



---

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA

**Revisión Bibliográfica de los Modelos Experimentales en  
Fase Preclínica, para Evaluar Actividad Antineoplásica.**

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO  
P R E S E N T A:

**ALIN AMANDA MONTOYA HERNÁNDEZ**



Director: Ma. Teresa O. Ramírez Apan.

Asesor: Ma. Teresa Griselda Fuentes Lara

23, MAY. 2011



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Tesis: Revisión Bibliográfica de los Modelos Experimentales en Fase Preclínica,  
para Evaluar Actividad Antineoplásica.**

Nombre: Alin Amanda Montoya Hernández

Número de cuenta 300156553

Orientación Farmacia

Área del proyecto:  
Evaluación de Fármacos y Medicamentos II

Directora de Tesis:  
M en C. Ma. Teresa O. Ramírez Apan

Asesora de Tesis:  
M. en C Ma. Teresa Griselda Fuentes Lara

---

*No des vueltas al pasado,  
pues no lo puedes cambiar.  
Que no te agobie el futuro:  
no sabes si llegará.  
Disfruta y vive el presente,  
no lo dejes escapar,  
porque una vez que se vaya  
ya nunca más volverá.*

*Nuestra recompensa se encuentra en el  
esfuerzo y no en el resultado.  
Un esfuerzo total es una victoria completa.*

*Mahatma Gandhi*

---

## AGRADECIMIENTOS

Es difícil comenzar con un orden los agradecimientos ya que hubo y hay muchas personas importantes en mi vida, disculpen si faltaron nombres, no por eso dejan de ser importantes en mi vida.

Gracias Abuelos por su amor y cariño demostrado a lo largo de mi vida siempre los llevare en mi mente y corazón.

Josefa Gaviño García (†)

Leonardo Hernández Castro (†)

Gracias a mis padres por ser mi apoyo y por darme todo su amor sin ustedes esto no habría sido posible disculpen por tardarme un poquito, les dedico este trabajo.

En especial a usted mamá, por su coraje, devoción y esfuerzo para sacarnos adelante en los momentos difíciles, pero sobre todo por apoyarnos en todas las decisiones que tomamos como se lo prometí aquí está la tesis, gracias por todo mamá.

Gracias a mis hermanos Gabriel, Xochitl y mi cuñada Norma por su apoyo y cariño, se que siempre contare con ustedes a si como ustedes pueden contar conmigo. A mis niños q siempre me sacan una sonrisa a pesar de estar triste, los amo Christian y Natalia. Gracias especiales a un miembro de esta familia que nos trajo felicidad desde que llego a la casa hasta el momento en que se fue, gracias Terry (mi lindo BB).

Gracias a mis amigos que han estado conmigo a lo largo de mi vida y no solo de la carrera.

*“Los amigos son como las estrellas, aunque no los vemos sabemos que siempre están ahí”*

Gracias Ara, Belem, Yurihelem, Paulina, Nai, Dianita y en especial a Donanin por aguantar mis neurosis tantos años (creo que por eso te hiciste psicóloga) las quiero mucho amigas.

A mis amigos, Héctor, Isaac, Hernán, Omar, Ale, Abraham, José Luis, Oce, Noé, Julio, Apolo, a los amigos del TKD una disciplina que marco mi vida de una forma muy positiva gracias a todos.

Gracias a mis profesores en especial a M. en C. Ma. Teresa O. Ramírez Apan por darme este proyecto y apoyarme en todo, M. en C. Ma. Griselda Fuentes Lara por su asesoramiento y paciencia, M. en C. Agustín Hernández Gaviño por su apoyo en este proyecto, pero sobre todo por el ofrecido a mis seres queridos, sin el yo no sería lo que soy, gracias.

Gracias a la Dra. Leticia Cruz Antonio y a la profesora Q.F.B Ma. Elena Flores Ponce quienes se tomaron el tiempo para revisar este trabajo.

---

---

Gracias especiales a ti Cami por estos tres grandiosos años, sin tu apoyo este trabajo no habría sido posible. El amor que me has demostrado en los tiempos difíciles ha sido de gran significado para mí.

Es difícil saber dónde vamos a encontrar el amor (en mi caso fue en un laboratorio), tampoco sabemos cuánto tiempo va a durar, pero es inútil buscar una respuesta a estas interrogantes, lo importante es disfrutar y vivir día con día sin arrepentirnos de lo que hacemos, disfrutemos juntos el presente.

***"Kyo wa ashita no tame ni ikiru koto ga kitai"***

**TE AMO**

## CONTENIDO

RESUMEN .....	3
INTRODUCCIÓN.....	4
MARCO TEÓRICO.....	5
I. EL CÁNCER COMO ENFERMEDA.....	5
II. CICLO CELULAR.....	9
2.1 CONTROL DEL CICLO CELULAR.....	10
2.2 ONCOGENES.....	11
2.3 GENES SUPRESORES DE TUMORES.....	12
2.4 APOPTOSIS.....	14
III. TRATAMIENTO CONTRA EL CÁNCER.....	17
3.1 CIRUGÍA.....	17
3.2 RADIOTERAPIA.....	18
3.3 TERAPEUTICA GENICA.....	19
3.4 HORMONOTERAPIA.....	20
3.5 QUIMIOTERAPIA.....	20
IV. MEDICAMENTOS UTILIZADOS EN LA QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER .....	21
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	26
OBJETIVO GENERAL.....	27
OBJETIVO PARTICULAR.....	27
MATERIAL Y MÉTODO.....	28
DIAGRAMA DE FLUJO.....	28
V. BÚSQUEDA DE NUEVOS FARMACOS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICAS.....	29
5.1 ETAPA PRECLÍNICA.....	29
5.2 ETAPA CLÍNICA.....	30
5.2.1. Fase I ¿Es Seguro?.....	30
5.2.2. Fase II ¿Es activo?.....	31
5.2.3. Fase III ¿Es activo doble ciego?.....	31
5.2.4. Fase IV Post-aprobación de la droga para una determinada indicación.....	31
5.3 EVALUACIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS.....	32
VI. MÉTODOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS EN LA ETAPA PRECLÍNICA.....	35
6. <i>In Vitro</i> .....	36
6.1. Fundamentos de los Métodos para Evaluar Citotoxicidad.....	37
6.1.1. Tinción de Yoduro de Propidio.....	37
6.1.2. Ensayo de 5-Bromodeoxiuridina (BrdU).....	37
6.1.3. Tinción 4´6-diamino-2-fenilindon diclorohidrato (DAPI).....	37
6.1.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	37
6.1.5. Southern Blot (SB).....	37
6.1.6. Northern Bloth.....	38
6.1.7. La hendidura de PARP.....	38
6.1.8. Timidina tritiada (3H-Timidina).....	38
6.1.9. Ensayo de Micronúcleos.....	38
6.1.10. Electroforesis en gel de células individuales ó Ensayo Cometa.....	39
6.1.11. Exclusión por Azul de Tripán y Negro de naftaleno.....	43
6.1.12. Diacetilfluoresceina.....	43
6.1.13. Annexina V.....	43
6.1.14. Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH).....	43
6.1.15. Ensayo de enlazamiento de Azul de Kenacid.....	44
6.1.16. Sulforodamina B.....	45
6.1.17. Western blot.....	45

6.1.18. MTT (3-[4,5-dimetil tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio bromuro).....	45
6.1.19. Ensayo Rojo Neutro.....	46
6.1.20. Citometría de flujo.....	46
6.1.21. Ensayo de TUNEL.....	47
6.1.22. Ensayo de éster de carboxifluoresceína diacetato succinimidil.....	47
6.1.23. Ensayo de Formación de Colonias (CFE).....	48
<b>7. In Vivo.....</b>	<b>50</b>
<b>7.1. TRANSGÉNICOS.....</b>	<b>52</b>
<b>7.2. KNOCKOUS.....</b>	<b>52</b>
<b>7.3. KNOCK-IN.....</b>	<b>53</b>
<b>7.4. SINGÉNICOS.....</b>	<b>55</b>
<b>7.5. ATÍMICO DESNUDO.....</b>	<b>55</b>
<b>7.6. FUNDAMENTOS DE LOS DIFERENTE MODELOS TUMORALES Y SUS ENSAYOS.....</b>	<b>57</b>
7.6.1. Modelos Tumoraes Transplantables en Animales.....	57
7.6.2. Tumores Xenotransplantados.....	58
7.6.3. Modelo de Xenotransplatación Ortotópica.....	59
<b>ANALISIS DE RESULTADOS.....</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>GLOSARIO.....</b>	<b>64</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>65</b>

---

---

## RESUMEN

El presente trabajo tiene como propósito, ofrecer a los alumnos, docentes e investigadores interesados una idea clara y fundamentada de los modelos experimentales más comunes *-in vitro* e *in vivo* utilizados para el estudio de **fármacos con actividad antineoplásica**, conociendo sus ventajas, desventajas y el blanco de ataque que tienen.

La función principal es tener una visión comprensible de lo que ofrece cada modelo, presentando al alumno algunas de las bases que se deben de considerar para la evaluación de dichos fármacos, así mismo se permite al investigador elegir el modelo más indicado a sus necesidades teniendo en cuenta el blanco de ataque.

---

## INTRODUCCIÓN

El cáncer constituye un problema de salud pública, siendo esta enfermedad la segunda causa de muerte en México y en el mundo. El número de casos nuevos al año es de poco más de cien mil, mientras el de decesos en el país por esta enfermedad es de 50 mil, y la expectativa es que aumente su incidencia <sup>(1)</sup>.

Esta enfermedad puede afectar a personas de todas las edades, inclusive a los fetos, pero el riesgo de sufrir los tipos más comunes de cáncer se incrementa con la edad. De acuerdo con la Sociedad Americana del Cáncer, 7.9 millones de personas murieron de cáncer en el mundo durante 2007.

Se cree que la mayoría de cánceres se originan a partir de una célula única que ha experimentado una mutación somática, pero para que la progenie de esta célula se transforme en cancerosa ha de presentar más cambios, los cuales probablemente requieren varias mutaciones adicionales. <sup>(2 y 3)</sup>

Hasta el momento no se ha podido encontrar una forma de erradicar el cáncer sin afectar a otras células. En general se manejan tres procedimientos para tratar el cáncer: el primero, a través de extirpar quirúrgicamente las células cancerosas; el segundo empleando quimioterapia; y el tercero recurriendo a la radioterapia. <sup>(2)</sup>

Cuando se emplea la quimioterapia, generalmente los antineoplásicos son fármacos citotóxicos, las cuales se dirigen especialmente a las células que muestran una reproducción muy activa, como son las células malignas; sin embargo algunos tejidos sanos tienen una alta frecuencia de mitosis como son las células del folículo piloso, células epiteliales del intestino, y algunas células del sistema inmunológico, entre otros. <sup>(2)</sup>

Todos los medicamentos empleados en la quimioterapia del cáncer, así como los fármacos que se extraen de productos naturales o provienen de síntesis, se han evaluado en modelos experimentales, *in vitro* e *in vivo*.

Con estos modelos se evalúa la actividad antineoplásica, el blanco molecular, el posible mecanismo de acción, su grado de toxicidad, así como predecir los efectos adversos de fármacos en el organismo completo.

A la fecha no existe un documento que reúna los modelos experimentales que contemple su fundamento, ventajas y desventajas, para evaluar fármacos aislados de productos naturales o de síntesis potencialmente antineoplásicos.

Por lo antes expuesto, este trabajo tiene como objetivo reunir esta información que servirá como material de consulta para todo el interesado en conocer los métodos experimentales que se emplean en el estudio de compuestos antineoplásicos.

## I. EL CÁNCER COMO ENFERMEDAD

Se caracteriza por la existencia de células que han sufrido un cambio en los mecanismos de control que regulan su capacidad de diferenciación y de proliferación. Su propagación excesiva ocasiona la penetración en tejidos adyacentes, la compresión de estructuras vecinas (nervios, vasos sanguíneos), y su migración a otros tejidos donde crecen y se expanden dando origen a la metástasis que es la propagación a distancia, por vía fundamentalmente linfática o sanguínea, de las células originarias del cáncer, y el crecimiento de nuevos tumores en los lugares de destino de dicha metástasis.<sup>(2,4)</sup>

Este último proceso es largo y complejo comprende las siguientes fases: desprendimiento, invasión, penetración vascular, transporte intravascular, embolia con muerte celular y embolia con crecimiento (colonización).

El cáncer se considera una enfermedad genética, resultado de las alteraciones que presentan las células cancerosas en genes relacionados con el control del ciclo celular en la figura 1 se puede observar el proceso que lleva una célula normal y una cancerosa.

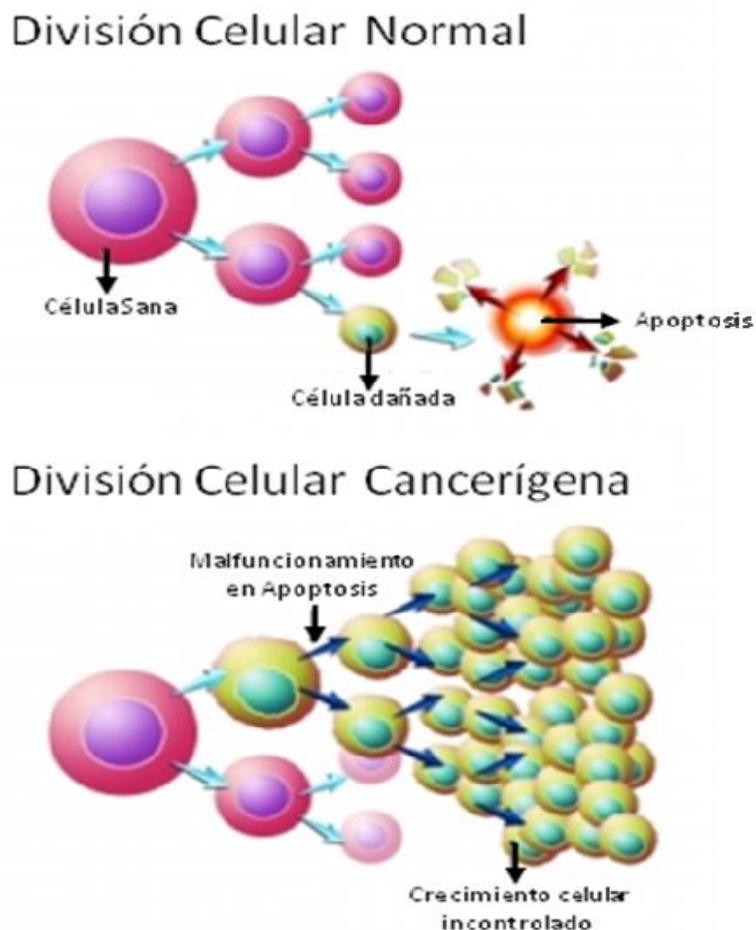


Figura 1. Proceso Neoplásico.<sup>(1)</sup>

---

---

Durante este proceso de transformación de las células normales a células cancerosas, ocurren varias alteraciones genéticas dando lugar a una pérdida del control de los mecanismos de replicación y reparación del ADN (ácido desoxirribonucleico), así como la segregación del material genético. Aunque las células normales tienen estrategias de defensa (reparación del ADN, genes supresores de tumores, sistema inmune etc.) contra el desarrollo del cáncer pese a esto las células tumorales activan diferentes vías de escape que permiten su proliferación. Por este motivo la prevención primaria y la detección de lesiones precursoras son las únicas armas disponibles para contener el aumento de una incidencia de los tumores malignos. <sup>(5)</sup>

El cáncer ha llegado a ser la segunda causa de muerte en los países desarrollados en donde cada cuatro personas fallecen. <sup>(5)</sup> En México es un problema de salud pública, no solo por sus graves manifestaciones clínicas y su alta letalidad, sino también por su gran variedad de factores de riesgos individuales y ambientales con los que se asocia.

A mediados del siglo pasado el cáncer no era considerado como una enfermedad común, hoy en día sin embargo, a pesar de que cada vez se conoce más sobre cómo prevenir y tratar el cáncer, cada año aumenta el número de personas que lo padecen, de tal manera que durante los últimos años, los principales factores que han contribuido a su incremento son: aumento en la proporción de personas de mayor edad en el mundo, decremento de las defunciones por enfermedades transmisibles, reducción de la mortalidad por enfermedades cardiovasculares en algunos países, y la creciente incidencia de ciertas formas de cáncer, en particular del cáncer de pulmón resultante del consumo de tabaco. <sup>(6)</sup>

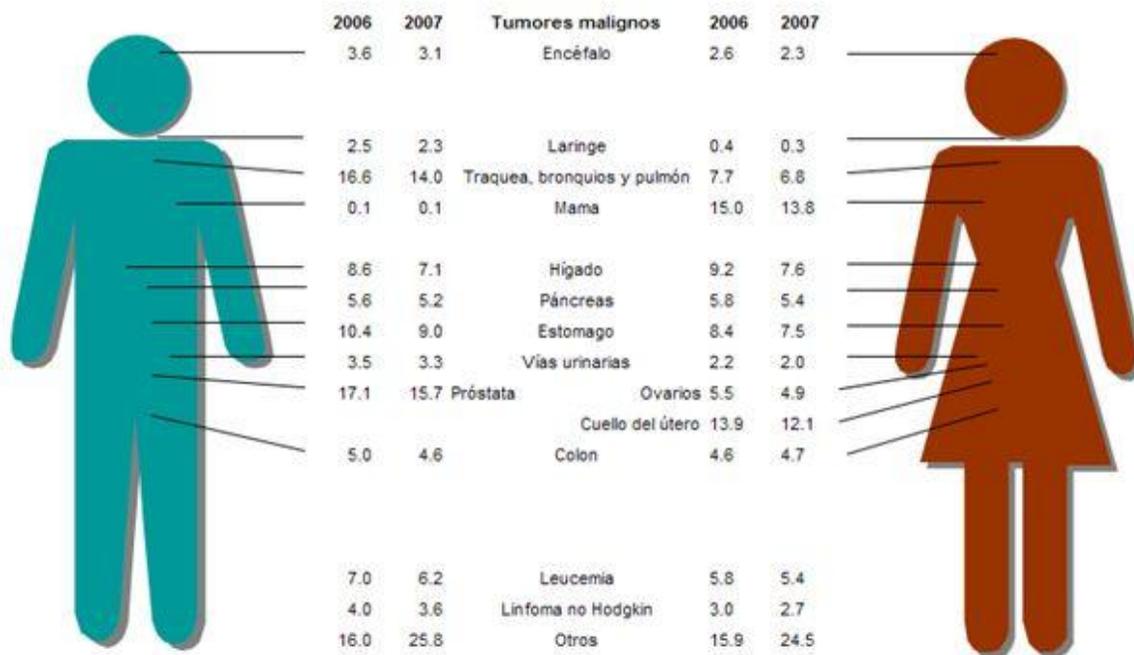
Para el cáncer no existe fronteras, para los países de bajos ingresos figura entre las tres principales causas de muerte de los adultos. El 12.5% del total de causas de muerte se atribuye al cáncer, porcentaje que supera al total de muertes debidas al SIDA, la tuberculosis y la malaria consideradas conjuntamente.

Para el año 2002 a nivel mundial, se estimó que hubo 10.9 millones de nuevos casos de neoplasias malignas, 6.7 millones de muertes, y 24.6 millones de personas que padecen algún tipo de cáncer, y si la tendencia continúa como hasta ahora, en el año 2020 habrá 16 millones de personas con cáncer, de las cuales, dos terceras partes vivirán en países de industrialización reciente. <sup>(6)</sup>

En los varones, los tumores malignos representaron la segunda causa de muerte de este grupo demográfico con 29 mil 797 defunciones, lo cual significó 11.4% de los fallecimientos de hombres. En las mujeres, se ubica en el tercer lugar de las principales causas de muerte con 31 mil 443 decesos; es decir, 14.9% de las defunciones en la población femenina.

En los hombres, las tres principales causas de muerte por tumores malignos en el año corresponden a los de: tráquea, bronquios y pulmón (15.5%), próstata (15.2%) y estómago (9.4 por ciento). En las mujeres, 13.5% de las defunciones por cáncer maligno corresponden al del cuello del útero (cervico-uterino) y 13.3% más al de mama; asimismo, el de hígado y vías biliares ocasionó 8.1% de las muertes. En la figura 2 se muestra la distribución porcentual, según el tipo de tumor maligno, por sexo. Mientras que en la figura 3 podemos observar la distribución de las neoplasias malignas por edad. <sup>(1,6)</sup>

Distribución porcentual de las defunciones por tumores malignos para cada sexo  
2006-2007



Fuente: INEGI. Estadísticas Vitales. Defunciones 2006 y 2007. Base de datos.

Figura 2. Distribución porcentual según el tipo de tumor maligno y sexo. <sup>(1)</sup>

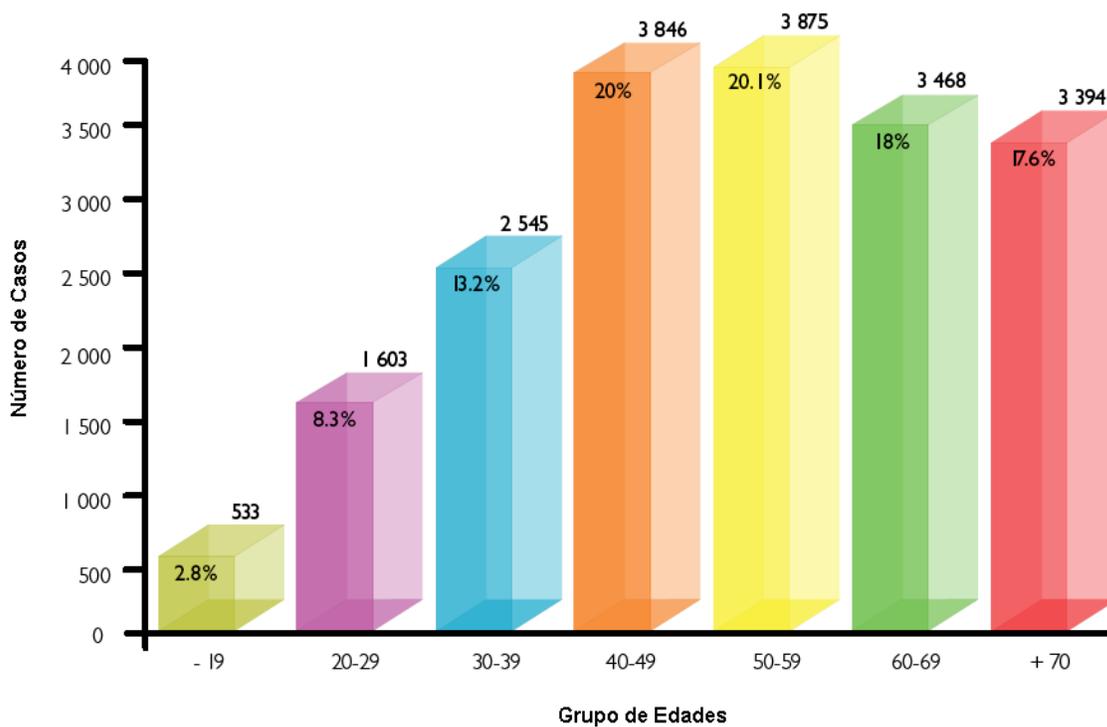


Figura 3. Distribución porcentual de Neoplasias malignas por Edad. <sup>(6)</sup>

---

---

Como se observo en las graficas anteriores esta enfermedad no discrimina raza, edad, estatus económico ni sexo además de que no es delimitada para una parte del cuerpo, su distribución es amplia y variada. Para poder encontrar una cura a esta enfermedad se debe comprender como actúa; Una célula tumoral lo primero que presenta es una alteración en el ciclo celular, este tiene como función la formación completa de una nueva célula evitando en lo posible la creación de células con múltiples errores, lo cual le permite al organismo permanecer en un constante equilibrio. Conocer este ciclo celular y la apoptosis ayudara a entender el mecanismo de acción de los agentes quimioterápicos y los mecanismos de la quimioresistencia.<sup>(6)</sup>

## II. CICLO CELULAR

El ciclo celular regula la división celular y es fundamental tanto para generar nuevas células en el desarrollo embrionario como para reemplazar las células dañadas en un órgano adulto. Se distinguen cuatro fases ordenadas y estrictamente reguladas como se muestra en la figura 4. G1 (brecha o gap 1), S (Síntesis de ADN), G2 (brecha o gap 2) y M (Mitosis /Meiosis). La síntesis del ADN ocurre en la fase S, la separación de cromosomas y división celular ocurre en la fase M, y las fases G1 y 2, son de crecimiento. El ciclo completo dura 12 horas o más mientras la mitosis tiene una duración constante de 1 hora. Este ciclo regula la duplicación de la información genética. <sup>(7,8)</sup>

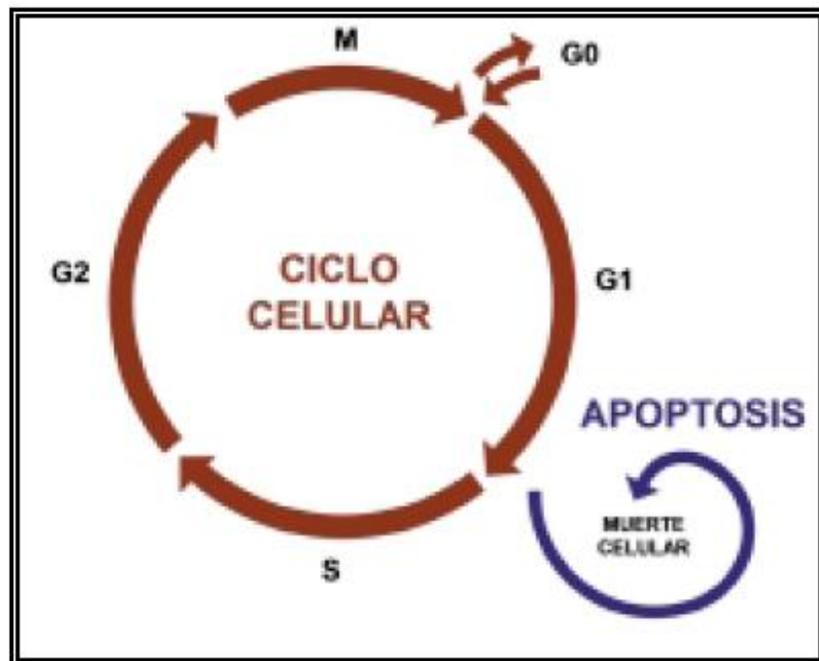


Figura 4. Ciclo celular y apoptosis. <sup>(7)</sup>

Debido a que la célula es dependiente de varios estímulos extra celulares durante la fase G1 esta fase es considerada un punto primario en la regulación del crecimiento.

Distintas proteínas ejercen el control en la entrada y progresión de las células a lo largo de las fases del ciclo una de estas es la Protein-kinasa dependiente de ciclinas (*cyclin-dependent kinases* o *CDKs*) estas fosforilan elementos claves en la progresión del ciclo celular. Se denominan ciclinas porque se sintetizan y degradan durante el ciclo celular. <sup>(7,9,10)</sup>

Estas son sintetizadas en la interfase y destruidas abruptamente al final de la mitosis. Actualmente se conocen seis familias de genes de ciclinas, estas son clasificadas por su secuencia homóloga y por el punto dentro del ciclo celular en el cual tienen su función.

---

---

En **G1** se sintetizan las ciclinas A, E y D, uniéndose a continuación a sus CDKs respectivas. Los complejos formados por las CDKs y las ciclinas A, E y D1 se importan y concentran en el núcleo, mientras que el complejo formado por CDK6-ciclina D3 se localiza tanto en el núcleo como en citoplasma, aunque solo es activo en el primero.

Al entrar en **S**, los complejos CDKs-ciclinas A y E permanecen en el núcleo, mientras el formado por CDK-ciclina D1 sale del núcleo y es degradado. Las ciclinas del tipo D (D1, D2, D3 y D4) intervienen regulando el punto de control G1/S.

En la fase **M** actúan dos ciclinas principales, la ciclina B1 y B2. La ciclina A se asocia con proteínas reguladoras del crecimiento celular, como el producto del gen del retinoblastoma (Rb), el factor de transcripción E2F y la oncoproteína E1A del adenovirus.

Existen otras proteínas que inhiben directamente la actividad de los complejos CDK-ciclinas funcionando como oncosupresores, de esta manera, durante el ciclo celular se determina cuando la célula debe de entrar en el proceso de autodestrucción o cuando continuar el ciclo y dividirse. Se ejerce a si un equilibrio entre mitosis y apoptosis, regulando la población celular de cada tejido. A estas proteínas se les llama inhibidores de los complejos CDK-ciclina, o CKI y su efecto es por tanto bloquear el ciclo de división. <sup>(5,9)</sup>

El retinoblastoma (Rb) es un gen supresor de tumores que inhibe la proliferación celular, esta proteína se caracteriza por experimentar cambios de fosforilación a lo largo del ciclo. <sup>(5,9)</sup>

La proteína Rb mantiene secuestrado el factor de transcripción y por tanto detiene el ciclo celular en la fase G1, evitando que se replique un ADN incorrecto. <sup>(5,9)</sup>

Esta proteína es un camino hacia la inhibición del crecimiento celular y es el sitio por el cual las señales inhibitorias de crecimiento mantienen a la célula en G1 o G0. <sup>(5,11)</sup>

Otro gen con carácter oncosupresor es p53. Es un activador transcripcional conocido como “guardián del genoma”, activa a la p21CIP1, CDKI que inhibe la fosforilación de la pRb impidiendo la liberación del E2F, deteniendo el ciclo en G1 e induciendo apoptosis. Cuando es activada por señales de estrés tales como radiaciones gamma, UV, hipoxia, infecciones por virus o daños en el ADN. Esta proteína funciona como un regulador negativo del ciclo celular, por lo que alteraciones en el gen que interfieren con su función conducen a la pérdida de esta regulación, la que conduce a una rápida proliferación celular. <sup>(9,12)</sup>

Las células tienen mecanismos de control capaces de frenar el ciclo celular si algún error ocurre, bien para poder ser reparado, o bien para inducir la apoptosis cuando el daño es muy extenso. En condiciones normales no se permite la progresión del ciclo hasta que el error no se haya corregido; sin embargo, las células tumorales tienen mutada alguna de las proteínas reguladoras y son capaces de repetir el ciclo indefinidamente aún sin integridad del ADN. <sup>(9,12)</sup>

## **2.1 CONTROL DEL CICLO CELULAR Y CANCER**

Como ya se vio anteriormente el cáncer es la consecuencia de alteraciones en los procesos de señalización que generan el crecimiento celular. Por esta razón es importante tener presente el ciclo celular, proceso que como ya se ha dicho antes permite a la célula dividirse y donde intervienen

decisivamente tanto señales de actividad positiva, como son las CDKs, y sus subunidades reguladoras, las ciclinas, como proteínas inhibitoras de las anteriores. Desde el conocimiento de estas CDKs se han utilizado como dianas farmacológicas.

Se conocen dos estadios donde operan los puntos de control en el ciclo celular: uno al final de la fase G1 y la entrada a la fase S, y el otro, en la transición de la fase G2 a la fase M. Los procesos de regulación por retroalimentación positiva y negativa también contribuye a la progresión del ciclo celular, es decir, la regulación normal del ciclo depende del balance entre los estímulos positivos que lo impulsan y los negativos o frenos que detienen el ciclo. Los controles negativos de dicha progresión están presentes durante el desarrollo, diferenciación y muerte celular, y pueden tener una función importante en la prevención de la carcinogénesis. <sup>(5,7, 13)</sup>

En general la interrupción de la proliferación celular ocurre cuando la integridad del genoma ha sido comprometida. Alteraciones en el proceso de interrupción del ciclo celular permiten que células con genomas inestables evolucionen a células cancerosas.

Las mutaciones, presentes en estas células, que provocan la aparición de las características tumorales, afectan a genes cuyos productos proteicos regulan la proliferación celular, la apoptosis o la senescencia celular (véase **Tabla 1**). <sup>(5, 9)</sup>

<b>TABLA 1. CATEGORÍAS DE GENES CELULARES INVOLUCRADOS EN EL CICLO CELULAR Y EN EL DESARROLLO DEL CÁNCER.</b>			
<b>Categoría</b>	<b>Gen</b>	<b>Función</b>	<b>Alteración</b>
I	c-ras, c-myc, c-abl, c-Src, c-fos, c-jun, c-ets	Factores de transcripción y transducción	Aumento de su función
II	p-53, Rb, APCI, MPCI, p16, p21, p27, Wi.	Puntos de control del ciclo celular. Crecimiento y proliferación	Degradación o pérdida de la función.
III	A) bcl-2, bax	Inhiben apoptosis.	Expresión ganancia de la función
	B) p53, c-myc, factores solubles como TNF Y FAS	Inducen apoptosis.	Degradación o pérdida de la función.

## 2.2 ONCOGENES

Se denomina oncogén a la forma mutada de un gen normal o protooncogén, el cual codifica una proteína normal, generalmente relacionada con la proliferación celular o la apoptosis, que actúa solo cuando recibe señales reguladoras específicas. <sup>(5, 9)</sup>

El oncogén expresa una proteína anormal que se mantiene activa independientemente de las señales reguladoras, por lo que el resultado es una ganancia de función. Esto conduce a una proliferación descontrolada o a una apoptosis reprimida, y por consiguiente a la aparición del cáncer. Las mutaciones no son el único mecanismo para activar a los oncogenes, en algunos casos como el proto-oncogén viral *gag*, la proteína de función es activada. <sup>(8,11)</sup>

Los retrovirus pueden inducir algunos tumores con una larga latencia (meses) y con pocos tumores; lo contrario sucede con los virus transformantes que tienen latencias cortas (semanas) y pueden inducir múltiples tumores. Los virus conocidos hasta el momento que contribuyen a la formación de tumores son pocos (véase **Tabla 2**).

Por lo que la etiología viral del cáncer no ha sido demostrada en la mayoría de los tumores humanos. Las propiedades más importantes y claves del fenotipo modificado son la transformación morfológica y la inmortalización de las células. <sup>(9, 11)</sup>

<b>TABLA 2. VIRUS TUMORALES HUMANOS.</b>		
<b>Familia Viral</b>	<b>Tipo</b>	<b>Tumor</b>
Hepadnavirus Herpesvirus	Virus de hepatitis B Epstein-Barr	Hepatocarcinoma Linfoma Burkitt, in munoblástico, Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo.
Flavivirus Papilomavirus	Virus hepatitis C 16,18, 33, 39 5, 8, 17.	Hepatocarcinoma Cáncer anogenital, y vías aéreas superiores. Cáncer de piel
Polioavirus Retrovirus	BK, JC HTLV-1 HTLV-2	Tumores naturales, insulino mas Linfoma/leucemia de células T del adulto. Leucemia de células peludas.

### 2.3 GENES SUPRESORES DE TUMORES

Las células además de todo cuentan con moléculas importantes que vigilan la secuencia normal de acontecimientos genéticos que permiten su proliferación. A estas moléculas se les llama genes supresores de tumores. Cuando los productos de estos están ausentes o no son funcionales la célula pierde la protección que le brinda, lo cual conduce a la aparición del cáncer (véase **Tabla 3**). <sup>(8, 9)</sup>

De todos los genes supresores de tumores los más conocidos y de los que ya mencionamos anteriormente son el retinoblastoma (Rb) y el gen p53 por su estrecha relación con cánceres humanos.

La forma normal del gen supresor codifica una proteína normal antioncogénica, que actúa deteniendo la proliferación o bien induciendo a la apoptosis. La mutación de genes supresores de tumores conduce a la síntesis de una proteína no funcional o impide esa síntesis, la proliferación deja de estar controlada o la apoptosis nunca tiene lugar, por lo que aparece una proliferación excesiva, a menudo con acumulación de daños genéticos en las células. <sup>(8,14)</sup>

**TABLA 3. ALTERACIONES DE GENES SUPRESORES DE TUMORES Y TUMORES ASOCIADOS.**

<b>Localización subcelular</b>	<b>Gen</b>	<b>Función</b>	<b>Tumores asociados a mutaciones somáticas</b>	<b>Tumores asociados con mutaciones hereditarias</b>
Superficie celular	Receptor de TGF- $\beta$	Inhibición del crecimiento	Carcinoma de colon	Desconocidos
	Cadherina E	Adherencia celular	Carcinomas de estómago y mama	Cáncer gástrico familiar
Bajo la membrana citoplasmática	NF-1	Inhibición de la transducción de la señal ras	Schwannoma y meningiomas	Neurofibromatosis tipo 1 y sarcomas
Citoesqueleto	NF-2	Desconocida	Carcinomas de estómago, colon, páncreas; melano ma	Neurofibromatosis tipo 2; meningiomas y schannomas del acústico.
Citosol	APC	Inhibición de la transducción de la señal	Retinoblastoma osteosarcoma carcinoma de mama, colon, pulmón.	Poliposis adenomatosa familiar, cáncer de colon.
Núcleo	Rb	Regulación del ciclo celular	Casi todos los canceres humanos	Retinoblastoma, osteosarcoma.
	p53	Regulación del ciclo celular y apoptosis en respuesta a la lesión de ADN.	Tumor de Wilms	Síndrome de Lifraumeni; numerosos carcinomas y sarcomas
	WT-1	Transcripción nuclear	Cáncer de páncreas, estómago.	Tumor de Wilms
	p16 (INK4a)	Regulación del ciclo celular por inhibición de las cinasas dependientes de las ciclinas		Melanoma maligno.
	BRCA-1	Reparación del ADN		Carcinomas de la mama y del ovario.
	BRCA-2	Reparación del ADN		Carcinomas de mama.

---

## 2.4 APOPTOSIS

La muerte por apoptosis es el resultado de la puesta en marcha de una maquinaria celular en respuesta a un estímulo externo, que conlleva a la autodestrucción de la célula y es por tanto un proceso bioquímico de “suicidio celular”. La apoptosis interviene en la embriogénesis, en el recambio celular de los tejidos y en la eliminación de células infectadas, mutadas o dañadas. Este es un proceso irreversible, puesto que una vez que el estímulo llega a la célula, una serie de procesos bioquímicos se ponen en marcha y llevan a la célula a la muerte. Este proceso se caracteriza por los cambios que ocurren en el núcleo, en el que se aprecia como la cromatina se compacta y se acumula en la periferia de la membrana nuclear. En estadios más avanzados se observa que la célula se hace más pequeña porque se van desintegrando componentes proteicos del citoesqueleto, y se disgregan en pequeños fragmentos que contienen parte del núcleo y del citoplasma. Estos fragmentos se les conocen “cuerpos apoptóticos” teniendo como característica una membrana intacta lo que impide que exista un vaciado en el contenido intracelular al medio, y los organelos no sufren cambios al ser observados al microscopio. <sup>(2, 15)</sup>

La muerte por **necrosis** viene determinada por un cambio físico-químico que tiende a destruir el equilibrio de la célula: choque térmico u osmótico, desnaturalización de proteínas, falta de oxígeno entre otros; estos cambios suelen dar lugar a la rotura de la membrana plasmática. Este es un proceso reversible, puesto que en el momento de eliminar el estímulo inductor de muerte, la célula podría recuperar su normalidad, pero si el proceso prosigue, hay un aumento en el tamaño de la célula (swelling) provocado por el desequilibrio osmótico, el siguiente evento sería la dilatación de los organelos intracitoplasmáticos consecuentemente el rompimiento de éstos y la membrana celular, liberándose todo el contenido citoplasmático al medio lo cual daría lugar a reacciones inflamatorias. Es importante resaltar que una muerte por necrosis no se aprecia cambios importantes en la estructura nuclear. <sup>(7)</sup>

La diferencia más notable de que la muerte ocurre por apoptosis en lugar de necrosis, es la fragmentación del ADN, mientras se mantiene la integridad de la membrana hasta estadios tardíos en la muerte celular. La fragmentación del ADN puede ser medida por métodos que permitan estimar el porcentaje de células que se encuentran en apoptosis frente al número de células normales. <sup>(16, 17)</sup>

En la tabla 4 se resumen las diferencias entre la muerte por necrosis y apoptosis.

Tabla 4. PRINCIPALES DIFERENCIAS ENTRE LOS PROCESOS DE NECROSIS Y APOPTOSIS		
Fase	Necrosis	Apoptosis
Iniciación	Célula inflamada Orgánulos dañados Cromatina alterada	Célula arrugada, con burbujas Pérdida de uniones intercelulares Orgánulos intactos Cromatina marginal
Efectora	Alteración membrana plasmática Pérdida homeostasis mitocondrial Lisis celular Orgánulos destruidos Cromatina destruida Liberación del contenido	Fallos en mecanismos reparación y homeostasis Cromatina condensada. Activación endonucleasa, fragmentación ADN. Cuerpos apoptóticos (restos de cromatina rodeados de membrana. Orgánulos intactos. Contenido no liberado.
Degradativa	Fagocitosis con inflamación	Fagocitosis sin inflamación.

La apoptosis se controla mediante proteínas implicadas en varios niveles de señalización celular, codificada por protooncogenes y genes supresores de tumores. <sup>(5,17)</sup>

Al igual que en el ciclo celular, el control de la apoptosis puede alterarse generando situaciones patológicas entre las que se incluye el cáncer <sup>(18)</sup>. La apoptosis puede iniciarse en el tercio final de G1 para impedir que una célula dañada ingrese en la fase de síntesis, de manera que las mutaciones no se produzcan durante la replicación del ADN; en la fase G2 para impedir que las células que no han llegado a la madurez entren en la mitosis. Una vez que la célula entra en el proceso de apoptosis, en su interior se produce una serie de procesos bioquímicos que conducen a la degradación de proteínas y de la cromatina. <sup>(5)</sup>

Dicho todo lo anterior podemos resumir el proceso de apoptosis en las siguientes tres fases, las cuales se observan en la figura 6.

- a) **Fase de iniciación**, que se inicia con una inducción dependiente del estímulo de muerte y seguida por la fase de transducción de señales correspondiente. El estímulo inductor es muy variado incluyendo agentes químicos y físicos, activadores fisiológicos, asociados a terapias, y toxinas, también puede iniciarse por acción sobre receptores específicos (CD95/Fas/TNF-R).
- b) **Fase efectora**, en la que la célula está programada para morir, activándose las enzimas proteolíticas encargadas del proceso, denominadas *caspasas*. Este punto aparece claramente modulado por la familia de proteínas bcl-2, las cuales regulan la fase efectora de la apoptosis. La proteína Bcl-2 se encuentra asociada a membranas intracelulares, (mitocondria, retículo endoplásmico y envoltura nuclear. En realidad bcl-2 son un gran grupo de proteínas que dimerizan unas con otras

determinando la supervivencia o la muerte, el dímero Bcl-2/Bcl-x inhibe la apoptosis mientras que el dímero bcl-2/Bax la favorece.

c) **Fase degradativa**, en la que las células muertas son reconocidas y fagocitadas por los macrófagos. La muerte celular se produce después de grandes alteraciones nucleares, de la membrana plasmática y de las mitocondrias. En el núcleo se degrada el ADN y se hacen visibles condensaciones de cromatina nuclear formándose aglomeraciones que se desplazan hacia la superficie de la membrana nuclear.

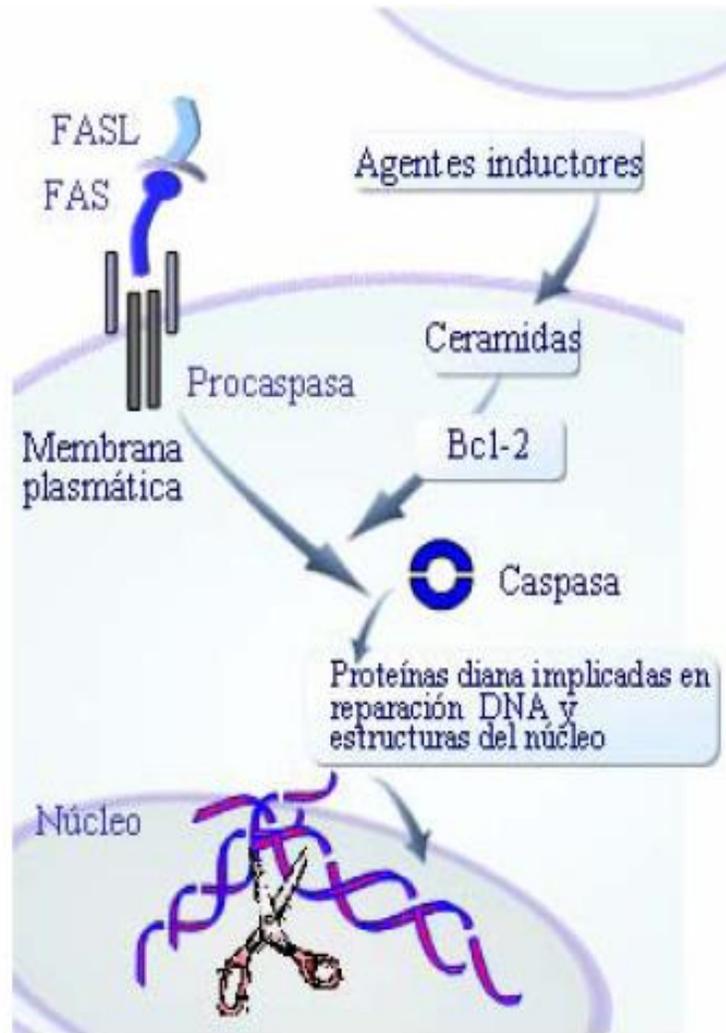


Figura 6. Principales eventos del proceso de apoptosis. <sup>(19)</sup>

La inactivación de la vía apoptótica permite sobrevivir indefinidamente a las células neoplásicas, contribuyendo a aumentar el número de células presentes en un tumor.

Por lo tanto, un tumor crece no solo por aumento de la proliferación celular, sino también porque sus células no mueren. <sup>(19)</sup>

---

### III. TRATAMIENTOS CONTRA EL CANCER

Actualmente se cuenta con una gran variedad de opciones terapéuticas para los distintos tipos de cáncer, siendo la cirugía temprana el método con mayor tasa de curaciones. Además, la combinación, de cirugía y tratamientos coadyuvantes como radioterapia o quimioterapia facilitan y mejoran el propósito tras la intervención quirúrgica del paciente. <sup>(5)</sup>

Si esta extirpación completa es posible, se habla de curación o tratamiento radical, pero si la neoplasia no está localizada, existen metástasis o no es posible la erradicación por motivos diversos, el objetivo de la terapéutica es paliativo: reducir el tamaño del tumor o el número de células, aliviar los síntomas y prolongar la supervivencia con una calidad de vida aceptable. La farmacología anticancerosa constituye un método terapéutico muy útil que coadyuva, junto con la cirugía y la radioterapia, a mejorar el pronóstico de la enfermedad. <sup>(4)</sup>

La radioterapia constituye una buena opción terapéutica en caso de que la extirpación quirúrgica tumor no sea recomendable por destruir órganos vitales.

La tercera opción es la quimioterapia, un tratamiento sistemático, en el que se distribuyen sustancias citotóxicas por todo el organismo. Es especialmente útil si el tumor ya ha progresado hacia metástasis, o bien en el caso de leucemia. A parte de los agentes quimioterapéuticos convencionales, algunos tipos de cáncer responden al tratamiento hormonal (cáncer de mama, ovario y próstata), siendo sus efectos adversos menores que los de las quimioterapias. <sup>(5,20)</sup>

Existe una cuarta opción para el tratamiento del cáncer, la terapia génica, ya que el inicio del cáncer siempre va precedido de un cambio en el genotipo que provoca que una célula antes normal se convierta en una célula cancerosa con una proliferación excesiva. Se han tenido algunos avances sobre esta terapia pero no han sido del todo concluyentes ya que no es solo un gen el que muta sino varios los que pueden acarrear el cáncer en una persona, además de que no se han podido identificar todos los tipos de genes que desencadenan los diferentes tipos de cáncer. <sup>(21)</sup>

A continuación se abordaran con un poco mas de detalle estos tratamientos, y otros que también se utilizan.

#### 3.1 CIRUGÍA

La cirugía es la forma más antigua de tratamiento antineoplásico eficaz, requiere que el tumor se encuentre localizado o que tenga una diseminación locorregional limitada, lo cual permite una resección en bloque. Esto se aplica, sobre todo, a los cánceres de vejiga, mama, cuello uterino, colon, endometrio, laringe, cabeza y cuello, riñón, pulmón, ovarios y testículos. En las situaciones en que no pueda llevarse a cabo una resección en bloque, la politerapia con radioterapia, quimioterapia o quimiorradiación puede reducir el tamaño del cáncer, haciéndolo susceptible de ser curado mediante resección quirúrgica. <sup>(5,20)</sup>

---

### 3.2 RADIOTERAPIA

La radioterapia puede administrarse mediante diversos métodos. El más frecuente consiste en un haz externo aplicado con un acelerador lineal, que produce una gran cantidad de fotones (radiación  $\gamma$ ). La radioterapia con haz de neutrones se utiliza en algunos tumores que presentan márgenes tisulares estrechos. La radioterapia con haz de electrones tiene una penetración tisular muy corta y se emplea principalmente para tratar cánceres cutáneos o superficiales. La terapia con protones, si bien es de disponibilidad muy limitada, proporciona una profundidad muy estrecha de exposición de campo con márgenes nítidos. La braquiterapia implica la colocación de una fuente radiactiva potente en el interior del lecho tumoral (p. ej., en próstata o cerebro) mediante agujas, con lo que se suministra una dosis muy alta en un campo pequeño. Los isótopos radiactivos sistémicos pueden utilizarse como tratamiento de órganos que poseen receptores para su captación (cáncer de tiroides) o como paliación de una diseminación ósea generalizada (p. ej., radiostroncio para el cáncer de próstata metastásico). La radioterapia curativa generalmente requiere la existencia de enfermedad local o locorregional que puede englobarse en el interior del campo de irradiación.

Las lesiones que produce la radiación en las células son aleatorias e inespecíficas, con efectos complejos sobre el ADN. La eficacia de la terapia depende del daño celular que sobrepasa la capacidad normal de reparación. En general, la reparación del tejido normal es más eficaz que la del tejido canceroso, lo cual permite una muerte celular diferencial.

La radioterapia es curativa en numerosos cánceres. La radioterapia combinada con cirugía (cánceres de cabeza y cuello, laringe o útero) o con quimioterapia y cirugía (sarcomas o cánceres de mama, esófago, pulmón o recto) mejora las tasas de curación que obtiene la terapia tradicional con una única modalidad. La fototerapia, la forma de politerapia más reciente, emplea un derivado porfirínico (una protoporfirina), que se adhiere y posteriormente ilumina el tumor, permitiendo una captación selectiva de la radiación.  
(5,22)

La radioterapia proporciona un control paliativo importante del cáncer, incluso cuando no es posible la curación. Por ejemplo, en los tumores cerebrales, prolonga la capacidad funcional del paciente; en los cánceres que provocan compresión medular, puede eliminar las deficiencias neurológicas; en el síndrome de la vena cava superior, reduce la posibilidad de muerte brusca y en las metástasis sintomáticas o dolorosas, suele controlar los síntomas.

---

### 3.3 TERAPÉUTICA GÉNICA (TG)

La TG puede ser definida como la transferencia de material genético a las células adecuadas, con el propósito de producir un efecto terapéutico en virtud del cual se logre corregir un defecto genético o permitir la adquisición de una nueva respuesta funcional, como el control de una infección o la inactivación de genes que son indeseables para el organismo. El término técnico empleado para referirse a la introducción del material genético es el *transferir* o el de *transfectar* y, a veces, cuando se utiliza un vector viral para la transferencia, se denomina *infección*.<sup>(21,23,24)</sup>

Para entender un poco más esta terapéutica tenemos que conocer sus conceptos básicos:

Gen: Es la unidad funcional de material genético que codifica un transcrito. En otras palabras, el gen es un fragmento de ADN que se encuentra en el núcleo de la célula y se copia a una molécula de ácido ribonucleico (ARN), que es el transcrito. Luego este último mensaje es enviado al citoplasma de la célula para que se traduzca en una proteína con función específica.

Sus líneas de investigación, tanto preclínicas como clínicas dentro de la TG, pueden ser agrupadas en varias estrategias:

- ❖ Destrucción de las células tumorales mediante la expresión de productos tóxicos, o, en su defecto, enzimas capaces de activar profármacos, como puede ser por la sobreexpresión de la enzima tiroxina cinasa que transforma un profármaco, el aciclovir, en un veneno.
- ❖ Fortalecer y estimular la protección natural del sistema inmunitario contra las células anormales incrementando el carácter extraño de estas células, potenciando los mecanismos del sistema inmunitario o modificando las células cancerígenas para hacerlas más susceptibles a su destrucción.
- ❖ Cambio del fenotipo de las células cancerígenas, bien inhibiendo la expresión de oncogenes o aumentando la de genes supresores de tumores, como el p53 que aparece mutado en un alto porcentaje de tumores, o introduciendo «genes suicidas» en células tumorales.
- ❖ Protección de las células normales de los efectos de la quimioterapia o radioterapia.
- ❖ Incremento de la cantidad y citotoxicidad específica de los linfocitos que reaccionan con las células tumorales.

No se trata de corregir un defecto genético como ocurre en las enfermedades monogénicas, sino de utilizar la manipulación génica para dotar de una nueva propiedad a las células, que permite aprovecharlas en algún aspecto de la patología oncológica con fines terapéuticos. En la actualidad, se han desarrollado distintas estrategias en terapia génica del cáncer, y se están realizando diversos ensayos clínicos para tratar diferentes tipos de cáncer: de mama, ovario, cabeza y cuello, pulmón, próstata, células renales, tumor cerebral, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, linfomas, melanoma, mieloma múltiple y neuroblastoma.<sup>(23,24)</sup> A continuación se enumeran las diferentes estrategias aplicadas en los ensayos clínicos realizados en terapia génica del cáncer:

- Aumentar la actividad antitumoral de células inmunes por medio de citoquinas (interleucinas, factores de necrosis tumoral, factores estimulantes de colonias o interferones).
- Aumentar la inmunogenicidad del tumor introduciendo antígenos foráneos (“vacunas tumorales”).

- 
- Introducir un gen “suicida” o de sensibilidad aumentada a determinados fármacos. Se transduce el gen de una enzima ( timidina cinasa ) que activa selectivamente un profármaco (aciclovir).
    - ♣ Bloquear la expresión de oncogenes mediante terapia antisentido.
    - ♣ Introducir genes supresores de tumores (p53).
    - ♣ Eliminación de las células tumorales mediante adenovirus oncolíticos.
    - ♣ Transferencia de genes con efecto antiangiogénico, para inhibir la formación de vasos sanguíneos inducidos por el propio tumor.
    - ♣ Introducir genes de resistencia a fármacos para reducir la toxicidad de la quimioterapia, particularmente sobre la médula ósea.

### 3.4 HORMONOTERAPIA

La hormonoterapia aditiva o ablativa puede influir en la evolución de algunos cánceres, pero debe tenerse en cuenta que sólo es paliativa y no curativa. La orquiectomía tiene un valor paliativo notable en el cáncer metastásico de próstata, de manera que suele prolongar la supervivencia 3-5 años. Su eficacia está en función de la población de células cancerosas que dependen de la testosterona. Otros cánceres con receptores hormonales en sus células (p. ej., mama, endometrio, ovario) a menudo pueden recibir tratamiento paliativo con hormonoterapia ablativa. Este éxito favoreció el empleo de hormonas como tratamiento farmacológico de estos tumores. Los estrógenos poseen un efecto paliativo eficaz en el cáncer de próstata, pero incrementan el riesgo de cardiopatías. Estas observaciones condujeron al tratamiento con inhibidores de la secreción de gonadotropinas. La leuprolida, un análogo sintético de la hormona liberadora de gonadotropinas, inhibe la secreción de gonadotropinas y la producción posterior de andrógenos gonadales y resulta tan eficaz como la orquiectomía en la paliación del cáncer de próstata. Incluso puede lograrse un bloqueo androgénico más completo mediante la adición de un antiandrógeno oral (flutamida o bicalutamida), que limita la unión de los andrógenos a sus receptores; esta combinación parece prolongar la supervivencia libre de enfermedad en 6-12 meses más que la leuprolida o la orquiectomía aisladas. <sup>(5, 25)</sup>

De manera semejante, la ablación estrogénica (mediante ooforectomía) presenta efectos paliativos en el cáncer de mama avanzado. El tamoxifeno, una hormona oral, puede ligarse a los receptores de estrógenos presentes en las células del cáncer de mama y tiene efectos paliativos tan eficaces como la ooforectomía. Resulta particularmente eficaz en el cáncer de mama metastásico que afecta a mujeres posmenopáusicas. Como terapia adyuvante en el cáncer de mama, prolonga la duración de la supervivencia libre de enfermedad, mejora la tasa de curación en las pacientes con receptores positivos en un 20-30% y reduce el riesgo de cáncer de mama contralateral en aproximadamente un 60%.

### 3.5 QUIMIOTERAPIA

El fármaco quimioterapéutico ideal sólo debería tener como objetivo destruir las células cancerosas sin mostrar efectos adversos ni toxicidad sobre las células normales. Por desgracia, no existen tales fármacos, ya que el margen terapéutico entre la muerte de células cancerosas y la de células normales es estrecho. A pesar de este hecho, la quimioterapia, incluso con fármacos aislados, logra la curación en determinados

---

cánceres (p. ej., coriocarcinoma, leucemia de células peludas y leucemia linfocítica crónica). Con mayor frecuencia, las pautas que emplean varios fármacos con mecanismos, lugares de acción intracelular y efectos tóxicos diferentes (para reducir el posible componente de toxicidad) deparan tasas de curación significativas (p. ej., leucemia aguda, cáncer de vejiga y testículo, enfermedad de Hodgkin, linfoma maligno, cáncer de pulmón de células pequeñas y cáncer nasofaríngeo).<sup>(22)</sup>

El fracaso *in vivo* de las pautas de quimioterapia que habían demostrado eficacia *in vitro* ha conducido a la realización de estudios amplios sobre la resistencia a fármacos. Un mecanismo identificado, la resistencia multifarmacológica, se debe a la existencia de varios genes que limitan la función de los fármacos en las células cancerosas del paciente. Hasta ahora, los intentos de alterar esta resistencia no han resultado satisfactorios.

Existen diferentes tipos de quimioterapia como son los siguientes:

- ✓ **Poliquimioterapia:** Es la asociación de varios citotóxicos que actúan con diferentes mecanismos de acción, sinérgicamente, con el fin de disminuir la dosis de cada fármaco individual y aumentar la potencia terapéutica de todas las sustancias juntas.
- ✓ **Quimioterapia adyuvante:** Es la quimioterapia que se administra generalmente después de un tratamiento principal, como es la cirugía o radioterapia, para disminuir la incidencia de diseminación a distancia del cáncer o destruir la enfermedad residual.
- ✓ **Quimioterapia neoadyuvante o de inducción:** Es la quimioterapia que se inicia antes de cualquier tratamiento quirúrgico o de radioterapia con la finalidad de reducir al máximo el volumen tumoral. La quimioterapia neoadyuvante permite además un alto índice de cirugía conservadora, evitando intervenciones mutilantes.
- ✓ **Radioquimioterapia concomitante:** También llamada quimio-radioterapia, que se administra de forma concurrente o a la vez con la radioterapia con el fin de potenciar el efecto local de la radiación y actuar de forma sistémica con la quimioterapia.<sup>(5,22)</sup>

---

---

## IV. MEDICAMENTOS UTILIZADOS EN LA QUIMIOTERAPIA DEL CÁNCER

La quimioterapia se puede definir como aquellas sustancias capaces de inhibir o impedir la evolución de la neoplasia restringiendo la maduración y proliferación de células malignas, actuando sobre fases específicas del ciclo celular y por ello es activo frente a células que se encuentran en proceso de división.

Los diferentes tipos de quimioterapia son:

- **Neoadyuvante:** Se realiza antes de la cirugía de extirpación tumoral.
- **Complementaria:** Su objetivo es eliminar las metástasis subclínicas en el momento del primer tratamiento. Se debe realizar inmediatamente después del tratamiento local de erradicación.
- **Alternante:** Se realiza cuando el cáncer presenta dos o más subpoblaciones celulares con distinta sensibilidad a los citostáticos.
- **Local o dirigida:** tiene el fin de aumentar la eficacia y disminuir la toxicidad (intrarterial, intrapericardica, intratecal, intrapleural, intraperitoneal, etc.).

Una clasificación de los agentes citostáticos es aquella que toma en cuenta su mecanismo de acción y estructura química <sup>(20)</sup> (véase **Tabla 5**)

Podemos destacar los siguientes grupos:

- **Agentes alquilantes** (cisplatino, oxaliplatino, carboplatino, clorambucil, ifosfamida, entre otras) muestran gran afinidad por el ADN y las proteínas, a los que adicionan sus radicales altamente reactivos. Así producen enlaces entre cadenas de ADN y otras transformaciones, impidiendo su replicación y transcripción a ARN. Su acción tiene lugar en cualquier fase del ciclo celular. Son eficaces en el tratamiento de leucemias crónicas. <sup>(26)</sup>
- **Antimetabolitos** actúan en la fase de síntesis del ciclo celular porque interfieren en la síntesis de ADN y ARN. La mayoría son análogos estructurales de los metabolitos que normalmente intervienen en los procesos de crecimiento y división, incorporándose a las moléculas de ADN y ARN. La mayoría son análogos estructurales de los metabolitos que normalmente intervienen en los procesos de crecimiento y división, incorporándose a las moléculas de ADN y ARN, transmitiendo falsos mensajes. Otros inhiben enzimas específicas necesarias para la síntesis de compuestos esenciales. Su eficacia, en general, es máxima cuando la proliferación celular es rápida. Este tipo de fármacos, entre los que se incluyen, 5-fluoracilo, metotrexato o gemcitabina se administran a enfermos que padecen tumores de mama, ovario o bien de tracto gastrointestinal y también pacientes que padecen leucemia crónica. <sup>(5)</sup>
- **Inhibidores de la mitosis (Taxanos):** paclitaxel, docetaxel, son fármacos de reciente aparición; el paclitaxel fue aislado de un árbol, *Taxus brevifolia* y posteriormente surgió el docetaxel, análogo semisintético de paclitaxel. Constituyen en la actualidad una de las principales armas terapéuticas

---

---

en el tratamiento quimioterapéutico del cáncer de ovario, mama, pulmón no microcítico, próstata e incluso inhibe la metástasis de distintos tumores. Actúa promoviendo la formación de microtúbulos al unirse a la  $\beta$ -tubulina formándose estructuras microtubulares anómalas o excesivamente estables que no pueden participar en la mitosis, presentándose un acúmulo de células en la fase G2-M<sup>(27)</sup>. También presentan la capacidad de activar e inducir apoptosis mediada por caspasa 10.

- **Antibióticos (con efecto citostáticos).** Son de origen y estructura muy diversos y su mecanismo de acción también puede ser muy diferente: intercalarse entre cadenas de ADN, inhibir topoisomerasas y alterar la membrana celular. La mayoría no son específicos del ciclo celular.<sup>(28,29)</sup>
- **Inhibidores de la Topoisomerasa I:** estabilizan el complejo seccionable y terminan por escindir las cadenas de ADN y matar la célula. La **camptotecina** fue el principal activo de la planta *Camptotheca acuminata* cuyo extracto mostró actividad antitumoral frente a leucemias y diversos tumores sólidos.<sup>(28,29)</sup>
- **Inhibidores de Topoisomerasas II.** Es inhibida por los derivados de la podofilotoxina (etopósido y tenipósido) y por antibióticos antraciclínicos (daunorrubicina y doxorubicina).<sup>(28,29)</sup>
- **L- Asparraginasas:** Es una enzima que hidroliza la asparragina en ácido aspártico y amoníaco. La L-asparragina es un aminoácido *no* esencial sintetizado por las células del organismo humano por transaminación del ácido L-aspártico; el grupo amino es aportado por la glutamina, siendo catalizada la reacción por la L-asparragín-sintetasa. Esta enzima abunda en las células que, de este modo, sintetizan su propia asparragina, pero algunas células, como las leucémicas linfoblásticas agudas, carecen de asparragín-sintetasa, por lo que su suministro de asparragina depende exclusivamente del medio extracelular. En tal caso, la reducción plasmática de L-asparragina provocada por la L-asparraginasas significa la interrupción del aporte del aminoácido a dichas células y su consiguiente incapacidad para sintetizar proteínas. La citotoxicidad del producto es proporcional a la inhibición de la síntesis proteica.<sup>(28,29)</sup>
- **Diversas hormonas** (hipotalámicas, glucocorticoides, andrógenos, estrógenos y gestágenos) y sus correspondientes antagonistas son muy eficaces en tumores hormonodependientes. Existen, además, otras sustancias de diverso tipo que actúan por mecanismos muy variados.<sup>(4)</sup>

**TABLA 5. CLASIFICACIÓN AGENTES CITOSTÁTICOS EN FUNCIÓN DE SU MECANISMO DE ACCIÓN**

Clasificación	Principios Activos	Mecanismos de acción	Fase principal de actividad en el ciclo celular
Agentes Alquilantes	Ifosfamida Ciclofosfamida Treosulfan Carboplatino Cisplatino Tiotepan Mecloretamina Clorambucilo Busulfan Nitrosureas Dacarbazina	Alquilación del ADN ↓ Enlaces cruzados ↓ Inhibición de la replicación del ADN	Actividad inespecífica en todas las fases del ciclo.
Antimetabolitos	Citarabina 5-Fluorouracilo Gemcitabina Mercaptopurina Metotrexato Floxuridina Hidroxiurea Hexametilmelanina Amsacrina Procarbazina Irinotecan	Incorporación de una base falsa en el ADN ↓ Inhibición enzimática o codificación errónea en la síntesis del ADN	Fase S
Inhibidores de la mitosis (Taxanos)	Paclitaxel Vinorelbina Docetaxel Vincristina Vinblastina Vindesina	Alteración de la formación de microtúbulos ↓ Detección de la mitosis en metafase	Fase M
Antibióticos con efecto citostáticos	Daunorubicina Doxorubicina Epirubicina Mitoxantrona Dactinomicina Mitomicina C	Intercalación entre base del ADN ↓ Inhibición de la biosíntesis del ADN	Fase S Fase G <sub>2</sub>
Inhibidor de la Topoisomerasa I	Etopósido Tenipósido	Inhibición de la Topoisomerasa I: inhibe la torsión del ADN	Fase S Fase G <sub>2</sub> Fase M
Inhibidor de la Topoisomerasa II	Topotecan	Inhibición de la Topoisomerasa II que cataliza la torsión del ADN, también procesos opuestos	Fase S
L-Asparaginasa	L-Asparaginasa	Inhibición de la síntesis de proteínas y de la síntesis del ADN y ARN.	Fase G <sub>1</sub>

Las células cancerosas crecen y se reproducen muy rápidamente, y por ello los agentes que se usan para el tratamiento de quimioterapia, en general, son aquellos que atacan las células de crecimiento rápido, interactuando con su ADN, su ARN o con la síntesis de proteínas celulares. De igual forma los agentes que se usan para combatir el cáncer también pueden afectar a las células normales de tejidos de rápida renovación y en ocasiones causar efectos secundarios indeseables. Dentro de estos efectos secundarios destacan fatiga, náuseas y vómitos, pérdida de cabello, dolor, pancitopenia, infecciones, etc. Además existe una toxicidad que implica a determinados órganos con cierta especificidad; los más frecuentemente afectados son el pulmón, el hígado, el riñón y las estructuras nerviosas. (véase **Tabla 6**)

<b>Tabla 6. Efectos secundarios por antineoplásicos (Toxicidad).</b>		
	<b>Común a muchos fármacos</b>	<b>Se aprecia preferentemente con uno o dos fármacos</b>
1. Inmediata (comienzo en horas-días)	Nauseas y vómitos Necrosis tisular local Flebitis Hiperuricemia Insuficiencia renal Anafilaxia Erupción cutánea	Cistitis hemorrágica (ciclofosfamida e ifosfamida) Hipocalcemia (mitomicina) Rubefacción facial (mitramicina) Reacción de recuerdo radioterápico (dactinomicina) Fiebre/escalofríos (bleomicina e interferón)
2. Temprana (comienzo en días-semanas)	Leucopenia Trombocitopenia Alopecia Estomatitis Diarrea Megaloblastosis	Íleo paralítico (vincristina) Hipercalcemia (estrógenos) Psicosis (corticoides) Coagulación intravascular (asparraginasas) Retención líquida (estrógenos y corticoides) Síndrome griposo (dacarbazina)
3. Diferida (comienzo en semanas-meses)	Anemia Aspermia Lesión hepatocelular Hiperpigmentación Fibrosis pulmonar	Neuropatía periférica (vincristina) Necrosis cardíaca (adriamicina y ciclofosfamida) Estreñimiento (vincristina) Síndrome de Cushing (corticoides) Masculinización (andrógenos) Feminización (estrógenos) Ictericia colestásica (mercaptopurina) Síndrome Addisoniano (aminoglutetimidato y busulfano)
4. Tardía (comienzo en meses-años)	Esterilidad Hipogonadismo Carcinogénesis Leucemia aguda Linfomas Tumores sólidos Otras malignizaciones Secundarias	Fibrosis hepática (metotrexato) Encefalopatía (metotrexato y radiación del SNC) Carcinoma de vejiga (ciclofosfamida) Osteoporosis (corticoides)

La modificación estructural del genoma, provocada por los propios fármacos, puede originar otras formas de toxicidad cada vez más preocupantes: la mutagenicidad y la carcinogenicidad (véase **Tabla 7**).

A medida que la expectativa de vida aumenta al mejorar la sistemática de la administración, se incrementa la probabilidad de que ciertos antineoplásicos provoquen mutaciones génicas, algunas de las

cuales significan una pérdida del control de crecimiento y diferenciación de células hasta entonces normales, originando así un nuevo tipo de tumor. <sup>(28)</sup>

<b>TABLA 7. FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS CON TOXICIDAD GONADAL Y CARCINÓGENA</b>			
<b>A. Riesgo de Toxicidad Gonadal</b>			
<b>Con certeza</b>	<b>Probable</b>	<b>Improbable</b>	<b>Pendiente de valoración</b>
Busulfano Ciclofosfamida Clorambucilo Mostaza nitrogenada Mostaza-L-Fenilalanina Procarbazina	Citarabina Doxorrubicina Vinblastina	5-Fluorouracilo 6-Mercaptopurina Metotrexato Vincristina	Bleomicina Cisplatino Nitrosoureas
<b>B. Riesgo de Carcinogénesis</b>			
<b>Alto</b>	<b>Bajo</b>	<b>Desconocido</b>	
Azatioprina Ciclofosfamida Clorambucilo Melfalán Nitrosoureas Procarbazina Tiotepa	Citarabina 5-Fluorouracilo Metotrexato	Bleomicina Cisplatino Dactinomicina Doxorrubicina Vinblastina Vincristina	

Además de lo anterior estos fármacos producen una quimioresistencia de las células neoplásicas. Es posible que desde el principio del tumor, todas o una fracción de las células sean intrínsecamente resistentes al fármaco; es la resistencia *de novo*.

Puede ocurrir, en tal caso, que el factor genético responsable de la resistencia sea transferido de las resistentes a las sensibles a lo largo de la vida del tumor. Pero también es posible que las células inicialmente sensibles, puestas en contacto con el fármaco, desarrollen procesos de adaptación utilizando mecanismos de diversa naturaleza. Esta resistencia no se desarrolla en las células normales, sino sólo en las cancerosas; siendo una propiedad que acompaña a la existencia de un genoma mutable e inestable como es el de las células que se han transformado en cancerosas. <sup>(28,29)</sup>

Por todo lo antes expuesto se siguen buscando los modelos o métodos experimentales que ayuden de mejor manera la identificación de fármacos antineoplásicos.

---

---

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Actualmente no se cuenta con un documento que reúna los métodos experimentales que sirven para evaluar fármacos –aislados de productos naturales o de síntesis- potencialmente antineoplásicos-. Por tal razón el material que se realiza servirá como base de consulta para los estudiantes del modulo de Evaluación de Fármacos y Medicamentos II, de igual manera a docentes, investigadores y personas interesadas en estudiar el efecto antineoplásico de nuevos fármacos potencialmente activos, en modelos experimentales *in vitro* e *in vivo*, que son empleados en la estrategia de evaluación de posibles antineoplásicos.

---

---

## **OBJETIVO GENERAL**

Recopilar mediante revisiones bibliograficas y electrónicas información referente a los modelos experimentales aceptados en fase preclínica para la evaluación de fármacos potencialmente antineoplásicos.

## **OBJETIVO PARTICULAR**

Identificar los modelos experimentales *in vitro* e *in vivo* que se emplean en el estudio de los fármacos antineoplásicos.

---

---

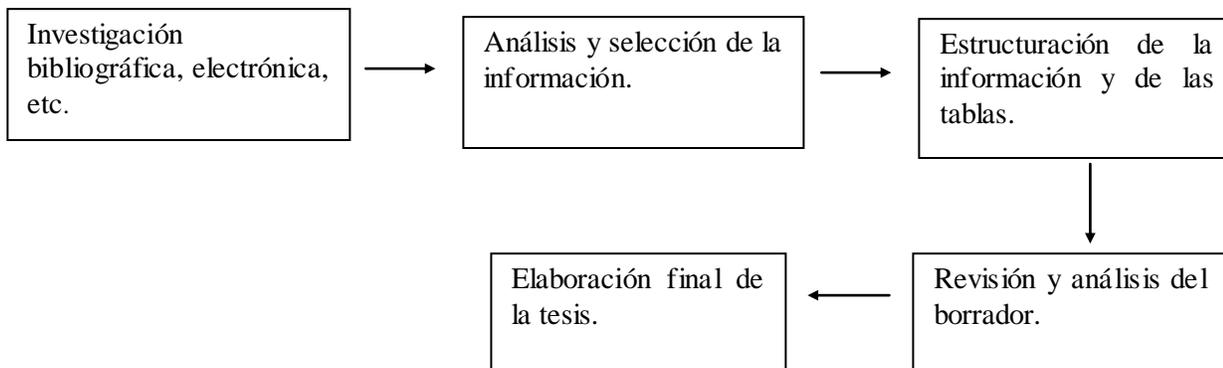
## MATERIAL Y MÉTODO

Referencias primarias (Revisión de libros, revistas, artículos y tesis).

Referencias secundarias. (Revisión en internet). Revisión de referencias publicadas del 2003-2010.

Computadora.

### DIAGRAMA DE FLUJO



---

## V. BÚSQUEDA DE NUEVOS FARMACOS CON ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICAS

En el desarrollo de una nueva molécula para el tratamiento, diagnóstico, prevención o rehabilitación de una enfermedad se sigue un recorrido prolongado y azaroso, a través de dos etapas bien definidas: **la preclínica y la clínica**.

Es importante reconocer que durante el estudio sólo una pequeña fracción de las moléculas descubiertas o sintetizadas llega a comercializarse. La inversión requerida – en tiempo y dinero - a lo largo del proceso es muy importante (7 a 15 años y decenas a centenares de millones de dólares). Hay múltiples aspectos involucrados: científicos, éticos, comerciales, regulatorios, legales, etc. No todos los productos aprobados son útiles, y no todos persisten en el mercado para siempre algunos son retirados por efectos adversos, y otros se vuelven obsoletos. <sup>(30)</sup>

### 5.1. ETAPA PRECLÍNICA

El primer paso de este proceso es identificar aquellas moléculas que pueden tener elevada probabilidad de tener una actividad biológica importante, éstas pueden provenir a través de las siguientes fuentes:

- ◆ Empleo de plantas empleadas en la medicina tradicional.
- ◆ Sustancias fisiológicas de origen animal.
- ◆ Química empírica y farmacología sistemática.
- ◆ Empleo de Biotecnología.
- ◆ Diseño molecular racional, y síntesis en el laboratorio.
- ◆ Síntesis de análogos de una molécula exitosa ya aprobada, con el propósito de hacer derivados mejorados de un fármaco líder (Serendipia o hallazgo casual).

Una vez que la molécula es sintetizada o extraída se emplea un conjunto de modelos experimentales denominados *in vitro* e *in vivo*, a los cuales a través de métodos ó ensayos de **cribaje, tamisaje, cernimiento o screening**, se explora el perfil farmacológico de una molécula. Además durante esta etapa, es posible identificar la diana molecular en la que el fármaco esta interactuando.

Los sistemas de cernimiento o tamisaje, se dividen y caracterizan en:

Cernimiento primario, cuyas características son:

- Diseño simple.
- Blanco terapéutico definido: enzimas, receptores, ADN.
- Alta sensibilidad y especificidad usualmente se emplea una sola concentración.

Cernimiento secundario en el cual se emplean ensayos heterogéneos es utilizado para:

- Confirmar la especificad sobre el blanco a un mayor nivel de complejidad lo que implica un costo más elevado.

- 
- 
- Permitir evaluación de efecto umbral y relación concentración respuesta.

En la actualidad, los procesos de cribado a gran escala suelen llevarse a cabo a partir de bibliotecas de miles de compuestos obtenidos por síntesis combinatoria (quimiotecas). Estas quimiotecas se someten a ensayos bioquímicos, generalmente automatizados, frente a una amplia batería de dianas terapéuticas. Este procedimiento de tamizado se conoce como “Análisis de alto rendimiento o de alto flujo” o **HTS (High Throughput Screening)** y constituye uno de los métodos más empleados en la actualidad por las grandes compañías farmacéuticas para búsqueda de nuevos compuestos.<sup>(31)</sup>

El HTS es un proceso en el que un elevado número de compuestos se analiza mediante un ensayo que pone de manifiesto su capacidad de interactuar con una diana farmacológica dada. Aquellos compuestos que resulten activos en el ensayo primario serán sometidos a posteriores estudios encaminados hacia su potencial farmacológico para el tratamiento de la enfermedad de interés. Con este tipo de técnica se pueden analizar entre 100 mil y 2 millones de compuestos al año, de los que sólo unos pocos podrán considerarse candidatos a fármacos y avanzarán en las fases posteriores del desarrollo farmacéutico.<sup>(32)</sup>

**Las técnicas analíticas que con frecuencia se emplean en el tamisajes de actividad son:**

- ◆ Radioactividad.
- ◆ Colorimetría.
- ◆ Turbidimetría.
- ◆ Fluorescencia.
- ◆ Quimioluminiscencia.
- ◆ Bioluminiscencia.
- ◆ Citometría.

## 5.2. ETAPA CLÍNICA

Una vez estudiado en tubos de ensayo y en animales, el medicamento puede estar listo para ser evaluado en humanos (o no). Debido a numerosos inconvenientes, abusos y desastres en la historia de la medicina, se ha implementado un sistema de control en la mayoría de los países: La autoridad sanitaria tiene capacidad de vetar el inicio de la investigación en humanos si considera que no se brindan suficientes garantías de seguridad. En otras palabras, la investigación clínica requiere autorización previa por la autoridad sanitaria nacional. Tal solicitud se conoce por su sigla: IND (Nueva Droga de Investigación), si al finalizar el plazo legal no ha habido objeciones o respuesta oficial, el estudio en humanos queda autorizado de oficio.<sup>(25, 28,29)</sup>

Las etapas de la investigación clínica de fármacos se conocen con el nombre de fases I, II, III y IV.

### 5.2.1. Fase I ¿Es Seguro?

La investigación en fase I representa la primera ocasión en que un nuevo fármaco es evaluado en humanos sanos, y tiene como propósito fundamental determinar si éste es seguro o no, esta fase no se aplica para los antineoplásicos, pero es importante mencionarla ya que en los demás fármacos si es utilizada.<sup>(28,29)</sup>

---

Los objetivos típicos de esta fase son:

- Identificar una dosis segura, para realizar ulteriores estudios. En pacientes con cáncer y bajo la premisa *más es mejor*, es importante identificar la dosis máxima tolerada.
- Describir la toxicidad en humanos (por primera vez), e identificar la toxicidad limitante.
- Describir (por primera vez) la farmacocinética del nuevo fármaco en humanos.

### 5.2.2. Fase II ¿Es activo?

Si la fase I fue completada sin mayores incidentes, ahora ya se sabe que dosis usar, pero queda una pregunta: ¿el fármaco produce el efecto terapéutico buscado en pacientes con patologías específicas?

Así en esta fase se evalúa la actividad y toxicidad del fármaco, en un ensayo clínico no-controlado. La actividad se expresa como el porcentaje de los pacientes tratados que alcanza un cierto nivel de respuesta (desaparición del tumor, baja de la carga viral, desaparición de la fiebre, etc.), sin implicar ningún tipo de comparación. <sup>(28,29)</sup>

### 5.2.3. Fase III ¿Es activo doble ciego?

Una vez obtenido un resultado interesante en la fase II, podría considerarse que el nuevo fármaco está listo para desafiar al tratamiento estándar, para esto se diseña un ensayo clínico comparativo (es la fase III). <sup>(28,29)</sup>

En ésta, se desea comparar la *eficacia y seguridad* del nuevo fármaco contra el medicamento estándar. Para que ambos grupos sean comparables, la asignación deberá ser hecha al azar; se hace un estudio doble ciego en el cual ni el paciente ni el médico saben que tratamiento se está administrando. Con esto se permite un mejor análisis de los resultados, posteriormente:

- Si el nuevo tratamiento resultó superior, es probable que sea aprobado para la indicación (patología) en que fue demostrado superior al estándar.
- Si el nuevo tratamiento fue inferior, probablemente no sea aprobado, y haya que evaluar si el fármaco nuevo tiene alguna posibilidad en otra patología (volver a empezar).

### 5.2.4. Fase IV Post-aprobación de la droga para una determinada indicación

Para registrar un nuevo fármaco, deben recopilarse y presentarse los datos de todos los estudios preclínicos y clínicos, junto con la descripción del proceso de fabricación, a las autoridades reguladoras para solicitar el registro. El nuevo fármaco puede entonces comercializarse para que llegue a los pacientes.

Una vez que el medicamento está en el mercado, es necesario seguir monitorizando constantemente los efectos secundarios y comunicarlos a las autoridades reguladoras. Además, a menudo se llevan a cabo programas de ciclo de vida, incluyendo estudios clínicos de fase IV, para explorar y añadir nuevas indicaciones o mejorar las formulaciones existentes del medicamento. <sup>(28,29)</sup>

Por lo mismo, es importante "vigilar" lo que sucede. De allí la expresión "Farmacovigilancia".

### 5.3. EVALUACIÓN DE FÁRMACOS ANTINEOPLÁSICOS

Los antineoplásicos como cualquier otro fármaco deben de pasar por estas fases a excepción de la fase I como ya se menciona con anterioridad. La citotoxicidad se mide por medio de métodos experimentales que nos ayudan a evaluarla, esto es de manera *in vitro* de forma general los autores incluyen parámetros para la medición de la misma. (véase **Tabla 8**).<sup>(34)</sup>.

Estos parámetros servirán para separar los métodos experimentales de acuerdo al blanco de ataque.

<b>Tabla 8. Parámetros de Medición de Citotoxicidad</b>	
<b>Punto Final</b>	<b>Parámetro Experimental</b>
Morfología Celular	Tamaño de la célula Contacto célula-célula Número nuclear, tamaño, forma e inclusiones. Formación de vacuola nuclear. Formación de vacuola citoplasmática.
Viabilidad Celular	Captación de colorante vital. (Diacetato de fluoresceína y derivados) Prueba de Exclusión de Azul de Tripano. Cuento de número celular. Eficiencia de Replantación.
Célula de adhesión	Apego a la superficie de cultivo. Desprendimiento de cultivo sobre la superficie. Adhesión célula-célula
Proliferación celular	Incremento del número celular. Incremento del ADN total. Incremento del ARN total. Incremento en proteínas totales. Formación de colonias.
Daño de Membrana	Perdidas de las enzimas citolíticas (LDH, GOT, GPT). Pérdida de iones o Co-factores ( $Ca^{2+}$ , $K^+$ , NADPH) Fuga de células precargadas. Fuga a través de la membrana celular.
Absorción / Incorporación	Timidina y síntesis de ADN. Uridina y síntesis de RNA. Aminoácidos y síntesis de proteínas.
Efecto Metabólico	Inhibición de la cooperación metabólica. Co-factor de Agotamiento. Deterioro de la función mitocondrial. Alteración Lisosomal (Tinción de Rojo Neutro)

Además de medirla de forma *in vitro* se debe de evaluar en forma *in vivo* ya que se debe apreciar la forma en que actúa el fármaco en el metabolismo debido a que el cáncer es una enfermedad que se presenta en múltiples formas, según el tejido donde se origina esto ha obligado a la creación de distintos modelos que

---

puedan abarcar ese polimorfismo.

Así, aparte de los modelos de carcinogénesis epitelial, se pueden reproducir experimentalmente mediante la utilización de carcinógenos químicos:

- Adenocarcinomas mamarios en ratas jóvenes, tras la administración de una dosis intravenosa del agente alquilante N-metilnitrosurea (NMU).
- Linfomas de timo, en este modelo se utilizan ratones jóvenes a los que se inyectan NMU intraperitonealmente o bien se exponen a radiación gamma.
- Tumores del sistema nervioso. Para provocar este tipo de neoplasias se inyecta, en fetos de ratas, por vía trasplacentaria otro agente alquilante el N-etinil- nitrosurea (ENU).
- Tumores hepáticos que pueden inducirse con mayor incidencia tras inyectar carcinógenos por vía intraperitoneal a algunas cepas de ratas o ratón que desarrollan espontáneamente tumores de hígado con gran frecuencia.
- Plasmocitomas, se trata de un tipo de linfoma que puede inducirse en ratones mediante la inyección intraperitoneal de una serie de hidrocarburos, sobre todo el pristano (2, 6, 10, 14-tetrametilpentadecano).<sup>(32)</sup>

En la actualidad el Instituto Nacional de Cáncer en Estados Unidos, USA (National Cancer Institute, NCI) aplica un programa como parte de los estudios preclínicos, para la selección y evaluación de nuevos fármacos que contribuyan al tratamiento de las diferentes neoplasias. El desarrollo de este fármaco es prolongado y se calcula que el tiempo transcurrido desde su descubrimiento hasta la aprobación por las autoridades sanitarias como medicamento puede ser de 6 a 17 años, como se aprecia en el (diagrama 3)

Dicho programa consiste en realizar un ensayo de pre-selección, a una sola dosis por 48 horas de exposición al compuesto sobre tres líneas celulares de cáncer: Los compuestos seleccionados deben cumplir con el criterio mínimo de inhibición del crecimiento que es, al menos en una de las tres líneas celulares probadas mostrar una inhibición del 32% mayor al que se observa con un fármaco control.<sup>(29,32)</sup>

Las moléculas que son preseleccionadas, se evalúan en 60 o hasta 75 líneas celulares para determinar su  $CI_{50}$  (concentración inhibitoria 50, definida como la concentración a la cual un compuesto inhibe el 50% del crecimiento de la población celular) a 5 concentraciones desde 0.01-100  $\mu M$ ; y se eligen aquellos que tengan una  $CI_{50}$  menor o igual a 1 $\mu M$ , o que presenten especificidad sobre alguna de las líneas celulares.<sup>(29)</sup>

Una vez terminada la selección *in-vitro* se realizan estudios *in-vivo*, por medio del modelo de inducción de tumores en ratones atímicos, utilizando 12 líneas celulares, 2 de cada tipo de cáncer humano: mama, colon, pulmón, melanoma, cerebro y ovario. Se considera la disminución del tamaño del tumor respecto al tiempo para la selección de moléculas activas. Y si se conoce que actúa sobre una molécula diana, se realizan estudios adicionales para establecer el mecanismo de regulación de dicha molécula.<sup>(25)</sup>

Una vez que se realiza la formulación farmacéutica, se llevan a cabo los perfiles farmacológicos y toxicológicos *in-vivo*. La Administración de Fármacos y Alimentos de Estados Unidos (Food and Drug

Administration, FDA), requiere reportes farmacológicos y toxicológicos de los estudios en al menos 2 especies, y que se incluya una no roedora.

Los ensayos *in-vitro* de citotoxicidad en líneas celulares de cáncer de origen humano representa un método estándar para la selección de fármacos antineoplásicos. Dado que permite la selección simultánea de gran número de nuevas moléculas con relativa facilidad. El parámetro que se emplea en este tipo de ensayos es la  $CI_{50}$ . Sin embargo, la principal desventaja es que no se puede identificar si el fármaco requiere una activación metabólica para que sea activo en los pacientes, o que el metabolismo de cada persona pueda inactivarlo. Además, no proporciona información de la toxicidad sistémica ya que el modelo *in-vitro* no es representativo de la población celular en el tejido tumoral. <sup>(33, 35)</sup>

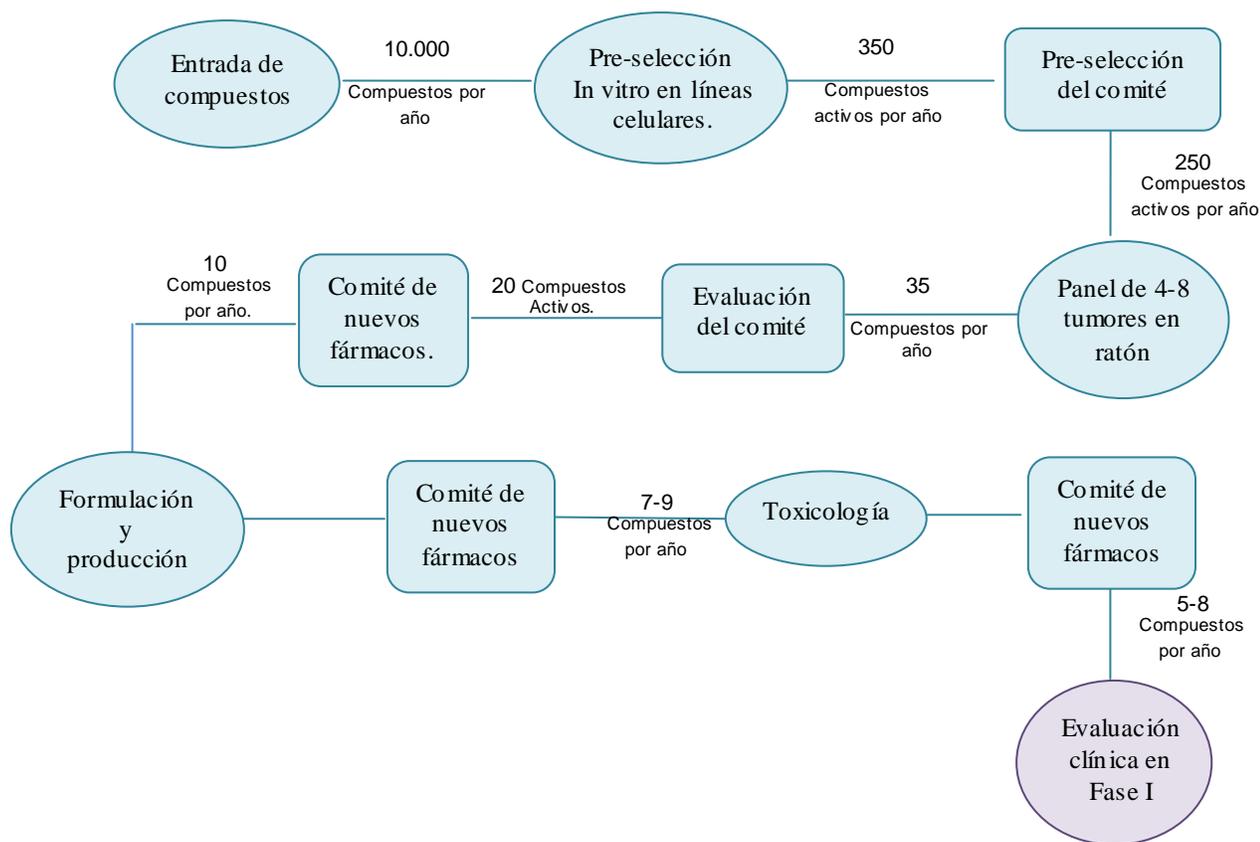


Diagrama 2. Programa de selección y evaluación de nuevos fármacos del NCI (Nationale Cancer Institute).

## VI. MÉTODOS EXPERIMENTALES EMPLEADOS EN LA ETAPA PRECLÍNICA.

El protocolo experimental que se emplea en el estudio preclínico en la búsqueda de antineoplásicos, van a estar de acuerdo a el objetivo que se pretende medir, es decir cuantificar la viabilidad, y el tipo de muerte la cual puede ocurrir por apoptosis y/o necrosis.

Para evaluar a los posibles compuestos antineoplásicos, se utilizan varios modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, ambos ofrecen ventajas y desventajas, las cuales se describen a continuación (véase **Tabla 9**).

<b>Tabla 9. Análisis Comparativo de los Modelos <i>In Vitro</i> e <i>In Vivo</i>.</b>		
<b>Modelos de detección</b>	<b>Ventaja</b>	<b>Desventaja</b>
<i>In Vitro</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alta sensibilidad.</li> <li>• Bajo costo.</li> <li>• Rapidez.</li> <li>• No está limitada la población de estudio.</li> <li>• Se evita interferencia de la respuesta del organismo.</li> <li>• Versatilidad en el diseño experimental.</li> <li>• Posibilidad de automatización, robotización, miniaturización.</li> <li>• Utilización de material biológico humano.</li> <li>• Reducción del número de animales.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• No es detectable la actividad mediado por hospedero.</li> <li>• No existe una estimación de las diferencias.</li> <li>• Efecto tumor contra hospedero.</li> <li>• Carece de sensibilidad para compuestos que requieren de alto grado de biotransformación.</li> </ul>
<i>In Vivo</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Detección de la actividad mediante un anfitrión.</li> <li>• Estimación Terapéutica de la Dosis.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Baja sensibilidad</li> <li>• Alto costo</li> <li>• Periodos de tiempo prolongados</li> <li>• Limitada la población de estudio</li> </ul>

A continuación se hablara un poco de la historia de los modelos *in vitro* e *in vivo* dando paso a la fundamentación de cada método, ventajas y desventajas.

### 6. *In Vitro*

Los modelos *in vitro* son usados para el estudio de mecanismos moleculares inherentes para la transformación neoplasica de células normales. Estos ensayos usan células procarioticas y humanas,

tienen diferentes niveles de complejidad y pueden superar el aspecto ético relacionado a la experimentación animal. <sup>(16)</sup>

Los modelos *in vitro*, se han empleado desde hace varias décadas, iniciándose con la evaluación mutagénica, conocida como la prueba de **Ames**, puesto que el cáncer está vinculado a menudo con el daño del ADN. <sup>(35,36, 37)</sup>

En la siguiente tabla se muestra la evolución que se tuvo de estudios *in vitro* (véase **Tabla 10**).

<b>TABLA 10. CRONOLOGÍA DE LOS EVENTOS MÁS DESTACADOS HECHOS DE MANERA <i>IN VITRO</i>.</b>		
<b>Fecha</b>	<b>Evento</b>	<b>Investigador</b>
1885/1898	Primer tejido que se mantuvo <i>in vitro</i> y primer tejido humano que se mantuvo en líquido ascético.	Wilhem Roux/ Ljunggren
1907/1911	Experimento de crecimiento de la fibra de nervio de la rana. Primeras investigaciones de factores en el medio requerido para el crecimiento y la supervivencia.	Ross Harrison/ Warren Lewis
1912	*Explante de tejido conectivo de pollo; Corazón musculo contráctil para 2-3 meses.	Carrel, Burrows
1916	*Tripsinización y subcultivo de explante.	Rous & Jones
1923	Subcultivo de líneas de células de fibroplasto.	Carrel & Ebeling
1925-1926	Diferenciación <i>in vitro</i> en cultivo de órganos.	Strangeways & Fell
1940s	Introducción del uso de antibióticos en cultivos de tejidos.	Keilova; Cruikshank & Lowbury.
1951	Primera línea continua de célula de cáncer humano (HeLa)	George Gey
1965/1969	Primer medio definido sin suero y formación de colonias en células hematopoyéticas.	Ham/ Metcalf
1965	Desarrollo y empleo de grandes números de líneas celulares.	Multiple
1970s	Desarrollo de gabinetes de flujo-laminar. Factor de crecimiento de fibroblastos Se detecta que las células de HeLa contaminan con línea celular 3T3 en cultivos celulares.	Kruse ; Collins & Kennedy, Gospodarowicz Nelson-Rees & Flandermeyer
1977	Se emplean disco de los tubérculos de patata de la especie <i>Solanum tuberosum L.</i> infectados con <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .	-----
1979	Los tumores de la rozadura de la corona en plantitas de guisante <i>Pisum sativum L.</i> demostraron ser un buen sistema preeditor del cáncer y por ende un sistema para evaluar fármacos anticancerígenos.	-----
1980/1983	Regulación de expresión de genes y del ciclo celular.	Darnell/ Evans
1990s	Escala industrial de cultivos de células transfectadas para la producción de productos biofarmacéuticos	Butler
2000- presente	Proyecto Genoma Humano: la genómica, la proteómica, las deficiencias y errores de expresión genética. La explotación de la ingeniería tisular.	Dennis Atala & Lanza; Vunjak- Novakovic & Freshney.

\*Explante: tejido que es removido de un organismo y transferido a un medio de cultivo para que pueda crecer.

En los modelos *in vitro* hay varias formas de medir la toxicidad de los antineoplásicos ya que se pueden ver los cambios en una célula, el metabolismo enzima, gen o tejido esto lo podemos observar

---

utilizando un colorante o algún cromóforo con la ayuda de algún equipo como el espectro, microscopio, PCR, citómetro de flujo, entre otros.

## **6.1 FUNDAMENTOS DE LOS MÉTODOS PARA EVALUAR CITOTOXICIDAD**

### **6.1.1 Tinción de Yoduro de Propidio**

El yoduro de propidio tiene afinidad por el ADN (se intercala en la doble cadena de ADN) esto permite una evaluación rápida y sencilla de la muerte celular, dado que dicho proceso implica cambios en el equilibrio osmótico celular que conlleva la rotura de membrana (véase **Tabla 11**).<sup>(39)</sup>

### **6.1.2 Ensayo de 5-Bromodeoxiuridina (BrdU)**

La BrdU es un análogo halogenado de la timidina que se integra permanentemente en el ADN de las células en división durante su síntesis en la fase S del ciclo celular. El BrdU puede ser detectado inmunocitoquímicamente, permitiendo la identificación de las células que se encontraban dividiendo durante el período de exposición al BrdU (véase **Tabla 11**).<sup>(40,41,42)</sup>

### **6.1.3 Tinción 4'6-diamino-2-fenilindon diclorohidrato (DAPI)**

El DAPI es un cromóforo fluorescente de tonalidad azul que posee más afinidad por el ADN de doble cadena, pues se une a los dímeros Adenina Timina (AT) que existen en el surco menor del ADN. Esta unión produce una fluorescencia azul, debido a que el compuesto desplaza moléculas de agua en el surco menor. Tiene capacidad de unirse también al ARN, pero el modo en que lo hace es por la unión a los dímeros Adenina Uracilo (AU), emitiendo una fluorescencia en un rango distinto (véase **Tabla 11**).<sup>(39,43)</sup>

### **6.1.4 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Esta técnica fue desarrollada por Mullis y Faloona en 1985, permite generar de 107 a 1011 copias de una secuencia específica de ADN. Se basa en la habilidad de la polimerasa para copiar cadenas de ADN usando un fragmento del mismo como template iniciador. Los productos de PCR, una vez sintetizados, pueden ser analizados por electroforesis utilizando geles de agarosa o acrilamina, también se puede utilizar hibridación con sondas radiactivas o marcadas con fluorescencia que se visualiza mediante autoradiografía (véase **Tabla 11**).<sup>(9)</sup>

De esta técnica se derivan otras que pueden utilizar tejido incluido en parafina estas técnica son realizadas *in situ*.

### **6.1.5 Southern Blot (SB)**

La técnica de Southern blot (SB) fue descrita por Eward Southern en 1975, 7 y consiste en obtener ADN genómico, el cual es dirigido con una o varias endonucleasas de restricción generando fragmentos más pequeños, éstos son separados por electroforesis en geles de agarosa y transferidos a una membrana sólida de nitrocelulosa o nylon. Después de la transferencia, se realiza hibridación con una sonda marcada radiactivamente, y el segmento hibridado se pone en contacto con un revelador (véase **Tabla 11**).<sup>(9)</sup>

---

### 6.1.6 Northern Blot

Se realiza siguiendo pasos similares al análisis por SB. Este método identifica cambios en el tamaño y cantidad del RNAm, lo cual refleja cambios en la expresión genética (véase **Tabla 11**).<sup>(9)</sup>

### 6.1.7 La hendidura de PARP

La familia de cisteín proteasas conocidas como caspasas son parte de un mecanismo común de la destrucción celular.

La Poli (ADP-Ribosa) Polimerasa (PARP-1), es una enzima nuclear de 116 kDa, que cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa empleando como sustrato NAD<sup>+</sup>, sobre residuos carboxílicos de glutámico y aspártico de proteínas nucleares. Una de las funciones biológicas de la PARP-1 es la reparación del ADN y el mantenimiento de la integridad del genoma. Esta proteína nuclear funciona como sensor activándose en respuesta al daño del ADN de causa isquémica, señalizando la ruptura de su cadena.

Cuando la intensidad del daño al que está expuesto el ADN es severa, el estrés oxidativo induce una sobre activación de PARP -1, que tras consumir el NAD<sup>+</sup> y deplecionar de ATP las células, produce disfunción celular y muerte por necrosis.

Por último, fragmentos PARP en forma de 89kD y 24kD polipeptidos derivados del péptido de cuerpo entero 116kD durante la degradación del ADN celular puede ser medida por Western blot en combinación con quimioluminiscencia (ECL) de detección (véase **Tabla 11**).<sup>(44,45)</sup>

### 6.1.8 Timidina tritiada (3H-Timidina)

La timidina es un compuesto soluble, la cual es específica para el ADN. Se incorpora en la estructura macromolecular del ADN durante la síntesis y replicación de los cromosomas (véase **Tabla 11**).<sup>(40)</sup>

### 6.1.9 Ensayo de Micronúcleos

Los micronúcleos son fragmentos de cromosomas o cromosomas completos que espontáneamente o por causa de agentes que rompen cromosomas, como las radiaciones (agentes que se denominan clastógenos) o que dañan el huso mitótico, como la vincristina (aneuploidógenos), quedan fuera del núcleo durante la mitosis. Tales núcleos son mucho más pequeños que en núcleo principal, y de ahí su nombre de “micronúcleos”. Entonces, si el compuesto estudiado es un clastógeno, se formarían micronúcleos pequeños, pero si es un aneuploidógeno se observarían micronúcleos grandes, esto lo podemos observar en la figura 8 (véase **Tabla 11**).<sup>(17,46,47)</sup>

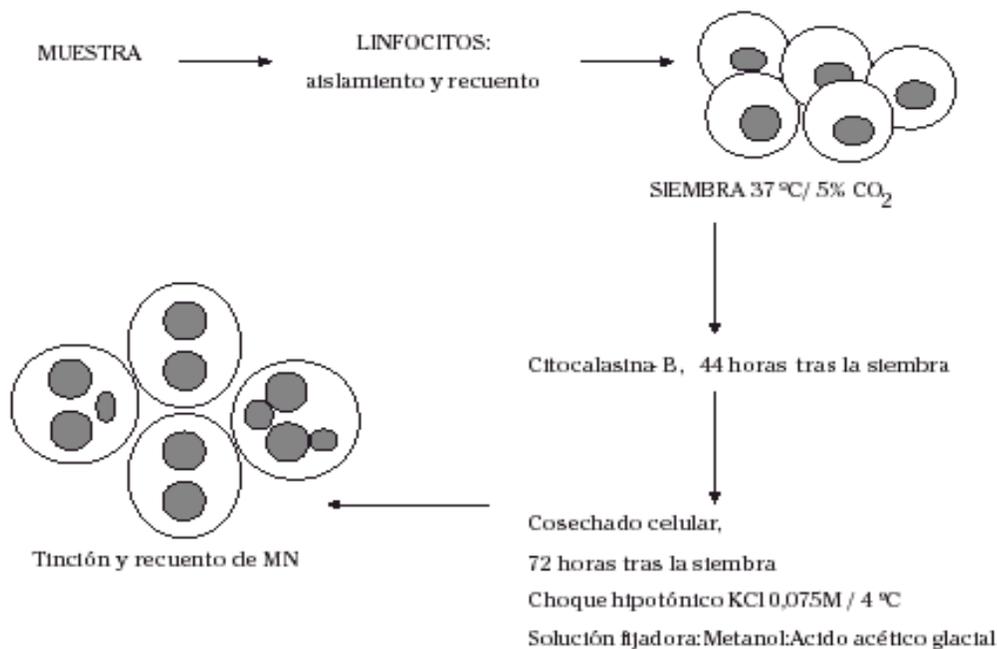


Figura 8. Ensayo de Micronúcleos. <sup>(44)</sup>

### 6.1.10 Electroforesis en gel de células individuales ó Ensayo Cometa

El ADN intacto mantiene una asociación altamente organizada con proteínas de la matriz en el núcleo, éste se relaja bajo condiciones alcalinas o neutras, los fragmentos de ADN roto o dañado migran lejos del núcleo. Al ser observada la célula al microscopio por fluorescencia teñidas con el bromuro de etidío, yoduro de propidio o por tinción con plata del material nuclear, da la apariencia de un cometa, con una cabeza que corresponde a la región nuclear, y la cola formada por fragmentos nucleares que han migrado en dirección opuesta. El gel se lee por la cantidad de fluorescencia que se queda en la cabeza y la longitud de la cola, así la extensión del ADN liberado de la cabeza del cometa es directamente proporcional a la cantidad de daño en el ADN nuclear como se muestra en la figura 9. El tratamiento se realiza sobre ADN desnudo, por tanto una alteración en la migración del ADN bajo estas condiciones indica que la sustancia de prueba es capaz de inducir daño al material genético, independientemente de la citotoxicidad y al efecto que puedan ejercer las barreras biológicas, todo esto se puede observar en la figura 9 (véase **Tabla 11**).  
(45,46, 47)

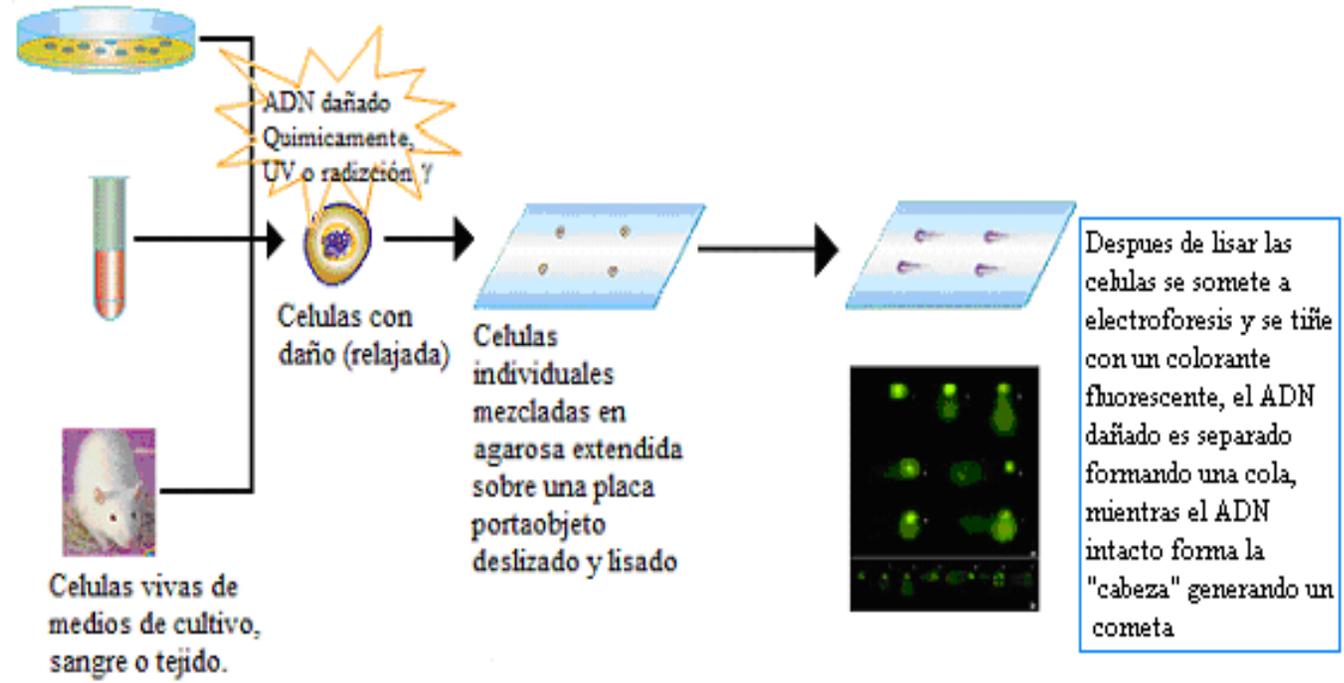


Figura 9. Ensayo Cometa.

**TABLA 11. TABLA COMPARATIVA DE LOS MÉTODOS QUE TIENEN COMO BLANCO ADN Y RNA**

<b>Método</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Ventaja</b>	<b>Desventaja</b>
5-Bromodeoxiuridina (BrdU)	El BrdU se incorpora al ADN en el momento de su replicación en células que entran en fase S del ciclo celular.	Seguimiento de proliferación celular <i>in vivo e in vitro</i> Revela detalles de la morfología nuclear celular.	No es un marcador confiable del número de divisiones celulares.
Tinción de Yoduro de Propidio	El yoduro de propidio se intercala en la doble cadena de ADN, produciendo cambios en el equilibrio osmótico de la célula que conlleva a la rotura de membrana.	Determina viabilidad celular Puede cuantificarse el contenido de ADN ser utilizado para microcopia como para citometría.	Uso de compuestos tóxicos Se requiere microscopio fluorescente.
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	Utiliza la capacidad de la polimerasa para copiar cadenas de ADN usando un fragmento del mismo como template iniciador.	Alta Sensibilidad. Requiere una cantidad mínima de tejido. Puede utilizar ADN purificado a partir de tejido incluido en parafina.	Requiere un equipo más complejo. Alto costo.
Southern Blot (SB)	Identifica secuencias específicas de ADN de una mezcla de ácidos nucleicos mediante el uso de electroforesis en gel seguida de hibridación empleando sondas complementarias.	Alta Sensibilidad.	Requiere un equipo más complejo. Alto costo. Requiere mayor volumen de ADN genómico. Requiere tejido fresco Consume mucho tiempo y trabajo.
Northern Blot	Identifica secuencias específicas de RNA mediante el uso de electroforesis en gel seguida de hibridación empleando sondas complementarias.	Alta Sensibilidad. Identifica tamaño y cantidad de RNA m	Requiere un equipo más complejo. Alto costo. Requiere tejido fresco. Consume mucho tiempo y trabajo.
La hendidura de PARP Poli (ADP-ribosa) Polimerasa -1	Proteína nuclear, que cataliza la transferencia de unidades de ADP-ribosa (a residuos carboxílicos de glutámico y aspártico de proteínas nucleares. Se activa en respuesta de daño del ADN.	Diferenciar apoptosis de necrosis. Es muy simple. Bajo costo.	Equipo especializado.

**TABLA 11. TABLA COMPARATIVA DE LOS MÉTODOS QUE TIENEN COMO BLANCO ADN Y RNA**

<b>Método</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Ventaja</b>	<b>Desventaja</b>
Ensayo de Micronucleos	Los micronúcleos son cuerpos citoplasmático de naturaleza nuclear. Es material genético no incorporado correctamente a las células hijas. Refleja aberraciones cromosómicas por errores durante la replicación y posterior división celular o por la exposición de agentes genotóxicas. Las aberraciones cromosómicas que responden a alteraciones de tipo estructural (efecto clastrogenico) o alteraciones numéricas (efecto aneugénico).	Facilidad de uso para el personal. Mayor rapidez para el conteo. Mayor poder estadístico. Se puede probar un solo químico sin otros compuestos. La prueba es confiables para demostrar efecto genotóxico.	No es cuantitativo. Se tiene que estudiar cada fase del ciclo celular por separado. No es útil en poblaciones celulares que no se dividen. No detecta agentes que no producen pérdidas de material genético o rezagos anafásicos.
Tinción 4´6-diamino-2-fenilindon diclorohidrato (DAPI)	El DAPI es un cromóforo fluorescente que se une fuertemente al DNA, pasa a través de la membrana celular intacta por ende puede teñir tanto células fijas, como vivas. En células vivas éste posee gran afinidad por el ADN de doble cadena, se une a los dímeros Adenina Timina (AT) que existen en el surco menor del ADN. Lo mismo pasa con el ARN pero la unión se hace por la unión a los dímeros Adenina Uracilo (AU).	No tiñe el citoplasma. Puede ser utilizado en técnicas de citometría de flujo con laser UV.	Produce desechos tóxicos. Requiere lavados.
Ensayo Cometa	El ADN intacto mantiene una asociación altamente organizada con proteínas de la matriz en el núcleo, éste se relaja bajo condiciones alcalinas o neutras. Los fragmentos de ADN roto o dañado migran lejos del núcleo, por lo que al ser teñidos se aprecia la forma de un cometa.	Alta sensibilidad para detectar bajos niveles de ADN dañado. Análisis de los datos a nivel de células individuales. Requiere bajo número de células. Flexibilidad y bajo costo.	Bromuro de etidífo es cancerígeno Requiere de microscopio fluorescente. Tiempo de ejecución largo y laborioso.

---

### **6.1.11 Exclusión por Azul de Tripán y Negro de naftaleno**

Estos métodos están basados en que las células vivas (viables) no captan el azul de tripán ni el negro de naftaleno mientras que las células muertas (no viables) si lo hacen. Se cuentan como muertas las células teñidas y como vivas las refringentes. Haciendo un conteo de las células muertas se puede estimar la viabilidad del cultivo celular (véase **Tabla 12**).<sup>(30,39)</sup>

### **6.1.12 Diacetilfluoresceína**

Las células viables incorporan diacetilfluoresceína y la metabolizan a fluoresceína en la membrana citoplasmática y sólo las células vivas emiten fluorescencia verde (véase **Tabla 12**).<sup>(30,40)</sup>

### **6.1.13 Annexina V**

Durante la apoptosis hay traslocación de la fosfatidil serina desde la cara interna del citoplasma a la cara externa de la superficie celular. La fosfatidil-serina se detecta mediante Annexina V (proteína dependiente de calcio que se une con gran afinidad a la fosfatidilserina). La Annexina V se marca con un compuesto fluorescente (Ej: FITC) y se cuantifica por citometría de flujo o por microscopía de fluorescencia (véase **Tabla 12**).<sup>(43)</sup>

### **6.1.14 Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH)**

Esta enzima está presente normalmente en el citoplasma de las células vivas y se libera en el medio de cultivo celular al permeabilizarse la membrana de las células muertas o moribundas que se han visto afectadas por un agente tóxico (véase **Tabla 12**).<sup>(35,51)</sup>

**TABLA 12. TABLA COMPARATIVA DE LOS MÉTODOS QUE TIENEN COMO BLANCO LA MEMBRANA CELULAR**

Método	Mecanismo	Ventaja	Desventaja
Annexina V	Durante la apoptosis hay traslocación de la fosfatidil serina desde la cara interna del citoplasma a la cara externa de la superficie celular. Esta se detecta con la anexina que se une con gran facilidad a la fosfatidil serina.	Diferenciar apoptosis de necrosis. Permite examinar grandes cantidades de células.	Requiere el uso de microscopio de fluorescencia o citómetro de flujo. Puede introducir el colorante en cualquier célula que tenga una pérdida de integridad de membrana. No puede ser utilizado en células que han sido permeabilizadas o en tejidos incluidos en parafina.
Exclusión por Azul de Tripán y/o Negro de naftaleno	Colorantes que se emplean para ensayos de viabilidad, lo que permite diferenciar entre células vivas de muertas. Las células vivas con membrana intacta no son teñidas debido a su alta selectividad.	Bajo costo. No contamina.	Alto riesgo de error humano. Solo captan células muertas.
Diacetilfluoresceína (DTF)	Las células viables incorporan DTF y la metabolizan a fluoresceína en la membrana citoplasmática, por lo que emiten fluorescencia verde.	Detección de efectos a largo plazo. Es rápido.	Es tóxico. No mide el número total de células. Requiere microscopio de fluorescencia o citómetro de flujo.
Actividad Lactato Deshidrogenasa (LDH)	Esta enzima presente el citoplasma de las células vivas. Cambios en la permeabilidad de la membrana, libera al medio de cultivo.	Es una medida cuantitativa de la pérdida de la viabilidad celular y no del metabolismo celular. Puede utilizarse como una medida del total de células en un procedimiento de valoración inversa (lisar todas las células artificialmente y medir total de la LDH).	La estabilidad del LDH es variable dependiendo de tipo de células. La cantidad de liberación es variable dependiendo del alcance de los daños a través de la membrana para completar la lisis celular. Las condiciones de cultivo también influyen en los niveles intracelulares del LDH.

### 6.1.15 Ensayo de enlazamiento de Azul de Kenacid

Este ensayo mide el cambio en el contenido de proteínas totales, lo cual constituye un reflejo de la proliferación celular. Si un compuesto es citotóxico a la célula debe afectar al menos uno o más procesos implicados en la proliferación celular como son: la síntesis del ADN, el adecuado funcionamiento de los organelos como mitocondrias, lisosomas, o producir una afectación de la integridad de la membrana o en la síntesis de proteínas (véase **Tabla 13**).<sup>(49, 50)</sup>

### 6.1.16 Sulforodamina B

La Sulforodamina B (SRB) es un colorante aniónico que se une electrostáticamente a proteínas aniónicas (PTS) de células cancerosas que han sido precipitadas con ácido tricloroacético (TCA) en el fondo de micropozos. El complejo SRB-PTS es solubilizado con buffer, lo que facilita medir la densidad óptica (DO) de los micropozos. La DO es directamente proporcional al crecimiento celular e inversamente proporcional al grado de citotoxicidad de un compuesto de prueba (véase **Tabla 13**).<sup>(52,53)</sup>

### 6.1.17 Western blot

Método originado en los laboratorios de George Stark en Stanford. El nombre de "*western blot*" fue dado a la técnica por W. Neal Burnette con base en "*Southern blot*". Es un método para identificar proteínas específicas en una mezcla compleja de proteínas, la técnica sigue el mismo fundamento que SB (véase **Tabla 13**).<sup>(9)</sup>

**TABLA 13. TABLA COMPARATIVA DE LOS MÉTODOS QUE TIENEN COMO BLANCO LAS PROTEÍNAS**

Método	Mecanismo	Ventaja	Desventaja
Azul de Kenacid	Se basa en que un compuesto citotóxico afecta la síntesis de proteínas. Esta afectación conlleva a una disminución de crecimiento de células.	Bajo costo. Fácil accesibilidad.	Variaciones en el pH. Enlazamiento del compuesto a componentes del medio de cultivo. La estabilidad del compuesto puede influir en los resultados La solubilidad.
Sulforodamina B (SRB)	SRB es un colorante aniónico que se une electrostáticamente a proteínas aniónicas de células cancerosas que han sido adheridas a una superficie.	Se pueden hacer varias líneas celulares a la vez. Alta Sensibilidad. Cuantificación de la clonogenicidad.	Es contaminante. Es costoso. Requiere de varios lavados.
Western blot	Detecta proteínas específicas de una mezcla celular. Por electroforesis se separa proteínas de diferente peso molecular, estructuras e hidrofobicidad. Estas son transferidas a membranas adsorbentes y a través de anticuerpos específicos se reconoce la proteína en estudio.	Alta sensibilidad. Alta especificidad.	Alto costo. Requiere un equipo complejo.

### 6.1.18 MTT (3-[4,5-dimetil tiazol-2-il]-2,5-difenil tetrazolio bromuro) Sal de tetrazolio

Se basa en la rotura de sales de tetrazolio añadidas al cultivo celular, ligada a un cambio de color. MTT fue la primera sal de tetrazolio descrita, presenta un color pero cuando es partida por el sistema enzimático succinato-tetrazolio reductasa, que forma parte de la cadena respiratoria de la mitocondria, da

lugar a formazán, que posee color púrpura. La cantidad de formazán formada se correlaciona directamente con el número de células metabólicamente activas del cultivo (véase **Tabla 14**).<sup>(39,45,54)</sup>

### 6.1.19 Ensayo Rojo Neutro

Es un colorante que se acumula en los lisosomas de células viables. La cuenta se realiza cuantificando la densidad óptica en un lector ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay).<sup>(49, 45,46)</sup> (véase **Tabla 14**).

**TABLA 14. TABLA COMPARATIVA DE LOS METODOS QUE TIENEN COMO BLANCO ORGANELOS**

Método	Mecanismo	Ventaja	Desventaja
Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT)	La reducción metabólica del MTT a través de la enzima mitocondrial succinato-deshidrogenasa produce el compuesto formazan de color púrpura. La reducción del MTT se correlaciona con la actividad de la enzima y por ende cuantifica la viabilidad celular.	Seguro (no utilización de compuestos radioactivos). La Fiabilidad (la absorbancia se correlaciona directamente con el número de células Buena sensibilidad Rapidez (utilización de un lector de placas que permite medir un gran número de muestras). Facilidad (no necesita de lavado, ni compuestos adicionales).	Se descompone rápidamente a la luz. Producción de residuos tóxicos.
Rojo Neutro	Este colorante se acumula en los Lisosoma de células viables.	Bajo costo. Fácil accesibilidad. No contamina.	Requiere lavados No mide el número total de células. Si el compuesto que se evalúa requiere de activación metabólica previa para ser tóxico, esta prueba no da la información adecuada. El rojo neutro tiende a precipitar irreversiblemente formando cristales.

### 6.1.20 Citometría de flujo

La citometría de flujo permite detectar la intensidad de fluorescencia de las células mediante un dispositivo electrónico y mecánico denominado citómetro. En este aparato es posible analizar grandes cantidades de células en pocos minutos, adicionalmente existen técnicas que se basan en la medición del ADN, evaluación de la morfología, detección de fragmentación e incluso expresión de proteínas propias de apoptosis, que pueden ser evidenciadas, medidas y cuantificadas en una población celular en la figura 10 Podemos observar algunos citómetros utilizados en la actualidad. (véase **Tabla 15**).<sup>(45,47)</sup>



Figura 10 Equipo citómetro de flujo

### 6.1.21 Ensayo de TUNEL

TUNEL es un acrónimo de “terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling” el ensayo se basa en la adición de bromodeoxiuridina marcada con un fluoróforo a los extremos de los fragmentos de ADN generados durante el proceso apoptótico, mediante una deoxinucleotidil transferasa (TdT). De este modo solo quedan marcadas las células apoptóticas y no las necróticas (véase **Tabla 15**). (15,45)

**TABLA 15. TABLA COMPARATIVA DE LOS MÉTODOS QUE TIENEN COMO BLANCO LA VIABILIDAD CELULAR**

Método	Mecanismo	Ventaja	Desventaja
Citometría de Flujo	Permite detectar la intensidad de fluorescencia de las células mediante un dispositivo electrónico y mecánico denominado citómetro	Técnica sofisticada. Altamente sensible. Se pueden analizar grandes cantidades de células. Puede ser utilizada en todas las etapas de la interacción entre un fármaco y sus células diana específicas o inespecíficas.	Costo alto. Solo se aplica en suspensiones celulares.
TUNEL	Se basa en la adición de bromodeoxiuridina marcada con un fluoróforo a los extremos de los fragmentos de ADN generados durante el proceso apoptótico, mediante una deoxinucleotidil transferasa (TdT).	Se considera como una metodología cuantitativa. Se puede aplicar tanto en suspensiones celulares como en tejidos procesados en parafina.	Es costosa. Su extrema sensibilidad detecta fragmentación inducida por topoisomerasas. Requiere microscopio de Fluorescencia.

### 6.1.22 Ensayo de éster de carboxifluoresceína diacetato succinimidil (CFDA-SE)

El éster de carboxifluoresceína diacetato succinimidil (CFDA-SE) es un reactivo muy efectivo para el estudio y seguimiento del progreso de la división de celular. Atraviesa pasivamente la membrana celular y se une covalentemente a los grupos amino libres de las macromoléculas intracelulares. Esterasas endógenas citoplasmáticas remueven los grupos carboxil del diacetato (CFDA-SE fluorescente) a CFSE

fluorescente. Durante la división celular, el CFSE se distribuye uniformemente entre las células hijas. Cada división celular reduce la intensidad de la fluorescencia de las células hijas por la mitad en el análisis por citometría de flujo (véase **Tabla 16**). <sup>(55,56)</sup>

### 6.1.23 Ensayo de Formación de Colonias (CFE)

Evalúa si una célula es capaz de dividirse y formar una colonia, luego de haber sido expuesta a un tratamiento. La formación y crecimiento de colonias se da sobre agar suave, superficies sólidas como cajas de Petri, o en matrices semisólidas de metil celulosa, como se muestra en la figura 11 (véase **Tabla 16**). <sup>(40,57)</sup>

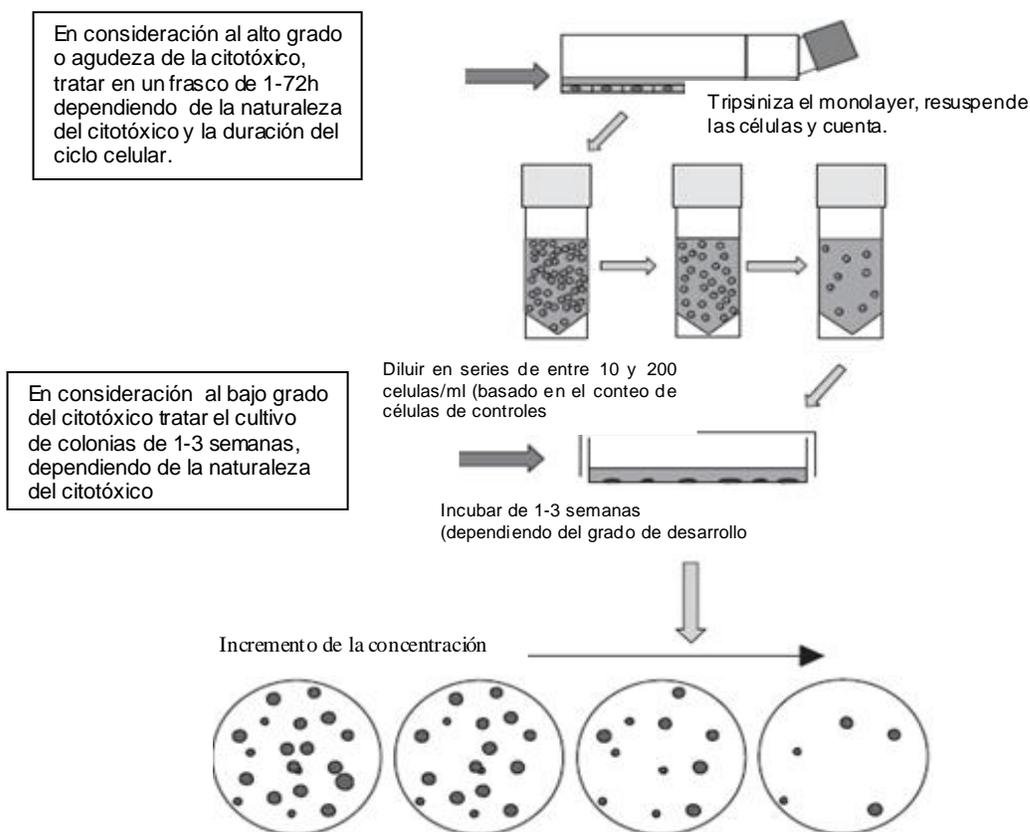


Figura 11. Formación de Colon

**TABLA 16. TABLA COMPARATIVA DE MÉTODOS QUE TIENEN OTROS BLANCOS A EVALUAR**

<b>Método</b>	<b>Mecanismo</b>	<b>Ventaja</b>	<b>Desventaja</b>
Ensayo de Formación de Colonias (CFE)	Se basa en si una célula es capaz de dividirse y formar una colonia después de ser expuesta a un tratamiento	Es de bajo costo. Reproducibilidad. Sencillez. Rapidez. Visible y cuantitativo.	La dilución para aislar células individuales es estresante para la célula, por lo que puede que se deban utilizar, estrategias de alimentación adicionales. Tardan muchos días para ser completado.
Éster de carboxifluoresceína diacetato succinimidil (CFDA-SE)	Atraviesa pasivamente la membrana celular y se une covalentemente a los grupos amino libres de las macromoléculas intracelulares. Esterasas endógenas citoplasmáticas remueven los grupos carboxil del diacetato (CFDA-SE fluorescente) a CFSE fluorescente.	Diferencia entre necrosis y apoptosis.	Requiere citómetro de flujo. Es costoso. Toxico.

## 7. *In Vivo*

En los modelos *in vitro*, es muy difícil crear la farmacocinética compleja de la exposición al fármaco, ya que no suele haber diferencias significativas en el tiempo de exposición y la concentración del fármaco, el metabolismo, la penetración en el tejido, la remoción, y excreción de éste.<sup>(58)</sup>

Aunque puede ser posible simular estos parámetros, por ejemplo, utilizando esferoides tumorales multicelulares para cuantificar la penetración del fármaco; la mayoría de los estudios se concentran en una respuesta celular directa. Por otra parte, los modelos *in vivo* ofrecen la ventaja de medir si un compuesto aparentemente no tóxico *in vitro*, al ser biotransformado por el hígado se generen metabolitos altamente tóxicos.

En los últimos años se utilizan modelos animales para llevar a cabo el estudio de la carcinogénesis, fundamentalmente desde el punto de vista molecular. Estos modelos están diseñados para inducir tumores con un rendimiento bastante elevado, lo que permite manipular los parámetros que intervienen en dicho proceso, como son el tipo de carcinógeno, la dosis y el tejido interesado.<sup>(59)</sup>

En la tabla 12 se muestra en orden cronológico el uso experimental del ratón.

<b>TABLA 17. CRONOLOGÍA DEL USO EXPERIMENTAL DEL RATÓN.</b>		
<b>Fecha</b>	<b>Evento</b>	<b>Investigador</b>
1909	Obtiene un par de ratones portadores de los alelos recesivos, procreó los descendientes hermano con hermana, seleccionando los más vigorosos.	Clarence Cook Little
1961	Miller extirpa el timo en unos ratones de laboratorio y demostró que en ellos se reducía o se perdía el desarrollo de la inmunidad celular.	Jacques Miller
1972	El Laboratorio Jackson elabora la primera base de datos genética de mamíferos, precursora de la base de datos genómica del ratón.	
1982	Crean el primer ratón transgénico, a través de implantar un gen de rata a un ratón.	Richard Palmiter y Martin Evans
1987	Crea el primer ratón knock-out. El investigador italiano, colaborador del HHMI (Instituto Médico Howard Hughes), desarrolló una técnica capaz de insertar o eliminar un gen determinado en las células ES del ratón.	Mario Capecchi
1998	Investigadores de la Universidad de Hawaii consiguen clonar el primer ratón: "Cumulina".	Ruyzo Yanahimachi
2001	La firma privada Celera Genomics empieza a vender su secuencia genética del ratón obtenida por la técnica shotgun, que se extrajo de cuatro cepas de ratón.	
2002	En mayo, la revista Science publica la secuencia del cromosoma 16 del ratón, que tiene gran similitud con el cromosoma 21 humano.	

Las características que han hecho del ratón de laboratorio el modelo biológico y biomédico más utilizado en las investigaciones científicas son:

- 
- ✓ Su fácil manejo
  - ✓ Su tamaño apropiado para la crianza y manipulación
  - ✓ No requieren demasiados cuidados.
  - ✓ Tienen un sistema inmune similar al de los seres humanos.
  - ✓ Tienen un alto número de crías.
  - ✓ Poseen un breve período de gestación (19-21 días), y su destete es rápido.
  - ✓ Las hembras producen un gran número de óvulos, los cuales al ser fecundados son muy resistentes.
  - ✓ Al ser mamíferos euterios, poseen un genoma muy similar al de los seres humanos.
  - ✓ Es una especie que cuenta con muchas cepas consanguíneas diferentes.
  - ✓ El conocimiento de la biología del ratón es grande.

Además la piel de ratón es un tejido epitelial con ciertas ventajas como modelo experimental para estudiar los cambios asociados al desarrollo neoplásico, que podemos resumirlas en:

- ✓ Es un órgano fácilmente accesible, que permite la aplicación localizada del agente carcinogénico.
- ✓ La existencia de las dos etapas conocidas como iniciación y promoción es operativa ya que permite la investigación de los diferentes aspectos de cada una de ellas.
- ✓ El desarrollo morfológico de los tumores se puede observar fácilmente tanto microscópicamente como macroscópicamente.
- ✓ Pueden detectarse fácilmente cambios significativos en el metabolismo de las células del huésped como consecuencia de la aplicación de iniciadores o promotores, ya que éstos actúan directamente sobre la piel.
- ✓ Es posible correlacionar variaciones en la respuesta tumoral con las consecuencias metabólicas y morfológicas del agente carcinogénico testado.
- ✓ Permite el estudio de distintos factores que pueden intervenir en la respuesta tumoral, como por ejemplo, cambios en la dosis, susceptibilidad del animal y aplicación de otras sustancias que interfieran con el proceso tumoral.

Para el ratón existe un número abundante de anticuerpos y sondas de cADN, se han construido bibliotecas genómicas y de cADN para cada cepa de ratón. Los ratones son relativamente baratos en comparación con otros animales experimentales su mantenimiento aún en condiciones de alta seguridad es relativamente sencillo figura 12.<sup>(59)</sup>



Figura 12 Ratones utilizados en el laboratorio <sup>(59)</sup>

Existen diferentes tipos de ratones: **transgénicos, knock-ins, knockouts**

### 7.1 TRANSGÉNICOS

Los animales transgénicos portan un fragmento de ADN exógeno en su genoma. Estos animales se fabrican usando una construcción transgénica (plásmido de ADN con la secuencia del gen que se piensa introducir). Con técnicas de ADN recombinante y con técnicas de micromanipulación o transfección, se introducen en la célula blanco para que se inserte este nuevo gen al azar en el genoma celular. Todos los organismos cuyo genoma tiene un gen añadido o alterado en sus células (incluyendo las células germinales), y portan el gen nuevo o alterado, son en el sentido estricto de la palabra, organismos transgénicos como se observa en la figura 13. <sup>(59,60)</sup>

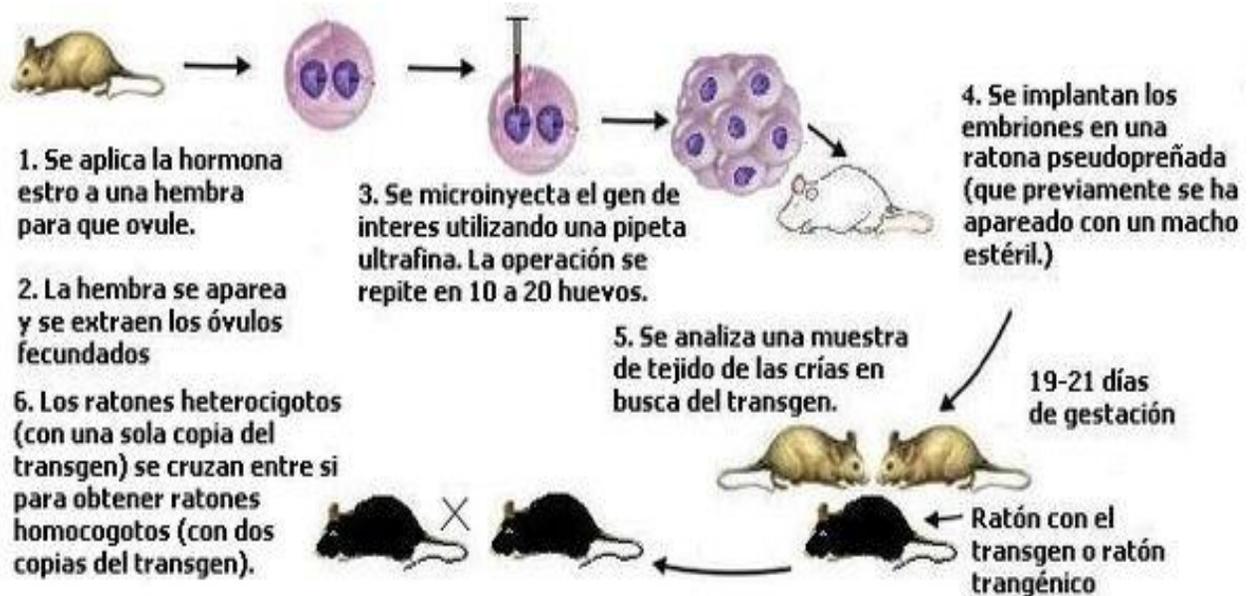


Figura 13 Estrategia generar animales transgénicos <sup>(60)</sup>

---

## 7.2 KNOCKOUS

Un ratón *knock-out* (KO) es un organismo genéticamente modificado (OGM) que carece de la expresión de un gen en particular. Una mutación dirigida (mutación en un sitio predeterminado) con frecuencia producirá una delección funcional del gen. A esta eliminación específica se le ha denominado "gen targeting" y el producto es un animal mutante que carece de la expresión específica de ese gen. Los ratones knock-out son muy útiles en el estudio del cáncer y de otras enfermedades complejas. En la figura 14 se muestran a unos ratones knock-out. <sup>(60)</sup>

Al igual que los ratones transgénicos los knock-ous también tienen estrategias para ser generados como se observa en la figura 15.



Figura 14 Ratón *knock-out*

## 7.3 KNOCK-IN

Se le llama así a un organismo al que se le ha sustituido un gen normal por otro alterado, con mutaciones específicas. Su elaboración es muy similar a la de un ratón *knock-out*; sin embargo, en lugar de inhabilitar el gen, éste se reemplaza por otro. En algunos casos lo que se hace es añadir la sección promotora para hacer que el gen modificado se exprese continuamente. <sup>(59, 60)</sup>

# Cómo construir un ratón con un gen desactivado

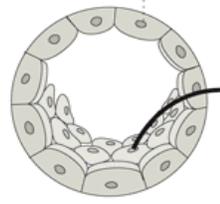
## A) SELECCIÓN DEL GEN OBJETIVO

### 1 Cultivo de células

Se extrae un embrión de un ratón de laboratorio



El genoma de los ratones coincide en un 95% con el de los humanos

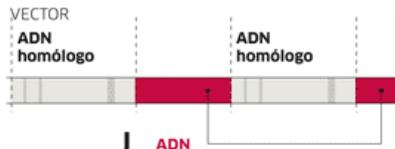


Blastocisto

Extracción y cultivo de células embrionarias

### 2 Construcción del vector

El vector contiene fragmentos de ADN que son homólogos con el gen de destino, así como ADN que permitirá la selección de las células modificadas



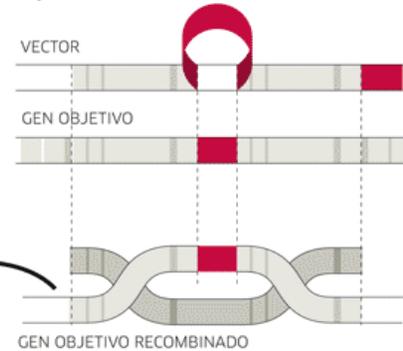
Transfección

Núcleo

Célula portadora del gen mutado

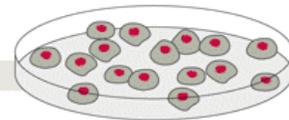
### 3 Reemplazo

Las secuencias de ADN homólogo permiten al vector encontrar y recombinarse con el gen objetivo



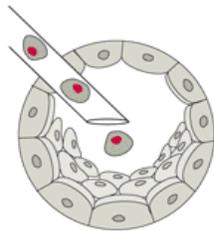
### 4 Proliferación de células objetivo

Población pura de células portadoras del gen mutado

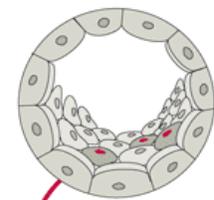


## B) DEL GEN AL RATÓN MUTADO

### 5 Inyección en los blastocistos



Las células mutadas son inyectadas en los blastocistos de un nuevo embrión

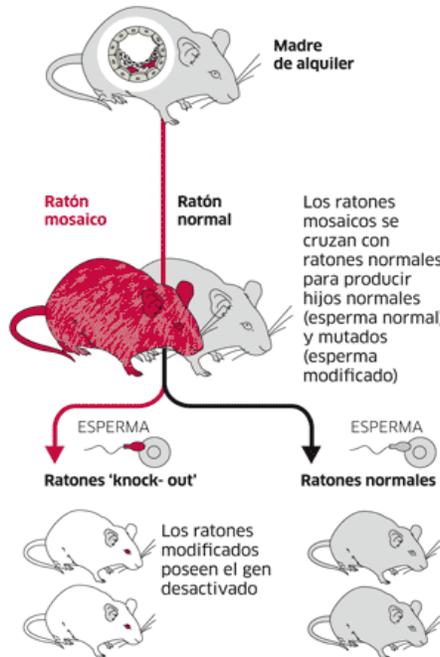


Se mezclan y forman un mosaico con las células originales del embrión



Los blastocistos son implantados en una madre de alquiler que desarrolla embriones mosaico

### 6 Nacimiento de ratones mosaico



Madre de alquiler

Ratón mosaico

Ratón normal

Los ratones mosaicos se cruzan con ratones normales para producir hijos normales (esperma normal) y mutados (esperma modificado)

ESPERMA

Ratones 'knock-out'

ESPERMA

Ratones normales

Los ratones modificados poseen el gen desactivado

FUENTE: THE NOBEL COMMITTEE

GRÁFICO: ÁLVARO VALIÑO

Figura 15 Estrategia para generar animales con expresión inducible o condicionada. <sup>(60)</sup>

---

## 7.4 SINGÉNICOS

El término singénico o isogénico, implica la cruce de los animales entre hermanos o con sus progenitores durante más de 20 generaciones, con el propósito de obtener animales genéticamente similares, a los que se denominan cepas. La utilidad de contar con animales idénticos entre sí radica en que los experimentos que se realizan con ellos son reproducibles. La mayoría de los fármacos antitumorales se han ensayado en ratones singénicos, en los cuales es posible trasplantar un tumor de un animal a otro ya que, como son genéticamente idénticos, no rechazan el implante figura 16. <sup>(59,62)</sup>



Figura 16 Ratón Singénico

## 7.5 ATÍMICO DESNUDO

Tipo de ratón de laboratorio que es calvo, carece de una glándula del timo normal y tiene un sistema inmunitario defectuoso debido a una mutación genética. Los ratones atímicos desnudos se usan a menudo en la investigación del cáncer porque no rechaza las células tumorales de los ratones u otras especies figura 17. <sup>(60,64)</sup>



Figura 17 Ratón Atímico desnudo

La selección de un modelo experimental apropiado es crítica para el descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos anticancerosos. El valor del modelo depende de su validación, selectividad, predictibilidad y reproducibilidad. <sup>(62,66, 67)</sup> En el desarrollo de fármacos anticancerosos, el modelo de animal es seleccionado para demostrar el efecto citotóxico del fármaco o agente biológico sobre el tumor transplantado en el sistema modelo. En la selección de este modelo, se deben hacer consideraciones con respecto a la estabilidad genética y heterogeneidad de la línea celular transplantada, su inmunogenicidad en el animal hospedero y punto final biológico apropiado (crecimiento local, metástasis, sobrevida).

Los modelos deben ser sensibles a los tratamientos experimentales respondiendo bien, con la variación mínima entre sujetos tratados de la misma manera. La variación incontrolada, es causada por infección, genética, heterogeneidad ambiental o la edad y esto reduce el poder de un experimento para detectar los efectos del tratamiento. <sup>(69)</sup>

En general, los modelos animales de tumoración pueden ser divididos en espontáneos o sistemas transplantados. (véase **Tabla 18**) Esta clasificación va a depender del estudio que se está realizando, en algunos casos el tumor tiene que ser trasplantados al ratón, en otros es inducido para estudiar las neoplasias provocados por virus (ej. El VHP, virus de la hepatitis B y C etc.) o por agentes químicos cancerosos.

Los tumores sólidos son normalmente transplantados por la inoculación de células en suspensión por las vías subcutánea (SC), intradérmica (ID), intramuscular (IM), intraperitoneal (IP) o intravenosa (IV). Las leucemias son sólo por las vías SC, IV o IP. <sup>(70,64)</sup>

TABLA 18. TIPOS DE TUMORES	
Transplante de Tumores en Animales	Tumores Autocrinos
Singénicos	Espontáneos o inducidos con virus
Desnudos	Carcinógenos

A su vez lo modelos transplantados se clasifican en: espontáneos, trasplantables de generación temprana, transplantables establecidos de los cuales se mencionan sus ventajas y desventajas en la (véase **Tabla 19**).

TABLA 19. CLASIFICACIÓN DE LOS TUMORES DE TRANSPLANTE		
Tumor	Ventaja	Desventaja
Espontáneos en Animales	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cepas con tumores espontáneos.</li> <li>• Tipos histológicos variados.</li> <li>• Comportamiento de crecimiento similar a las neoplasias clínicas.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Números reducidos.</li> <li>• Dificultad en el diseño de experimentos.</li> <li>• Caracterización pobre.</li> <li>• Escasa aplicabilidad de ensayos.</li> </ul>
Transplantables de generación temprana.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muy parecidos a los tumores espontáneos.</li> <li>• Pueden generarse grupos de replicación de los tumores.</li> <li>• Comportamiento de crecimiento caracterizado.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Necesariamente transplantables.</li> <li>• Pobre caracterización.</li> <li>• Falta de disponibilidad de métodos de ensayos.</li> </ul>
Transplantables establecidos.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bien caracterizado.</li> <li>• Disponibilidad de ensayos múltiples.</li> <li>• Reproducibilidad.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Removido lejanamente del tumor original.</li> <li>• Selección celular extensiva</li> <li>• Usualmente displásico.</li> <li>• Escasa diferenciación</li> </ul>

Los modelos tumorales espontáneos que son idiopáticos o que son originados enseguida de una exposición a un agente carcinógeno o viral, imitan la situación clínica de mejor forma. Su patrón metastásico no es uniforme y su respuesta a la terapia es generalmente pobre. Estos también se asemejan al cáncer humanos en cuanto a su cinética y antigenicidad. Sin embargo, hay obstáculos significantes para

---

el uso de dichos sistemas como modelos. Por ejemplo, un porcentaje relativamente pequeño de animales pueden desarrollar enfermedad después de la exposición al carcinógeno o virus y los tumores pueden tener un curso natural variable. Además, la incapacidad para establecer estadios precisos hace a estos modelos cuantitativamente inapropiados para evaluar una respuesta terapéutica a un agente dado en una forma uniforme. <sup>(64,70)</sup>

Por esta razón se mencionan los siguientes modelos.

## **7.6 FUNDAMENTOS DE LOS DIFERENTE MODELOS TUMORALES Y SUS ENSAYOS**

### **7.6.1 Modelos Tumorales Transplantables en Animales**

Los pases iniciales de los tumores transplantables se asemejan mucho más cercanamente al cáncer espontáneo. Estos primeros estadios muestran una heterogeneidad significativa en histología y cinética celular. A pesar de estas limitaciones, dichos modelos han sido usados para la selección de fármacos. Debido a que los modelos de tumores transplantables establecidos están bien caracterizados y son reproducibles, estos han sido tradicionalmente la base del desarrollo de fármacos contra el cáncer <sup>(72)</sup>.

Una variedad de métodos pueden ser usados para evaluar el efecto de fármacos sobre tumores en modelos animales. El tamaño y peso del tumor o cambio de volumen son parámetros simples y fácilmente reproducibles. Cambios morfológicos y alteraciones en la inmunogenicidad o invasividad del tumor son otros marcadores de respuesta.

Además se han desarrollado varios ensayos específicos para la medición de los efectos de tratamientos en tumores a continuación se mencionan. <sup>(65)</sup>

#### **a) Ensayo de Escisión Clonogénica**

Este ensayo se basa en el supuesto de que el potencial proliferativo o clonogénico de las células tumorales se refleja en la tumorigenicidad *in vivo*. Por lo tanto, se asume que el número de colonias es proporcional al número de células viables.

Este ensayo tiene la ventaja de colocar a los tumores tratados y no tratados en ambientes idénticos. También es capaz de seleccionar una población resistente de células dentro del tumor a una dosis baja del fármaco. Además, extirpar el tumor 24 hrs. después de exponer al animal al agente citotóxico, nos permite dar dosis por encima del rango de tratamiento, lo cual tiene implicaciones importantes para la selección de agentes para el trasplante de médula ósea. <sup>(72)</sup>

#### **b) DF50 (Ensayo de Dilución Final)**

DF50 es el inóculo de células tumorales que produce crecimiento del tumor en 50% de animales o sitios inoculados. Es una medida del número de células requeridas para producir tumores con un inóculo *in vivo*. Este ensayo se basa en los mismos principios que el de la formación de colonias. <sup>(72)</sup>

#### **c) Ensayo de Retraso del Crecimiento Tumoral**

Los tratamientos citotóxico pueden reducir el crecimiento del tumor y retrasar el progreso de la enfermedad. Estos efectos son medidos por el ensayo de Retraso del Crecimiento Tumoral. Esta se define como el tiempo requerido para que el tumor tratado alcance un tamaño específico menos el tiempo para

---

que un tumor no tratado alcance ese cierto tamaño. A diferencia del ensayo anterior, esta evaluación no requiere muerte como punto final. <sup>(72)</sup>

#### **d) Ensayo de Sobrevida**

El tiempo de sobrevida es un punto final obvio, ya que combina la suma total de interacción entre tumor, fármaco y hospedero. Ya que tanto la toxicidad del fármaco como el crecimiento del tumor tienen efectos independientes en la sobrevida, se puede hacer un juicio acerca del índice terapéutico. Sin embargo, este acercamiento no puede evaluar directamente la muerte celular ni la citotoxicidad en función del tiempo. <sup>(72)</sup>

### **7.6.2 Tumores Xenotransplantados**

Antes de la disponibilidad de ratones atímicos o desnudos, los tumores humanos fueron xenotransplantados en ratones inmunocomprometidos por medio de radiación, timentomías o esteroides.

La transplantación de líneas celulares en ratones desnudos puede ser realizada por múltiples vías: subcutánea, intraperitoneal, intravenosa, intracraneal, intraplénica, renal subcapsular o a través de un nuevo modelo ortotópico por inoculación órgano-específica. Cada sitio tiene ventajas y limitaciones específicas.

El implante subcutánea es el sitio predominante para la trasplantación de tumores humanos en el ratón desnudo debido a su simplicidad y fácil acceso al tumor.

Curiosamente, los xenotransplantes subcutáneos metastatizan con poca frecuencia y rara vez invaden tejidos adyacentes. A pesar de estos cambios en la cinética del potencial invasivo, la mayoría de los tumores humanos xenotransplantados, mantienen las características morfológicas y bioquímicas de sus tumores originales. Por lo tanto, se espera que la quimosensibilidad sea similar en ambos, tanto en el tumor humano original como en el xenotransplantado y que esta correlación puede predecir tanto agentes activos simples, como combinaciones activas de fármacos. <sup>(66,69,74)</sup>

#### **a) Ensayo Renal Subcapsular (RSC)**

A diferencia del ensayo xenotransplantación subcutánea, el ensayo renal subcapsular requiere un periodo fijo y relativamente corto de tiempo entre la inoculación del tumor y la aparición de una masa claramente palpable. Los tumores pueden ser usualmente evaluados en un periodo de 6 días. Por lo que este modelo es particularmente adecuado cuando se requiere un ensayo *in vivo* de corto plazo.

Estos tumores mantienen auténticamente las características morfológicas, funcionales y de crecimiento del tumor original de los cuales fueron derivados. Por Ej.: estos conservan el contacto célula-célula, mantienen la proporción espacial del tumor y forman un modelo más representativo de una metástasis humana que un xenotransplante subcutáneo. <sup>(66,72)</sup>

#### **b) Ensayo de Tumor Microencapsulado, Intraperitoneal**

Debido a las limitaciones del RSC y su pobre adaptabilidad especialmente para tumores de lento crecimiento, se han desarrollado ensayos alternativos de corto plazo *in vivo*. Se basa en la tecnología de microencapsulación. La semipermeabilidad de la cápsula protege a las células tumorales de la célula hospedera-mediadora de inmunidad citotóxica, de manera que no se necesita usar ratones atímicos. Al

mismo tiempo, permite que los nutrientes y los agentes citotóxicos sistémicos se difundan y lleguen a las células tumorales. El efecto anticanceroso es evaluado por la recuperación de las microcápsulas y mediante el conteo de la viabilidad celular en los animales tratados y testigo observar figura 18.

El ensayo de microencapsulación es simple, rápido y relativamente barato para un análisis, ya que requiere menos ratones que el ensayo de tumor de transplante subcutáneo. Por definición, las células tumorales se evalúan después de la exposición a concentraciones del fármaco obtenidas *in vivo*. Además, el sistema es adaptable a la mayoría de tumores sólidos y a diferencia del ensayo de tumores transplantados subcutáneamente, usa ratones inmunocompetentes.

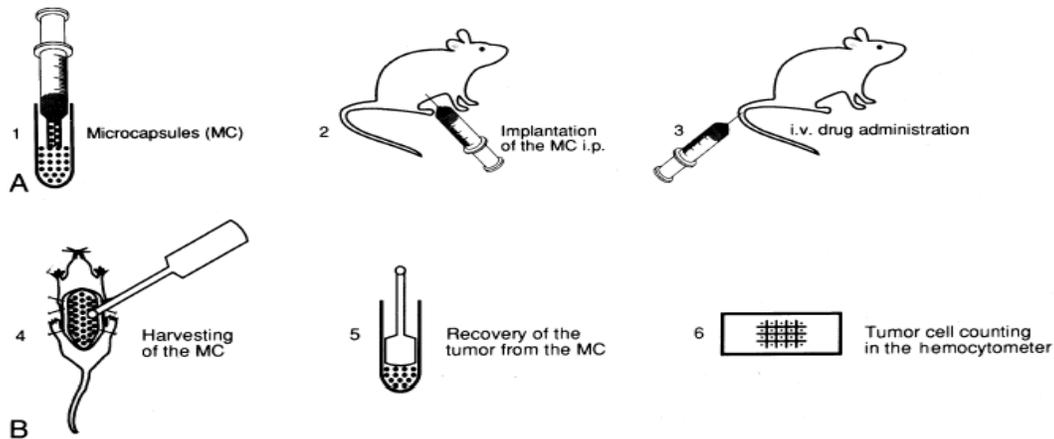


Figura 18 Ensayo de microencapsulación de tumor intraperitoneal

### 7.6.3 Modelo de Xenotransplatación Ortotópica

Es un sistema en el cual células del tumor son implantadas en el sitio del órgano de origen, este sitio-órgano específico presumiblemente provee a las células tumorales con un ambiente óptimo para el crecimiento y progresión. Debido a su relevante novedad y costo, este modelo todavía no ha sido usado extensamente. <sup>(76,77,78)</sup>

#### a) Tecnología de Fibra Hueca

Estas fibras huecas permiten a las células tumorales crecer en contacto una con otra, ya sea en las fases log o estacionaria del crecimiento celular. La permeabilidad de las fibras puede seleccionarse para limitar el peso molecular del fármaco para que pueda penetrar en la masa de tumoral. Una ventaja práctica de este sistema es que puede ser implantado más de un tipo de tumor en un sólo animal, permitiendo que se obtenga más información de un experimento *in vivo*. Otra ventaja potencial de la tecnología de fibra-hueca es que permite el mantenimiento exitoso de alotransplantes y de xenotransplantes en hospederos inmunocompetentes y por lo tanto se reducen considerablemente los costos asociados con el desarrollo de fármacos *in vivo*. Actualmente, esta técnica ha mostrado ser prometedora con fármacos reconocidamente activos y la tecnología de fibra hueca está siendo adaptada de forma creciente a la fase *in vivo* en el desarrollo de fármacos anticancerosos.

---

---

También existen numerosos protocolos para conseguir la aparición de tumores cutáneos. Uno de los más habituales es la aplicación sobre la piel de ratón de una pequeña dosis de DMBA como iniciador, seguida de aplicaciones repetidas de TPA como promotor. De este modo se inducen en corto espacio de tiempo tumores benignos (papilomas) que son considerados heterogéneos ya que unos persisten, otros desaparecen o regresan y solamente un pequeño número (5-10%) progresan a carcinomas invasivos. <sup>(70,72)</sup>

**TABLA 20. TABLA COMPARATIVA LOS DIFERENTES MODELOS TUMORALES**

Modelo tumor	Ensayos	Parámetro a Evaluar	Ventaja	Desventaja
Transplantables en Animales	Escisión Clonogenica	Tumorigenicidad.	Se pueden colocar los tumores tratados y no tratados en ambientes idénticos. Es capaz de seleccionar una población resistente de células dentro del tumor a una dosis baja del fármaco. Permite dar dosis por encima del rango de tratamiento.	Costo de compra y mantenimiento elevado. Reproducibilidad limitada.
	Dilución Final DF50	Tumorigenicidad.	Inoculo de células tumorales que produce crecimiento del tumor en 50% de animales o sitios inoculados.	Costo de compra y mantenimiento elevado. Reproducibilidad limitada.
	Retraso del Crecimiento Tumoral	Tiempo requerido para que el tumor alcance un tamaño específico.	No requiere muerte como punto final.	Costo de compra y mantenimiento elevado. Reproducibilidad limitada.
	Sobrevida	Tamaño del tumor y eficacia del compuesto.	Índice terapéutico.	No puede evaluar directamente la muerte celular ni la citotoxicidad en dependencia del tiempo.
Xenotransplantados	Renal Subcapsular (RSC)	Metástasis. Medición del tumor. Sobrevida del animal.	Evaluación a corto plazo. Mantienen las características morfológicas, funcionales y de crecimiento del tumor original.	Poca adaptabilidad a tumores de lento crecimiento.
	Microencapsulado, Intraperitoneal	Recuperación de las microcapsulas y viabilidad celular.	No se necesita usar ratones atómicos. Es simple, rápido y relativamente barato. Adaptable a la mayoría de tumores sólidos. Usa ratones inmunocompetentes.	Costo de compra y mantenimiento elevado. Reproducibilidad limitada.
Xenotransplatación Ortotópica	Tecnología de fibra hueca.		Puede ser implantado más de un tipo de tumor en un solo animal. Permite el mantenimiento exitoso de alotransplantes y de xenotransplantes en hospederos inmunocompetentes.	Costo de compra y mantenimiento elevado. Reproducibilidad limitada.

---

---

## ANALISIS DE RESULTADOS

El estudio preclínico de los fármacos antineoplásicos es complejo, y se requiere de varios protocolos experimentales para llegar a demostrar que un compuesto pueda ser incluido en las fases clínicas en el tratamiento contra el cáncer.

En las tablas anteriores se describen diversos ensayos para elaborar el estudio de posibles compuestos antineoplásicos en modelos tanto *in vitro* como *in vivo*, en éstos se describen las principales ventajas y desventajas que tienen cada uno de ellos, así como el blanco celular al que van dirigidos, lo que permite hacer más puntual al modelo experimental.

Entre los métodos más empleados en las pruebas de citotoxicidad encontramos al MTT método colorimétrico que por su costo, fiabilidad, y ventajas antes mencionadas permite un estudio exacto para los laboratorios que no cuentan con el equipo necesario para realizar una Citometría de Flujo, éste último es un método más completo ya que puede analizar grandes cantidades de células en pocos minutos, sin embargo su costo y mantenimiento limita su acceso a laboratorios de bajos recursos.

En comparación con los modelos *in vitro*, los modelos *in vivo* son los que realmente van a confirmar la actividad antineoplásica de un compuesto, sin embargo, estos estudios tienen la desventaja de que son costosos ya que se requieren cepas de ratones transgénicos y su reproducibilidad es limitada.

---

---

## CONCLUSIONES

Como se observa en cada una de las tablas ninguno de los métodos experimentales es concluyente, puesto que cada uno de éstos se ve limitado a la sensibilidad, costo y facilidad de manejo de cada laboratorio experimental.

- Como se ha descrito a lo largo de este trabajo, cada uno de estos métodos poseen ventajas y desventajas los cuales limitan a concluir si la molécula en estudio posee un solo mecanismo de acción en base al blanco molecular que analizan.
- Es necesario identificar cual es el blanco de acción a través de la determinación de una serie de marcadores moleculares.
- Se necesita realizar protocolos *in vivo* para demostrar que el compuesto en estudio reduce y/o desaparece el tumor experimental, además de determinar tanto su cinética como los efectos tóxicos que producen en el animal en experimentación.
- Se recopilaron los métodos más simples y convencionales para abordar el estudio de moléculas potencialmente antineoplásicas en la fase preclínica. Además de dar un panorama de las estrategias que se emplean en la terapia del cáncer.

---

---

## GLOSARIO

**Ablación:** en medicina y cirugía es la extirpación de cualquier órgano o parte del cuerpo mediante una operación o escisión quirúrgica.

**Antineoplásico:** Que impide la formación de neoplasias (crecimientos que se pueden volver cancerosos).

**Antioncogén:** Par de genes (unidades de herencia que pasan de padres a hijos) que hacen que la célula elabore una proteína que controla el crecimiento de las células. Se puede contraer cáncer cuando la proteína de los antioncogénos no funciona debido a mutaciones (cambios en el ADN) en los genes. Las mutaciones en los antioncogénos pueden heredarse o contraerse. También se llama gen supresor tumoral.

**Citotóxico:** Que destruye células.

**Carcinogénesis:** Proceso por el cual las células normales se transforman en células cancerosas

**Delección:** En genética, es un tipo especial de anomalía estructural cromosómica que consiste en la pérdida de un fragmento de ADN de un cromosoma.

**Embolia:** Bloqueo de una arteria por un coágulo de material extraño. La embolización se puede usar como tratamiento para impedir el flujo de sangre hacia un tumor.

**Idiopático:** irrupción espontánea o de causa obscura o desconocida.

**Metástasis:** Diseminarse de una parte del cuerpo a otra. Cuando las células cancerosas se metastatizan y forman tumores secundarios, las células del tumor metastásico son como las del tumor original (primario).

**Neoplasia:** Masa anormal de tejido que resulta cuando las células se multiplican más de lo debido o no mueren cuando debieran. Las neoplasias pueden ser benignas (no cancerosas) o malignas (cancerosas). También se llama tumor.

**Pancitopenia:** Es una condición médica en la que hay una reducción en el número de glóbulos rojos, glóbulos blancos de la sangre, así como plaquetas.

**Proliferación:** Multiplicación o aumento del número. En biología, la proliferación celular se presenta por medio de un proceso llamado multiplicación celular.

**Quimioterapia:** Tratamiento con medicamentos que destruyen las células cancerosas.

**Radioterapia:** Uso de radiación de alta energía proveniente de rayos X, rayos gamma, neutrones, protones y otras fuentes para destruir células cancerosas y reducir el tamaño de los tumores. La radiación puede venir de una máquina fuera del cuerpo (radioterapia de haz externo) o de un material radiactivo colocado en el cuerpo cerca de las células cancerosas (radioterapia interna). La radioterapia sistémica usa una sustancia radiactiva, como un anticuerpo monoclonal radiomarcado, que circula con la sangre hasta los tejidos de todo el cuerpo. También se llama irradiación y radioterapia.

**Transcripción:** En el campo de la biología, es el proceso mediante el cual una célula elabora una copia del ARN de una secuencia del gen ADN.

**Xenotransplante:** es el trasplante de células, tejidos u órganos de una especie a otra, idealmente entre especies próximas para evitar rechazo, como de cerdos a humanos.

---

---

## BIBLIOGRAFÍA

1. Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática (INEGI). <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2009/cancer09.asp?s=inegi&c=2676&ep=8>
2. Alberts, B., Jonson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. “Introducción a la Biología Celular” 4ta ed. México: Medica Panamericana; 2006.
3. Massague J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*, 432: 298-306, 2004
4. Florez J., Armijo J. A., Mediavilla A. “Farmacología Humana” 3ª. Ed. Barcelona: Masson, S.A.; 1998.
5. Jiménez Medina E. Ma. “Estudio de las Actividades Antitumorales de un Extracto de Caléndula: Propiedades Inmunomoduladoras y Cytotóxicas.” [Tesis Doctoral]. Granada: Hospital Universitario Virgen de las Nieves Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Granada; 2006.
6. Rizo R. P., Sierra C. Ma.I., Vázquez P.G., Cano G.C, Meneses G.A., Mohar A. “Registro Hospitalario de Cáncer: Compendio de Cáncer 2000 – 2004” Rizo et al, *Cancerología* 2: 203-287, 2007.
7. Burgués Gasió J.P., Pontones Moreno J.L., Vera Donoso C.D., Jiménez Cruz J.F., Ozonas Moragues M. “Mecanismos del ciclo celular y la apoptosis implicados en las resistencias a los fármacos de uso intravesical en el cáncer superficial de vejiga” *Actas Urol Esp.* 29(9): 846-859, 2005.
8. Karp G., “Biología Celular y Molecular” USA: Mc. Graw-Hill Interamericana; 2003.
9. Ruíz Godoy Rivera L. Ma. “Biología Molecular en Cáncer” México: Planeación y Desarrollo Editorial; 2008.
10. Zapata A. G., “La regulación del Ciclo Celular: Modelos Experimentales sencillos que resultan en Premios Nobel” *Anal. Real Acad. Farmacia*, 67 (4):1-14, 2001.
11. Meza J., Montañó A. & Aguayo A. “Bases Moleculares del Cáncer” *RIC* [en línea]. 2006. [fecha de acceso 11 de Noviembre 2009]; No. 58 URL disponible en: <http://www.imbiomed.com.mx>
12. Montalvo Muñoz F. “Estudio Del Papel De La Proteína p53 y del Efecto de un Extracto de Tamarindo en Respuesta a un Carcinógeno Renal *In Vivo*” [Tesis Licenciatura]. México: Universidad Nacional autónoma de México; 2008.
13. Lowe S., Cepero E., Evan G., “Intrinsic Tumor Suppression”. *Nature*, 432: 307-315, 2004.
14. Sherr C. J., Principles of tumor suppression. *Cell*, 116: 235-246, 2002.
15. Flores Pérez F. I. “¿Es la muerte importante para la vida?” *UNAM*; 33(2): 161-172, 2002.
16. Oliveira P.A., Colaco A., Chaves R., Guedes P.H., De la Cruz L.F. López C., “Chemical Carcinogenesis” *Annals of the Brazilian Academy of Sciences.* 79(4): 593-616, 2007.
17. Urrego R. A., Pareja A. Vásquez N. A., Márquez Ma. E. “El Ensayo Cometa: una técnica para evaluar genotoxicidad en el ADN de oocitos bovinos” *Revista colombiana de ciencias pecuarias*, 18(3): 222-227, 2005
18. Danial N.N., Korsmeyer S. J. Cell death. Critical control points. *Cell*, 116: 205-219, 2004.
19. Lozano J.M, Tarazona R. y Peña J.”Citotoxicidad” [en línea]. [fecha de acceso 11 Noviembre 2009] URL disponible en: [http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/temas\\_nuevos\\_pdf/tema14](http://www.uco.es/grupos/inmunologiamolecular/temas_nuevos_pdf/tema14)
20. Gibbs J. B., “Mechanism Based Target Identification and Drug Discovery in Cancer Research” *Science*, 287: 1969-1972, 2000.

- 
21. Vera L. Olga Lidia "Terapia Génica" [en línea] México: Med Int Mex; 22: 422-438, 2006. [fecha de acceso 01 octubre 2009]. URL disponible en: <http://www.revistasmedicasmexicanas.com.mx>
  22. López Rodríguez V. "Estudio De Biodistribución Y Farmacocinética De Nanoesferas Lipídicas Cargadas Con Cis-Diaminodicloroplatino (II) y Marcadas con Núcleos Radiactivos de Indio-III en un Modelo Tumoral de Cáncer Cérvico Uterino en Roedores" [Tesis Licenciatura]. México: Universidad Nacional autónoma de México; 2008.
  23. Fillat C., "Perspectivas Actuales de la Terapia Génica" BSCP Can Ped; 28 - n° 2 y 3. 203-208. 2004.
  24. Rozalén J., Fernández G. F. J., Ceña V., y Jordán J., "Aplicación de la terapia Génica" Ámbito farmacéutico, 22 (10):142-150, 2003.
  25. Mendoza Tenorio E. "Evaluación Citotóxica de Pirido [2,3-d] pirimidinas y  $\square$ -Alquinilcetonas sustituidas con grupos Alquilo, Fenilo y Ferrocenilo, en líneas celulares de Cáncer" [Tesis Licenciatura]. México: Universidad Nacional autónoma de México; 2009.
  26. Sedletska Y., Giraud-Panis M. J., "Cisplatin is a DNA-damaging antitumour Compound Triggering Multifactorial Biochemical Responses in cancer cells: importance of apoptotic pathways". Curr. Med. Chem. Anticancer Agents, 5(3): 251-265, 2005.
  27. Abal M., Andreu J.M., Barasoain I., Taxanes: microtubule and centrosome targets, and cell cycle dependent mechanisms of actin" Curr Cancer Drug Targets, 3(3): 193-203, 2003
  28. Goodman A.G., Rall T.W., Nies A., & Taylor P.; "Las bases Farmacológicas de la terapéutica" 10ª ed. Vol. II; Mc. Graw-Hill Interamericana, México, 2003.
  29. Katzung Bertram G. "Farmacología Básica y Clínica" 10ª ed. El manual moderno; México, 2007.
  30. León C.J., Gómez S.M., Morantes S.J. "Caracterización del perfil de sensibilidad de un panel de líneas celulares para valoración de citotoxicidad *in vitro*"; Biomédica; 26:161-8, 2006.
  31. Delgado G., Olivares Ma.S., Chávez Ma.I., Ramírez Apan T., Linares E., Bye R., Espinosa García F.J. "Antiinflammatory Constituents From *Heterotheca Inuloides*". Journald of Natural Products 64:861-864, 2001.
  32. Seethala R., and Fernandez B.P., "Handbook of Drug Screening" New York: Marcel Dekker, Inc. 2001.
  33. García-Argáez A.N., Ramírez Apan T.O., Parra Delgado H., Velázquez G. and Martínez-Vázquez M. "Anti-Inflammatory Activity Of Coumarins From *Decatropis Bicolor* On Tpa Ear Mice Model Planta" Medica 66: 278-281, 2000.
  34. Doyle A. and Griffirhs B.J. "Cell and tissue Culture for medical Research" New York, John Wiley & sons, 2000.
  35. Budman, D.F.; Calvert, A.H.; Rowinsky, E.K.; "Handbook of Anticancer Drug Development", 1a. Ed; Editorial Williams & Wilkins, USA, 2003.
  36. Ticona V.R., Nieva T.M., Irahola S. P., & Giménez T. A. "Pruebas Biológicas destinadas a Evaluar Citotóxicos como indicadores de Potenciales Antitumorales" Biofarbo; 6: 11-16, 1998.
  37. Sandoval Villasana A.M., "Ensayo de Mutagenicidad con la Bacteria *Salmonella Typhimurim*. Prueba de Ames" [en línea] [fecha de acceso: 12 de Enero 2010] Amplia Experiencia: URL Disponible en: <http://www.ine.gob.mx/publicaciones/libros/573/cap21>

- 
38. McLaughlin J.L., Anderson E.J., Colman-Sarzaibitoria T. "Tres ensayos simples para guía química de productos naturales", *Revista de la sociedad venezolana de química*; 18(4) 13-23, 1995.
  39. Alcaraz M. J., Calixto J. B. & Delgado R. (Ed.). "Técnicas *In Vitro* para el Estudio de Farmacos Antiinflamatorios". España: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo; 2002.
  40. Freshney R.I. "Culture of Animal Cells a Manual of Basic Technique", 5ª ed. Wiley-Liss 2005.
  41. Rascón Duran A.D., "Obtención de B-Ficoeritrina de la microalga roja *Rhodospirillum rubrum* y evaluación *in vitro* de su efecto en la proliferación de células de cáncer cervicouterino (HeLa)" [Tesis Maestría]. Sonora: Universidad de Sonora; 2009.
  42. Mass J.O., Minomiya A.J., and García C.A., "Advances in Cancer Research at UNAM" Mexico D.F: Manual Moderno; 2007.
  43. Bordón R.E., Pinar S. B., Lloret S. B. M., Rodríguez G. C., Lara J. P. C. "Predicción Del Daño Radioinducido Tras Irradiación" *Biocancer.com* [en línea] 2007. [Fecha de acceso: 2 Marzo 2010]; No. 4 URL disponible en: <http://www.biocancer.com>
  44. Oliva D.M., Muñoz G. J. A., Aguilera Q.R., Ruiz de Almodóvar M., Oliver F. J., "Poli (ADN-Ribosa) Polimerasa-1: una proteína nuclear implicada en procesos inflamatorios, muerte celular y cáncer" *Medica UIS*; 19(2): 95-103, 2006.
  45. Langdon S. P., "Cancer Cell Culture Methods and Protocols" New Jersey: Humana Press; 2004
  46. Arencibia A. D.F., Rosario Fernández L.A. "Actualización sobre el ensayo cometa y de micronúcleos *in vitro*" *RETEL* [en línea]. 2003. [Fecha de acceso 11 Abril 2010] URL disponible en: [http://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/20003](http://www.sertox.com.ar/img/item_full/20003)
  47. Mussali G.P., "Es la técnica de Electroforesis Unicelular (Ensayo Cometa) Capaz de Predecir el Efecto de Fármacos Antineoplásicos" Estudio Inicial sobre la Inducción de Daño al ADN de Sustancias Antineoplásicas con Mecanismos de Acción Conocidos." [Tesis Licenciatura]. México: Facultad de Ciencias, UNAM; 2001.
  48. Crowther J.R., "ELISA Theory and Practice" New Jersey: Humana Press; 1995.
  49. Arencibia .D.F., Rosario L. A., Curveco D.L. "Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad" *RETEL* [en línea]. 2003 [Fecha de acceso 30 Marzo 2010] URL disponible en: [http://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/19003](http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19003)
  50. Riva M. C. y D. López "Utilización de las Pruebas de Citotoxicidad *In Vitro* en la Valoración de los Efectos de los Contaminantes Ambientales" *INTEXTER*; 104: 59-64, 1993.
  51. Magaña H.A., "Evaluación de la citotoxicidad por acetaminofen en rata: Efecto de la melatonina" [Tesis Maestro en Ciencias]. Colima: Centro Universitario de Investigaciones Biomédicas, Universidad de Colima; 1997.
  52. Monks A., Scudiero D., Skehan P., Shoemaker R., Paull K., Vistica D., Hose C., Langley J., Cronise P., Wolff A.V. Goodrich M.G. Campbell H., Mayo J. and Boyd M. "Feasibility of a high-Flux Anticancer Drug Screen Using a Diverse Panel of Cultured Human Tumor Cell Lines": *Journal of the National Cancer Institute*, 83(11), 757-766, 1991.
  53. Pérez L. R., García M. M.R., Martínez V.M., Soto H.M., "Actividad Citotóxica y Antioxidante de *Pentiveria alliacea* L." *Redalyc*. [en línea]. 2006. [fecha de acceso: 19 de Marzo 2010]; 12(01): 51-56. URL disponible en: <http://redalyc.uaemex.mx>

- 
54. Sieuwerts A. M., Klijn J. G. M., Peters H. A. & Foekens J. A. "The MTT Tetrazolium Salt Assay Scrutinized: How to Use this Assay Reliably to Measure Metabolic Activity of Cell Cultures *in vitro* for the Assessment of growth Characteristics, IC<sub>50</sub>-Values and Cell Survival" *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem*, 33(11): 813-823, 1995.
  55. Lyons B. "Analysing cell divisions *in vivo* and *in vitro* using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution" *Journal of Immunological Methods* 243: 147-154. 2000.
  56. Wang X., Duan X., Liu L., Fang Y. y Tan Y. "Carboxyfluorescein Diacetate SuccinIDCimyl Ester Fluorescent Dye for Cell Labeling". *Acta Biochimica et Biophysica Sinica* 37(6):379-385, 2005.
  57. Castro de Pardo C., "Ensayo de Formación de Colonias para Determinar Efecto de Extraco, Fracciones o Sustancias sobre Ciclo Celular" [en línea]. Colombia: Facultad de Medicina; 2007 [fecha de acceso 27 de Abril de 2010]. URL disponible en: [http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal\\_chemistry](http://www.iupac.org/publications/cd/medicinal_chemistry)
  58. Martínez C., Cardozo de Martínez C.A., Mrad de Osorio A., Saúl D., "Cytotoxicity *in vitro* study of the extract of a Colombian flora plant using One cell test" *Revista Colombiana de Biotecnología* 6(1): 31-35, 2004
  59. Benavides F., Guenet J.L. "Modelos Murinos de Enfermedades Humanas" *MEDICINA*. 61: 215-231, 2000.
  60. Meraz Rios M.A. y Sánchez Torres C. "Animales Modificados Genéticamente. La Herramienta del Futuro" *Revista Digital Universitaria* [en línea]. 2001. [fecha de acceso: 17 Febrero 2010]; No. 3.
  61. Kühn R., and Würst W., "Gene Knock-out Protocols" 2a. ed. New York: Humana; 2009.
  62. Hendrich H.J., and Bullock G., (Ed.) "The Laboratory Mouse" London: ELSEVIER ACADEMIC PRESS; 2004.
  63. Papaioannou V.E., y Behringer R.R., "Mouse Phenotypes a Handbook of Mutation Analysis" New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2005.
  64. Carbone C., Maschi F. "El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia" *Química Viva*. 5(1):19-23, 2006.
  65. Krauss R.S. (Ed.) "Mouse Models of Developmental Genetic Disease" San Diego California: Academic; 2008.
  66. De Vita VT, Schein PS. "The use of drugs in combination for the treatment of cancer: rationale and results". *N Engl J Med*; 288:998-1006, 1973.
  67. Zubrud CG. "The national program for cancer chemotherapy". *JAMA*; 222:1161-1162, 1972.
  68. De Vita VT., Hellman S., Rosenberg SA., "Cancer Principles □ Practice of Oncology" 4<sup>th</sup> Vol. I, Philadelphia, LIPPINCOTT COMPANY, 1993.
  69. Rossell P.J., Jackson P., Kingsley E.A. (Ed.), "Prostate Cancer Methods and Protocols" New Jersey, Humana Press, 2003.
  70. Fidler I.J., White J.R. "Design of Models for Testing Cancer Therapeutic Agents" New York: Van Nostrand Reinhold Company; 1982.
  71. Jackson I.J., and Abbott C.M., "Mouse Genetics and Transgenics: a practical approach" Oxford: Oxford University; 2000.

- 
72. Samir N., Khleif, M.D., and Gregory A. Curt, MD “ Animal Models in Developmental Therapeutics” [en línea]. *Cancer Medicine*; 2000 [fecha de acceso 26 de mayo 2010]. URL disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=cmed&part=A9538>
  73. Hofker M.H., Deursen J.V. “Transgenic mouse: methods and protocols” Totowa, New Jersey: Humana; 2003.
  74. Prendergast G.C. (Ed.), “Molecular Cancer Therapeutics Strategies for Drug Discovery and Development” New York, Wiley-Liss, 2004.
  75. PV Sánchez , RL Perry , JE Sarry , AE Perl , K Murphy , CR Swider , Bagg A , Choi JK , JA Biegel , G-Desnoyers Danet , M Carroll., “ Un modelo de xenotrasplante robusta para la leucemia mieloide aguda.” *Epub*; 23 (11):2109-2117, 2009.
  76. Green E.L. “Biology of the Laboratory Mouse, by the staff of the Jackson Laboratory” 2a. ed. New York: Dover Publications; 1998.
  77. Crawley J.N. “What’s Wrong with my Mouse? Behavior phenotyping of Transgenic and Knock-out Mice” New York: Wiley-Liss; 2000.
  78. Bishop J.M., Weinberg R.A.(Ed.), “Molecular Oncology” Scientific American, Inc. New York, 1996.