de luz-oscuridad fueron de 12/12 horas. Se proporcionó una dieta especial para roedores y agua *ad libitum*, el agua fue filtrada por ósmosis inversa y acidificada hasta alcanzar un pH = 2.5 (22, 23).

Después de mantenerlos en observación 2 semanas, se comenzó su apareo en régimen bigámico (2 hembras/macho) alojándolos en jaulas de policarbonato tipo caja de zapato, que ofrecen un área de piso de 364 cm² y protegidos con filtros de poliéster tipo Kraft y en las condiciones ambientales ya mencionadas, formando así la colonia de “fundación”. Esta colonia permanece en un apareo de endogamia estricta ya que se continúa su apareo hermanos carnales entre sí (hxh).

Una vez establecida la colonia de fundación, se procedió al establecimiento de la colonia de “propagación” apareando individuos al azar, esto con la final de expandir la colonia para contar con un número suficiente de animales de experimentación. Con este mismo objetivo, fue que se procedió así mismo a obtención de la colonia híbrida B6D2F1.

Antes de comenzar los ensayos para evaluar actividad antineoplásica, es recomendable contar con información sobre la toxicidad del complejo. Para esto se llevó a cabo un experimento que permitió obtener, al menos, la dosis letal 50 aguda (DL50). Este dato hizo posible diseñar un experimento empleando dosis iniciales más cercanas a la óptima (9).

Los animales que se ocuparon tanto para el perfil farmacológico y toxicidad aguda como para la evaluación de la actividad antineoplásica, se alojaron en cuartos aislados diseñados especialmente para experimentación y bajo las mismas condiciones ambientales rigurosas señaladas con anterioridad.

Perfil Farmacológico y Toxicidad Aguda.

a. Perfil farmacológico en el ratón.

Con el propósito de conocer los efectos biológicos en el animal íntegro, el complejo se evaluó con el método de perfil farmacológico en el ratón. El producto se disolvió *in situ* en

un disolvente fisiológicamente compatible y se administró por vía intraperitoneal en dosis de

1, 3, 10, 30, 100 y 300 mg/kg. Se utilizaron 2 animales CD1 por dosis y de un solo sexo para todas las dosis. Las observaciones de mortalidad se llevaron a cabo a las 2, 6 y 24 Hrs después de la administración y se registró el número de muertos (24 y 25).

b. Toxicidad aguda.

Hecho lo anterior se escogieron 7 niveles de dosis por debajo de la que causó la muerte a los dos ratones del grupo y por encima de la que no causó muerte en ninguno de los dos ratones. Las dosis se inocularon intraperitonealmente (24 y 25). Se utilizaron ratones de un solo sexo de la línea exogámica CD1 con un peso de 25 a 30g, es decir, de alrededor de 10 semanas de edad, formando grupos de 10 ratones aplicando dosis diferentes a cada grupo.

La mortalidad de los animales se evaluó cada 24 Hrs durante 14 días y la DL50 se determinó con el número de animales de cada dosis que sobrevivieron hasta el día 14 y se calculó por el método de Litchfield y Wilcoxon (24 y 25) que se basa en la graficación de probit *Vs.* logaritmo de la dosis.

EVALUACIÓN PRIMARIA

Las líneas fueron adquiridas del "American Type Culture Collection"².

Medios de cultivo: la leucemia linfocítica L1210 fue cultivada con 90% de medio Fischer y 10 % de suero fetal bovino libre de antibiótico

El melanoma B16 y el carcinoma de pulmón LL se cultivaron en 90% de medio Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 4.5 g/l de glucosa y 10% de suero fetal bovino.

El sarcoma S180 en 95% de Eagle's MEM sin aminoácidos esenciales y 5% de suero fetal bovino.

² ATCC Catalogue of Cell Lines and Hybridomas, 7th edition, 1992. 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland 20852-1776, USA.

Una vez que se propagaron en número suficiente, se pasó a su cultivo *in vivo*; después de 2 pases de ratón a ratón, el modelo es apropiado para la experimentación como se describe a continuación.

LEUCEMIA LINFOIDE L1210.

Se implantó fluido ascítico en ratones B6D2F1, o CD2F1. El tratamiento comenzó 24 horas después de los implantes. Bajo condiciones normales, el sitio de inóculo para un cernimiento primario es intraperitoneal, y el parámetro a cuantificar es el tiempo de sobrevida (14, 15, 16.).

Animales

Propagación DBA/2J (o B6D2F1, o CD2F1 por una generación si DBA/2J no estuviera disponible).

Prueba: B6D2F1, (C57BL/6J * DBA/2J).

Peso: Con un peso mínimo de 18 g. para machos y 17 g. para hembras y un intervalo de peso de ± 3 g.

Sexo: Un sexo usado para todas las pruebas y animales control en un experimento.

Tamaño del experimento

Ensayo general: 6 animales por grupo experimental.

Transferencia del tumor

Implante: Inyección intraperitoneal (ip).

Tamaño del implante: 0.1 ml de fluido ascítico diluido conteniendo 10^5 células.

Tiempo de transferencia para propagación: Día 6 ó 7.

Tiempo de transferencia para prueba: Día 6 ó 7.

Plan de Prueba

Con objeto de validar el modelo tumoral se usa como control positivo el cisplatino:

Dosis Intermitente = 3 mg/kg./inyección.

Las Casiopeínas III y IV se administraron intraperitonealmente en una dosis qd4x3 tomando como día 0 el día del implante tumoral.

Se usó un grupo sin cáncer y con tratamiento para evaluar la toxicidad de las Casiopeínas III y IV.

Evaluación

Un valor de ILS (increase life span) inicial ≥ 25 es considerado como necesario para demostrar actividad. En el caso de valores menores, se suspende la evaluación.

Las medias del tiempo de vida se calculan por grupo y se da por terminado el experimento el día 30 considerando "curados" a los ratones vivos en ese día.

$$ILS = 100 * \frac{\text{media del tiempo de sobrevivida ratones tratados}}{\text{media del tiempo de sobrevivida ratones control}} - 100$$

MELANOMA B16.

El tumor homogenizado se implantó en forma subcutánea en ratones B6D2F1. El tratamiento inició 24 horas después del implante por vía intraperitoneal (14, 15, 16).

Animales

Propagación: Ratones C57BL/6J.

Prueba: Ratones B6D2F1 (C57BL/6J * DBA/2J).

Peso: Con un peso mínimo de 18 g para machos y 17 g para hembras y un intervalo de peso de ± 3 g.

Sexo: Un sexo usado para todas las pruebas y animales control en un experimento.

Tamaño del experimento

Ensayo general: 6 animales por grupo experimental.

Transferencia del tumor

Propagación: Se implanta un fragmento subcutáneo (sc) con una aguja de biopsia del No. 12 o se implanta tumor homogenizado cada 10-14 días en la región axilar con un pinchazo en la región inguinal.

Prueba: Extirpar el tumor subcutáneo alrededor del día 10-14.

Homogenizado: Mezclar 1 g de tumor con 10 ml de solución salina balanceada fría y homogeneizar e implantar 0.5 ml de éste tumor homogenizado ip o sc.

Fragmento: Un fragmento de 25 mg puede ser implantado sc.

Plan de Prueba

Con objeto de validar el modelo tumoral se usó como control positivo el 5-fluorouracilo: dosis crónica = 20 mg/kg./inyección o ciclofosfamida: dosis crónica = 50 mg/kg./inyección.

El límite inferior de ILS para un compuesto de control positivo debe ser ≥ 35 , una media aceptable de vida para un grupo control es de 14-22 días.

Se usó un grupo sin cáncer y con tratamiento para evaluar la toxicidad de los fármacos experimentales.

Bajo condiciones normales, el sitio del inóculo en esta evaluación es intraperitoneal, de ahí que las casiopéinas II y IV se administraron por esa vía diariamente durante 9 días.

El día 60 se sacrificó a todos los sobrevivientes y se evaluó el experimento.

Evaluación

Un valor de ILS ≤ -15 indica una prueba tóxica. Un ILS inicial ≥ 25 es considerado como necesario para demostrar actividad.

SARCOMA S180.

Se implantó intraperitonealmente líquido ascítico conteniendo las células sarcomatosas en ratones C57BL/6J. El tratamiento comenzó 24 horas después del implante por vía intraperitoneal (14, 15, 16).

Animales

Propagación: Ratones C57BL/6J.

Experimentación: Ratones C57BL/6J.

Peso: Con un peso mínimo de 18 g para machos y 17 g para hembras y un intervalo de peso de ± 3 g.

Sexo: Un sexo usado para todas las pruebas y animales control en un experimento.

Tamaño del experimento

Ensayo general: Seis animales por grupo experimental.

Transferencia del tumor

Implante: Inyección intraperitoneal.

Tamaño del implante: 0.1 ml de fluido ascítico diluido Conteniendo 10^6 células.

Tiempo de transferencia para propagación: Día 12 a 14.

Tiempo de transferencia para prueba: Día 12 a 14.

Plan de Prueba

Se usó como control positivo Cisplatino, empleando una dosis intermitente de 3 mg/kg./inyección. El límite inferior de ILS para un compuesto de control positivo debe ser ≥ 35 , una media aceptable de vida para un grupo control es de 14 a 22 días.

Bajo condiciones normales, el sitio del inóculo en esta evaluación es intraperitoneal. las casiopeínas de estudio se administraron de esta forma diariamente durante 9 días.

El día 60 se sacrificó a todos los sobrevivientes y se evaluó el experimento.

Evaluación

Se determinó ILS para todos los grupos experimentales con más del 65 % de sobrevivientes en el día 5. Un $ILS \leq -15$ indica un ensayo tóxico. Un ILS inicial ≥ 25 es considerado necesario para demostrar actividad.

CARCINOMA DE PULMÓN DE LEWIS LL.

El tumor homogenizado se implantó en forma subcutánea en ratones C57Bl/6J. El tratamiento inició 24 horas después del implante por vía intraperitoneal (14, 15, 16).

Animales

Propagación: Ratones C57Bl/6J.

Prueba: Ratones BDF1 (C57Bl/6J * DBA/2).

Peso: Con un peso mínimo de 18 g para machos y 17 g para hembras y un intervalo de peso de ± 3 g.

Sexo: Un sexo usado para todas las pruebas y animales control en un experimento.

Tamaño del experimento

Ensayo general: 6 animales por grupo experimental.

Transferencia del tumor

Propagación: Se implanta un fragmento sc con una aguja de biopsia del No. 12 o se implanta tumor homogenizado cada 10-14 días en la región axilar con un pinchazo en la región inguinal.

Prueba: Extirpar el tumor subcutáneo alrededor del día 10-14.

Homogenizado: Mezclar 1 g de tumor con 10 ml de solución salina balanceada fría y homogeneizar e implantar 0.5 ml de éste tumor homogenizado ip o sc.

Fragmento: Un fragmento de 25 mg puede ser implantado sc.

Plan de Prueba

Con objeto de validar el modelo tumoral se usó como control positivo el 5-fluorouracilo: dosis crónica = 20 mg/kg./inyección o ciclofosfamida: dosis crónica = 50 mg/kg./inyección.

El límite inferior de ILS para un compuesto de control positivo debe ser ≥ 35 , una media aceptable de vida para un grupo control es de 14-22 días.

Se usó un grupo sin cáncer y con tratamiento para evaluar la toxicidad de las drogas experimentales.

Bajo condiciones normales, el sitio del inóculo en esta evaluación es intraperitoneal, las casiopeínas II y IV se administraron en forma intraperitoneal diariamente durante 9 días.

El día 60 se sacrificó a todos los sobrevivientes y se evaluó el experimento.

Evaluación

Un valor ILS $\leq 85\%$ indica una prueba tóxica. Un ILS inicial ≥ 25 es considerado como necesario para demostrar actividad.

EVALUACIÓN SECUNDARIA

LEUCEMIA VIRAL FELINA (LVF)

Como la casiopéina III cubrió satisfactoriamente la evaluación primaria, se procedió a su evaluación secundaria empleando gatos seropositivos y con signología de LVF.

Desafortunadamente no existen signos típicos que sean comunes a todas las formas de la enfermedad causada por el FeLV. La clasificación de las enfermedades neoplásicas en la LVF se basa en el tipo celular que sufre transformación maligna. A su vez cada una es subclasificada con base en la localización de la lesión. Así pues, se emplearon gatos que presentaron cualquiera de las neoplasias producidas por el FeLV.

El diagnóstico de la LVF se basó en forma práctica, en los hallazgos clínicos y en los exámenes citológicos e histológicos de los tejidos y fluidos corporales así como la prueba de inmunoabsorción ligadas a enzimas (ELISA)³ para detectar al antígeno viral p27 en suero, plasma o sangre entera. El primer criterio de inclusión de los pacientes a este protocolo fue su seropositividad y un número de leucocitos $\geq 8,000/\text{mm}^3$.

Otros criterios de inclusión a este ensayo cubren los siguientes aspectos:

Gatos menores a 6 meses (Grupo A)

Gatos de 7 meses a 2 años (Grupo B)

Gatos de 2 a 8 años (Grupo C)

Posteriormente se les incluyó en un subgrupo conforme al estadio de avance de la enfermedad:

Fase I (historia de fiebre recurrente, anorexia, depresión, anemia leve).

Fase II (lo anterior más gangliomegalias, disnea, vómito, diarrea y palidez de mucosas).

Fase III (depresión total, postración, tumoración (no necesaria) y aumento de los signos ya descritos).

³ Kit "Snap Combo" para la detección del antígeno del virus de la leucemia felina y del anticuerpo contra el virus de la inmunodeficiencia felina. IDEXX Innovators In Diagnostics. IDEXX Laboratories Inc. One IDEXX Drive, Westbrook, Maine 04092 USA.

TRATAMIENTOS Y TAMAÑO DE LA MUESTRA.

Se utilizaron 5 gatos con edades de 1.5 a 8 años. Los gatos se evaluaron y se trataron con 1/4 de la DL50 aguda obtenida en ratones casiopeína III y el tratamiento se efectuó por vía intravenosa por medio de infusión continua (50ml/h). El tratamiento consistió en 6 aplicaciones del fármaco, una cada semana, no obstante esto podría modificarse en función de los parámetros sanguíneos que fueron valorados a lo largo del tratamiento.

METODOLOGÍA ESTADÍSTICA

Los resultados de sobrevida de los experimentos se evaluaron por medio de la prueba de Logrank, esta prueba fue seleccionada dado que permite comparar, de forma cuantitativa, la sobrevida de dos grupos diferentes (27, 31). Aunado a esta prueba se obtuvieron los índices de sobrevida (ILS = increase life span) en la evaluación primaria.

Capítulo 3

RESULTADOS

Fármacos

Las casiopeínas III y IV fueron obtenidas por su ruta usual de síntesis (29) y se les practicó un control pureza para cada lote de fármacos en uso por medio de, análisis elemental, espectrofotometría de infrarrojo, ultravioleta y visible (UV-Vis) (Cuadro 1 y Figs. 8-11). Se determinaron así mismo la estabilidad de las casiopeínas III y IV las siguientes soluciones:

Solución salina 0.9%

Solución dextrosada 5%

Solución Hartmann

Las casiopeína III permaneció estable 9 días en solución salina, 4 días en solución dextrosada y 3 semanas en solución Hartmann. La casiopeína IV sólo fue estable en solución dextrosada por un periodo de 9 días aproximadamente. En función de estos resultados se decidió el empleo de solución dextrosada preparando la disolución al momento de su empleo para todos los experimentos.

	Peso Molecular	Análisis elemental teórico	Análisis elemental experimental	Coefficiente de extinción (moles/litro)	% de Pureza
Casiopeína III $C_{17}H_{19}N_3O_5Cu$	408.5	%C 49.94 %H 4.65 %N 10.18	%C 49.89 %H 4.81 %N 10.67	58.92	99
Casiopeína IV $C_{14}H_{15}N_4O_5Cu.H_2O$	400.5	%C 42.98 %H 4.29 %N 14.16	%C 42.20 %H 4.41 %N 14.30	60.33	99

Cuadro 1. Resultados Analíticos de las Casiopeínas III y IV

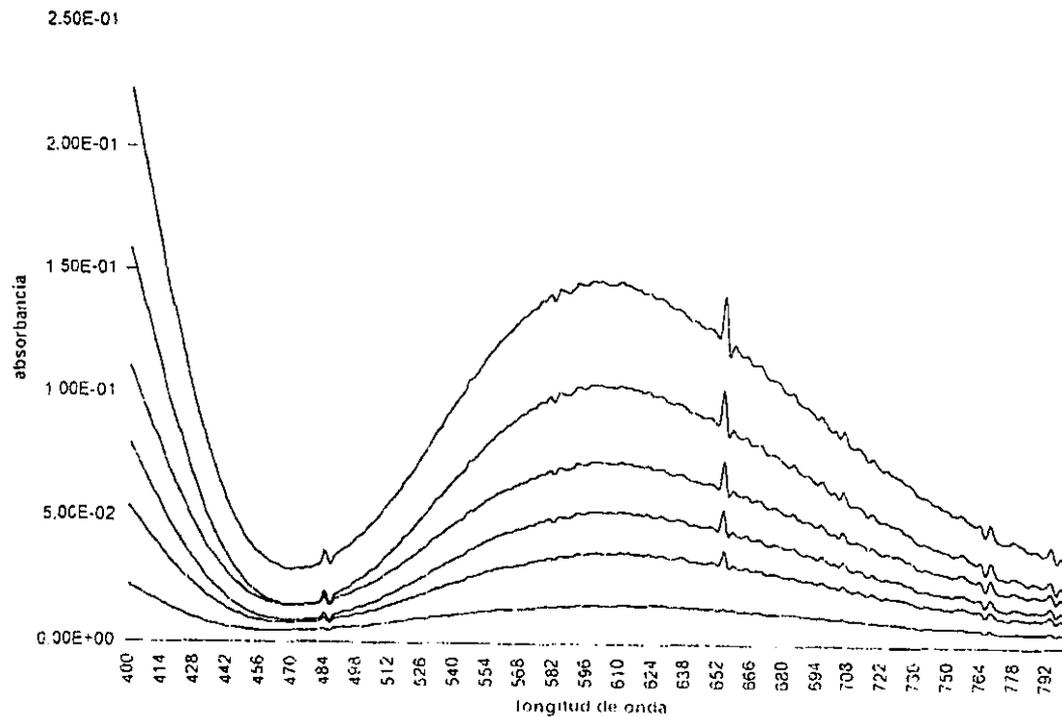


Figura 8. Espectro Electrónico de la caseína III en agua.

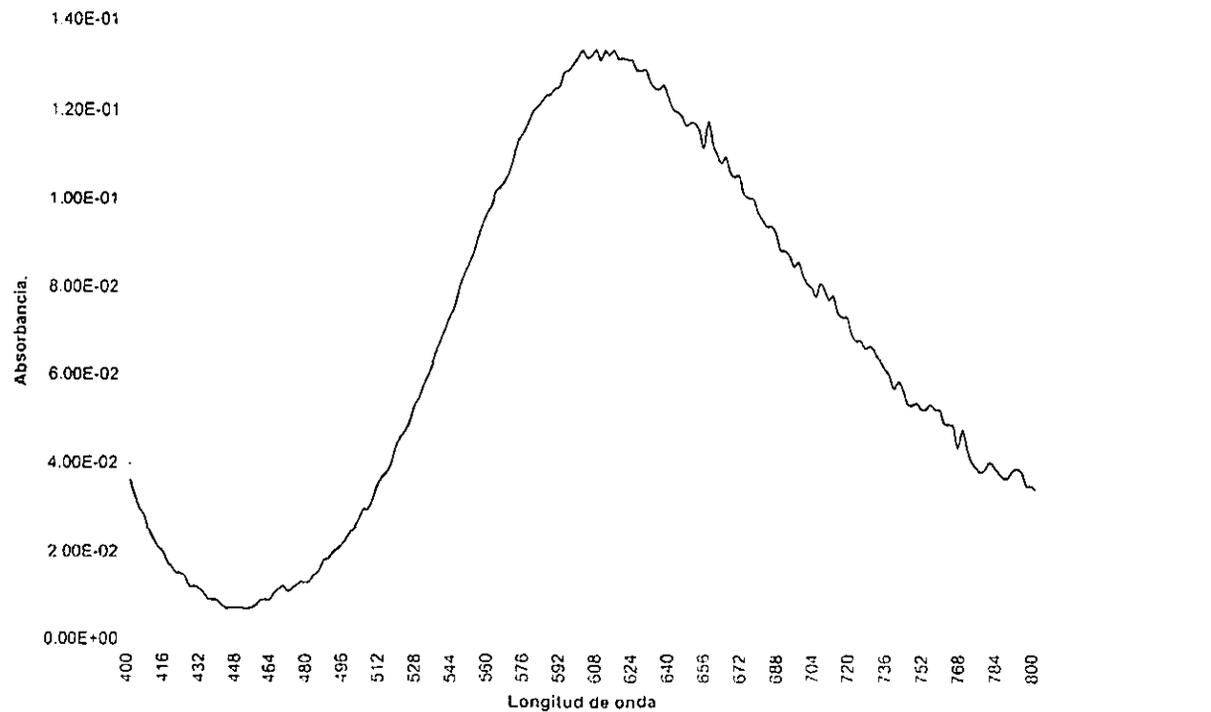


Figura 9. Espectro Electrónico de la casiopeína IV en agua.

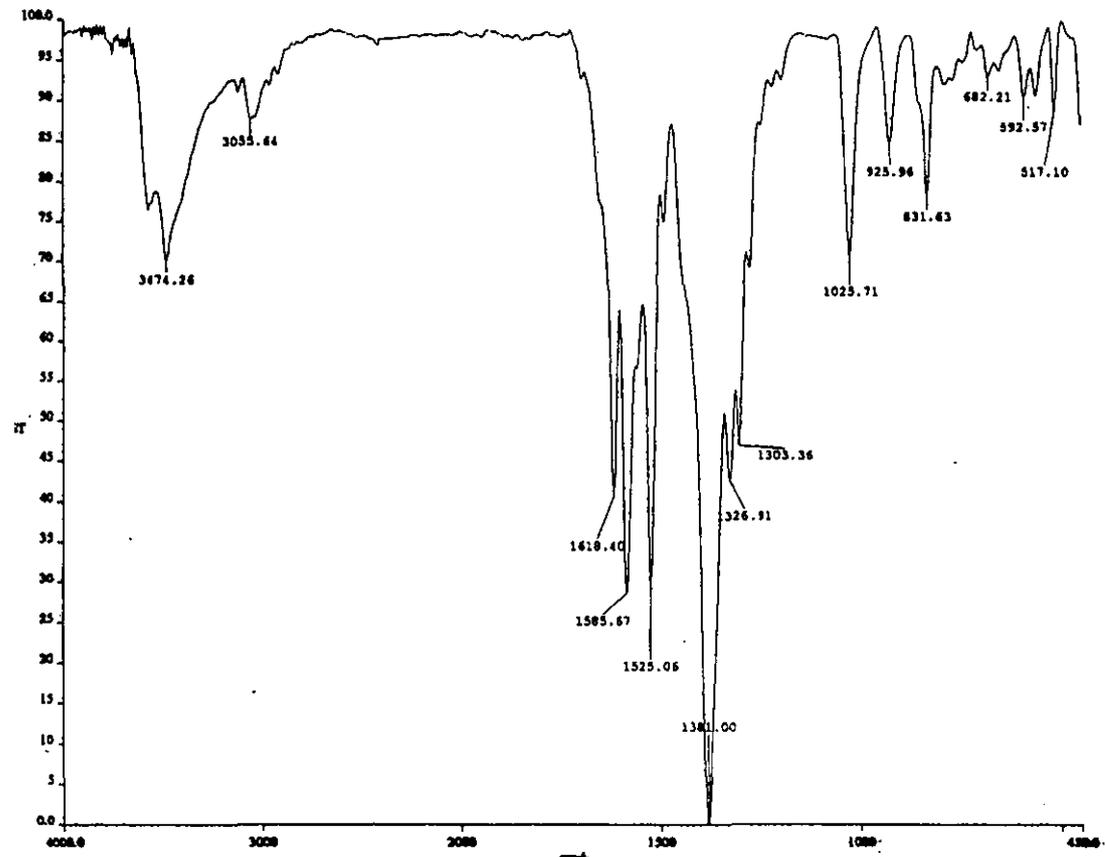


Figura 10. Espectro infrarrojo de la casiopeína III

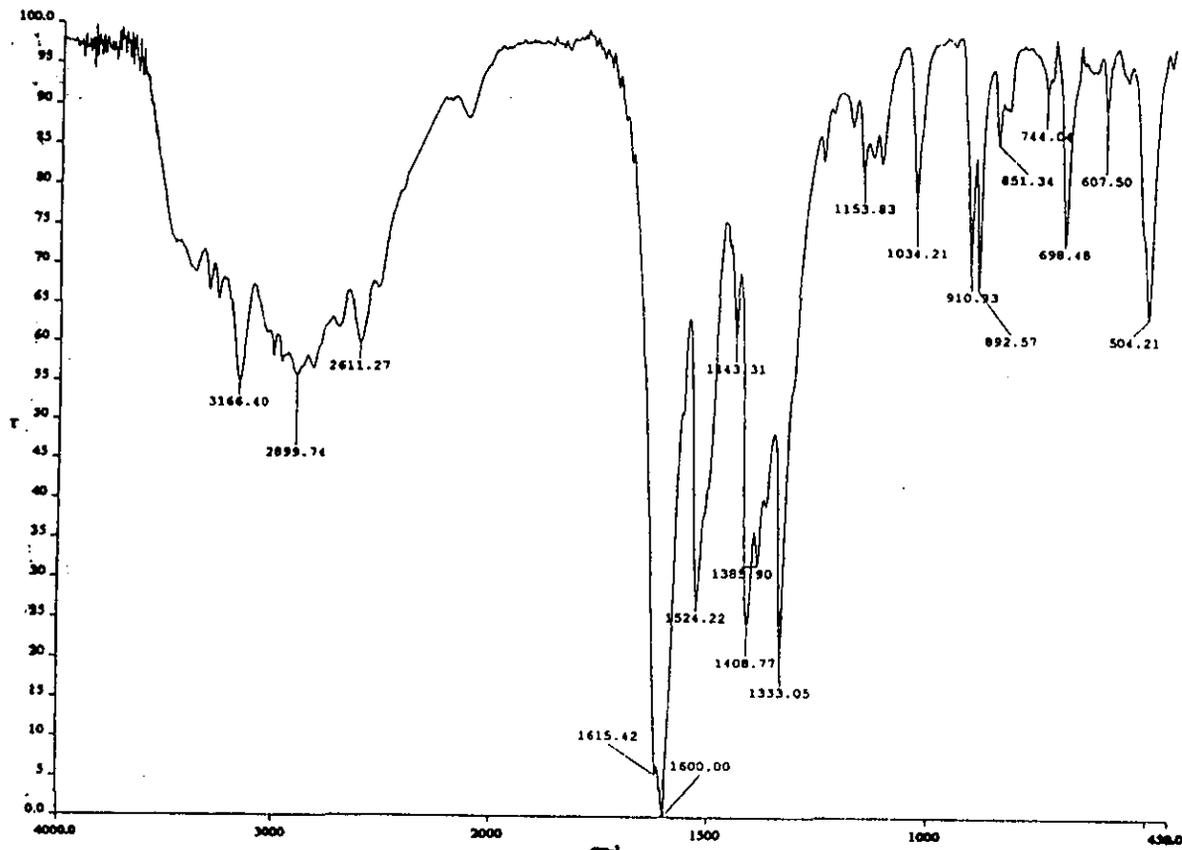


Figura 11. Espectro infrarrojo de la caseína IV.

Reproducción de cepas singénicas

Se logró la obtención de las cepas C57BL/6J, DBA/2J y de sus híbridos en condiciones isogénicas, manteniéndose estas cepas hasta la fecha en la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química. Por la baja fertilidad y fecundidad de las cepas homocigóticas se decidió obtener los híbridos. En las figuras 12-14 se presentan las variables reproductivas de estas cepas.

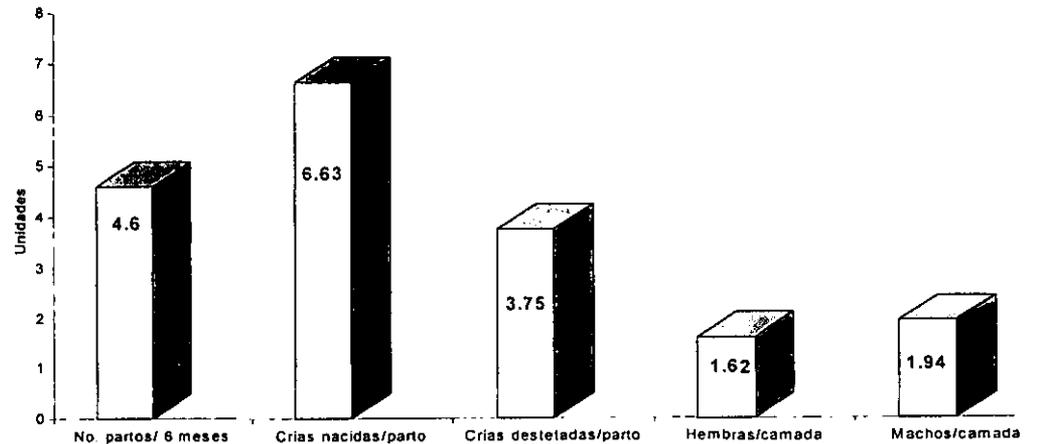


Figura 12. Parámetros reproductivos promedio de la cepa C57BL/6J

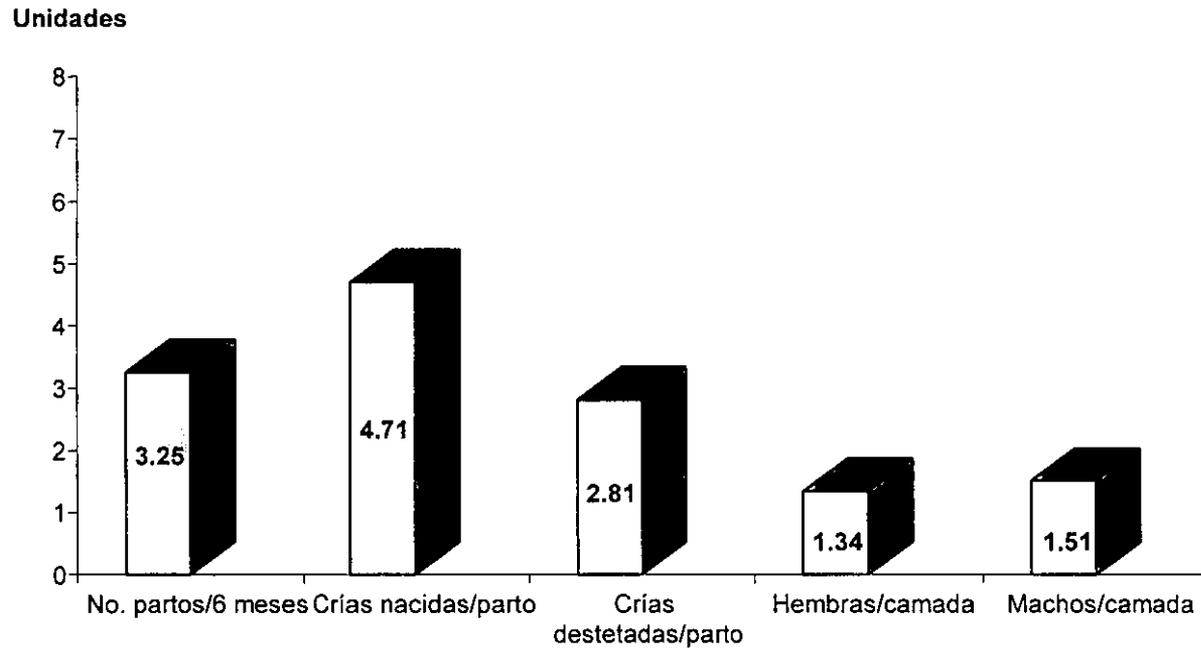


Figura 13. Parámetros reproductivos promedio de la cepa DBA/2J

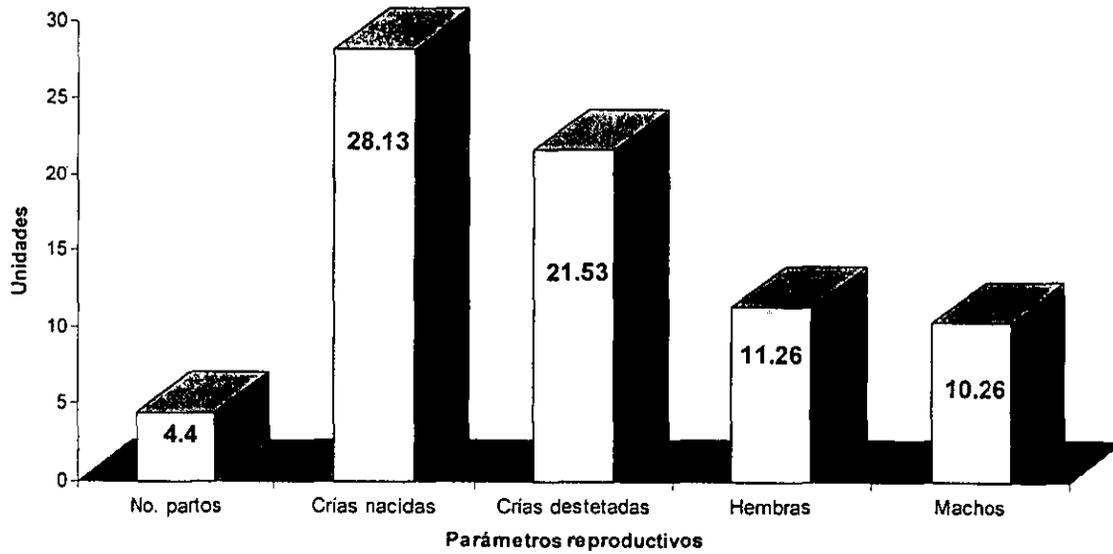


Figura 14. Parámetros reproductivos promedio de la híbridos B6D2F1

Perfil Farmacológico y Toxicidad Aguda

CASIOPEÍNA III

El perfil farmacológico mostró que las dosis letales se encuentran entre 10 y 30 mg/kg de peso corporal.

En el ensayo de toxicidad aguda en ratones, se encontró que la Dosis Letal 50 aguda (DL50) por vía intraperitoneal de la Casiopeína III es de 11.54 mg/kg. (Véase cuadro 2).

DL50 aguda = 11.54 mg/Kg	Límite Inferior = 10.25 mg/Kg	Límite superior = 12.82 mg/Kg
DL90 aguda = 13.43 mg/Kg	Límite inferior = 12.10 mg/Kg	Límite superior = 18.09 mg/Kg

Cuadro 2. Dosis letal 50 aguda intraperitoneal de la casiopeína III en ratones.

CASIOPEÍNA IV

El perfil farmacológico mostró que las dosis letales se encuentran entre 10 y 30 mg/kg de peso corporal.

Mientras que para la Casioipeína IV, en el ensayo de toxicidad aguda en ratones, se encontró que la Dosis Letal 50 aguda (DL50) por vía intraperitoneal es de 13.13 mg/kg. (Véase cuadro 3).

DL50 aguda = 13.12 mg/Kg	Límite Inferior = 10.82 mg/Kg	Límite superior = 15.51 mg/Kg
DL90 aguda = 17.88 mg/Kg	Límite inferior = 14.88 mg/Kg	Límite superior = 29.68 mg/Kg

Cuadro 3. Dosis letal 50 aguda intraperitoneal de la casiopeína IV en ratones.

Crecimiento *in vitro* de las líneas tumorales murinas L1210, S180, B16 y LL

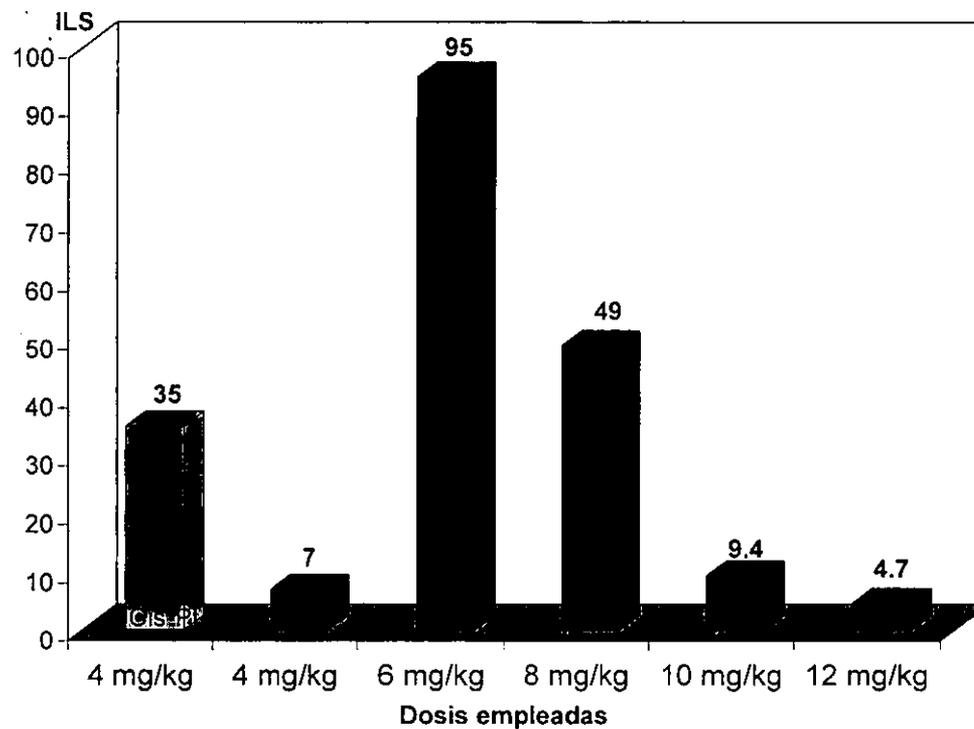
Características de crecimiento: Un inóculo de $1-2 \times 10^5$ células viables/ml en los medios de cultivo, ya mencionados, se multiplica aproximadamente de 10 a 15 veces en 7 días a 37° C en atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de O₂.

Crecimiento *in vivo* de las líneas tumorales murinas L1210, S180, B16 y LL

Una vez que se logró el cultivo *in vitro*, se procedió al implante y propagación de estas líneas *in vivo*. Después de 2 pases de ratón a ratón, las líneas se hallan adaptadas para comenzar la evaluación de la actividad antineoplásica de las casiopeínas III y IV.

Evaluación Primaria con la casiopeína III

Los resultados se pueden apreciar en la figura 15, 16 y 17 donde se muestran las sobrevividas de los diferentes grupos:



Esquema de tratamiento intermitente los días 1, 5 y 9 del experimento por vía intraperitoneal

Figura 15. Índice de sobrevida con la casiopeína III en leucemia linfoide L1210.

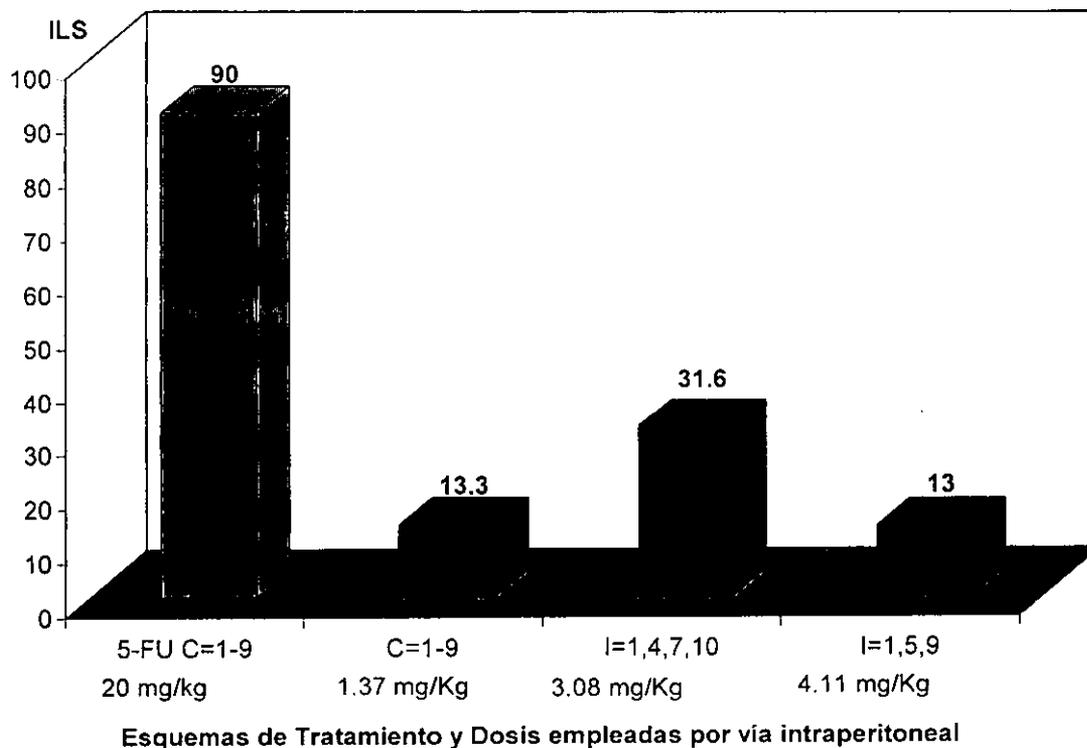
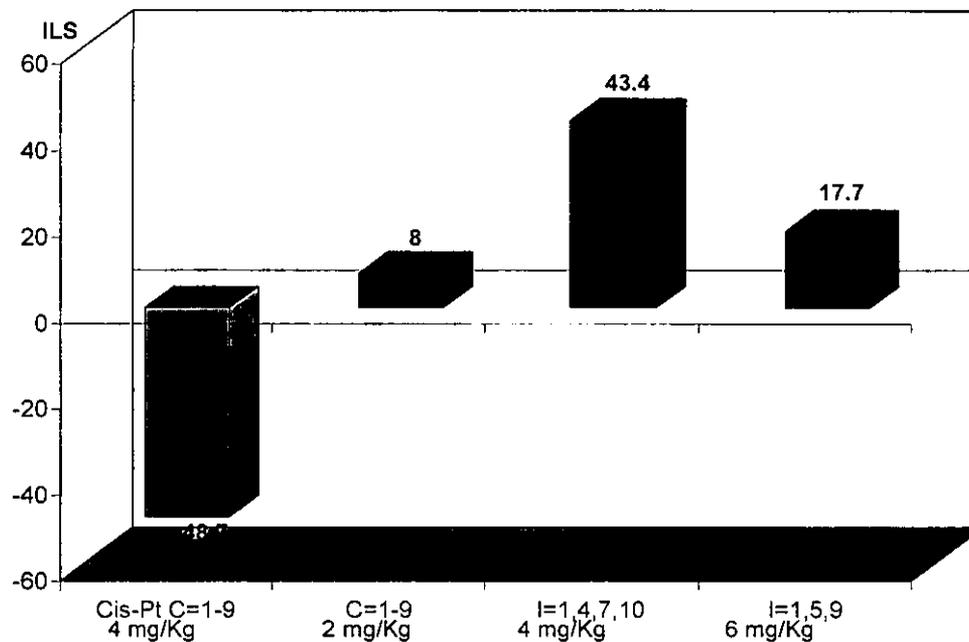


Figura 16 Índice de sobrevida con la casiopeína III en Melanoma B16.



Esquemas de Tratamiento y Dosis empleadas por vía intraperitoneal

Figura 17. Índice de sobrevida con la casiopeína III en Sarcoma 180.

Evaluación Primaria con la casiopéina IV

Los resultados se puede apreciar en la figura 18, 19 y 20 donde se muestran las sobrevidas de los diferentes grupos:

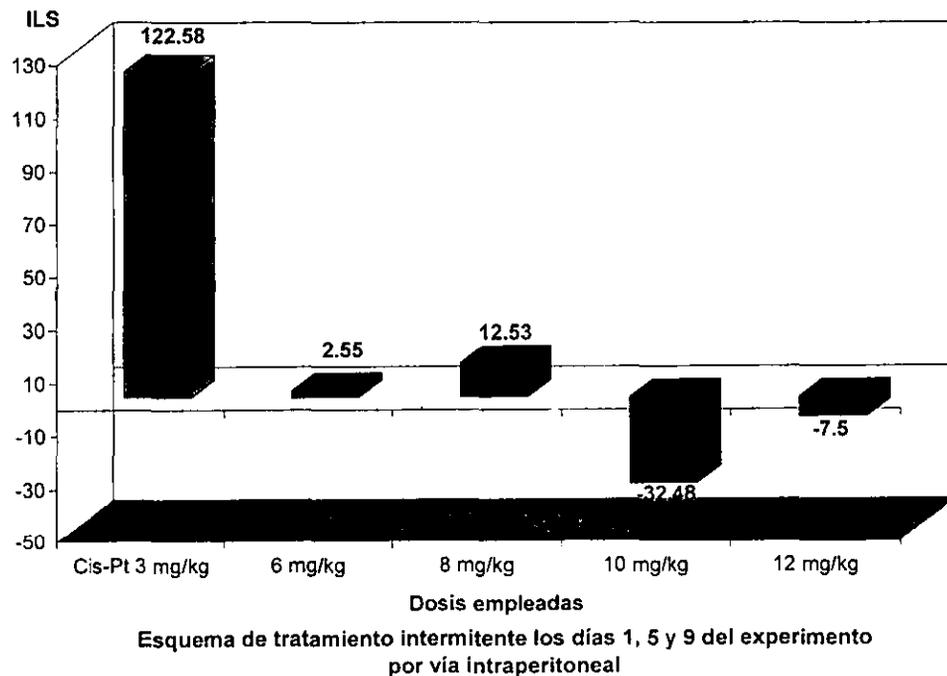


Figura 18. Índice de sobrevida con la casiopéina IV en Leucemia Linfoide L1210.

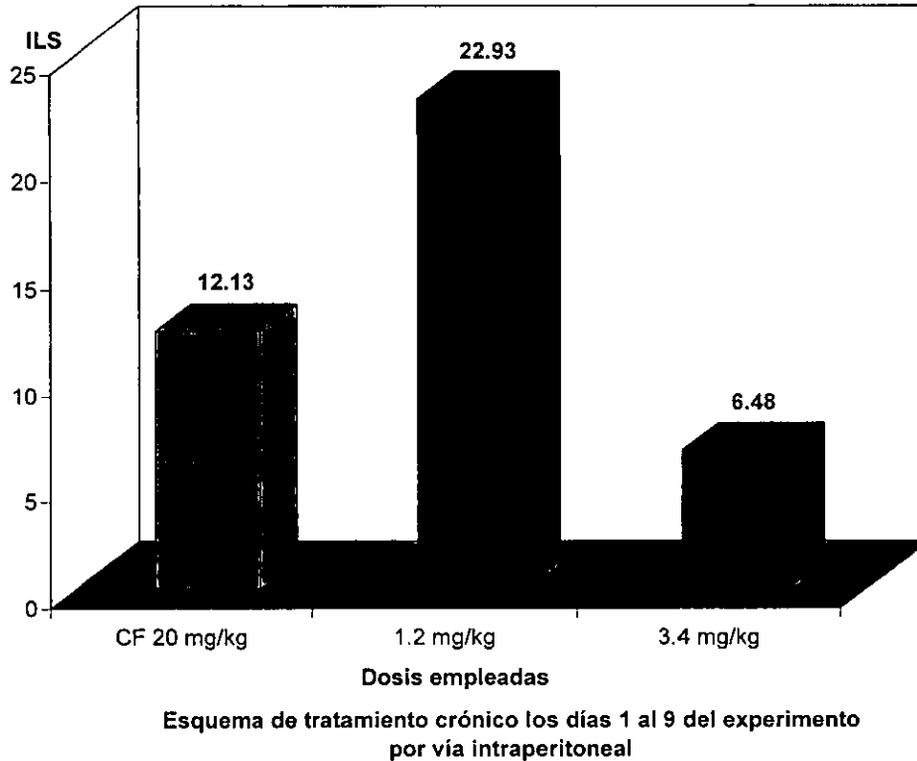


Figura 19. Índice de sobrevida con la casiopeína IV en Melanoma B16.

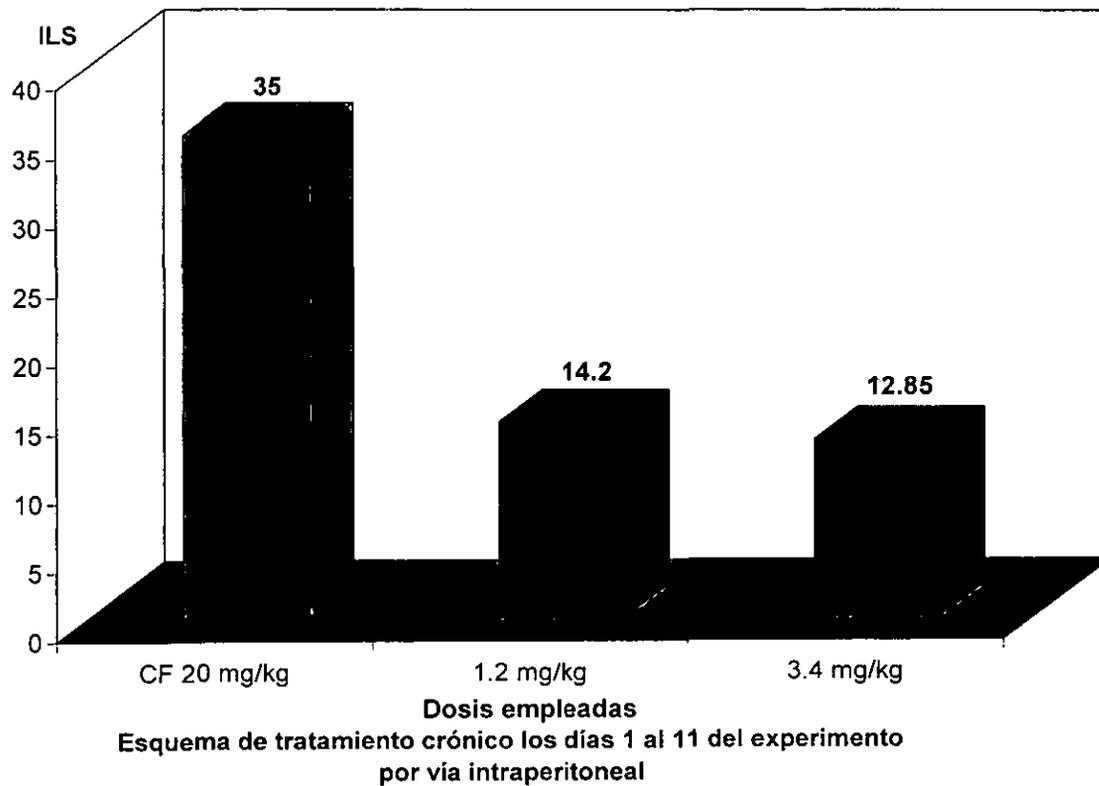


Figura 20. Índice de supervivencia con la caseopecina IV en Carcinoma de Pulmón de Lewis I.L.

Análisis de sobrevida de Logrank con la casiopeína III

La casiopeína III en leucemia linfóide L1210 mostró sobrevidas diferentes ($P < 0.05$) a los otros grupos con la dosis de 6 mg/kg, ya que la sobrevida de este grupo fue mayor.

En el melanoma B16 todos los grupos difieren entre sí ($P < 0.05$) con excepción de los grupos tratados con casiopeína de forma intermitente (qd3x4) y el control tratado con 5-fluoruracilo (5-FU) siendo mayor la sobrevida en estos 2 grupos.

En el sarcoma S180 el grupo tratado con Cisplatino fue diferente a todos los grupos ($P < 0.05$) dado que incluso vivió menos que el grupo no tratado. No hubo diferencias significativas ($P < 0.05$) en la sobrevida de los grupos tratados con casiopeína III y el grupo no tratado, con excepción del grupo testigo, que recibió casiopeína pero no el implante tumoral.

Análisis de sobrevida de Logrank con la casiopeína IV

En la leucemia linfóide L1210 el único grupo que mostró sobrevidas mayores a los demás grupos ($P < 0.05$) fue el control positivo (Cisplatino).

En el melanoma B16 el grupo que mostró una sobrevida significativamente mayor a los demás grupos fue el tratado con 1.2 mg/kg de casiopeína IV.

En el carcinoma de pulmón de Lewis LL no hubo evidencia estadística para afirmar que existe diferencia entre el control negativo (con tumor y sin tratamiento) y los grupos tratados con casiopeína IV.

Evaluación secundaria empleando como modelo la Leucemia Viral Felina (LVF).

Se consideró que sólo la casiopeína III mostró actividad suficiente para usarla como tratamiento en la LVF.

La reseña de los pacientes se detalla en el Cuadro 4, en el cual se describe la edad, peso y fase en la que se clasificó de acuerdo al modelo ya explicado en material y métodos.

GATO	EDAD	SEXO	PESO	FASE
1	4 años	macho	4.5 Kg.	Fase II
2	8 años	hembra	4.0 Kg.	Fase III
3	6 años	macho	4.9 Kg.	Fase III
4	3 años	hembra	4.1 Kg.	Fase I
5	1.5 años	macho	4.3 Kg.	Fase I

Cuadro 4. Reseña de la evolución de los gatos con Leucemia Viral Felina

Una vez realizado el diagnóstico y la valoración del paciente se inició con el tratamiento de quimioterapia empleando la CASIOPEINA III, según la dosis establecida en ratón (3 mg/Kg de peso). La dosis total del fármaco fue diluida en 50 ml. de solución salina al 0.9% y se administró por vía intravenosa en infusión continua en un tiempo de 1 hora.

El tratamiento consistió en seis aplicaciones, una cada semana.

En los gatos que presentaron linfoma, éste persistió no obstante la cuenta leucocitaria total mostró un descenso muy marcado (Figura 21).

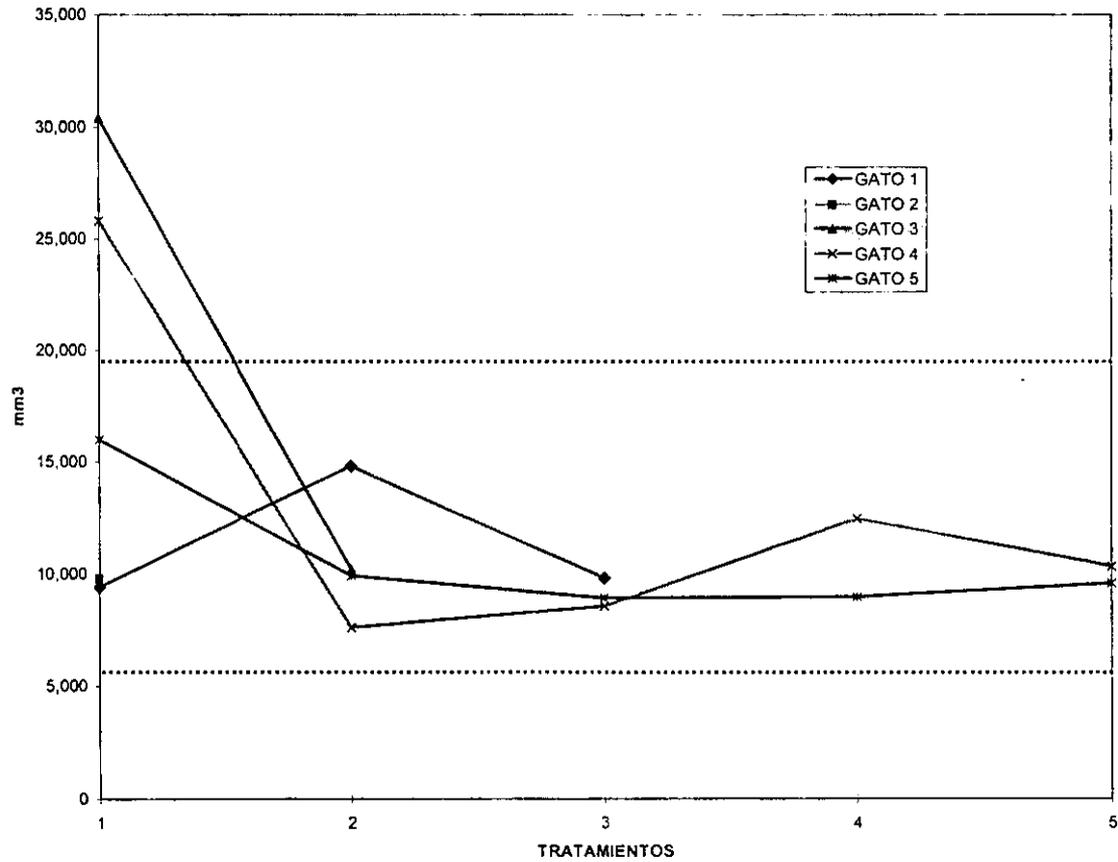


Figura 21. Cuenta Leucocitaria Total

En el gato 1, se detectó *Haemobartonella felis* durante el tercer tratamiento y se le excluyó del protocolo; los gatos 2 y 3 fallecieron durante el proceso del tratamiento.

En las figuras 22, 23, 24 y 25, se resumen las tendencias hematológicas a la aplicación de la Casiopeína III, en contraste con la baja significativa de leucocitos totales, no se detectaron alteraciones importantes en los valores de la estirpe roja.

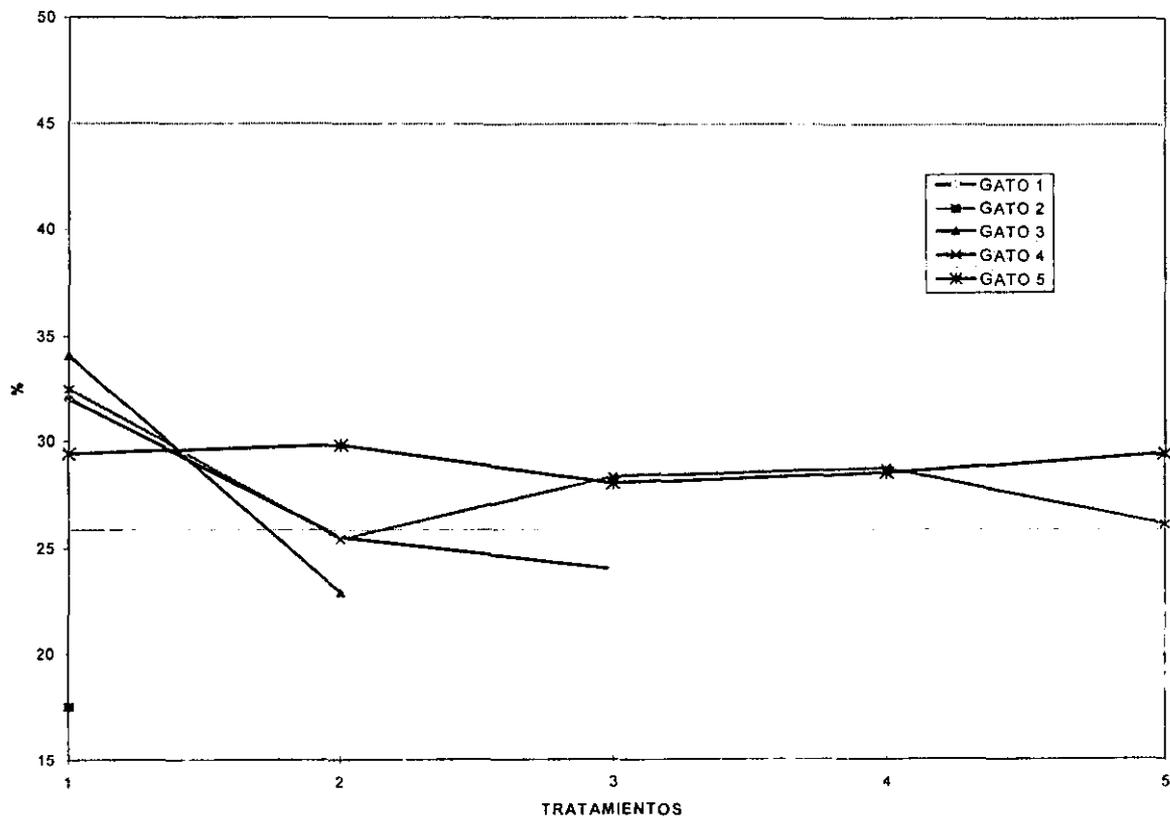


Figura 22. Hematocrito

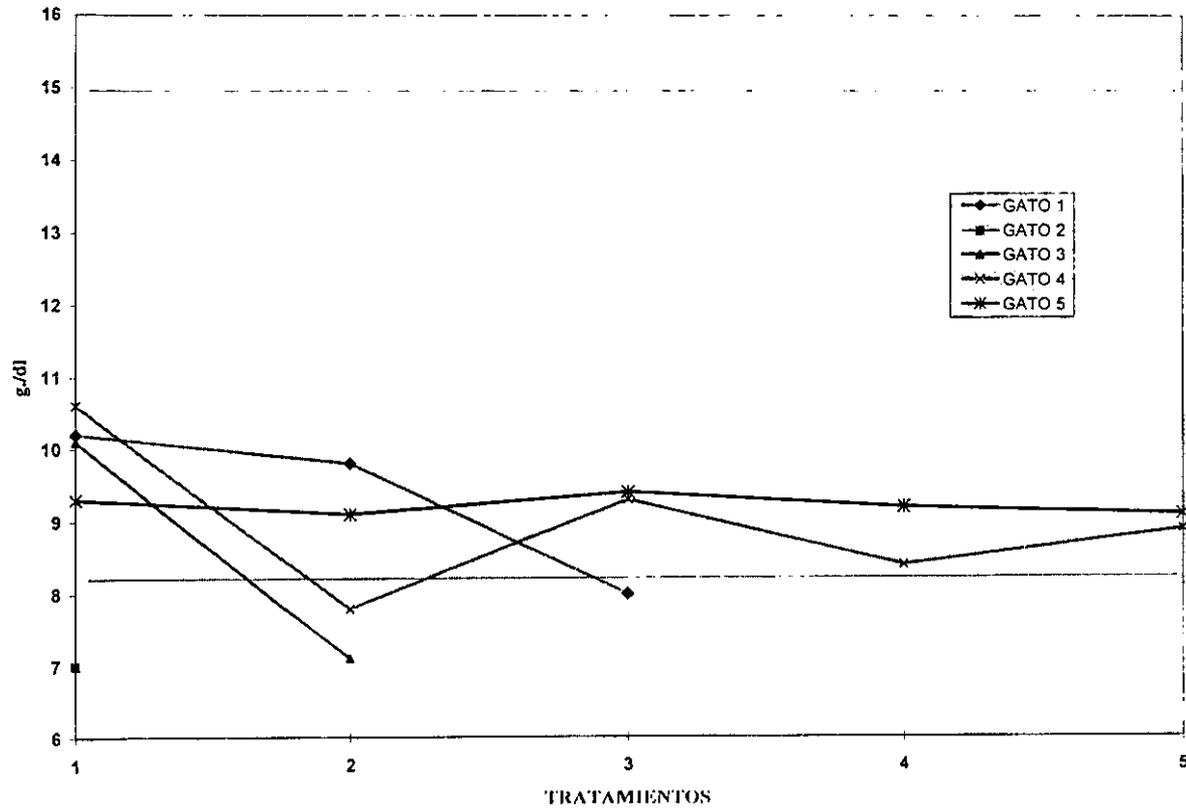


Figura 23. Hemoglobina

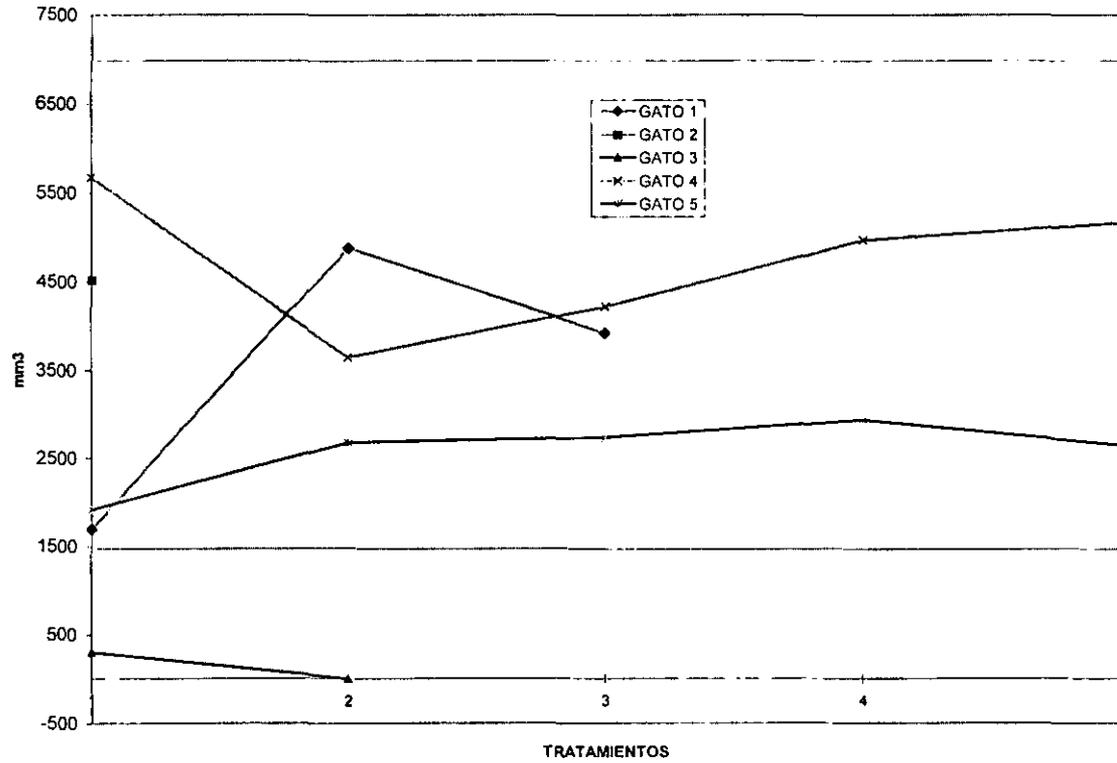


Figura 24. Linfocitos

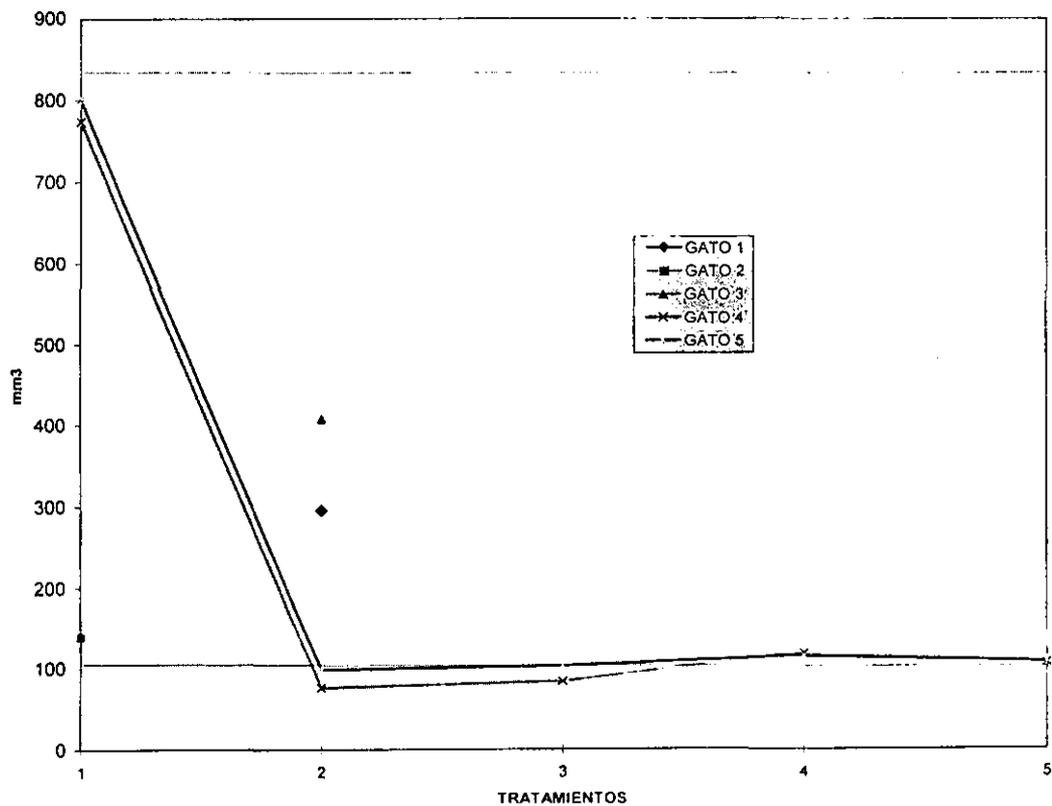


Figura 25. Monocitos

En las Figs. 26, 27, 28 y 29 se muestran los valores de química sanguínea, específicamente los perfiles hepático y renal.

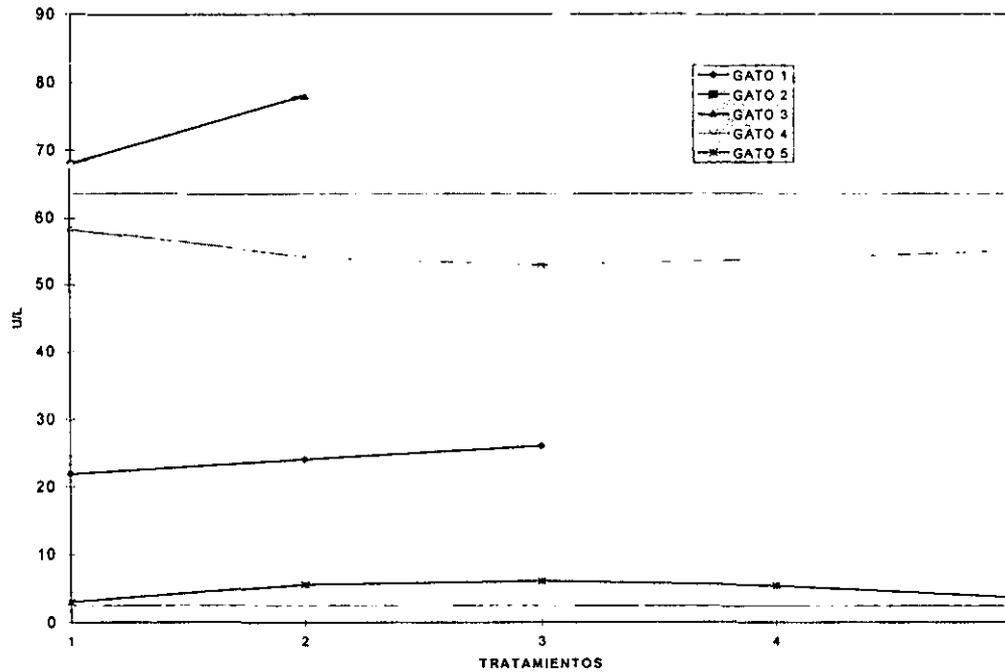


Figura 26. Alanino Amino Transferasa

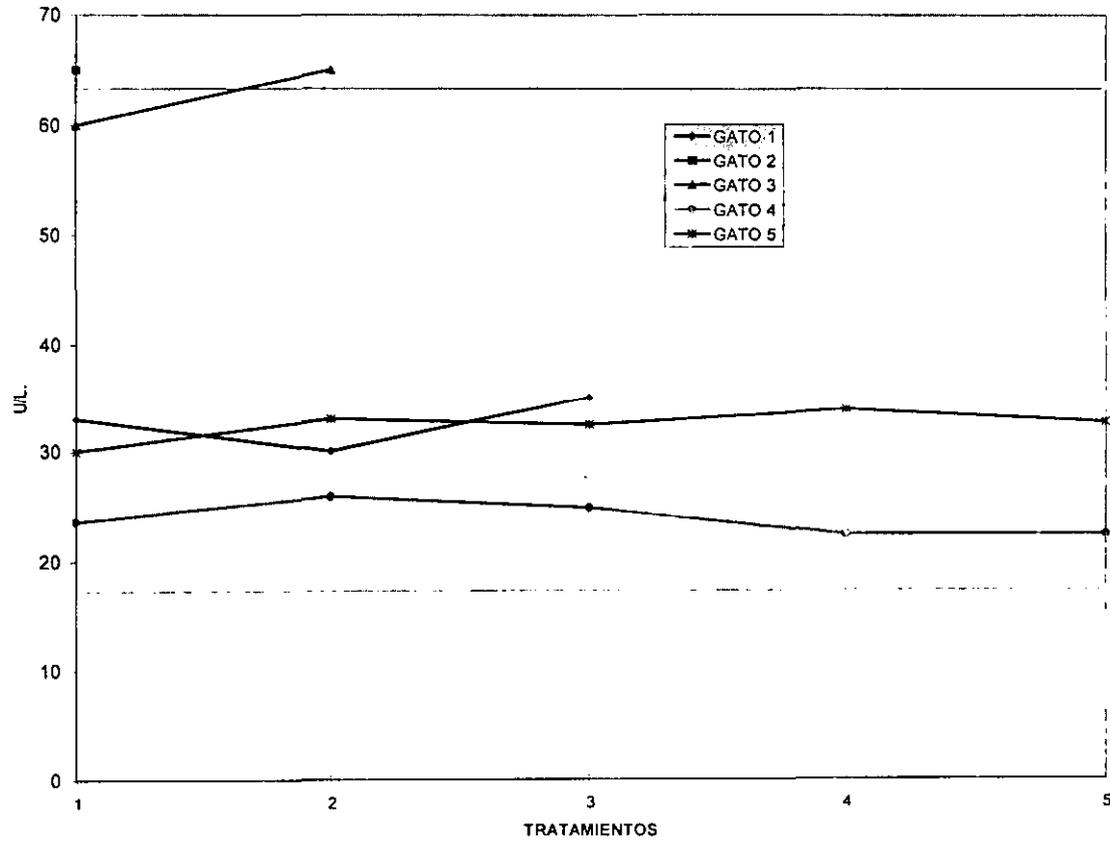


Figura 27. Fosfatasa Alcalina

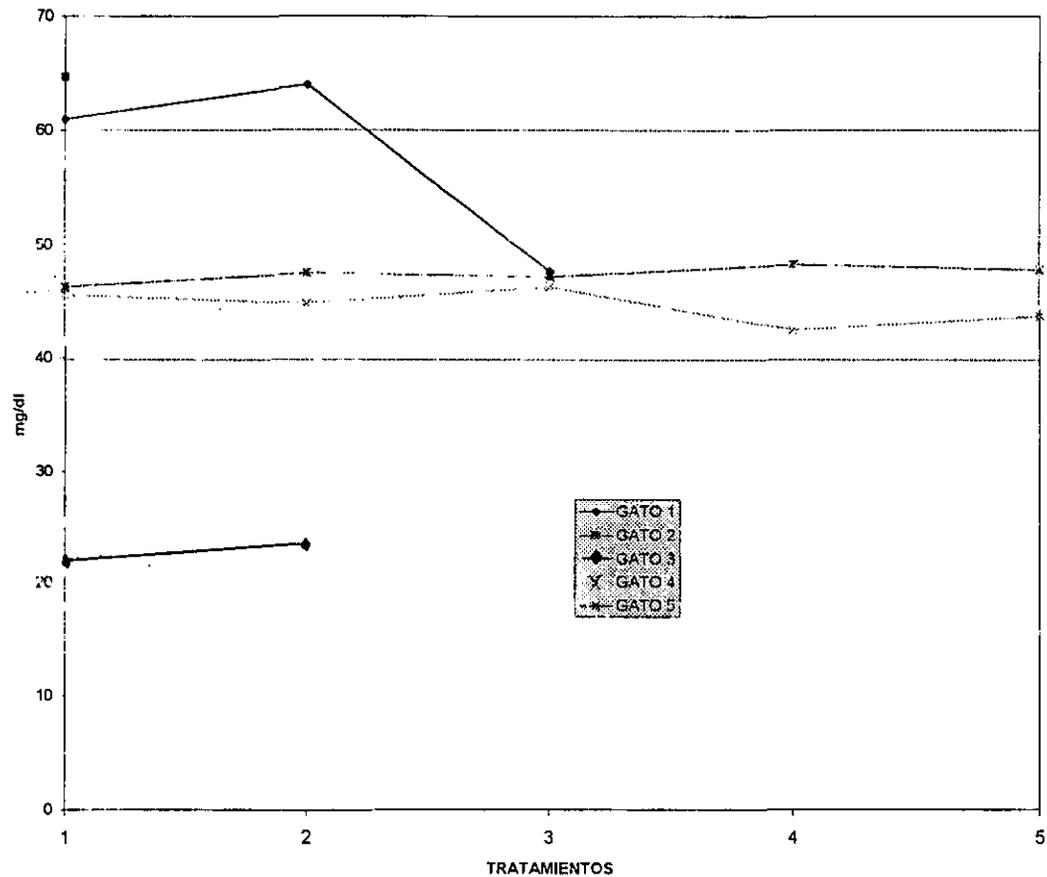


Figura 28. Urea

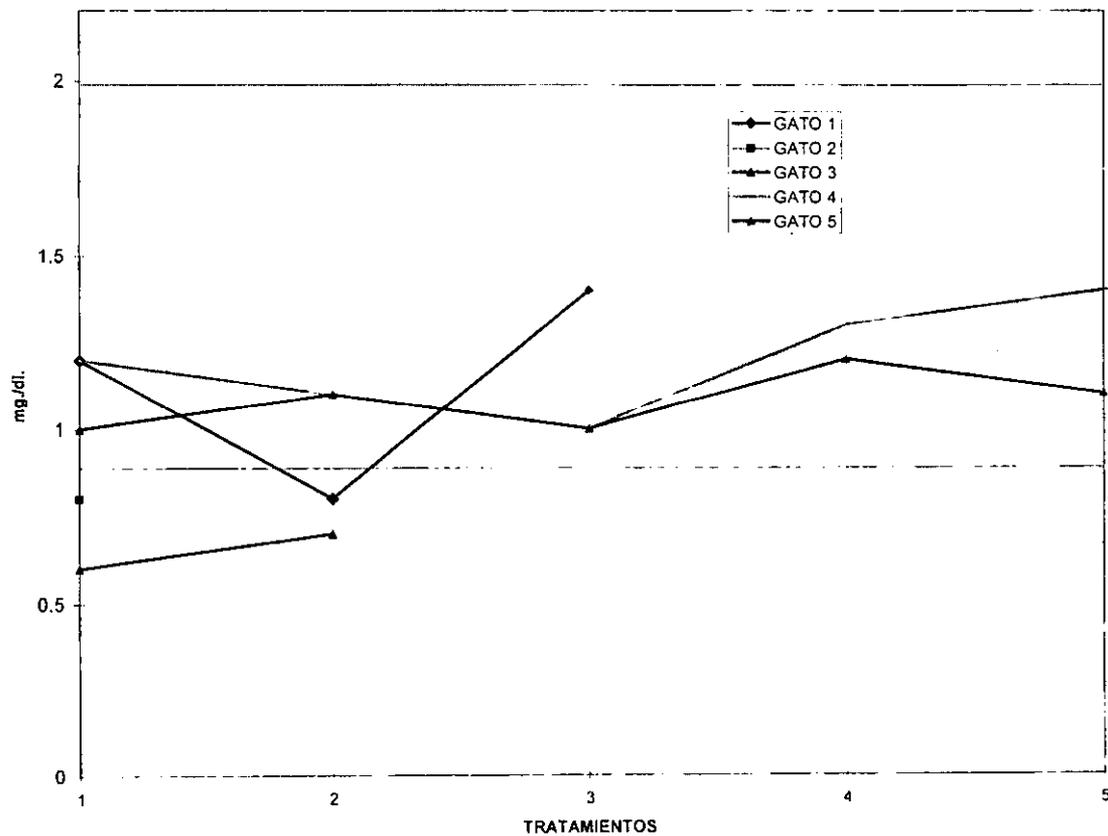


Figura 29. Creatinina

Capítulo 4

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En México no existen antecedentes escritos sobre la instauración de la metodología para realizar cernimientos sobre medicamentos que tengan un potencial anticancerígeno. De hecho, después de una búsqueda en los acervos de informática de la Universidad Nacional Autónoma de México, las únicas publicaciones en este sentido presentan como sede la Facultad de Química y aun no se les ha liberado para su publicación internacional por protección a la patente. No obstante, la metodología se encuentra perfectamente establecida en la literatura (14, 15, 16) y en la medida de lo posible ha sido reproducida en este ensayo.

Un primer paso que debe resguardarse meticulosamente es la obtención del producto a probar, en este caso las casiopeína III y IV. La reacción patentada y sus controles (29) ofrecen una pureza química de las casiopeínas mencionadas de aproximadamente 99%, lo que supera en mucho a la gran mayoría de los agentes quimioterapéuticos no sintéticos y aun a algunos de los sintéticos. La estabilidad de estos productos permitió un intervalo de síntesis de años dado que en su forma cristalina son muy estables (29). En solución, utilizando como vehículo solución dextrosada al 5% y en refrigeración, ambas casiopeínas fueron utilizadas en intervalos no mayores a una semana.

Por su parte, las líneas tumorales utilizadas (L1210, B16, S180 y LL) fueron obtenidas del *American Type Culture Collection* (ATCC), institución que no garantiza la pureza de las líneas ni la repetibilidad de los ensayos. En este ensayo se puede considerar como un éxito el haber logrado, a través de su implantación en animales isogénicos, la depuración de las líneas celulares y posteriormente la repetibilidad de su comportamiento en los ratones prueba. Por su parte los receptores (ratones B6, D2 y B6D2F1) fueron elegidos y mantenidos en condiciones ideales de bioterio (21) por su elevado coeficiente de endogamia (98.7%), lo que garantiza una variación biológica muy baja y permite calificar o descalificar con precisión un fármaco en este sistema de cernimiento. Es necesario el rigor de las condiciones mencionadas, en virtud de que la variable que determina si un agente anticancerígeno potencial merece o no ser estudiado, es el tiempo de supervivencia, mismo que puede ser afectado notablemente si la longevidad de la cepa es variable, si la línea

tumoral no está depurada o si las condiciones de alojamiento no son las ideales. De tal suerte, la implantación de una dosis de células tumorales brindó una supervivencia de 12 días con una variabilidad de 12-24 Hrs. De acuerdo con el NCI, si dicha supervivencia supera un 125% el fármaco en evaluación merece estudios posteriores. Solamente la casiopeína III logró brindar una supervivencia tal que ameritara más estudios. (Véase Fig. 17).

Para dar una dimensión adecuada al hecho de haber obtenido un medicamento con potencial anticancerígeno, vale la pena hacer la siguiente reflexión. Una empresa farmacéutica de talla internacional genera por lo menos 1,000 moléculas que se pueden estudiar al año, de ellas, sólo un 10% llega a pasar las fases iniciales del desarrollo farmacéutico y quizá sólo una pueda soportar el rigor de las pruebas que se exigen para desarrollo farmacéutico y llegar al mercado (30). Se ha calculado que para que un medicamento llegue al mercado se requieren de 7 a 10 años y aproximadamente de 50 a 100 millones de dólares (30). En su caso, las casiopeínas fueron generadas, sintetizadas y puestas a prueba, con un presupuesto infinitamente inferior al mencionado. El hecho de haber encontrado actividad en una de las casiopeínas, de las dos probadas, representa un hallazgo que muchos persiguen por muchos años, quizá por toda una vida.

La casiopeína III brindó tasas de supervivencia superiores a las requeridas como mínimas por el NCI en todos los tumores tratados. En particular el índice de sobrevivencia para la leucemia linfoide L1210 fue de 95, esto es, los animales vivieron aproximadamente el doble de su máximo nivel de sobrevivencia sin tratamiento. Con estos datos y en función de la notable eficacia de la casiopeína III contra la leucemia, se consideró de importancia intentar el tratamiento de la leucemia viral felina, tanto por el probable éxito que tuviese en el tratamiento de una enfermedad hasta ahora incurable, como por la proyección que estos resultados pudieran dar a la casiopeína en el tratamiento de problemas similares en el hombre.

La LVF es una enfermedad tumoral generada por retrovirus que presenta algunas peculiaridades relevantes para la evaluación de la eficacia clínica de un compuesto de las características de la casiopeína III. De los animales infectados con el retrovirus, sólo un 30% manifiesta signos clínicos que denotan una enfermedad grave. Un 5% de los animales tienen una remisión espontánea y la mortalidad dentro del 25% restante es del 100% (17, 18). De tal suerte que, los animales que presenten una prueba positiva (ELISA), tendrán una alta probabilidad de morir, quizá del 99%.

Aunque la muestra de gatos tratados no fue del tamaño necesario como para asegurar que existe una eficacia evidente, los resultados obtenidos y el análisis de cada caso en particular, permiten postular que la casiopeína III es un medicamento con un enorme potencial en esta y otras enfermedades relacionadas o producidas por retrovirus.

Probablemente es muy prematuro postular utilidades adicionales para la casiopeína III, pero en farmacología se debe mantener un criterio amplio y cauto al mismo tiempo. Por ejemplo: difícilmente se llegó a pensar que el ácido acetil salicílico pudiera servir para algo más que disminuir la fiebre. Más de 100 años después, este fármaco se usa en microdosis para aumentar el tiempo de coagulación en pacientes con cardiopatía tromboembólica. Por analogía, es necesario mantener una visión amplia acerca del uso de las casiopeínas en general y en especial de la casiopeína III.

Es importante señalar que el efecto citotóxico de la casiopeína III representa un reto de toxicidad para cualquier especie. No obstante y paradójicamente, las determinaciones de los perfiles hepáticos, pancreáticos y renales mostraron una toxicidad muy baja o inexistente en gatos, una de las especies más susceptibles a presentar reacciones adversas.

De tal suerte, los estudios realizados en esta disertación permiten postular a la casiopeína III como un medicamento de potencial curativo para una enfermedad sin cura como la LVF y abren una gama de posibilidades para otras enfermedades causadas por retrovirus. Al igual que en otras investigaciones, esta evaluación cuenta con la fortuna de haber obtenido resultados positivos para uno de los agentes, y una vez resolviendo los

problemas inherentes a la presentación farmacéutica, resta realizar un estudio clínico multicéntrico para determinar el valor de la casiopeína III en la clínica.

CONCLUSIONES

1. Es posible implementar las técnicas necesarias para lograr una evaluación constante y confiable de medicamentos con potencial anticancerígeno, lo que implica un avance importante para calificar objetivamente las numerosas opciones que la industria farmacéutica y la cultura popular ofrecen.

2. La casiopeína III es capaz de remitir los signos clínicos en pacientes confirmados como afectados de LVF y cuando la evaluación de la enfermedad lo permite, pueden recuperarse por completo.

Capítulo 5

REFERENCIAS

1. Lessner Howar E., 1980. *Oncología Médica*. Editorial El Manual Moderno, S.A.
2. Guy de The, 1987. Sobre la pista del cáncer. Protagonistas de la ciencia. Ediciones Castell Mexicana, S.A. CONACYT.
3. Tannok, Ian F. and Hill, Richard P., 1987. The basic science of oncology. Pergamon Press.
4. Cerotti, P. A., 1987. Research on carcinogenesis and anticarcinogenesis. Intern. Cancer News 5: 10-12.
5. De Vita, V. T. Jr., Hellman, S., Rosenberg, S. A., 1982. *Cancer. Principles & Practice of Oncology*. E.U.A.: J. B. Lippincott Company.
6. Pratt W. and Ruddon R. W., 1979. "The cancer problem" en: The anticancer drugs. New York: Oxford University Press, pp. 3-11.
7. Sigel Helmut, 1980. Metal Ions in Biological Systems. Carcinogenicity and metal ions. Vol. 10. E.U.A., Marcel Dekker Inc.
8. Sigel Helmut, 1980. Metal Ions in Biological Systems. Metal Complexes as Anticancer Agents. Vol. 11. E.U.A., Marcel Dekker Inc.
9. Prestayko, A. W., Crook, S. T., Carter, S. K., 1980. *Cisplatin. Current Status and New Developments*, London: Academic Press.
10. De la Garza, J., 1992. "Semblanza histórica de los agentes antineoplásicos" en: *Cáncer y Quimioterapia*. Memorias. Facultad de Química, UNAM.
11. Gianni Sava, 1987. Tumor animal models used for evaluating the neoplastic activity of platinum coordination complexes. Inorganica Chimica Acta 39-44.
12. Foster, H. L., Small, J. D., Fox, J. G., 1983. *The Mouse in Biomedical Research*. London: Academic Press, Inc.
13. Gómez Ruiz, C., De la Garza Salazar, J., Arenas Huertero, F., Ruuiz-Ramírez L., Gracia Mora I., 1993. Quimiosensibilidad *in vitro* en células de cáncer cervicouterino por efecto de casiopéinas I, II y III. Tumor 6: 4, 76.
14. Geran, Greenberg, Macdonald and Abbott, 1987. *Protocols for in vivo screening systems*. National Cancer Institute.

15. *In vivo* cancer models 1976-1982. 1984. Developmental Therapeutics Program, Division of Cancer Treatment; National Cancer Institute, NIH publication 84-2635, Washington, D.C.; United States Government; Printing Office.
16. Bush, H., 1967. Methods in Cancer Research. Vol. V: Academic Press, pp 143-226.
17. Holzworth, J., 1987. Diseases of the cat. Medicine & Surgery, Vol. 1. W. B. Saunders Company.
18. Higashihara, T., Maejima, K., Fujikawa, Y. and Mikami, T., 1987. Feline leukemia virus infection in street cats in Tokio area. Jpn. J. Vet. Sci. 49, 6: 1162-1164.
19. Goitsuka R., Hirota Y., Hasegawa A. and Tomoda I., 1987. Feline interleukin I derived from alveolar macrophages stimulated with lipopolysaccharide. Jpn. J. Vet. Sci. 49, 4: 631-636.
20. Sarma, P. S., Log, T., 1973. Viral envelope antigens of the viruses of feline leukemia-sarcoma complex. Bibl. Haematol 39: 113-124.
21. Gracia Mora, M. I., Gómez M. A., Tinoco M. M., 1996. Nuevo bioterio en el conjunto "E" de la Facultad de Química, UNAM. Animales de Experimentación. Revista Internacional Informativa de Alta Tecnología Biomédica. 2, 2: 24-25.
22. Hall, E. H., White, W. J. and Lang, C. M., 1980. Acidification of drinking water: it's effect on selected biologic phenomena in male mice. Lab. Anim. Sci. 30: 643-651.
23. Mcpherson, C. W., 1963. Reduction of *Pseudomona aeruginosa* and coliform bacteria in mouse drinking water following treatment with hydrochloric acid or chlorine. Lab. Anim. Care 13: 737-744.
24. 1970. Détermination de la DL50 Chez La Souris. Méthode de Litchfield et Wilcoxon. Suplément au N° 3 souris Toxicité aigüe. J. Pharmacol. 1, 3: 407-414.
25. Litchfield, J. T. and Wilcoxon, F., 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. J. Pharmacol. 96: 99-113.
26. Biennial Report 1994.1995, 1995. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer.

27. Reyes Castañeda P., 1987. Bioestadística Aplicada. Agronomía-Biología-Química. 4ª reimpresión, México: Trillas, S. A.
28. Registro Histopatológico de Neoplasias en México, 1995. Dirección General de Epidemiología, Secretaría de Salud.
29. Registros No. 188101-120579 y 18802-120580. Dirección General de Invencciones, Marcas y Desarrollo Tecnológico, (SECOFI).
30. Busto, U. E., Du Souich P., Erill, S., Naranjo, C. A., Ogilvie, R. I., 1992. Métodos en Farmacología Clínica. Organización Panamericana de la Salud.
31. Dawson-Saunders Beth and Trapp Robert G., 1994. Bioestadística médica. México, D. F.-Santafé de Bogotá: Manual Moderno.
32. 3ª. Jornada de Trabajo en Casiopeínas, Unidad de Sseminarios Ignacio Chávez, Vivero Alto, Mayo 1998. Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México.