



# **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**

**MAESTRÍA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD  
ANIMAL**

**(FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, FACULTAD DE QUÍMICA)**

**Evaluación Primaria de Seguridad y Eficacia del  
Compuesto de Coordinación de Estaño NF60,  
como Posible Agente Antineoplásico**

**TESIS**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS**

**PRESENTA:**

**JORGE FRANCISCO VANEGAS SORIANO**

**TUTOR: MARÍA ISABEL GRACIA MORA (FACULTAD DE QUÍMICA UNAM)**

**COMITÉ TUTORAL: LAURA PATRICIA ROMERO ROMERO (FMVZ)**

**LUIS ENRIQUE GARCÍA ORTUÑO (FMVZ)**

**MÉXICO, D.F. 2014**



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.

## RESUMEN

Se evaluó la actividad antineoplásica *in vitro* e *in vivo* del compuesto de coordinación de estaño NF60, se realizaron las pruebas preclínicas primarias de seguridad mediante ensayos de toxicidad aguda y toxicidad subcrónica.

*In vitro* se realizó un ensayo con sulforrodamina B, calculando la concentración inhibitoria media ( $CI_{50}$ ) del compuesto NF60 y de 2 quimioterapéuticos aprobados sobre la línea tumoral murina Melanoma B16F10. La  $CI_{50}$  más baja fue la del compuesto NF60 (0.567  $\mu\text{g/ml}$ ) seguida por el 5-Fluorouracilo (85.418  $\mu\text{g/ml}$ ) y por último la ciclofosfamida (221.882  $\mu\text{g/ml}$ ).

Las pruebas preclínicas de seguridad fueron: toxicidad aguda en ratones y ratas exogámicos, Hsd:ICR y Hsd:WISTAR y toxicidad subcrónica únicamente en ratas Hsd:WISTAR, todas por vía intraperitoneal. La dosis letal ( $DL_{10}$ ) en ratones fue de: 24.44 mg/kg y en ratas de: 14.24 mg/kg. La dosis letal media ( $DL_{50}$ ) en ratones fue de: 28.32 mg/kg y ratas de: 18.27 mg/kg. La exposición subcrónica tuvo una duración 90 días con administración semanal. Se formaron 4 grupos de 10 ratas para probar 3 niveles de dosis y un control: Grupo Control: Agua destilada, Grupo D1: 2.5mg/kg, Grupo D2: 4.5mg/kg, Grupo D3: 6.5 mg/kg. Semanalmente se registró el peso y consumo de alimento, se realizaron 3 muestreos los días 0, 45 y 90 para estudios de hematología, bioquímica clínica y urianálisis; posterior al día 90 se realizó necropsia completa y estudio histopatológico de cada individuo. Los grupos Control y D1 no presentaron muertes durante los 90 días del estudio a diferencia de los grupos D2 y D3 que presentaron signos clínicos asociados con alteraciones en el tracto digestivo (diarrea, distensión abdominal). No se observaron cambios importantes al hemograma, ni a nivel hepático o renal en ninguno de los grupos. En el estudio histopatológico se observó una serositis en los órganos de la cavidad abdominal (engrosamiento y fibrosis de las cápsulas), ocasionada por la aplicación repetida del compuesto. Para evaluar la eficacia *in vivo* se utilizó la línea celular HCT-15 que se implantó subcutáneamente en ratones nu/nu. Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos:

Control negativo (agua destilada), control positivo (cisplatino 4.5 mg/kg), NF60 esquema crónico (4.5 mg/kg), NF60 esquema intermitente (6.5 mg/kg). Con los volúmenes tumorales promedio se determinó la inhibición de crecimiento tumoral de cada grupo con respecto al control negativo. El único grupo que cumplió con los estándares del *Cancer Chemotherapy National Service Center* para determinar la actividad antineoplásica, fue el NF60 en esquema intermitente. Este mismo grupo fue el que mostró menor tasa de crecimiento, índice mitótico y menor porcentaje de positividad a Ki67 con respecto al control negativo. Se observó diseminación del tumor en toda la cavidad abdominal los animales del control negativo, que no fue observada en los grupos con tratamiento. El compuesto de coordinación de estaño NF60 demostró tener actividad antineoplásica tanto *in vitro* como *in vivo*, su administración repetida no ocasionó efectos secundarios a nivel hepático ni renal en ratas tras la administración repetida.

# ÍNDICE

1.0 Introducción y Marco Teórico .....	1
1.1 Estadísticas y Definiciones del cáncer .....	1
1.2 Patología molecular del Cáncer.....	4
1.2.1 Ciclo celular .....	4
1.2.2 Oncogenes .....	9
1.2.3 Genes supresores.....	14
1.2.4 Aapoptosis .....	18
1.2.5 Telomeros, Telomerasa y Cáncer .....	22
1.2.6 Inestabilidad Genómica .....	23
1.2.7 Metabolismo y Cáncer .....	24
1.2.8 Angiogénesis.....	26
1.2.9 Invasión y metástasis .....	28
1.2.10 Epigenética.....	32
1.3 Quimioterapia y Cáncer.....	34
1.3.1 Multiresistencia a Quimioterapéuticos .....	40
1.4 Desarrollo de Fármacos .....	42
1.5 Modelos Tumorales Murinos.....	45
1.6 Compuestos metálicos como Quimioterapéuticos.....	47
1.7 Compuestos de Coordinación de Estaño .....	49
2.0 Justificación .....	50
3.0 Objetivo General .....	50
4.0 Hipótesis.....	51
5.0 Evaluación de la actividad antineoplásica <i>in vitro</i> .....	51
5.1 Objetivo Específico .....	51
5.2 Metodología .....	51
5.3 Resultados.....	53
5.4 Discusión .....	54
6.0 Pruebas Preclínicas de Seguridad .....	55
6.1 Toxicidad Aguda .....	56
6.1.1 Objetivo específico.....	56
6.1.2 Toxicidad aguda en Ratones Hsd:ICR.....	56

6.1.3 Toxicidad aguda en Ratas Hsd:WISTAR.....	59
6.1.2 Discusión .....	62
6.2 Toxicidad Subcrónica en Ratas Hsd:Wistar .....	63
6.2.1 Objetivo Específico .....	63
6.2.2 Metodología.....	63
6.2.3 Resultados Toxicidad Subcrónica Ratas Hsd:WISTAR .....	67
6.3 Discusión .....	79
7.0 Evaluación de actividad antineoplásica <i>in vivo</i> .....	84
7.1 Objetivo Específico .....	84
7.2 Metodología.....	84
7.3 Resultados.....	89
7.5 Discusión .....	95
8.0 Conclusiones.....	101
ANEXO 1 .....	103
ANEXO 2 .....	104
BIBLIOGRAFÍA.....	105

# 1.0 Introducción y Marco Teórico

## 1.1 Estadísticas y Definiciones del cáncer

Los tumores malignos representan aproximadamente 13% de las defunciones mundiales, 7.9 millones de muertes por año, de las cuales más del 72% se registran en países de ingresos bajos y medios. La Organización Mundial de la Salud (OMS) prevé que entre 2007 y 2030, aumentará 45% la mortalidad por cáncer a nivel mundial, pues estima que pasará de 7.9 a 11.5 millones de defunciones por año, resultado del crecimiento demográfico y el envejecimiento de la población. Además, se estima que durante el mismo periodo, el número de casos nuevos de cáncer aumentará de 11.3 a 15.5 millones <sup>(1)</sup>.

La OMS estima que el cáncer podría cobrar la vida de 10.3 millones de personas en el mundo para 2020, afectando a 6.7 millones de individuos cada año. En nuestro país, la tasa de defunción por cáncer tiende a aumentar. De 1998 a 2008, se incrementó, pasando de 57.7 a 66.6 por cada 100 mil habitantes. Entre las mujeres, el crecimiento fue de 59.6 a 66.7 por cada 100 mil habitantes, mientras que entre los hombres, de 55.6 a 66.5 por cada 100 mil habitantes <sup>(1)</sup>.

Si bien, el cáncer podría considerarse una enfermedad relativamente moderna atribuida a factores ambientales y al estilo de vida actual, en realidad convive con el ser humano desde hace muchísimo tiempo. Se han encontrado tumores en momias egipcias que datan del año 3000 a.C., de hecho la primera descripción escrita sobre cáncer, se encuentra en el llamado “papiro quirúrgico de Edwin Smith” una especie de manual médico que data del año 500 a.C. en donde se describe cómo tratar “tumores en el pecho, fríos, sin secreciones y que se extienden sobre el mismo pecho” es curioso que desde entonces se menciona que no hay tratamiento para estos casos <sup>(2)</sup>.

Cien años después Hipócrates, en el año 400 a.C. fue el primero en usar las palabras "carcinomas" y "carcinoma" para describir los tumores y así nació el uso del

término “Cáncer” dicha palabra proviene del latín “calco” y del griego karkínos κarkínos que significa cangrejo. Se dice que se relacionó a los cangrejos con estos tumores debido al parecido que tienen las venas que rodean un tumor canceroso con las patas de un cangrejo y, por el hecho, de adherirse de manera obstinada a cualquier parte <sup>(3)</sup>.

A lo largo de la historia se han acuñado distintas definiciones de “cáncer”, sin embargo encontrar una que englobe todos los aspectos relacionados en su desarrollo, es complicado. En la actualidad sabemos que de hecho el cáncer no es solo una enfermedad si no un grupo de enfermedades (>100) que comparten alteraciones en la regulación del crecimiento y división celular <sup>(4)</sup>.

Según el diccionario de la real academia española el cáncer se define como: enfermedad neoplásica con transformación de las células, que proliferan de manera anormal e incontrolada; mientras que el National Cancer institute (NCI) de los Estados Unidos de América refiere que “Cáncer es un término que se usa para enfermedades en las que células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos” <sup>(4)</sup>.

Como podemos ver estas definiciones son muy similares, sin embargo, dejan de lado varios aspectos básicos implicados en el desarrollo de este grupo de enfermedades, por lo que en este trabajo se propone la siguiente definición que si bien, sigue siendo general, incluye distintos factores importantes omitidos:

- Conjunto de enfermedades que se presentan como resultado de la interacción entre factores genéticos, epigenéticos y factores externos (físicos, químicos y biológicos) que producen trastornos en el crecimiento, proliferación, diferenciación y muerte celular que generalmente conducen a la formación de tumores malignos, cuyas células transformadas tienen la capacidad de invadir y colonizar otros tejidos al de origen.

Hasta el momento se han mencionado diferentes términos tales como cáncer, tumor, neoplasia; es importante diferenciar entre cada uno de ellos para su uso correcto.

En términos generales *neoplasia* significa “nuevo crecimiento” mientras que *tumor* se refiere a un aumento de tamaño que originalmente se aplicó a la tumefacción desarrollada durante un proceso inflamatorio. Sin embargo, en la actualidad la utilización no neoplásica del término *tumor* casi ha desaparecido por lo que podría considerarse un equivalente a neoplasia <sup>(5)</sup>.

Una definición más exacta para el término neoplasia es la siguiente:

- “Masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede y está descoordinado con el de los tejidos normales, y persiste de la misma forma excesiva después de cesar los estímulos que desencadenaron el cambio” <sup>(6)</sup>.

Aunque esta definición pudiera parecerse a las antes mencionadas para cáncer, estos no son sinónimos ya que en realidad solamente las neoplasias consideradas como malignas en conjunto son las que se denominan *cánceres*.

Los tumores o neoplasias benignas son aquellos cuyas características micro y macroscópicas no representan un riesgo importante para la vida del paciente. Son tumores bien diferenciados con estructura típica a la del tejido de origen, su crecimiento es progresivo pero lento; incluso pueden llegar a estabilizarse o tener una regresión espontánea, generalmente son masas expansivas, cohesivas, bien delimitadas, que no invaden ni infiltran los tejidos normales circundantes <sup>(5)</sup>.

Por otro lado, los tumores malignos son aquellas neoplasias cuyas células pueden invadir y destruir las estructuras adyacentes y diseminarse a localizaciones distantes (metástasis). Las células muestran distintos grados de anaplasia, su velocidad de crecimiento es variable, son localmente invasivos e infiltran tejido circundante <sup>(5)</sup>.

Todos los tumores tienen 2 componentes básicos:

- Parénquima: Compuesto por células neoplásicas clonales.
- Estroma: Formado por tejido conjuntivo, vasos sanguíneos, y cantidades variables de células inflamatorias.

La nomenclatura de los tumores se basa principalmente en el componente parenquimatoso de cada tipo de tumor.

Los tumores benignos de origen mesenquimatoso se designan añadiendo el sufijo *oma* a la célula de origen. La nomenclatura de los tumores benignos de origen epitelial es más compleja ya que se clasifican de forma variable de acuerdo a las células de origen, otros al patrón microscópico y aun otras en su arquitectura macroscópica <sup>(5)</sup>.

Los tumores malignos que se originan en el tejido mesenquimatoso generalmente se llaman sarcomas. Mientras que las neoplasias de origen epitelial, derivadas de cualquiera de las tres capas germinales se llaman carcinomas. Los cánceres originados en células hematopoyéticas se les denomina de forma genérica como leucemias, aunque tengan un origen mesenquimatoso <sup>(5)</sup>.

Hay que mencionar que dentro de la clasificación de los tumores existen algunos usos inapropiados o que no corresponden a las reglas de nomenclatura pero que se encuentran profundamente arraigados por lo que no han sido corregidos; por ejemplo el linfoma, o el melanoma, son neoplasias consideradas malignas y se les nombra con el sufijo *oma*, término que sugieren benignidad <sup>(5)</sup>.

## **1.2 Patología molecular del Cáncer**

### **1.2.1 Ciclo celular**

Para poder comprender las distintas alteraciones que llevarán a una proliferación celular continua y descontrolada, primero debemos entender cómo es que las células normales regulan su propia proliferación.

Como sabemos todas las células forzosamente provienen de otra célula preexistente. La reproducción celular se da mediante una secuencia ordenada de procesos en los que las células primero deben duplicar su contenido para posteriormente dividirse en dos células iguales. El ciclo completo de duplicación y división es lo que se conoce como ciclo celular <sup>(7; 8)</sup>.

Para producir dos células genéticamente idénticas es necesaria la reproducción exacta del DNA en cada cromosoma y la separación y distribución precisa de los cromosomas replicados, así como la duplicación de los organelos celulares y el tamaño celular ya que de no ser así en cada división la célula sería mas pequeña <sup>(7)</sup>.

La regulación del ciclo celular se da por medio de un grupo de proteínas llamadas en conjunto "*sistema de control del ciclo celular*" el cual es sensible a distintas señales tanto intra como extra celular <sup>(7)</sup>.

Este sistema es fundamental en la regulación de la cantidad de células en los tejidos; por lo que una disfunción en dicho sistema permitiría divisiones celulares excesivas favoreciendo al desarrollo de cáncer.

El ciclo celular en células eucariontes se divide en 4 fases: <sup>(5; 7)</sup>

- Fase S (síntesis): Fase S o de síntesis activa de DNA, en ella se duplica el DNA de la célula; dura aproximadamente 12 a 18 horas. La actividad de las enzimas replicadoras, como la timidincinasa, DNA polimerasa, dihidrofolato reductasa, ribonucleótido reductasa, RNA polimerasa II y las topoisomerasas I y II, están aumentadas.
- Fase G2: es el período premitótico, cesa la síntesis de DNA, continúa la síntesis de proteínas y RNA y se producen los microtúbulos, precursores del huso mitótico. La fase G2 dura 1 a 8 horas y el complemento de DNA es  $4n$  (dos veces el número normal de cromosomas).
- Fase M (mitosis): Es la fase en la cual tiene lugar la división citoplasmática (citocinesis); la mitosis dura aproximadamente 1 a 2 horas. Las tasas de

producción de proteínas y ARN disminuyen de golpe, mientras el material genético es segregado en las células hijas. Una vez completada la mitosis las nuevas células pasan a la fase G0 o G1.

- Fase G1 (o interfase): Es el período posmitótico en el que cada célula comienza su crecimiento. Durante el mismo tiene lugar la síntesis de RNA y proteínas para funciones celulares especializadas. La duración de la fase G1 es variable, se produce una aceleración en la síntesis de RNA y aumentan muchas de las enzimas necesarias para la replicación del DNA. La fase G1 está en equilibrio con fase G0. La fase G1 puede estar ausente o puede ser tan prolongada como para producir el estado quiescente (G0).

En las dos fases de intervalo la célula aumenta de tamaño, duplica los organelos citoplasmáticos y monitorea el ambiente intra y extracelular para determinar si las condiciones son las adecuadas para la división, en estas fases es donde se decide si la célula está lista para la siguiente fase o se realiza una pausa en el ciclo. El ciclo tiene una secuencia específica, incluso cuando, bajo ciertas circunstancias alguna de las fases dure más tiempo de lo habitual, por ejemplo si una célula sufre un daño sobre el ADN, esta interrumpirá el ciclo en G1 o en G2, para reparar el daño antes de poder ingresar a las fases S o M respectivamente. <sup>(9)</sup>

Estas pausas en el ciclo celular se pueden llevar a cabo mediante frenos moleculares ubicados en puntos de control estratégicos del ciclo. Los puntos de control más importantes se ubican en G1, en G2 y en M.

Primer punto de control: es el punto de restricción en la fase G1 tardía, justo antes de la fase S. Aunque se hayan enviado las señales extracelulares adecuadas y toda la maquinaria celular para que la síntesis de DNA esté preparada, el DNA debe estar intacto, de no ser así, la célula puede permanecer más tiempo en G1, o ingresar a una fase de reposo alterna (G0). De esta forma se evita la perpetuación de mutaciones en la progenie de la célula, este punto de control es particularmente importante ya que una vez que se superó este, la célula está obligada a dividirse. El evento fundamental en este punto es el nivel de

fosforilación de la proteína codificada por el gen supresor de tumores *RETINIBLASTOMA* (RB) <sup>(9; 10)</sup>.

Segundo punto de control: ocurre inmediatamente antes de que la célula entre en la fase M de regulación (G2-M); los inhibidores del ciclo celular detienen la célula hasta que se determina si la nueva progenie traerá sucesores adecuados, con copias exactas del material genético de la célula madre. Una célula que no ha conseguido duplicar exactamente todo su contenido en DNA, o que no posee todo el complemento de proteínas, materiales del huso y otras sustancias necesarias para la mitosis, será detenida en este punto hasta que todo esté establecido y antes de que pueda empezar la fase M <sup>(10)</sup>.

Tercer punto de control: sucede durante la transición de metafase a anafase en la mitosis, denominado punto M, que asegura que no hay errores en la formación del huso acromático o en el alineamiento de los cromosomas en la placa ecuatorial y se produzca un reparto igualitario de cromosomas entre las dos células hijas <sup>(10)</sup>.

Las fosforilaciones y desfosforilaciones de proteínas representan quizá el método utilizado con mayor frecuencia en las células para pasar de un estado activo a otro inactivo, el sistema de control del ciclo celular utiliza este recurso para regular el paso hacia las distintas etapas del ciclo <sup>(7)</sup>.

Las reacciones de fosforilación que controlan el ciclo son llevadas a cabo por medio de proteincinasas, mientras que las proteinfosfatasas son las encargadas de las desforforilaciones <sup>(9)</sup>.

A su vez, la activación o desactivación de estas cinasas en los momentos específicos del ciclo en los que se les necesita se lleva a cabo por otro grupo de proteínas denominado ciclinas, las cuales deben unirse a las cinasas para que estas adquieran su actividad enzimática. Por tal motivo, a las cinasas que controlan el ciclo celular se les conoce como cinasas dependientes de ciclinas (CDK), ya que las proteínas realmente activas son los complejos formados por ciclina-CDK <sup>(7; 11)</sup>.

Los complejos Ciclina-CDK orquestan la transición a través de las distintas fases del ciclo, en cuadro 1 se muestran los principales complejos y sus funciones. <sup>(5; 7)</sup>

<b>Cuadro 1. Complejos Ciclinas/CDK y sus principales funciones</b>			
<b>Ciclina</b>	<b>CDK</b>	<b>Complejo</b>	<b>Función</b>
D	CDK4, CDK6	G1-CDK	Impulsa el pasaje de la célula a través de G1, fosforila a RB para poder progresar a través del punto de restricción en G1
E	CDK2	G1/S-CDK	El complejo se forma en G1 y permite la transición de G1 a S
A	CDK2	S-CDK	Activador de la replicación de ADN. Participa en la transición de G2/M
B	CDK1	M-CDK	Transición de fase G2 a M,

El aumento y la disminución en la concentración de las ciclinas desempeñan un papel importante en la regulación de la actividad de las CDK, a su vez, dicha concentración es regulada a través del sistema proteolítico dependiente de ubiquitina, el cual al llegar a una concentración “X” en la que se desencadena la función específica de cada complejo, las ciclinas son ubiquitinizadas y degradadas en el proteasoma, por lo que al destruirse la ciclina la CDK se inactiva <sup>(7; 9; 11)</sup>. Otra forma de controlar la actividad de los complejos ciclina-Cdk es por medio de proteínas inhibidoras de CDK (CDKI), que ejercen un control negativo sobre el ciclo celular. Entre las más importantes se encuentran las CDKI de la familia CIP/WAF compuesta por p21, p27, y p57 las cuales actúan prácticamente en todas las fases del ciclo. Existe otra familia llamada INK4 formada por p15, p16, p18 y p20 tienen efectos selectivos sobre la ciclina D/CDK4. La expresión de estos inhibidores es controlado negativamente por señales mitógenas, promoviendo la progresión del ciclo celular <sup>(5; 8)</sup>.

En presencia de un daño al DNA el ciclo celular se interrumpirá en la fase G1, lo cual asegura que la célula no replique el DNA dañado. Esta lesión en el DNA provoca un incremento en la concentración de otra proteína reguladora de genes llamada p53, la cual activa la transcripción del gen que codifica para la expresión de p21 que se une a los complejos G1-CDK, G1/S-CDK impidiendo la transición de G1 a S. Durante esta pausa en el ciclo la célula intentará reparar el daño, de ser así la célula puede regresar nuevamente al ciclo normal <sup>(7; 9)</sup>.

Para funcionar adecuadamente los puntos de control del ciclo celular utilizan sensores que detectan si existe algún daño al DNA, dos grupos de proteínas se encargan de esta importante función: 1) La proteína relacionada con ataxia telangiectasia y Rad 3 (ATR) y 2) la proteína de la ataxia telangiectasia mutada (ATM). La primera se activa por colapso de la horquilla de replicación, mientras que la segunda en respuesta a rupturas en la doble cadena del ADN<sup>(12)</sup>.

Como se mencionó la detención del ciclo celular en el punto de control G1/S1 está mediada principalmente por p53, que induce la expresión de p21, mientras que la detención en el punto de control en G2/M implica mecanismos tanto dependientes como independientes de p53<sup>(7)</sup>.

Como veremos más adelante, alteraciones en la regulación del ciclo celular y principalmente en los puntos de control son una de las causas fundamentales de inestabilidad genómica y por consiguiente del desarrollo de cáncer.

### **1.2.2 Oncogenes**

Como se mencionó anteriormente las mutaciones genéticas ocurren de manera normal durante la vida de un individuo, sin embargo, es realmente la mutación de ciertos genes en particular lo que podría predisponer al desarrollo del cáncer, a estos genes se les ha llamado proto-oncogenes.

Los proto-oncogenes son genes implicados principalmente en el crecimiento y la proliferación celular. Muchos de estos proto-oncogenes juegan un papel importante durante la embriogénesis. Algunos proto-oncogenes también regulan negativamente la diferenciación celular, estas funciones son desactivadas una vez que los procesos de desarrollo que regulan se han completado<sup>(13)</sup>. Por otro lado, las proteínas para las que codifican se expresan en diferentes momentos del ciclo celular y son imprescindibles para la regulación de este. Los oncogenes, a diferencia de los proto-oncogenes, exhiben un aumento de la producción de estas proteínas (oncoproteínas), lo que conduce a un aumento de la división celular, disminución de la diferenciación celular, y la inhibición de la muerte celular. Estas oncoproteínas a diferencia de sus homólogas codificadas por los proto-oncogenes

carecen de elementos reguladores por lo que su producción por parte de las células malignas no depende de la acción de factores de crecimiento ni de otras señales externas. De esta manera el crecimiento celular se hace autónomo, libre de puntos de control e independiente de señales externas <sup>(13; 14)</sup>.

Los oncogenes sólo necesitan estar mutados en un alelo, para que se produzca la sobreexpresión de una proteína dada y esta ejerza su acción promotora, es por esta razón que la mutación de estos genes se considera de carácter dominante <sup>(5)</sup>.

- Mecanismos de activación oncogénica

Los oncogenes surgen como resultado de mutaciones que aumentan el nivel de expresión o actividad de un proto-oncogén. Esta ganancia de función se puede producir por diferentes mecanismos: <sup>(12; 13; 15)</sup>

1. Translocación Cromosómica: se da cuando una parte de un cromosoma se liga a otro. El resultado es un híbrido de cromosoma con mayor material genético y otro con menor material, en el caso de que el segundo cromosoma done material genético al primero; se dice que la translocación es recíproca. Estas alteraciones dan lugar a errores en la transcripción del DNA. Estos eventos pueden trasladar un proto-oncogén a un nuevo sitio cromosómico que conduce a una mayor expresión o provocar una fusión entre un proto-oncogén y un segundo gen, que produce una proteína de fusión con actividad oncogénica.
2. Mutaciones Puntuales (de punto): se refiere a la sustitución de un par de bases por otro par en una secuencia de DNA. Estas pueden ser causadas por distintos factores como radiación ultravioleta, altas temperaturas, radiaciones ionizantes, compuestos químicos o por errores en la replicación y/o reparación del DNA. Las mutaciones de punto en regiones promotoras de un proto-oncogén pueden conducir a un aumento en la transcripción del gen.
3. Amplificación Génica: las células eucariotas están formadas por un genoma diploide. En determinadas circunstancias una de las copias cromosómicas

puede multiplicarse miles de veces, aumentando su tasa de expresión, dando lugar a la amplificación del gen. Es uno de los mecanismos más habitualmente implicados en la carcinogénesis. Los genes amplificados miden hasta 1000 kb o más de longitud, o forman pequeños cromosomas dobles carentes de centrómero (dobles diminutos).

4. Mutagénesis por Inserción: Es la mutación del DNA mediante la inserción de una o más bases; estas pueden ocurrir de forma natural, mediada por virus o por un transposón. La célula es infectada por un virus que posee un gen promotor; el promotor se inserta en la vecindad de un proto-oncogén, esta acción ocasiona la pérdida de la regulación del proto-oncogén, lo cual lleva a la generación de un oncogén.

- Niveles de actuación de los oncogenes

Como ya se mencionó, los oncogenes codifican oncoproteínas que van a actuar siguiendo un esquema de funcionamiento semejante al de las proteínas normales pero de una manera descontrolada. Estas oncoproteínas pueden actuar a distintos niveles de la cascada de señalización encargada de regular la proliferación celular, en condiciones fisiológicas esta cascada de señalización puede resumirse en los siguientes pasos: <sup>(7; 16)</sup>

Unión de un factor de crecimiento con su receptor específico.

1. Activación transitoria de receptores transmembranales.
2. Activación de proteínas citosólicas transductoras de señal.
3. Transmisión de la señal a través del citosol hasta el núcleo por medio de proteínas transductoras secundarias.
4. Inducción y activación de factores de transcripción nucleares.
5. Entrada al ciclo celular con la consecuente división celular.

Tomando esto como base podemos inferir que las oncoproteínas actúan a estos niveles para poder proveer de la autosuficiencia mencionada a las células tumorales.

### **a) Como factores de crecimiento**

Para que una célula normal prolifere requiere de la estimulación por parte de factores de crecimiento, por lo general estos actúan de forma parácrina. Los productos de muchos oncogenes actúan como factores de crecimiento; sin embargo las células neoplásicas presentan dos variantes principales con respecto a las células normales: 1) capacidad de sintetizar sus propios factores de crecimiento (ciclo autócrino) y 2) una producción exacerbada de estos factores que promueven la proliferación celular incrementando el riesgo de mutaciones en otros sitios de control, este efecto se atribuye a una sobreexpresión de los genes codificantes para los factores de crecimiento <sup>(17)</sup>.

### **b) Como receptores de factores de crecimiento**

En condiciones normales los factores de crecimiento para ejercer su efecto deben unirse a receptores en la membrana celular. Estos receptores transmembranales al unirse con su ligando sufren un cambio conformacional que conduce a la activación transitoria de un dominio intracelular que permite la progresión de la cascada de señalización cascada abajo <sup>(18)</sup>.

Las versiones oncógenas de estos receptores se activan constitutivamente sin que exista la unión con su ligando específico, liberando señales mitógenas continuas incluso en ausencia de factores de crecimiento en el entorno <sup>(19)</sup>.

La activación de este tipo de oncogenes se puede dar mediante múltiples mecanismos, como mutaciones puntuales, redistribuciones génicas o más comúnmente la sobreexpresión de formas normales de estos receptores derivados de una amplificación génica <sup>(5)</sup>.

### **c) Como proteínas transductores citoplasmáticas**

La transmisión de la señal del citoplasma hasta el núcleo, se realiza mediante una serie de reacciones en cascada en las que interaccionan distintas proteínas, dando lugar a numerosas fosforilaciones (mediadas por cinasas), defosforilaciones e hidrólisis de GTP. En esta cascada de reacciones van a intervenir, por tanto,

distintas cinasas así como enzimas que generarán segundos mensajeros (cAMP, cGMP, fosfatidil inositol).

Algunas oncoproteínas imitan la función de estas proteínas transductoras de señal, el ejemplo mejor estudiado es una oncoproteína de la familia *ras*, la mutación puntual de los genes *ras* es la anomalía más frecuente de los proto-oncogenes en tumores humanos (15 a 20 % de todos los tumores humanos). Una mutación con la consecuente activación constitutiva de *ras* mantendría a la célula en un estado continuo de proliferación. Por otro lado la alteración en la función de *ras* puede ser indirecta si existe una mutación en las proteínas encargadas de catalizar la actividad GTPasa de *ras* (GAP) o bien en proteínas que actúan como segundos mensajeros corriente abajo de la cascada de señalización (MAPK) <sup>(20; 21)</sup>.

#### **d) Como factores de transcripción**

Los factores de transcripción son proteínas nucleares encargadas del control de la expresión génica, estos actúan sobre un segundo grupo de genes involucrados en la proliferación por lo que cambios en la actividad de estas proteínas contribuyen al desarrollo de neoplasias.

Los productos de los oncogenes *myc*, *myb*, *jun*, *fos* y *rel*, son factores de transcripción que regulan la expresión de genes promotores de crecimiento.

Algunos factores de transcripción como SRF, SIS y NF- $\kappa$ B, están inactivos en las células quiescentes, tras la activación mitógena se unen a C-*fos*, C-*jun* y C-*myc* <sup>(22)</sup>. De estos *myc* es el que se encuentra más frecuentemente implicado en la carcinogénesis. Algunos de los genes diana de la proteína normal C-*myc* están asociados a proliferación celular como la ciclina D2, además de modular otros eventos celulares que incluyen acetilación de histonas, reducción de la adhesión celular, aumento de motilidad celular, aumento de la actividad de telomerasa, incremento en la síntesis de proteínas e incluso cambios en el metabolismo celular. Tomando esto en cuenta no es extraño que la expresión persistente o la

sobreexpresión de esta oncoproteína sea un hallazgo frecuentemente en cánceres humanos <sup>(5; 22)</sup>.

### **e) Ciclinas y cinasas dependientes de ciclinas**

La cascada de señalización de proliferación celular culmina con la entrada de las células quiescentes al ciclo celular, como ya se mencionó dicho ciclo está regulado principalmente por la actividad de las ciclinas y las CDKs. Los complejos (CDK-ciclina) fosforilan proteínas claves que conducen a la célula a través del ciclo celular. Niveles elevados de ciclinas y/o sobreexpresión de CDKs se han podido demostrar en numerosos cánceres humanos. <sup>(19; 21)</sup>

### **1.2.3 Genes supresores**

Con el descubrimiento de los oncogenes se encontró una explicación de cómo las células tumorales proliferaban de manera incontrolada, sin embargo también se pensó que si había un grupo de genes encargados de promover la proliferación celular, debía existir otro grupo que controlara o que suprimiera dicha proliferación. Este grupo de genes se nombraron anti-oncogenes o genes supresores; entre ellos, se encuentran algunos relacionados con los mecanismos de reparación del DNA así como con la inducción de apoptosis. Al contrario de lo descrito con los oncogenes la mutación en los genes supresores provoca una pérdida de la función, liberando a la célula de los “frenos” encargados de regular la proliferación celular <sup>(5; 23)</sup>.

Las proteínas antioncogénicas en conjunto forman una red de puntos de control que impiden el crecimiento incontrolado, además de funcionar como sensores de estrés genotóxico. De hecho, la mutación o falla en este tipo de genes es de mayor relevancia que las mutaciones en los proto-oncogenes en el desarrollo del cáncer, ya que la expresión de un oncogén en una célula sin alteración en los genes supresores entrarían en un estado quiescente o incluso senescente sin proliferación descontrolada <sup>(24)</sup>.

Los productos de los genes supresores tumorales al igual que los oncogenes pueden actuar a distintos niveles y funcionar como receptores de superficie

celular, inhibidores del ciclo celular, factores de transcripción, reguladores de las respuestas al daño del DNA, otra diferencia de los genes supresores con respecto a los oncogenes es que, en la mayoría de los casos las mutaciones que afectan a este tipo de genes, son de carácter recesivo; esto quiere decir que para que se dé la pérdida de función del gen se requieren de dos mutaciones que afecten ambos alelos <sup>(5; 24)</sup>.

Entre los genes supresores de tumores más conocidos y estudiados se encuentran el gen *RB* y el Gen *TP53*, sin embargo, no son los únicos implicados en la carcinogénesis de distintos tipos de tumores.

- **Gen *RB***

Fue el primer gen supresor descubierto, durante el estudio de un tipo de tumor llamado retinoblastoma del que toma su nombre. Se observó que este tumor se presentaba cuando se perdía la heterocigosidad para el gen *RB* normal, o visto de otra manera cuando la célula se vuelve homocigótica para el gen mutante. También se observó que las mutaciones en este gen podían ser heredadas de línea germinal o como consecuencia de una mutación somática espontánea <sup>(5; 13)</sup>.

La proteína Rb es una fosfoproteína nuclear que regula negativamente la progresión del ciclo celular. Las células en las que la proteína Rb está hipofosforilada se encuentran en un estado quiescente, por otro lado, cuando Rb se hiperfosforila, este se inactiva y la célula entra al ciclo celular <sup>(25)</sup>.

Esta proteína es particularmente importante en la transición de la G1 a S, es decir en el primer punto de control del ciclo celular. Su efecto lo realiza secuestrando al factores de transcripción de la familia E-2F, el cual es necesario para que se exprese la ciclina E y se inicie la replicación del DNA. Por otro lado RB recluta proteínas desacetilasas de histonas e histonas metil transferasa las cuales remodelan la cromatina impidiendo la unión de los factores de transcripción a las regiones promotoras, además RB controla la estabilidad de otro inhibidor del ciclo celular, la proteína p27 <sup>(5; 26)</sup>.

Ante señales mitógenas Rb es fosforilado por acción del complejo ciclina D-CDK4/6 por lo que se inactiva y libera a E2F, estimulando la progresión del ciclo celular. Si la actividad de *RB* se encuentra alterada, como resultado de una mutación, E2F se encontrará libre, aun en ausencia de señales mitógenas, por lo que la célula se mantendrá en un estado de proliferación constante <sup>(25)</sup>.

Con todo lo mencionado se pensaría que la mutación de *RB* es casi un requisito para la progresión del cáncer, sin embargo es mucho menos frecuente de lo que se piensa, esto se debe a que la función de *RB* puede alterarse de manera indirecta por medio de mutaciones en otros genes (ciclina D, CDK4) que controlan la fosforilación de Rb. <sup>(25; 26)</sup>

Otra forma de pérdida de función de *RB* es ocasionada mediante la unión de proteínas víricas como las proteínas E1A de los adenovirus, la proteína E7 del VPH en particular la del tipo 16, por lo que los pacientes infectados con este tipo papiloma tienen un alto riesgo de desarrollar carcinomas cervicales. <sup>(5)</sup>

- **Gen *TP53***

Este gen localizado en el cromosoma 17p13, codifica para la proteína p53, la cual cumple funciones tan importantes que incluso lo han llamado coloquialmente el “guardián del genoma”. Aproximadamente el 50% de los tumores humanos presenta mutaciones en este gen, a diferencia del gen *RB* las mutaciones que afectan a *TP53* son adquiridas principalmente en células somáticas. <sup>(13)</sup>

La principal función atribuida a esta proteína es la de evitar la proliferación de células genéticamente dañadas, orquestando señales que detectan estrés celular a distintos niveles, además se ha demostrado que p53 regula la actividad de una gran variedad de genes con distintas funciones. <sup>(27)</sup>

La proteína p53 frustra la transformación neoplásica mediante tres mecanismos entrelazados: <sup>(5; 12; 22)</sup>

1. Detención transitoria del ciclo celular (quiescencia), si el daño al ADN logra ser reparado la célula entra nuevamente al ciclo celular

2. Detención permanente del ciclo celular (senescencia), en los casos en los que el daño al ADN no pudo ser reparado.
3. Activación de la muerte celular programada (apoptosis), en los casos en los que el daño al ADN no pudo ser reparado.

La activación de p53 y de las proteínas de reparación se da a través de fosforilaciones por parte de las proteínas ATM (ataxia telangiectasia mutada) y ATR (proteína relacionada con la ataxia telangiectasia y Rad3), las cuales, detectan distintos tipos de daño en el DNA, provocando la detención del ciclo celular y la estimulación de los sistemas de reparación del DNA.

La respuesta primordial mediada por p53 ante un daño al DNA es la detención del ciclo celular en la fase de G1, ocasionada directamente por la transcripción del inhibidor p21 (CDKN1A), la cual es dependiente de p53. Durante esta pausa la célula intenta reparar el daño en el DNA. La proteína p53 también participa de cierta manera en este proceso mediante la inducción de GADD45, una importante proteína reparadora de DNA.<sup>(23; 28)</sup>

Si el daño logra ser reparado p53 orquesta su propia degradación, estimulando la transcripción de la proteína MDM2 la cual degrada a p53, reactivándose el ciclo celular<sup>(5)</sup>.

Como ya se mencionó, si el daño al ADN no puede ser reparado, la célula detendrá permanentemente el ciclo celular (senescencia) o llevará a cabo la muerte celular programada (apoptosis). La senescencia inducida por p53, requieren de la expresión continua de otros mediadores como las CDKI, así como de cambios epigenéticos que dan lugar a la formación de heterocromatina en distintos *loci* del genoma. Por otro lado, la apoptosis inducida por p53 es la última opción de protección de la célula contra la multiplicación de células dañadas genéticamente. La acumulación de p53 estimula la transcripción de factores proapoptóticos como Bax y Puma. Se piensa que la activación de la apoptosis se da posterior a la detención del ciclo celular debido a que esta necesita de la acumulación de p53 para poderse activar<sup>(5; 12; 27)</sup>.

Al igual que lo mencionado con Rb la falla en la actividad de p53 puede ser secundaria a una alteración en otras proteínas reguladoras como MDM o MDMX que, como se mencionó, se encargan de la degradación de p53, si estas proteínas se encuentran sobreexpresadas la degradación de p53 es continua y se da la pérdida de función <sup>(27)</sup>, por otro lado las proteínas de algunos virus ADN como la proteína E6 del VPH se puede unir a p53 promoviendo su degradación <sup>(5)</sup>.

Además de RB y p53 existen otros genes supresores cuya mutación se encuentra comúnmente implicada en la presentación de diferentes tipos de cáncer.

#### **1.2.4 Apoptosis**

Hasta el momento nos hemos centrado en el hecho de que con la acumulación de mutaciones en ciertos genes las células neoplásicas adquieren una mayor capacidad de proliferación. Sin embargo por si solo, este cambio en el comportamiento celular no sería suficiente para el desarrollo del cáncer. Para esto es necesario que también se alteren los mecanismos que controlan la muerte celular programada o apoptosis, es decir debe darse un aumento en la proliferación celular aunado a una disminución de la muerte celular.

Antes de mencionar a que niveles se dan las alteraciones que pueden llevar a la célula a una inhibición de la apoptosis, se hará una breve revisión de los mecanismos normales por medio de los cuales se lleva a cabo la muerte celular programada.

El término “apoptosis” deriva del griego ἀπό (apó), 'desde' o 'a partir de', más πτωσις, (ptōsis) que significa “caída” y se refiere a la caída de las hojas de los árboles en otoño. Fue descrita por primera vez por Kerr *et al* en 1970, y desde entonces es uno de los eventos celulares más estudiado <sup>(29)</sup>.

La apoptosis tiene como función biológica principal mantener la homeostasis en distintas poblaciones celulares. La desregulación de este proceso puede conducir a estados patológicos que involucran a enfermedades con excesiva acumulación

celular (disminución de apoptosis) o con excesiva pérdida celular (aumento de apoptosis)<sup>(13)</sup>.

En los últimos 20 años, la apoptosis y la necrosis se han considerado como los tipos fundamentales de muerte celular. Además de presentar una apariencia morfológica distinta, ambos tipos de muerte celular tienen características diferenciales que permiten su identificación. De todas ellas la más importante es la que se refiere a las alteraciones del DNA. En todo proceso de muerte celular se produce la activación de nucleasas, que fragmentan el DNA. Mientras que en la apoptosis se activan selectivamente solo en sitios internucleosomales, en la necrosis se activan más generalizadamente endonucleasas y exonucleasas, que fragmentan el DNA tanto en sitios internucleosomales como nucleosomales.<sup>(30)</sup> Otra diferencia importante entre ambos tipos de muerte se refiere a la utilización de energía, ya que mientras la apoptosis requiere energía para la síntesis de ARN y de proteínas, la necrosis no consume energía. Actualmente se acepta que la disponibilidad de ATP de una célula puede determinar que, ante un mismo estímulo, esta muera vía apoptosis o vía necrosis<sup>(29)</sup>.

Comprender los mecanismos de apoptosis ayuda a entender la patogénesis de condiciones que resultan de una apoptosis desordenada. Las caspasas son centrales al mecanismo de la apoptosis ya que son tanto iniciadoras como ejecutoras del proceso. Hay tres vías por el cual las caspasas pueden ser activadas. Las dos comúnmente descritas son la vía extrínseca (o del receptor de muerte) y la vía intrínseca (o mitocondrial). Ambas vías finalmente llevan a una vía común o fase de ejecución de la apoptosis. Una tercera vía de iniciación, menos conocida, es la vía intrínseca del retículo endoplásmico<sup>(29; 30)</sup>.

La vía extrínseca del receptor de muerte, como su nombre lo indica, comienza cuando los ligandos de muerte se unen a un receptor de muerte. Aunque se han descrito varios receptores de muerte, los más conocidos son, el receptor de TNF tipo 1 (TNFR1), y la proteína Fas (CD95) y sus ligandos, TNF y Fas ligando (FasL), respectivamente. Estos receptores de muerte tienen un dominio de muerte intracelular que recluta a proteínas adaptadoras tales como el dominio de muerte

asociado al receptor TNF (TRADD) y al dominio de muerte asociado a Fas (FADD). La unión de un ligando de muerte, a un receptor de muerte, resulta en la formación de un sitio de unión para una proteína adaptadora y el complejo completo de ligando-receptor-adaptador se conoce como DISC (complejo de señalización que induce muerte) <sup>(29)</sup>. El DISC, inicia el ensamblaje y activación de la pro-caspasa 8. La forma activada de la enzima, la caspasa 8, es una caspasa iniciadora, que activa a otro tipo de caspasas ejecutoras <sup>(31; 32)</sup>.

Por su parte la vía intrínseca, responde a estímulos internos, tales como un daño genético irreparable, hipoxia, concentraciones extremadamente altas de calcio citosólico y estrés oxidativo severo. Independientemente del estímulo, esta vía es el resultado de una permeabilidad mitocondrial aumentada y de la liberación de moléculas pro-apoptóticas tales como la citocromo-C hacia el citoplasma. Esta vía está estrechamente regulada por un grupo de proteínas que pertenecen a la familia Bcl-2. Hay dos grupos principales de proteínas Bcl-2, específicamente las proteínas pro-apoptóticas (Bax, Bak, Bad, Bcl-Xs, Bid, Bik, Bim y Hrk) y las anti-apoptóticas (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Bfl-1 y Mcl-1); en tanto las proteínas anti-apoptóticas frenan la apoptosis bloqueando la liberación mitocondrial de citocromo-C, las proteínas pro-apoptóticas actúan promoviendo la liberación de citocromo-C desde la mitocondria hacia el citoplasma. <sup>(29; 33)</sup> No es la cantidad absoluta, sino el balance entre las proteínas pro- y anti-apoptóticas lo que determina si se va a iniciar o no la apoptosis. Otros factores apoptóticos que se liberan desde el espacio intermembranoso mitocondrial hacia el citoplasma incluyen al factor inductor de apoptosis (AIF), al segundo activador de caspasa derivado de mitocondria (Smac), a la proteína de unión al IAP directo con bajo pH (DIABLO) y a la proteína A de requerimiento de alta temperatura/Omi (HtrA2). La liberación citoplasmática de citocromo-C activa a la caspasa 3 por medio de la formación de complejo conocido como apoptosoma, que está conformado de citocromo-c, Apaf-1 y caspasa 9. Por otro lado, el Smac/DIABLO o la Omi/HtrA2, promueven la activación de la caspasa uniéndose a las proteínas (IAPs) liberando a las caspasas 3 y 9 de su interacción con las IAPs <sup>(31; 32; 33)</sup>.

La vía intrínseca y extrínseca convergen en la caspasa 3. La caspasa 3, degrada al inhibidor de la desoxiribonucleasa activada por caspasa, que es responsable de la apoptosis nuclear. Además, las caspasas que están río abajo, inducen la degradación de las proteín-cinasas, proteínas del citoesqueleto, proteínas de reparación del DNA y subunidades inhibitorias de la familia de las endonucleasas. Por ultimo afectan estructuralmente al citoesqueleto, el ciclo celular y las vías de señalización<sup>(32)</sup>.

La vía intrínseca del retículo endoplásmico es una tercera vía y la menos conocida; se cree que depende de la caspasa 12 y es independiente de la mitocondria. Cuando el RE sufre algún tipo de estrés provocado por hipoxia, radicales libres o falta prolongada de glucosa, hay un desplegamiento de proteínas y una síntesis reducida de proteínas en la célula, una proteína adaptadora conocida como factor 2 asociado al receptor TNF (TRAF2), se disocia de la procaspasa 12, resultando en la activación de la misma<sup>(29)</sup>.

Se ha demostrado que la vía comúnmente afectada en la carcinogénesis es la vía intrínseca, en particular se han observado mutaciones que afectan la actividad de las proteínas de la familia Bcl-2. La familia de proteínas Bcl-2, está comprendida por proteínas pro-apoptósicas y anti-apoptósicas, que juegan un rol importantísimo en la regulación de la apoptosis, especialmente en la vía intrínseca y actúan principalmente a nivel mitocondrial<sup>(30; 33)</sup>.

Cuando hay un desbalance entre los miembros de la familia Bcl-2 anti-apoptósicos y pro-apoptósicos, el resultado es una apoptosis desregulada en las células afectadas. Esto puede deberse a una sobreexpresión de proteínas anti-apoptósicas, o a una sub-expresión de proteínas pro-apoptósicas. En el caso de algunos tipos de cáncer, se ha demostrado la sobreexpresión de Bcl-2 (anti-apoptósica) que protege a las células neoplásicas contra este mecanismo de “defensa” natural<sup>(5)</sup>.

Otra forma bien establecida de como las células neoplásicas logran evadir la apoptosis es mediante la mutación del gen supresor p53, que como ya se

mencionó, entre sus múltiples funciones p53 también juega un papel proapoptótico, induciendo apoptosis en las células incapaces de reparar algún daño en el DNA. Por lo tanto la maquinaria apoptótica puede alterarse por mutaciones que afecten directamente a las proteínas efectoras de apoptosis o de forma indirecta por mutaciones en genes reguladores de la integridad genómica como TP53 <sup>(5; 28)</sup>.

### **1.2.5 Telómeros, Telomerasa y Cáncer**

La mayor parte de las células humanas normales tienen una capacidad limitada de división (60-70 divisiones); después de esto las células pierden la capacidad de dividirse y entran en un estado de senescencia. Este fenómeno es atribuido a un acortamiento progresivo de los telómeros <sup>(34)</sup>.

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas situadas en los extremos de los cromosomas encargadas de su protección, están compuestos por repeticiones de una secuencia de DNA (TTAGGG). Este DNA telomérico se asocia con un grupo de proteínas llamadas *shelterinas* las cuales protegen a los telómeros, reclutan telomerasa, y en general favorecen la estabilidad telomérica. La telomerasa es una ribonucleoproteína cuya función es añadir *de novo* fragmentos de ADN telomérico en los extremos de los telómeros. La actividad de la telomerasa constituye el principal mecanismo regulador de la longitud telomérica y en consecuencia del “Tiempo” de vida de la célula. La expresión de la telomerasa en los mamíferos adultos está restringida a ciertas etapas tempranas del desarrollo embrionario y, en adultos, a determinados comportamientos de las células madre y linajes celulares altamente proliferativos como linfocitos, queratinocitos o las células germinales. Se estima que alrededor del 90 % de los procesos tumorales cursan en algún momento con una reactivación anómala de la telomerasa, a esta reactivación se le atribuye el hecho de que las células neoplásicas tengan un potencial replicativo ilimitado, por lo que se les considere como células inmortales. <sup>(5; 23; 34)</sup>

Si bien, no se considera a la telomerasa como un oncogén, su reactivación favorece la perpetuidad de células con mutaciones adicionales, especialmente en genes supresores, por lo que la longitud y estabilidad telomérica si constituye una barrera para la progresión tumoral <sup>(5)</sup>.

### **1.2.6 Inestabilidad Genómica**

Como hemos visto hasta ahora, el desarrollo del cáncer depende de una acumulación de mutaciones en distintos puntos estratégicos que le van a conferir a la célula neoplásica independencia, alterando la función de genes que participan en el control de la división, diferenciación y/o muerte celular. Es por esto, que una célula genéticamente inestable es potencialmente una célula oncogénica.

El término inestabilidad genómica se refiere a un incremento en la frecuencia de mutaciones o alteraciones genómicas, así como una incapacidad de la misma para reparar el daño. <sup>(35)</sup> De estos dos factores el que tiene una mayor relevancia es el que se refiere a los mecanismos de reparación del DNA, ya que de manera espontánea, incluso en un entorno libre de mutágenos se estima una frecuencia de mutación de  $10^6$  mutaciones por gen y por división celular, por lo que en el curso de la vida de un humano promedio, es probable que en cada gen se produzcan  $10^{10}$  mutaciones. <sup>(23)</sup> Se reconocen dos mecanismos principales generadores del fenotipo mutador: <sup>(36)</sup>

La inestabilidad cromosómica (CIN), presente en la de las neoplasias humanas; y la inestabilidad de microsatélites (MSI), exclusiva de un pequeño grupo de tumores. El fenotipo CIN se asocia a la presencia de diversos tipos de alteraciones cromosómicas tales como aneuploidías, alteraciones cromosómicas estructurales o desbalances alélicos asociados a la pérdida de heterocigosis. Otras formas de expresión de CIN incluyen niveles incrementados de roturas cromosómicas espontáneas o de intercambio de cromátidas hermanas, asociaciones teloméricas, y acortamiento telomérico. Se ha demostrado que la presencia de CIN está significativamente asociada a mal pronóstico <sup>(12; 36)</sup>. Las causas primarias involucradas en CIN parecen ser defectos en la segregación cromosómica,

regulación de los puntos de control del ciclo celular y la reparación de daño en el DNA lo que a su vez favorecerá la acumulación de un mayor número de mutaciones. La CIN se observa en el 85% del total de los tumores malignos <sup>(36)</sup>.

Por otro lado el fenotipo MSI se asocia a un aumento en la tasa de mutación puntual espontánea de 100 a 1000 veces que se evidencia por la acumulación de mutaciones somáticas en secuencias repetitivas de DNA denominadas microsatélites. Los microsatélites son secuencias polimórficas de DNA no codificante (de 1 a 6 pares de bases) repetidas (aproximadamente 10 a 50 veces) dispersas en el genoma. Lo que ocasiona variaciones en el número de copias del segmento repetido en el DNA tumoral, comparado con el tejido morfológicamente normal del mismo individuo. La MSI es causada por deficiencias en el sistema de reparación de bases (MMR), mal apareadas o apareamientos erróneos lo cual impide la reparación de errores de replicación (RER) que ocurren normalmente en secuencias repetitivas de DNA. La falla en el sistema MMR se origina por mutaciones germinales o silenciamiento inducido por metilación de los genes MMR <sup>(13; 36)</sup>. Entre el 10 y el 30% de los tumores colorrectales esporádicos presentan MSI inducida por la metilación del promotor del gen hMLH1. Además, se ha detectado MSI en otros tumores esporádicos de recto, endometrio uterino y ovario. También se han referido diferentes grados de MSI en una proporción del 2 al 50% de otros tumores esporádicos, indicando que los genes MMR están involucrados de alguna manera en la patogenia del cáncer <sup>(36)</sup>.

### **1.2.7 Metabolismo y Cáncer**

Si bien en las últimas décadas los estudios para tratar de dilucidar los mecanismos por los cuales se desarrolla el cáncer se han centrado en la detección de genes implicados en la transformación neoplásica, realmente una de las primeras observaciones realizadas en los tumores fue, que incluso en condiciones de aerobiosis la célula tumoral tiene una tasa glucolítica anormalmente alta metabolizando glucosa a lactato a velocidades mucho mayores que las células normales <sup>(37)</sup>. A esta característica se le denomina efecto Warburg en honor a Otto

Warburg quien en 1924 fue el primero en atribuir al metabolismo un papel relevante en el proceso de oncogénesis.

Warburg propuso que la mitocondria de la célula tumoral tenía que tener su función bioenergética alterada. Desgraciadamente, la hipótesis de Warburg fue ignorada durante muchos años, sin embargo, en los últimos años el interés por investigar el metabolismo tumoral ha resurgido <sup>(38)</sup>.

El cambio a la glucólisis como principal vía metabólica que aporta energía a las células neoplásicas, se considera un mecanismo compensatorio por la deficiente actividad de la fosforilación oxidativa. Este metabolismo aberrante que presentan las células neoplásicas le sirve para poder proliferar manteniendo un suplemento constante de energía.

Se ha demostrado que la expresión de la lactato deshidrogenasa, enzima encargada de llevar acabo la fermentación láctica es decir convertir el piruvato en dos moléculas de lactato, se encuentra alterada en células tumorales. Por otro lado también se ha observado, en ciertos tipos de cáncer una sobreexpresión del transportador de glucosa GLUT-1 favoreciendo el aumentando la tasa de glucólisis <sup>(39)</sup>.

Estos cambios se deben a que en las células neoplásicas el metabolismo mitocondrial esta alterado, reduciendo la capacidad oxidativa de la célula. La frecuencia de mutación del ADN mitocondrial de las células neoplásicas es diez veces mayor que en el ADN nuclear, lo que podría explicar estas alteraciones <sup>(37)</sup>.

Ahora se sabe que el incremento en la tasa glucolítica se debe al aumento en la expresión de genes que codifican las enzimas de glucólisis, provocado por la activación de factores de transcripción u oncogenes como c-myc, USF-1, H-ras, o HIF-1 <sup>(39)</sup>. Este metabolismo característico de las células neoplásicas abre una ventana para poder utilizarse como blancos terapéuticos en un futuro.

### 1.2.8 Angiogénesis

A pesar de todas las alteraciones genéticas que presentan las células neoplásicas, se sabe que un tumor no podría crecer más allá de 2mm de diámetro sin estar vascularizado. Esto se debe a que, al menos en los vertebrados, es necesario que las células estén localizadas entre 100 a 200  $\mu\text{m}$  de un vaso sanguíneo para poder sobrevivir, por lo que si un grupo de células tumorales necesita evadir la muerte por inanición, requieren promover el proceso normal de la angiogénesis para formar su propia fuente sanguínea mediante el desarrollo de nuevos vasos sanguíneos para, superar la falta de distribución de oxígeno y nutrientes <sup>(40)</sup>. Esto pone en evidencia la gran importancia de la angiogénesis tanto para el crecimiento tumoral como para el desarrollo de la metástasis.

Como cualquier otra célula, las células neoplásicas requieren de un riego sanguíneo adecuado a través del cual puedan difundir el oxígeno, los nutrientes y los factores de crecimiento necesarios para que las células tumorales puedan crecer y multiplicarse, removiendo a su vez del lecho tumoral los catabolitos producidos por estas células <sup>(5; 23)</sup>.

Las células neoplásicas pueden hacerse de una vasculatura mediante dos procesos principalmente, siendo el primero el de mayor importancia:

**Neoangiogénesis:** se refiere al proceso que conduce a la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de la vasculatura pre-existente. Este es un proceso de múltiples pasos que incluye la migración y proliferación de células endoteliales (ECs), la formación y organización de grupos celulares en estructuras tubulares que eventualmente se unirán, para finalmente madurar en vasos sanguíneos estables <sup>(40)</sup>.

**Vasculogénesis:** es la diferenciación *in situ* de células precursoras indiferenciadas (angioblastos) en células endoteliales que posteriormente se organizan en una red vascular <sup>(40)</sup>.

La angiogénesis patológica observada durante la carcinogénesis aparece cuando se pierde el equilibrio entre los estimuladores e inhibidores angiogénicos. Se pueden distinguir dos tipos de angiogénesis patológica: angiogénesis activada y angiogénesis inhibida, dependiendo de los niveles dominantes de moléculas pro- o anti-angiogénicas respectivamente. En el caso del cáncer, la angiogénesis activada es la que juega un papel más determinante<sup>(40)</sup>.

Existen distintas moléculas implicadas en la regulación positiva de la angiogénesis, incluyendo al factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor ácido de crecimiento de fibroblastos (aFGF), FGF básico, factor de crecimiento transformante alfa (TGF- $\alpha$ ) y TGF- $\beta$ , factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), angiogenina, interleucina 8 (IL-8) y angiopoyetinas (Ang-1 y -2), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), VEGF derivado de la glándula endócrina (EGVEGF), leptina, prostaglandinas y lípidos, entre otro. Algunos de ellos como el TGF- $\alpha$  y bFGF actúan, al menos en parte, regulando la expresión del VEGF<sup>(15; 40)</sup>. En etapas iniciales la mayoría de los tumores humanos no inducen angiogenia importante, manteniéndose como tumores *in situ* incluso durante años, hasta que se alcanza el umbral en la concentración de factores pro-angiogénicos que rompen el equilibrio existente, activando el interruptor angiogénico<sup>(41)</sup>.

Actualmente se reconoce al sistema que incluye al VEGF y sus receptores como el principal regulador de las ECs vasculares y de la formación de vasos sanguíneos<sup>(40)</sup>. El VEGF responde a varios estímulos tales como hipoxia/ isquemia principalmente mediante el factor inducible de hipoxia 1 (HIF-1), a distintos factores de crecimiento (EGF, TGF- $\alpha$  y - $\beta$ , KGF o factor de crecimiento derivado de queratinocitos, IGF-1 o factor de crecimiento insulínico tipo 1, FGF y PDGF), a oncogenes activados (por ejemplo ras o myc), así como a distintas citosinas (IL-1- $\alpha$  y IL-6), p53 mutado, estrógenos y óxido nítrico (NO). Mediante estos estímulos se aumenta la expresión del VEGF, resultando en la inducción de proliferación de ECs derivadas de las arterias, venas y vasos linfáticos, así como en la proliferación de algunos tipos celulares no endoteliales. Además, el VEGF

promueve la migración celular e inhibe la apoptosis, incrementa la conductividad hidráulica de microvasos aislados y vasodilatación, como resultado del NO derivado de ECs, promueve la angiogénesis y la permeabilización de los vasos sanguíneos y participa en la vasculogénesis y en la linfangiogénesis <sup>(40; 41)</sup>.

Si bien la angiogénesis no se considera un elemento de la carcinogénesis, si promueve la progresión tumoral y es esencial para la formación de metástasis al proveer un sitio de entrada a la circulación de los vasos sanguíneos, así como de oxígeno y nutrientes por la neo-angiogénesis.

Con todo lo mencionado no es de extrañarse que en la actualidad el bloqueo de la angiogénesis sea una de las áreas más estudiadas para encontrar blancos terapéuticos en la terapia contra el cáncer.

### **1.2.9 Invasión y metástasis**

A pesar de todas las alteraciones hasta ahora mencionadas, el cáncer no representaría un riesgo para la vida si no tuviera la capacidad de diseminarse en otros órganos. Es por esto que tanto la invasión como la metástasis, son considerados los marcadores biológicos de los tumores malignos, con pocas excepciones (gliomas, carcinomas de células basales de piel), casi todos los tumores malignos pueden metastatizar. A esta capacidad de diseminación se le considera la principal causa de mortalidad relacionada con el cáncer ya que reduce en gran medida la posibilidad de tratamiento, por lo que lograr bloquear esta característica del cáncer sería un logro sin precedentes en la terapia contra el cáncer <sup>(5; 42; 43)</sup>.

La diseminación puede darse por tres vías <sup>(5)</sup>:

1. Siembra directa en cavidades o superficies corporales: La cavidad más comúnmente afectada es la cavidad peritoneal y se observa en carcinomas de ovario y carcinomas apendiculares secretores.
2. Diseminación linfática: Esta es la vía de diseminación más utilizada por los carcinomas. En cáncer de mama es de gran importancia determinar la

afectación de los linfonodos para poder dar un pronóstico y tratamiento adecuado.

3. Diseminación hematológica: Esta vía es la predilecta por los sarcomas, y se da más comúnmente a través de las venas ya que las arterias al tener paredes más gruesas le es más difícil a las células neoplásicas romper esta barrera.

Como se verá más adelante estas vías de diseminación no explican del todo la distribución de las metástasis, a continuación se describe más detalladamente como se desarrolla el proceso metastásico, la descripción se hará con base en la diseminación hematológica, siendo prácticamente igual para la vía linfática.

Con fines didácticos el proceso metastásico se puede dividir en 2 fases principales: 1) invasión de la matriz extracelular, 2) diseminación vascular, alojamiento de las células tumorales y colonización. En conjunto, estas fases forman lo que se conoce como la cascada metastásica <sup>(5; 42)</sup>.

- Invasión de la matriz extracelular (MEC)

Para que las células neoplásicas puedan colonizar otro sitio distinto al de origen primero debe romper la membrana basal adyacente, atravesar el tejido conjuntivo intersticial, para posteriormente, atravesar la membrana basal vascular.

Para que esta invasión de la MEC pueda desarrollarse deben ocurrir distintos eventos tanto celulares como en la propia matriz, el primero de ellos es la alteración en las interacciones inter celulares asociados a defectos en las moléculas de adhesión principalmente en las E-cadherinas,  $\beta$ -catenina, y en general en el citoesqueleto de actina <sup>(5; 23)</sup>.

En varios tumores epiteliales existe una regulación negativa de la expresión de E-cadherina, con lo que se reduce la capacidad de adhesión entre las células facilitando la liberación de las células neoplásicas del tumor primario, en otros casos la disfunción de las cadherinas se altera indirectamente por mutaciones en las cateninas <sup>(42)</sup>.

La degradación de la membrana basal y el tejido conjuntivo intersticial se da por medio de la acción de enzimas proteolíticas las cuales pueden ser secretadas por las mismas células neoplásicas o inducir la secreción de estas por otras células normales como fibroblastos o células inflamatorias <sup>(5; 44)</sup>.

Entre las proteasas con mayor implicación en este proceso se encuentran las metaloproteasas, la catepsina D, y el activador del plasminógeno. Durante el proceso de degradación de la MEC también se liberan factores de crecimiento, factores angiogénicos y quimiotácticos secuestrados en esta.

Existe otra forma en el que las células neoplásicas pueden desplazarse a través de la MEC sin necesidad de degradarla, esto lo hacen internándose entre los espacios de la propia MEC. A este tipo de invasión se le denomina migración ameboide, y depende de alteraciones a nivel del citoesqueleto <sup>(15; 23)</sup>.

Además de las alteraciones en la adhesión intercelular también se encuentra alterada la adhesión entre las células y la membrana basal, esto se debe principalmente a defectos en receptores de laminina e integrinas. En condiciones normales la pérdida de adhesión a la membrana basal induciría la apoptosis (anoikis) de las células, pero como ya se ha mencionado este mecanismo también se encuentra alterada en estas células <sup>(5)</sup>.

Una vez degradada la membrana basal la célula debe desplazarse, por lo que la locomoción de las células neoplásicas es, tal vez, el paso más importante en esta fase de cascada metastásica. Este proceso es complejo e implica muchas familias de receptores y moléculas de señalización alterando el funcionamiento normal del citoesqueleto de actina favoreciendo la migración de estas células <sup>(42)</sup>.

- Diseminación vascular

Una vez que las células neoplásicas atravesaron la pared vascular e ingresaron a la circulación, estas pueden ser destruidas por muchos agentes o factores lesivos para ellas como: tensión mecánica, anoikis (apoptosis inducida por la pérdida de

adhesión de la célula a la matriz extracelular), y los sistemas de defensa, tanto innatos como adaptativos.

Por esta razón, las células tumorales han desarrollado estrategias que les permitan sobrevivir, una de las más importantes es la agregación por adhesiones homotípicas y heterotípicas principalmente con las plaquetas favoreciendo la supervivencia e implantación del tumor. Otra forma de evadir los mecanismo de defensa es formando émbolos metastásicos, esto lo logran mediante la activación de factores de coagulación, estos émbolos deben atravesar nuevamente la pared vascular en sentido inverso (extravasación). En este proceso, igualmente, están implicadas moléculas de adhesión y enzimas proteolíticas, una molécula de particular importancia es la sobreexpresión en muchos tumores de CD44<sup>(43)</sup>.

Ahora bien, ¿porque las células neoplásicas tienen cierto tropismo para hacer metástasis en ciertos órganos dependiendo del tipo de tumor primario?. En un principio se pensó que este tropismo dependía únicamente de la localización anatómica del tumor primario ya que las primeras metástasis aparecen en el lecho capilar más cercano al tumor; sin embargo, se observó que en muchos tipos de tumores su comportamiento metastásico general no se explica con esta teoría por lo que se han sugerido los siguientes mecanismos:

1. Expresión de receptores para ligandos, localizados en el endotelio vascular de los órganos diana.
2. Expresión de receptores a quimmiocinas (CXCR4 y CCR7), cuyos ligandos se expresan en los órganos diana.
3. Algunos tejidos simplemente nos son favorables para el crecimiento tumoral, sin importar la cercanía con el tumor primario.

Como podemos observar el proceso metastásico es complejo e implica múltiples pasos, por lo que se ha tratado de demostrar la participación de genes implicados en el control de la metástasis y así, poder hablar de genes supresores de metástasis u oncogenes metastásicos. Hasta el momento se ha confirmado la existencia de al menos 12 genes, que pierden su función en las lesiones metastásicas (supresores) entre ellos los más estudiados son dos RNA mi (mir335

y mir126) los cuales suprimen la metastasis en el cáncer de mama, mientras que el mir10b la promueve. Como oncogenes metastásicos se menciona a los genes SNAIL y TWIST<sup>(5; 42)</sup>.

### **1.2.10 Epigenética**

Si bien es en los últimos años cuando la epigenética ha tomado importancia para poder explicar el proceso de carcinogénesis, realmente es un concepto utilizado desde ya hace algunos años. Waddington en 1942 lo definió como el proceso por el cual el genotipo produce el fenotipo; unos años más adelante, Holliday en 1987 lo define como la herencia nuclear independiente de las secuencias de DNA, menciona que es el estudio de los cambios de expresión genética en organismos multicelulares y la transmisión mitótica de ese patrón de expresión. Por último Wu & Morris lo definen como los cambios en la función del gen, heredables y que no alteran la secuencia del DNA.

De manera general la epigenética estudia la expresión de genes por medio de la activación y el silenciamiento de genes, ya sea por demanda fisiológica o patológica. Este control se ejerce por medio de modificaciones en la estructura de la cromatina los cuales pueden ser heredados<sup>(45)</sup>.

La metilación del DNA tiene un papel crítico en el control de la actividad de los genes y la estructura de la cromatina. En los seres humanos, la metilación del ADN se produce en citosinas que preceden a guaninas, las cuales en conjunto son llamados dinucleótidos CpGs. Estos sitios CpG no son al azar y están distribuidos en el genoma, en su lugar, hay regiones ricas en dinucleótidos CpG conocidas como islas CpG, que abarcan el extremo 5' de la región de regulación de muchos genes. Estas islas generalmente no se encuentran metiladas en condiciones normales<sup>(45; 46)</sup>.

La metilación del DNA se da por medio de proteínas específicas denominadas DNA metiltransferasas (DNMTs), que modifican químicamente las histonas, proteínas no solamente encargadas del empaquetamiento del DNA, ya que también participan en la regulación de la expresión génica. Estas modificaciones

también pueden ser post –traduccionales e incluyen la acetilación de la lisina, la arginina, la metilación de lisina, y la fosforilación de serina. Estas modificaciones afectan a la transcripción de genes y los genes de reparación del DNA <sup>(23; 45)</sup>.

El bajo nivel de metilación del ADN en tumores, en comparación con el nivel de metilación del ADN en los tejidos normales fue una de las primeras alteraciones epigenéticas encontradas en humanos con cáncer <sup>(45)</sup>.

Durante el desarrollo de una neoplasia, el grado de hipometilación del DNA genómico aumenta a medida que progresa la lesión de una proliferación benigna de las células a una invasiva.

Además de esta hipometilación global del DNA, en células neoplásicas se observa otro fenómeno inverso, es decir, la hipermetilación de ciertas regiones específicas que favorecen el silenciamiento génico, por ejemplo la hipermetilación de las islas CpG de las regiones promotoras de los genes de reparación del DNA hMLH1 , BRCA1. El silenciamiento de estos genes bloquea la reparación de errores genéticos, favoreciendo la inestabilidad genética, y abriendo así el camino a la transformación neoplásica de la célula <sup>(5; 46)</sup>.

Por otro lado, también se ha observado hipermetilaciones en regiones promotoras de los genes supresores tumorales provocando su silenciamiento, que como se mencionó anteriormente, la pérdida de función de estos genes es una característica indispensable de las células cancerígenas <sup>(45)</sup>.

En resumen la hipermetilación de las islas CpG de las regiones promotoras pueden afectar múltiples genes implicados en el ciclo celular, reparación del ADN, metabolismo de carcinógenos, interacción célula-célula, apoptosis y la angiogénesis, que como fue mencionado, están involucrados en el desarrollo del cáncer.

A diferencia de las mutaciones, la metilación del DNA y las histonas son modificaciones reversibles. Las alteraciones epigenéticas permiten que la célula neoplásica pueda adaptarse a los cambios en su microambiente, sin embargo, los

genes supresores silenciados por esta hipermetilación pueden ser despertados con fármacos con propiedad desmetilante y así rescatar su funcionalidad <sup>(45)</sup>.

### **1.3 Quimioterapia y Cáncer**

La historia de los agentes quimioterapéuticos en el tratamiento del cáncer se inicia en los años 50, de hecho el primer producto que se usó como quimioterapéutico contra el cáncer no se usaba como medicamento. El gas mostaza, un compuesto orgánico nitrogenado con propiedades alquilantes, el cual se usó como arma química durante la Primera Guerra Mundial, y se estudió más a fondo durante la segunda guerra mundial, donde se observó que los individuos expuestos a dosis no letales de gas mostaza presentaban conteos anormalmente bajos de leucocitos. Partiendo de este hecho Goodman y Gilman en la década de los cuarenta realizaron pruebas preclínicas en modelos murinos, para posteriormente empezar estudios clínicos en varios pacientes con linfomas avanzados, observándose una mejoría notable, aunque temporal, dando inicio a la era moderna de la quimioterapia contra el cáncer <sup>(47)</sup>.

El uso de quimioterapia contra el cáncer puede tener diferentes fines dependiendo del tipo de cáncer y el estadio de la enfermedad, por lo que puede clasificarse de la siguiente manera <sup>(47; 48)</sup>:

- Quimioterapia curativa: se refiere a la administración de un tratamiento que tiene probabilidades de curar por si mismo el cáncer. Sin embargo, no existen garantías de esto ya que incluso después de años hay pacientes que presentan recaídas, por lo que a este tipo de quimioterapia también se le denomina quimioterapia con intención curativa.
- Quimioterapia adyuvante: la meta de este tipo de quimioterapia es controlar la enfermedad, reducir el tamaño del tumor y/o evitar el crecimiento y la propagación del cáncer, ayuda con el pronóstico en cuanto a supervivencia o prolongación del intervalo libre de enfermedad.

- Quimioterapia neoadyuvante: con este tipo de tratamientos se busca reducir el volumen tumoral antes de realizar un tratamiento local (cirugía o radiación).
- Quimioterapia paliativa: se administra en los casos en los que el cáncer ya no es curable y su objetivo es tratar de incrementar la supervivencia asintomática del paciente, brindando una mejor calidad de vida.

Hay que recordar que los quimioterapéuticos son más activos en células con un índice de proliferación elevado, por lo que las células normales con mayor propensión a ser dañadas son aquellas que se dividen rápidamente como: células sanguíneas y sus precursoras en medula ósea, células de los folículos pilosos, células del recubrimiento del tracto digestivo y células del recubrimiento del tracto reproductor. Los efectos secundarios que produce cada quimioterapéutico son particulares y dependen de la dosis, tiempo de administración, vía de administración y de la repuesta de cada individuo <sup>(49)</sup>.

Los agentes quimioterapéuticos antineoplásicos se pueden dividir en varios grupos basándose en su mecanismo de acción, su estructura química y su relación con otros medicamentos <sup>(50)</sup>. Antes de enlistar los distintos tipos de quimioterapéuticos es importante mencionar que por sí mismo un solo agente jamás podrá curar un proceso neoplásico, por lo que siempre debe asociarse con por lo menos otro durante el tratamiento <sup>(48)</sup>. Esto se debe a que los citostáticos destruyen una fracción constante de células (cinética de primer orden) teniendo como objetivo destruir el 99% de las células tumorales. La poliquimioterapia debe presentar las siguientes características <sup>(48)</sup>.

1. Quimioterapéuticos con mecanismo de acción y toxicidad distinta.
2. Los quimioterapéuticos deben utilizarse en su dosis máxima tolerada.
3. Se utilizarán aquellos que hayan demostrado sinergia.
4. Administración por periodos breves, discontinuos y a dosis elevadas.

A continuación se muestran los distintos grupos en los que se han clasificado a los quimioterapéuticos.

- Agentes alquilantes

Los agentes alquilantes provocan su acción citotóxica mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas moléculas nucleofílicas presentes en las células. Estos pueden reaccionar con el agua, lípidos, proteínas, RNA y DNA, pero la alquilación de este último parece ser de fundamental importancia para el efecto anti tumoral. La alquilación de proteínas podría adquirir importancia para algunos efectos tóxicos <sup>(49)</sup>. En el DNA, el Nitrógeno 7 de la guanina, el Nitrógeno 3 de la adenina y el Oxígeno 6 de la guanina son, en ese orden, los 3 principales sitios de ataque nucleofílico, mientras que en las proteínas lo son los grupos sulfhidrilo de la cisteína. Últimamente se le ha dado, además, importancia a la alquilación de estructuras de la membrana plasmática como mecanismo del efecto citotóxico <sup>(50)</sup>.

Una vez alquilada una base del ADN, puede ser eliminada y remplazada por la misma base o puede dar origen a toda una serie de fenómenos que llevan a la degradación del DNA,

- Una base alquilada cambia su estructura espacial en forma tal que permite un acoplamiento anómalo: G-T y A-C en lugar de los normales G-C y A-T.
- La base perdida puede no ser remplazada, originando una fractura de la cadena de DNA.

Dentro de este grupo de fármacos podemos encontrar a las llamadas mostazas nitrogenadas (melfalán, clorambucilo, mecloretamina, ciclofosfamida, isofosfamida), los alquilosulfonatos (busulfano), a las nitrosureas (cloroetilnitrosurea, carmustina, lomustina, clorozotocina), y las etileniminas y metilmelaminas.

- Cisplatino y análogos.

El *cis*-diaminodicloroplatino (II) (cisplatino, CDDP) fue el primer anticancerígeno derivado de platino en ser identificado, en 1847, siendo conocido primeramente como sal de Peyrone. Se trata de una molécula de 301.1 g/mol de peso molecular cuya fórmula es:  $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2(\text{Cl})_2$  <sup>(50)</sup>.

Durante prácticamente 15 años el cisplatino fue uno de los quimioterapéuticos más utilizados en Europa y Estados Unidos para el tratamiento de cáncer de ovario, pulmón, vejiga, cabeza y cuello y otras neoplasias.

Su mecanismo de acción se da preferentemente sobre las bases del ADN, en particular con el N7 de la guanina debido a su gran nucleofilia, al igual que lo hacen los agentes alquilantes. Además, se comporta como un agente bifuncional produciendo enlaces o puentes cruzados entre las dos hebras del ADN, lo cual implica una profunda modificación en la estructura y función del ADN; también parece que se forman puentes cruzados entre moléculas de guanina pertenecientes a la misma hebra e incluso, entrecruzamientos entre moléculas de ADN y proteínas. Como consecuencia se produce una fuerte inhibición en la síntesis de ADN, evitando la división celular e induciendo apoptosis<sup>(49; 50)</sup>.

Debido a la gran nefrotoxicidad del cisplatino y tratando de evadir la alta resistencia observada tanto *de novo* como adquirida a este compuesto, se desarrollaron análogos de este, que mejoraran el espectro del compuesto original, dando lugar al carboplatino el cual presenta una menor nefrotoxicidad, sin embargo, ocasiona una mayor mielosupresión<sup>(49)</sup>.

Hay que mencionar que tanto los agentes alquilantes como el cisplatino y sus análogos, al actuar directamente sobre el ADN pueden llevar a la producción de mutaciones, que en caso de perpetuarse pueden dar origen a la transformación neoplásica de la célula, por lo que este tipo de compuestos se consideran potencialmente oncogénicos.

- Alcaloides de la vinca

Son fármacos antineoplásicos naturales o semisintéticos, derivados de la planta VincaperVinca rosa (*Catharanthus roseus*) los cuales ejercen su efecto en los microtúbulos.

A este tipo de compuestos se les clasifica como antimitóticos, sin embargo también alteran otros procesos como quimiotaxis, secreción celular, transporte, anclaje y transmisión de señales<sup>(51)</sup>.

La citotoxicidad inducida por estos compuestos se debe a las interacciones que ejercen con la tubulina, lo que produce alteraciones en los microtúbulos, particularmente de huso mitótico, provocando una detención del ciclo celular en la metafase.

Existen dos mecanismos bien establecidos de resistencia a estos agentes: el primero mediado por el gen *mdr1*, el cual activa una bomba de flujo transmembrana (glicoproteína p) que bombea el compuesto hacia el medio extracelular. El segundo mecanismo tiene que ver con mutaciones en los genes que codifican para las tubulinas o modificaciones postranscripcionales en la estructura de estas, reduciendo su afinidad por el compuesto <sup>(50)</sup>.

Los principales efectos adversos de estos fármacos se observan a nivel neurológico, gastrointestinal, genitourinario, cardiovascular, pulmonar, endócrino, hematológico y dermatológico.

Dentro de este grupo se encuentran: la Vincristina, Vinblastina, Vindesina y la Vinorelbina.

- Antimetabolitos

Los fármacos que componen este grupo son específicos de la fase S del ciclo celular. Son análogos estructurales de metabolitos celulares (falsos sustratos). Mediante este mecanismo disminuyen la biodisponibilidad de precursores de nucleótidos de purina y/o pirimidina, interfiriendo con la síntesis de ADN y ARN.

Se dividen en tres grupos principales:

1. Análogos del ácido fólico: Metotrexato, Pemetrexed.
2. Análogos de la pirimidina: 5-Fluorouracilo, Capecitabina, Citarabina, Gencitabina.
3. Análogos de las pirimidinas: Mercaptopurina, Penfostatina, Cladribina, Fludarabina.

Con excepción de los análogos del ácido fólico el principal efecto toxicológico de estos compuestos es la mielosupresión, entre otros.

- Antracíclicos

Las antraciclinas pertenecen al grupo de los antibióticos glicosídicos de las quinonas. Su mecanismo de acción se divide de forma general en dos: Primero por unión al ADN, intercalándose entre los pares de bases, inhibiendo la síntesis de ADN, afectando principalmente a células en fase S. El segundo mecanismo tiene que ver con la inhibición de la topoisomerasa II, enzima necesaria para la síntesis de ADN<sup>(49)</sup>.

Los medicamentos más utilizados que pertenecen a este grupo son la doxorubicina, daunorrubicina y la idarrubicina.

- Epidofilotoxinas

El tenipósido es una sustancia obtenida de la planta *Podophyllum peltatum*, y el etoposido (VP-16) es una podofilina semisintética derivada del *Podophyllum notatum*. Ambos actúan disminuyendo la transición de las células en la fase S, arrojando el ciclo al final de esta fase, su principal blanco es la enzima topoisomerasa II a la cual inhibe, además de causar daño celular mediante rupturas en la cadena de ADN. El VP-16 actúa mediante la formación de complejos de anclaje, generando un daño permanente en los enlaces del ADN, afectando los mecanismos de reparación de este<sup>(52)</sup>.

En los últimos años se han desarrollado otros tipos de compuestos utilizados en la terapia oncológica, con la finalidad de tener terapias antineoplásicas dirigidas, las cuales inducen incremento en el éxito terapéutico con menos efectos indeseables. Entre las más importantes se encuentran los anticuerpos monoclonales (alemtuzumab, bevacizumab, cetuximab, rituximab, etc), inductores de la diferenciación celular (ácido transretinoico, trióxido de arsénico), inhibidores de tirosina cinasa (imitinib, nilotinib, dastinib, bosutinib) y más recientemente inhibidores de proteasoma (bertozemib), inmunomoduladores (lenalidomida), inhibidores de las desacetilasas de histonas (vorinostat), hipometilantes (5-Azacitidina, decitabina).

Si bien los medicamentos dirigidos molecularmente han tenido un éxito sobresaliente en algunos tipos de cáncer, es poco probable que en un futuro cercano sustituyan del todo a los fármacos citotóxicos tradicionales. En la actualidad, la combinación de quimioterapéuticos tradicionales con agentes farmacológicos dirigidos a blancos celulares permite remisiones más prolongadas de la enfermedad y en muchos casos la curación completa. Al mismo tiempo hoy en día se desarrollan un gran número de quimioprotectores con los que se trata de reducir los efectos adversos relacionados con el uso de quimioterapia.

### **1.3.1 Multiresistencia a Quimioterapéuticos**

La resistencia a fármacos por parte de las células tumorales es la limitación más importante para el empleo exitoso de los numerosos quimioterapéuticos utilizados. En un principio se pensó que esta resistencia se daba únicamente por la proliferación de clonas que se hicieron resistentes debido a la alta tasa de mutación, por lo que se empezaron a utilizar combinaciones de compuestos con el fin de destruir a las clonas resistentes, sin embargo esto no ha sido suficiente ya que las células neoplásicas pueden evadir el efecto citotóxico de los quimioterapéuticos mediante distintos mecanismos como: disminución en la absorción del compuesto, aumento de su catabolismo, modificación del blanco del fármaco, disminución de metabolitos activos, aumento en la reparación de ADN, inhibición de la apoptosis<sup>(53)</sup>.

Las células tumorales que expresan este amplio espectro de tipos de resistencias se dice que presentan fenotipo multidrogas resistente e implica que al hacerse resistentes a un medicamento al mismo tiempo se hacen resistentes a otros, lo que le confiere protección contra medicamentos estructuralmente distintos y con mecanismo de acción diferentes pero con características comunes (xenobióticos)<sup>(53)</sup>.

Las células con este fenotipo expresan en su superficie proteínas encargadas del bombeo activo del medicamento hacia afuera de la célula, estas proteínas forman parte de la superfamilia ABC.

- Proteínas ABC

Proteínas transmembrana encargadas especializadas en transporte celular dependiente de energía, se dividen en ocho subgrupos los más importantes son la glicoproteína P, MRP 1, BCRP, estas proteínas se encuentran ampliamente expresadas en células de leucemia mieloblástica aguda.

- Apoptosis

Como se mencionó, los alquilantes, así como los metabolitos y los inhibidores de la topoisomerasas II, inducen rupturas en el ADN desencadenando el proceso de apoptosis, sin embargo las células tumorales pueden incrementar su capacidad de reparación de ADN mediante alteraciones en la ADN metiltransferasa o en la actividad de la topoisomerasa II, por otro lado se ha observado mayor expresión de Bcl-2 y disminución de Bax en estas células<sup>(10)</sup>.

- Permeabilidad disminuida

La mayoría de los quimioterapéuticos antineoplásicos ingresan a las células por difusión simple, pero algunos (melfalán, metotrexato) requieren mecanismos de transporte. La disminución de la actividad de estos transportadores constituye un mecanismo de resistencia a esos fármacos<sup>(50)</sup>.

- Inactivación enzimática

El aumento del nivel intracelular de glutatión y/o de la glutatión-S transferasa, confiere resistencia contra la mayoría de los agentes alquilantes, así como contra otros productos electrofílicos generados durante el metabolismo celular, tanto normal como neoplásico<sup>(49)</sup>. Es frecuente que las células resistentes a agentes alquilantes tengan aumentados tanto el glutatión como la enzima. El glutatión es uno de los inactivadores por de compuestos electrofílicos reactivos. Si bien la mayoría de las sustancias electrofílicas (incluyendo los agentes alquilantes) pueden reaccionar espontáneamente con el glutatión, la glutatión-S-transferasa acelera notablemente esa reacción.

Aun no se sabe del todo como es que se genera la multidroga resistencia pero existen distintas hipótesis que podrían explicar este fenómeno: <sup>(53)</sup>

- La presencia de células con proteínas de MDR, logran sobrevivir a la quimioterapia, estas proliferan y el tumor ahora está formado por mayor número de células multiresistentes.
- La quimioterapia no destruye a las células madre cancerosa, estas persisten y generan nuevamente el tumor.
- La quimioterapia provoca mutaciones adicionales en las células madre cancerosas, que le confieren multiresistencia, generando una neoplasia resistente.
- El tumor presenta quimioresistencia intrínseca, previo a la administración del tratamiento.

## **1.4 Desarrollo de Fármacos**

El descubrimiento, desarrollo y registro de un producto farmacéutico es una operación costosa y representa un reto bastante singular. Se estima que por cada 9.000 a 10.000 compuestos sintetizados o aislados específicamente con potencial terapéutico, solo uno llegará realmente al mercado <sup>(54)</sup>. Cada etapa sucesiva en el proceso es más costosa, por lo que es de gran interés identificar lo antes posible los agentes que no son propensos a seguirse desarrollando.

Las principales causas por las que se interrumpe el desarrollo de un compuesto son:

1. Toxicidad y falta de tolerancia.
2. Falta de eficacia.
3. Falta de biodisponibilidad de la fracción activa en el hombre.

La identificación temprana de los candidatos pobres o no competitivos en cada uno de estas tres categorías es por lo tanto extremadamente importante y forma la base para la investigación en el descubrimiento y desarrollo farmacéutico.

Los programas de evaluación de los posibles fármacos se pueden dividir en 4 grandes etapas con el fin de acumular la información requerida para entender la eficacia, seguridad y tolerancia, permitiendo realizar una evaluación continua y así evaluar la relación entre el beneficio y riesgo que ofrecen los nuevos candidatos en desarrollo<sup>(55; 56)</sup>.

- Descubrimiento

Encontrar o desarrollar una materia química que tenga efectos sobre un modelo preclínico o sobre un blanco enzimático o receptor deseado. Esto depende de la firme comprensión médica de la enfermedad a tratar así como de la química y biología de la molécula a probar.

- Nominación del candidato para desarrollo

Para que se de esta nominación el compuesto candidato debe haber cumplido con una serie de pruebas preclínicas y demostrar que posee las características deseadas para seguir con su investigación:

- Demostrar actividad farmacológica *in vitro* e *in vivo*.
  - Cubrir los estándares de especificidad y potencia para el blanco deseado.
  - Determinar la relación entre la farmacocinética y farmacodinamia en distintas especies animales.
  - Determinar las vías metabólicas de eliminación y distribución esperadas en humanos con base en los resultados obtenidos en especies animales.
  - Evaluar la toxicidad del compuesto en al menos 2 especies animales (toxicidad aguda, crónica, carcinogenicidad, teratogenicidad, mutagenicidad) y que este tenga un índice terapéutico aceptable.
  - El candidato farmacológico debe poder sintetizarse a un costo razonable.
  - El candidato debe poder formularse y contar con estabilidad, solubilidad y biodisponibilidad suficiente para constituirse como un agente farmacéutico.
- Estudios clínicos de confirmación

Estos estudios buscan demostrar que el candidato farmacológico tiene los efectos deseados, con seguridad y tolerancia adecuados en humanos. En estos estudios se busca identificar aquellas dosis con mayor probabilidad de eficacia, tolerancia y seguridad. Antes de iniciar con estos estudios se debe determinar las pruebas estadísticas que se utilizarán, las poblaciones de pacientes que van a estudiarse, el tamaño, la diversidad y la duración del tratamiento, para poder establecer la seguridad y tolerancia en la población objetivo.

- Registro

El registro de un candidato para desarrollo farmacológico necesario para obtener la autorización para uso médico, se realiza cuando se dispone de información integral y suficiente para poder determinar en forma adecuada la relación riesgo beneficio del uso descrito del producto. Según lo estipulado por la *international conference on harmonization of technical requirements for restration of farmaceutical of human use* (ICH), debe haber un mínimo de 1500 individuos tratados, en caso de agentes para uso crónico debe haber al menos 100 individuos que hayan recibido el tratamiento por un periodo de un año o más.

La revisión reguladora no sólo incluye una determinación de la eficacia y seguridad en humanos, sino también una revisión cuidadosa de la farmacología y toxicología preclínicas.

El tiempo que transcurre entre la presentación de una solicitud de patente y la aprobación para la venta de un nuevo medicamento, puede ser hasta de 15 años y el costo asciende de 500 a 1,000 millones de dólares<sup>(55)</sup>.

Con todas estas pruebas y procedimientos se trata de garantizar que solamente medicamentos seguros lleguen al mercado, sin embargo, esto no es 100% posible ya que incluso después de entrar a la venta todos los nuevos fármacos tienen que estar bajo fármaco vigilancia durante años, periodo en el que se pueden presentar efectos no observados en el desarrollo del compuesto, pudiendo limitar el uso del nuevo medicamento a un grupo de pacientes particulares, o incluso retirarlo del mercado.

Si bien el número de nuevos fármacos en el mercado, año con año ha declinado, esto puede deberse a que los fármacos aprobados para la venta son mejores debido a que su desarrollo se apega estrictamente a las normas éticas, científicas y regulatorias que rigen los ensayos clínicos.

## **1.5 Modelos Tumorales Murinos**

Uno de los grandes retos que se presentan en el desarrollo de nuevos fármacos antineoplásicos es sin duda alguna, la necesidad de tener modelos preclínicos *in vivo* que permitan obtener un valor predictivo de la actividad de dichos compuestos en pacientes humanos.

Por más de medio siglo, el ratón de laboratorio ha sido la especie más utilizada para el estudio del cáncer humano, durante este periodo se han desarrollado numerosos modelos murinos para su estudio. Hasta hace unos 30 años los modelos de isotransplatación con tumores murinos eran los más utilizados para valorar la actividad de compuestos con potencial antineoplásico. Sin embargo, con el desarrollo de las líneas celulares tumorales humanas y la observación de que estas líneas tenían un crecimiento progresivo en ratones inmunocomprometidos, la isotransplatación fue superada por el uso de los xenotransplantes; inclusive en la actualidad cualquier fármaco antineoplásico aprobado para su uso obligatoriamente tuvo que haber demostrado actividad utilizando este tipo de modelos de experimentación.

Uno de los modelos tumorales más ampliamente utilizado es el xenoinjerto de tumor humano en ratones desnudos cuya finalidad es investigar los factores que intervienen en la transformación maligna, la invasión y metástasis, así como para examinar la respuesta a la terapia <sup>(57)</sup>. En este modelo, las células tumorales humanas son trasplantadas, ya sea subcutáneamente o directamente en el órgano de origen del tumor, en ratones inmunodeficientes que no rechacen las células humanas. Debido a esto se utilizan ratones atímicos que no rechazarán el trasplante debido a que se encuentran inmunológicamente comprometidos. Dependiendo del número y tipo de células inyectadas, o el tamaño y tipo de tumor

trasplantado, el tumor se desarrollará en el ratón, permitiendo evaluar *in vivo* la respuesta a los regímenes terapéuticos administrados <sup>(58)</sup>.

Aunque algunos de los componentes del sistema inmune no se encuentran presentes cuando uno elige como modelo al ratón desnudo, la función de las células B, células dendríticas y granulocitos son relativamente normales, además de existir un aumento compensatorio en la actividad de células NK en estos ratones <sup>(57; 58)</sup>.

Existen varias ventajas en el uso de xenoinjertos tumorales humanos para evaluar las respuestas terapéuticas <sup>(57)</sup>:

- Permite utilizar el tejido tumoral humano real, con la complejidad de anomalías genéticas y epigenéticas que existen en los tumores humanos.
- Los xenoinjertos de tumor humano se pueden utilizar para ayudar en el desarrollo de enfoques terapéuticos moleculares individualizados.
- Se pueden obtener resultados en cuestión de unas pocas semanas a partir de una biopsia de tumor humano en relación con la respuesta al tratamiento.

Si bien este tipo de modelos nos puede dar la pauta para saber si un compuesto es o no activo frente a un tumor humano, cuando los tumores primarios se utilizan como un xenoinjerto ortotópico, hay un mayor valor predictivo, especialmente cuando se utiliza una dosificación de fármaco clínicamente relevante <sup>(58)</sup>.

Hay tres tipos diferentes de respuesta a la terapia que se puede evaluar con este tipo de modelos experimentales:

- Efecto sobre la tasa de crecimiento del tumor.
- Efecto sobre la regresión del tumor.
- Efecto sobre la supervivencia del ratón.

El efecto de un fármaco sobre la tasa de crecimiento del tumor o citostasis ha demostrado ser más predictivo que la respuesta de regresión del tumor <sup>(59)</sup>. Por otra parte, los xenoinjertos subcutáneos que no son ortotópicos, tienen un menor

valor predictivo en las respuestas a los tratamientos en pacientes humanos<sup>(60)</sup>. Sin embargo, una desventaja de los modelos ortotópicos, en comparación con los modelos subcutáneos, es la dificultad de seguir el crecimiento del tumor, lo que implicaría el uso de tecnología como resonancia magnética. Por otra parte, los modelos de xenoinjertos en ratones desnudos también son útiles para anticipar la toxicidad de las terapias dirigidas<sup>(57)</sup>.

Sin duda alguna a lo largo de los años la utilización de estos modelos, han generado mucha información sobre el comportamiento de los tumores humanos, sin la cual sería imposible tener éxito en los ensayos clínicos.

## 1.6 Compuestos metálicos como Quimioterapéuticos

La importancia de los compuestos metálicos en la medicina data del siglo XVI, con informes sobre la terapéutica del uso de metales o compuestos metálicos en el tratamiento del cáncer. En la actualidad la lista de compuestos de origen metálico incluye al ya mencionado platino en la terapia contra el cáncer, a la plata como agente antimicrobiano, al oro en el tratamiento de la artritis, al vanadio en el tratamiento de la diabetes, entre otros<sup>(61)</sup>.

Una de las características de los iones metálicos es que son pobres en electrones, mientras que muchas moléculas biológicas como proteínas o el ADN son ricas en estos, y en consecuencia, hay una tendencia general a que los iones metálicos se unan e interactúen con muchas moléculas biológicas importantes. Los iones metálicos también tienen una alta afinidad por muchas moléculas pequeñas, por ejemplo  $O_2$ , que son cruciales para la vida<sup>(62)</sup>. Estas características han alimentado los intereses pasados y actuales del uso de metales o agentes que contienen metales para modular sistemas biológicos.

Los procesos biológicamente esenciales que requieren metales por lo general implican funciones enzimáticas o estructurales. Debido a esto los compuestos derivados de metales, explotan su rol en la activación enzimática o en la estructura molecular de su blanco; por ejemplo los organometálicos son compuestos que han alcanzado gran importancia como inhibidores enzimáticos. La inhibición de

metaloenzimas se puede lograr mediante la coordinación del metal con ligandos exógenos o por quelación <sup>(61; 62)</sup>.

Los compuestos metálicos también pueden inhibir a enzimas no metálicas mediante interacciones ya sea con el sitio activo o con el sustrato de la enzima. Un efecto secundario de metales de transición es catalizar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Se cree que la presencia de estos juega un papel importante, pero poco conocido en la modulación de las respuestas citotóxicas inducidas por fármacos <sup>(62)</sup>.

Aunque muchos metales son esenciales para todas las formas de vida, sus niveles en condiciones normales o terapéuticas deben ser estrictamente regulados porque la mayoría son tóxicos en exceso. Al igual que con otros compuestos, el uso de metales en el desarrollo de fármacos dependerá en gran medida de la comprensión de su mecanismo de acción y del control de su toxicidad <sup>(62)</sup>.

Además de controlar selectivamente su toxicidad, los compuestos que contienen metal también deben tener una adecuada estabilidad farmacológica. Muchos agentes antitumorales activos no han logrado alcanzar el uso clínico debido a sus escasas propiedades físico-químicas, incluyendo insuficiente solubilidad en agua, la inestabilidad hidrolítica y la tendencia a descomponerse con facilidad cuando se exponen a disolventes, humedad, la luz o el aire. Debido a esto, y a pesar del hecho de que los complejos de metales a menudo demuestran *citotoxicidad in vitro* a dosis significativamente más bajas que los compuestos orgánicos, en pocas ocasiones cumplen con los requerimientos para continuar con su investigación en modelos *in vivo* <sup>(60 (63))</sup>.

Entonces la actividad citotóxica o citostática de los compuestos metálicos o metaloides está dada por sus características moleculares, por lo que está influenciada tanto por la identidad del metal como por las propiedades de sus ligandos.

Se cree que existen cuatro principales mecanismos de acción por medio de los cuales los agentes metálicos ejercen su efecto citotóxico: unión a grupos sulfhidrilo biológicos, quelación, generación de ROS y la producción de iones lipofílicos<sup>(62)</sup>.

## 1.7 Compuestos de Coordinación de Estaño

Los usos más comunes de los compuestos inorgánicos de estaño se encuentran como estabilizadores de polímeros en el PVC, fungicidas, pastas dentales, desinfectantes y antibióticos. En la actualidad existe un gran interés por el estudio de complejos metálicos de bases de Schiff derivados de aminoácidos y sialialdehidos, gracias a propiedades estructurales, magnéticas y electroquímicas. Entre sus varias funciones biológicas muestran actividad antimicrobiana como antimaláricos, antiproliferativa, como quimioterapéuticos y fungicidas<sup>(64)</sup>.

Una de las áreas de mayor interés dentro del campo de la química bioinorgánica, es el estudio de los compuestos orgánicos de estaño, esto debido a la gran actividad citotóxica y antiproliferativa que han presentado. Dentro de este grupo se encuentran los compuestos de estaño (IV), los cuales presentan uno o más enlaces de carbono estaño que ya han demostrado ser citotóxicos<sup>(64)</sup>.

El grupo de trabajo del doctor Norberto Farfán, sintetizó complejos diorganoestánicos (IV) de base de Schiff mediante un procedimiento de un solo paso. Este procedimiento implica la reacción equimolecular de un  $\alpha$ -aminoácido con un salicilaldehído y/o con un di-n-butilestaño (IV), o con un difenilestaño (IV)-óxido<sup>(65)</sup>.

En estos compuestos las bases de Schiff actúan como ligandos tridentados donde el átomo de nitrógeno de la imina forma una enlace coordinado  $N \rightarrow Sn$ , que estabiliza los compuestos de estaño formando un átomo de estaño pentacoordinado<sup>(65)</sup>.

## 2.0 Justificación

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

En estudios previos realizados en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA), de la Facultad de Química de la UNAM se analizaron 17 compuestos de coordinación de estaño, los cuales demostraron actividad antineoplásica *in vitro* sobre 3 líneas celulares tumorales MCF-7 (adenocarcinoma mamario, HCT-15 (adenocarcinoma de colon) y HeLa (adenocarcinoma de cérvix), de estos uno de los que presentó mayor actividad citotóxica sobre las tres líneas tumorales y en particular sobre la línea de adenocarcinoma de colon HCT-15 fue el compuesto con clave NF60.

Tomando esto como base, en este estudio se realizaron ensayos *in vitro* e *in vivo* para determinar la actividad antiproliferativa del compuesto de coordinación de estaño NF60 sugeridos por el *Cancer Chemotherapy National Service Center* (CCNSC) del *National Cancer Institute* (NCI). Además de iniciar con pruebas primarias preclínicas de seguridad

## 3.0 Objetivo General

Evaluar la actividad antineoplásica *in vitro* e *in vivo* del compuesto de coordinación de estaño NF60, así como la seguridad del mismo mediante ensayos de toxicidad aguda y toxicidad subcrónica.

## 4.0 Hipótesis

El compuesto de coordinación de estaño NF60 presentará actividad antineoplásica tanto *in vitro* sobre la línea tumoral murina melanoma B16F10 como *in vivo* sobre la línea celular de carcinoma de colon HCT-15.

## 5.0 Actividad antineoplásica *in vitro*

### 5.1 Objetivo Específico

Determinar la concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>) en la línea tumoral murina melanoma B16F10.

### 5.2 Metodología

Existen varios métodos para determinar el efecto de agentes externos sobre la proliferación celular, en este estudio se utilizó un ensayo con sulforrodamina B (SRB), el cual se basa en la medición de proteínas por colorimetría, en el procesamiento las células muertas son removidas, por lo que no contribuyen en el punto colorimétrico.

Se evaluó la actividad antineoplásica de tres compuestos a distintas concentraciones (NF60, Ciclofosfamida y 5-Fluorouracilo) sobre la línea celular murina melanoma B16F10. En el caso del NF60 los primeros ensayos se realizaron utilizando concentraciones logarítmicas (0.01, 0.1, 1, 10 µg/ml) ya que no se tenían reportes de estudios previos en esta línea celular en particular, con los resultados de este primer ensayo se decidió realizar otro, utilizando concentraciones a intervalos más estrechos (0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 µg/ml). En el caso de la ciclofosfamida y el 5-fluorouracilo se utilizaron concentraciones más altas de acuerdo con lo reportado en otros estudios similares, en ambos casos se realizó un primer ensayo con concentraciones de 50, 100, 150 y 200 µg/ml. Sólo en el caso de la ciclofosfamida fue necesario realizar un segundo ensayo con

concentraciones más bajas (20, 40, 60 y 80 µg/ml). Cada concentración se analizó por triplicado, el procesamiento se describe a continuación:

A partir de un cultivo madre a 70% de confluencia de la línea celular melanoma B16F10, se preparó una suspensión de  $10^6$  células/ml, de esta se colocó un volumen de 20 µl a cada pozo de una microplaca de 96 pozos en los que previamente se había adicionado 100 µl de medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (SFB). Enseguida la microplaca se incubó a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub> durante 24h. Al término de las 24 h se aspiró el medio y se adicionaron 90 µl de medio con SFB y 10 µl de cada una de las concentraciones de los compuestos estudiados en tres pozos de la microplaca, dejando 3 pozos por compuesto sin adición del fármaco para ser utilizados como control/ blanco. Las microplacas se incubaron por 24 h, después de la incubación se aspiró el medio y se fijaron las células con 100 µl de ácido tricloroacético al 10% durante 1h a 4°C. Posteriormente a cada microplaca se le realizaron 5 lavados con agua corriente y fueron secadas a temperatura ambiente.

Para la tinción se adicionaron 50 µl de SRB al 4% a cada uno de los pozos de la microplaca, se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después se realizaron 3 lavados con ácido acético al 1%. Una vez secas las microplacas, el colorante que ha sido incorporado por las células se solubiliza con 100 µl de tris base de 10 mM (pH 10.5) durante 5 minutos con agitación mecánica suave. Finalmente se realizó la lectura del colorante celular en un lector de microplacas a 564 nm<sup>10</sup>.

Se calculó el porcentaje de viabilidad celular con respecto a las concentraciones utilizadas de cada uno de los compuestos considerando la proliferación celular máxima (100%) en los pozos a los que no se les adicionó ningún compuesto (Control/ Blanco).

Por último utilizando el programa SPSS Statistics versión 19<sup>®</sup>, se calculó para cada uno de los compuestos la concentración que inducía el 50% de inhibición de la proliferación celular, esto mediante un análisis de regresión probit.

## 5.3 Resultados

### Ensayo de viabilidad celular

Se calcularon los porcentajes de viabilidad celular obtenidos en los ensayos colorimétricos en la línea Melanoma B16F10 a distintas concentraciones ( $\mu\text{g/ml}$ ) de cada uno de los compuestos estudiados (NF60, Cicfosfamida y 5-fluorouracilo).

Concentración	0 $\mu\text{g/ml}$	0.01 $\mu\text{g/ml}$	0.1 $\mu\text{g/ml}$	0.2 $\mu\text{g/ml}$	0.4 $\mu\text{g/ml}$	0.6 $\mu\text{g/ml}$	0.8 $\mu\text{g/ml}$	1.0 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
	100%	100%	100%	100%	88.47%	84.67%	54.23%	42.64%	19.86%
	100%	100%	100%	100%	90.24%	86.44%	77.94%	50.75%	20.29%
	100%	100%	100%	94.4%	83.22%	75.50%	65.10%	45.57%	20.50%
Promedio	100%	100%	100%	98.0%	87.31%	82.87%	65.75%	46.32%	20.22%

Concentración	0 $\mu\text{g/ml}$	20 $\mu\text{g/ml}$	40 $\mu\text{g/ml}$	50 $\mu\text{g/ml}$	60 $\mu\text{g/ml}$	80 $\mu\text{g/ml}$	100 $\mu\text{g/ml}$	150 $\mu\text{g/ml}$	200 $\mu\text{g/ml}$
	100%	100%	100%	100%	78.20%	77.50%	58.00%	62.53%	49.24%
	100%	100%	93.69%	100%	79.94%	81.66%	76.03%	78.27%	43.82%
	100%	100%	100%	84.56%	87.39%	76.52%	69.77%	57.23%	61.09%
% Promedio	100	100	97.89%	94.79%	81.84%	78.56%	67.93%	66.01%	51.38%

<b>Cuadro 4. Porcentajes de viabilidad celular en melanoma B16F10 con distintas concentraciones de 5-Fluorouracilo</b>					
Concentración	0 µg/ml	50µg/ml	100µg/m	150µg/ml	200µg/ml
	100%	78.01%	41.30%	35.02%	28.50%
	100%	45.33%	43.08%	37.62%	32.47%
	100%	63.04%	45.03%	43.16%	31.67%
Promedio	100%	62.13%	43.14%	38.60%	30.88%

### **Concentración inhibitoria media (CI<sub>50</sub>)**

Está se determinó calculando la concentración que inhibe la proliferación celular en un 50% con respecto al blanco. La CI<sub>50</sub> de cada compuesto se muestra en el cuadro 5.

<b>Cuadro 5. Valores de CI<sub>50</sub> e intervalos de confianza del 95% de los distintos compuestos para la línea celular melanoma B16F10</b>			
	NF60	CICLOFOSFAMIDA	5-FLUOROURACILO
Concentración inhibitoria media	1.839µg/ml	221.882µg/ml	85.418µg/ml
Intervalo de confianza 95%	1.415-2.557 µg/ml	174.545-355.768 µg/ml	44.453-118.452 µg/ml

La concentración de NF60 necesaria para inhibir en un 50 por ciento la proliferación celular, es considerablemente mas baja que las concentraciones de los otros dos compuestos para ocasionar el mismo efecto en la línea celular melanoma B16.

### **5.4 Discusión**

Como puede observarse en los porcentajes de viabilidad celular y en los resultados de la CI<sub>50</sub>, el NF60 resultó ser, el compuesto con mayor actividad antineoplásica *in vitro* en esta línea tumoral en particular, esto concuerda con lo reportado por Barragan et al; 2013, donde se logró inhibir la proliferación celular en la línea tumoral humana HCT-15 (adenocarcinoma de colon) con una concentración de 0.88µg/ml.

Esta gran diferencia en los valores de  $CI_{50}$  podría asociarse a dos factores que pudieron haber influido en la actividad de los compuestos estudiados. El primero de ellos se refiere al grado de liposolubilidad de las moléculas, ya que entre más liposolubles sean estas, atravesarían con mayor facilidad y en mayor concentración la membrana de las células, sin embargo, en este estudio todos los compuestos se disolvieron con el mismo porcentaje de dimetilsulfóxido el cual es altamente liposoluble y atraviesa con gran facilidad las barreras biológicas, favoreciendo la absorción de todos los compuestos.

El segundo factor se refiere a la biotransformación de las moléculas, ya que en el caso de la ciclofosfamida y el 5-Fluorouracilo el compuesto que realmente es activo es un metabolito derivado de estos, es por eso que ambos son catalogados como profármacos. La ciclofosfamida necesita ser activada por el sistema de enzimas microsomales hepáticas metabolizando la ciclofosfamida en aldofosfamida y 4-hidroxiciclofosfamida y luego a acroleína y fosforamida, dos potentes sustancias alquilantes del ADN <sup>(49)</sup>. Por su parte, el 5 fluorouracilo también debe ser metabolizado primeramente en fluordeoxiuridina mediante la enzima timidina fosforilasa la cual debe ser fosforilada por una timidina cinasa formando fluordeoxiuridina monofosfato que es el metabolito capaz de bloquear la síntesis de ADN <sup>(49)</sup>. En estos dos casos al ser un ensayo *in vitro* existe una menor actividad enzimática por lo que la actividad citotóxica de estas sustancias se ve reducida. De igual forma la  $CI_{50}$  del NF60 es considerablemente menor que la  $CI_{50}$  del cisplatino reportada por Vicente et al; 2012, (63.31 $\mu$ g/ml) <sup>(66)</sup>, para la misma línea celular, esto a pesar de que el cisplatino no es un profármaco.

## 6.0 Pruebas Preclínicas de Seguridad

Para la realización de los estudios de toxicidad aguda así como en los de toxicidad subcrónica se emplearon ratones y ratas exogámicos machos, Hsd:ICR y Hsd:WISTAR “Libres de Patógenos Específicos” (*Specific Pathogen Free, S.P.F.*) adultos jóvenes, todos provenientes del Centro UNAM-Harlan, que cuenta con registro ante SAGARPA con No. de Oficio B00.02.06.01.01 043/10 y funciona

bajo un sistema de Gestión de la Calidad operando por medio de Procedimientos Normalizados de Trabajo que aseguran la calidad (ISO 9001-2008).

Los animales fueron alojados en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA), en donde se cuenta con un Sistema de Gestión de la Calidad (SGC), Buenas Prácticas de Laboratorio (BPL) y actualmente está sometida a proceso para obtener la Certificación como Tercero Autorizado ante COFEPRIS.

Las condiciones ambientales dentro de la UNEXA son controladas albergando a los animales conforme a lo señalado por a la NOM-062-ZOO-1999.

Fueron alojados un máximo de 5 animales en jaulas colectivas de polipropileno con las siguientes medidas: 18.4x 29.2x 12.7 en el caso de los ratones ICR y de 26.3x 47.2x 20.32cm para las ratas WISTAR.

Se les proporcionó alimento esterilizable para rata/ratón Harlan Teklad 2018S y agua *ad libitum* filtrada hasta 0.22  $\mu\text{m}$  y clorada hasta 10 ppm. Se empleó cama Pine Shaving Bedding (Harlan Teklad).

## **6.1 Toxicidad Aguda**

### **6.1.1 Objetivo específico**

Determinar la dosis letal diez ( $DL_{10}$ ) y la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) en ratones machos Hsd:ICR, como en ratas machos Hsd:WISTAR, por vía intraperitoneal.

### **6.1.2 Toxicidad aguda en Ratones Hsd:ICR**

#### **6.1.2.1 Metodología**

Con el propósito de conocer los efectos biológicos en el animal íntegro, el compuesto NF60 se disolvió en 5% de DMSO y 95% de carboximetilcelulosa al 0.4%. Se administró por vía intraperitoneal a dosis única de: 50, 100, 150 y 200 mg/kg a lotes de 3 ratones de cepa Hsd:ICR machos con peso de entre 25 y 30 g para cada una de las dosis mencionadas, en todos los casos el volumen administrado fue de 0.3 ml. Las observaciones de mortalidad se llevaron a cabo a

las 24 h postadministración, registrando el número de muertos en cada uno de los grupos. Posteriormente, y con base en los resultados anteriores, se probaron niveles de dosis a intervalos más estrechos y con lotes de 5 animales, las dosis utilizadas fueron las siguientes: 40, 38, 36, 35, 34, 32, 30, 28, 25, 20, 10 mg/kg.

Los animales se observaron durante las primeras 2 horas postinoculación y al menos una vez al día en busca de signos clínicos de toxicidad. La DL<sub>50</sub> y la DL<sub>10</sub> se determinaron con base en el número de animales muertos con cada dosis a las 24 h postadministración, mediante un análisis de regresión Probit utilizando el paquete estadístico SPSS Statistics versión 19<sup>®</sup>.

### **6.1.2.2 Resultados**

En el cuadro 6 se muestran las muertes registradas en cada uno de los grupos 24 horas después de la administración del compuesto.

<b>Cuadro 6. Mortalidad de ratones ICR a distintas dosis de NF60</b>			
Dosis mg/kg	No. ratones	Muertos 24 horas	Muertos día 7
10	5	0	5
20	5	0	5
25	5	0	5
28	5	4	1 (72 horas)
30	5	3	2 (72 horas)
32	5	5	-
34	5	5	-
35	5	4	1 (72 horas)
36	5	5	-
38	5	5	-
40	5	5	-
50	3	5	-
100	3	3	-
150	3	3	-
200	3	3	-

Los datos se trataron mediante un análisis de regresión Probit para determinar las dosis letales 10 y 50, los resultados se muestran en el cuadro 7.

<b>Cuadro 7. Valores de DL10 y DL50 del compuesto NF60 en ratones Hsd:ICR</b>	
	Concentración mg/kg
<b>Dosis letal diez (DL<sub>10</sub>)</b>	<b>24.44</b>
Intervalo de confianza 95 %	18.74 -27.23
<b>Dosis letal media (DL<sub>50</sub>)</b>	<b>28.32</b>
Intervalo de confianza 95%	25.54-29.63

La principal semiología de toxicidad observada en todos los animales del estudio se muestra a continuación:

1. Aumento de actividad locomotora (minutos)
2. Encorvamiento
3. Piloerección
4. Postración
5. Lagrimeo (1h)
6. Disminución de comportamiento exploratorio
7. Incremento en ritmo respiratorio
8. Descarga nasal (días)
9. Epistaxis
10. Ictericia (días)
11. Muerte

Los primeros 5 puntos indican que la administración del compuesto causa un grado de dolor importante en los individuos. En todos los animales se observó ictericia generalizada (imagen 1) sugerente de hepatotoxicidad y/o proceso hemolítico. El grado de la ictericia se relacionó con la dosis del compuesto administrada es decir los animales con mayor grado de ictericia fueron aquellos a los que se les administraron las dosis más alta del compuesto.



**Imagen1:** Ictericia generalizada en ratones ICR estudio de toxicidad aguda

### **6.1.3 Toxicidad aguda en Ratas Hsd:WISTAR**

#### **6.1.3.1 Metodología**

Para la realización del estudio en ratas se utilizó la cepa Hsd:Wistar, al iniciar el estudio todos los individuos se encontraban con un peso corporal entre los 170 y los 200 g. Las dosis utilizadas para este estudio se formularon con base en los resultados del estudio de toxicidad aguda previamente realizado en ratones Hsd:ICR, realizando un ajuste a la tasa metabólica de la rata, esto con el fin de reducir el número de animales utilizados.

El compuesto se disolvió en 5% de DMSO y 95% de agua destilada, se administró una sola dosis por animal, vía intraperitoneal a grupos de 5 ratas Wistar para cada una de las dosis probadas (12, 13, 14, 15, 16, 18, 20 mg/kg).

Los animales fueron observados durante las primeras 2 horas post administración y al menos una vez al día en busca de signos clínicos de toxicidad.

Se determinó el peso de cada uno de los individuos los días 1 (previo a la administración del compuesto), 7 y 14 del estudio en todos los casos entre la 8:00 y 10:00 horas, utilizando una balanza OHAUS SOCOUT PRO® previamente calibrada con una sensibilidad de 0.01-1.0 g y un rango de pesaje de 200 a 6000 g. La precisión de la balanza fue corroborada mediante el uso de pesas de calibración externas después de cada 5 mediciones.

Posterior al día 14 todos los animales fueron sacrificados mediante el uso de una cámara de CO<sub>2</sub>.

La determinación de las dosis letales para ratas se realizó por los mismos métodos antes mencionados para el estudio en ratones Hsd:ICR.

### 6.1.3.2 Resultados

En el cuadro 8 se muestran las muertes registradas en cada uno de los grupos 24 h después de la administración del compuesto.

<b>Cuadro 8. Mortalidad en ratas Wistar a distintas dosis de NF60</b>				
Dosis mg/kg	No. Ratas	Muertos 24 h	Muertos día7	Muertos día 14
12	5	0	0	0
13	5	0	0	0
14	5	0	1 (72h)	0
15	5	1	0	0
16	5	2	0	0
18	5	2	1 (72h)	0
20	5	3	0	0

Al igual que con el estudio realizado en ratones los datos se trataron mediante un análisis de regresión Probit para determinar las dosis letales 10 y 50, los resultados se muestran en el cuadro 9.

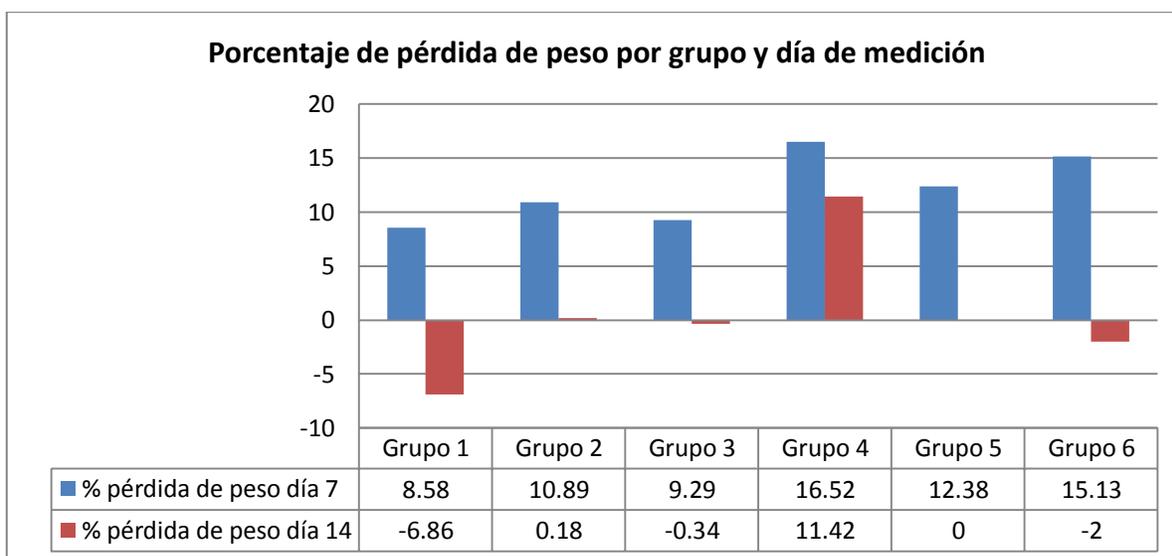
<b>Cuadro9. Valores de DL10 y DL50 del compuesto NF60 en ratas WISTAR</b>	
	Concentración mg/kg
<b>Dosis letal diez (DL<sub>10</sub>)</b>	<b>14.24</b>
Intervalo de confianza 95%	7.08-16.08
<b>Dosis letal media (DL<sub>50</sub>)</b>	<b>18.27</b>
Intervalo de confianza 95%	16.18-32.90

La semiología de toxicidad registrada se muestra en el cuadro 10. El peso promedio de cada uno de los grupos los días 1, 7 y 14 del estudio se muestran en el cuadro 11. El porcentaje de pérdida de peso de cada grupo para los días 7 y 14 post administración se muestra en la gráfica 1.

<b>Cuadro 10. Semiología de toxicidad en ratas Wistar</b>			
Categoría	Post administración (horas)	Día 7	Día 14
Peso corporal	ND	Pérdida de peso	Ganancia de peso
Apariencia	Piloerección Postura anormal Encorvamiento	Acicalado pobre Pelo hirsuto Letargia	Acicalado pobre
Comportamiento espontaneo	Aislamiento Vocalizaciones Postración	Inactividad	Ninguna
Respuesta a estímulos	Respuesta exagerada	Depresión leve	Ninguna

<b>Cuadro 11. Peso promedio por grupo y día de medición en ratas WISTAR</b>			
Grupo	Día1	Día7	Día 14
1 (12mg/kg)	200.32 ± 3.07	183.32 ± 5.12 a	214.25 ± 3.76 a
2 (13mg/kg)	198.84 ± 3.22	177.20 ± 5.88	198.59 ± 3.99
3 (14mg/kg)	204.99 ± 3.55	185.96 ± 7.42	205.73 ± 4.45
4 (15mg/kg)	202.06 ± 2.60	168.61 ± 10.19 b	179.0 ± 12.5 b
5 (16mg/kg)	203.08 ± 1.46	181.40 ± 8.24	207.25 ± 3.53
6 (18mg/kg)	207.14 ± 1.88	175.86 ± 8.63	212.80 ± 4.25 a
7 (20mg/kg)	203.20 ± 3.26	ND	ND

ND: no determinado debido a que ninguna unidad experimental sobrevivió al día 7.  
 Literales diferentes denotan diferencia significativa entre los distintos grupos (P < 0.05).



**Gráfica 1.** Siete días después de la administración del compuesto, observamos pérdida de peso en todos los grupos. Al día 14 todos los grupos recuperaron su peso inicial o lo incrementaron, con excepción del grupo 4, que a pesar de presentar ganancia de peso entre el día 7 y 14 no alcanzó a recuperar su peso inicial.

### 6.1.2 Discusión

La primera prueba de toxicidad realizada sobre una sustancia química nueva es la de toxicidad aguda. El objetivo de los mismos es “evaluar el riesgo o peligro potencial que un agente químico o físico puede ocasionar sobre la salud humana cuando es objeto de exposiciones agudas .Con este ensayo se determinó la dosis letal diez ( $DL_{10}$ ) y la dosis letal media ( $DL_{50}$ ) en ratón y rata así como la determinación de otros efectos tóxicos agudos.

Como puede observarse, el intervalo entre la  $DL_{10}$  y la  $DL_{50}$  para ambas especies es muy estrecho, lo que es de esperar en un compuesto con alta actividad citotóxica, esta es una característica común en la mayoría de los quimioterapéuticos utilizados. Sin embargo, si se compara el valor de la  $DL_{50}$  en ratones y ratas por vía intraperitoneal reportado por laboratorios “TEVA Parenteral Medicines” para el cisplatino (ratones: 6.6 mg/kg, ratas: 5.4 mg/kg), con la  $DL_{50}$  del NF60 (ratones: 28.32 mg/kg, ratas: 18.27 mg/kg) en las mismas especies, se observa que la concentración necesaria para causar la muerte del 50 % de los individuos es menor en el cisplatino.

Por otro lado, como se puede observar en la gráfica 1, existió pérdida de peso en todos los grupos al día 7 post administración, sin embargo, ninguno rebasó el 20 % de pérdida de peso establecido como límite para considerar tóxico a un compuesto. Para el día 14 todos los grupos con excepción del grupo cuatro (15mg /kg) recuperaron su peso inicial e incluso tuvieron una ligera ganancia de peso con respecto al día de administración, lo que evidencia reversibilidad de los efectos adversos. En cuanto a los otros hallazgos también existió una recuperación de los efectos secundarios (Acicalado pobre, pelo hirsuto, letargia, depresión) conforme paso el tiempo a la administración.

Con estos resultados podría pensarse, que al parecer existe variabilidad interespecie en la respuesta al compuesto ya que los efectos adversos fueron mas evidentes en el ratón que en la rata (en todos los ratones se observó ictericia marcada y ninguno de los individuos sobrevivió al día 7 del estudio). Si bien las

dosis aplicadas a los primeros grupos de ratones fueron más elevadas que las administradas a las ratas, las últimas dosis probadas en ratones si correspondieron a las utilizadas en ratas. Esta variabilidad generalmente está relacionada directamente con las concentraciones plasmáticas, que a su vez dependen, en la mayor parte de los casos, de variaciones en el metabolismo<sup>(67)</sup>.

## **6.2 Toxicidad Subcrónica en Ratas Hsd:Wistar**

### **6.2.1 Objetivo Específico**

Conocer los efectos tóxicos a largo plazo, así como identificar y caracterizar los órganos específicos afectados por la administración repetida del compuesto en ratas machos Hsd:WISTAR.

### **6.2.2 Metodología**

La exposición subcrónica tuvo una duración 90 días, se utilizaron ratas de cepa Hsd:Wistar, machos con un peso entre los 170 y 200 g con las características y condiciones de alojamiento ya mencionadas.

Se probaron 3 diferentes dosis: una dosis alta (6.5mg/kg) la cual fue formulada con base en los resultados del estudio de toxicidad aguda, utilizando como referencia el valor del límite inferior de la DL<sub>10</sub>, partiendo de esta dosis se ajustaron las 2 dosis restantes, una dosis baja (2.5 mg/kg) con la que se esperaba que no hubiera mortalidad y una dosis intermedia (4.5 mg/kg). Para cada una de las dosis se formaron grupos de 10 ratas (5 ratas/jaula), además de un grupo control sin tratamiento:

- Grupo Control: Agua destilada,
- Grupo D1: NF60 (2.5mg/kg)
- Grupo D2: NF60 (4.5mg/kg)
- Grupo D3: NF60 (6.5 mg/kg)

El compuesto se disolvió en 5% de DMSO y 95% de agua destilada, la administración del producto se realizó intraperitonealmente, con una frecuencia semanal de administración, durante 12 semanas, el volumen administrado en cada individuo estuvo entre 0.8 y 1 ml en todos los casos. Semanalmente entre las 08:00 y las 10:00 horas, se determinó el peso de cada rata utilizando una balanza OHAUS SOCOUT PRO® previamente calibrada con una sensibilidad de 0.01-1.0 g y un rango de pesaje de 200 a 6000 g. La precisión de la balanza fue corroborada mediante el uso de pesas de calibración externas después de cada 5 mediciones.

El consumo relativo de alimento semanal por individuo, se determinó pesando la cantidad de alimento ofrecida al inicio de la semana por jaula (800g), menos el peso del alimento sobrante al finalizar la semana, este valor se dividió entre el número de animales en cada jaula.

Los animales fueron observados al menos una vez al día en busca de signos de toxicidad, los animales agonizantes o gravemente afectados fueron sacrificados mediante el uso de una cámara de CO<sub>2</sub>, aplicando los criterios para establecer el punto de finalización humanitario y así evitar el sufrimiento innecesario de los animales <sup>(68)</sup>.

Cada animal fue muestreado los días 0, 45 y 90 para realizar estudios de hematología, bioquímica clínica y urianálisis. Previo a cada muestreo los animales se mantuvieron en ayuno por un periodo de 6h, posteriormente se anestesiaron mediante el uso de isoflurano, las muestras de sangre para hematología y bioquímica se obtuvieron por vía peri orbital colocando un tubo capilar encima del globo ocular. Las muestras para hemograma fueron colocadas en micro tubos con anticoagulante (heparina) mientras que las muestras para bioquímica clínica fueron remitidas sin aditivo.

La recolección de la orina se realizó mediante el uso de jaulas metabólicas, los animales fueron aislados en jaulas individuales durante un periodo no mayor a 4 horas para evitar la contaminación de la muestra.

Posterior al último muestreo todos los animales sobrevivientes fueron sacrificados mediante cámara de CO<sub>2</sub>, para la realización de la necropsia y estudio histopatológico en busca de lesiones estructurales. Los animales que fueron sacrificados o que murieron durante el desarrollo del estudio también se les realizó necropsia y estudio histopatológico.

- **Procesamiento de muestras**

Todas las muestras fueron procesadas en el Departamento de Patología, área de Patología Clínica de la FMVZ-Universidad Nacional Autónoma de México.

- Hematología

Los analitos determinados fueron: hematocrito, hemoglobina, eritrocitos, VGM, CGMH, sólidos totales, leucocitos, neutrófilos, neutrófilos en banda, linfocitos, monocitos, eosinófilos.

Los hemogramas fueron realizados mediante el uso de un analizador hematológico “BC-2800 vet” modelo RK10-VS el cual trabaja mediante el principio de impedancia.

El hematocrito se corroboró manualmente mediante el método de microhematocrito. Los sólidos totales se determinaron en plasma por medio de refractometría con un refractómetro Zeigen.

Por último se realizaron dos frotis sanguíneos por individuo, los cuales fueron teñidos con tinción de Wrigth y evaluados al microscopio óptico, para apreciar características morfológicas y realizar el conteo diferencial de leucocitos.

- Bioquímica clínica

El suero obtenido de cada muestra fue separado y colocado en tubos eppendorf estériles para su procesamiento. Se realizó la determinación de los siguientes analitos: urea, creatinina, alanina aminotransferasa (ALT), fosfatasa alcalina (FA), bilirrubina total (BT), y bilirrubina directa (BD), dichas determinaciones se

realizaron por colorimetría en un espectrofotómetro RX Daytona de la marca Randox.

➤ Urianálisis

Se colectaron de 2-3 ml de orina por individuo; se realizó examen físico (apariencia, color, densidad urinaria), examen químico utilizando tiras reactivas Combur10 Test-Roche. Por último, a partir del sedimento urinario obtenido de la centrifugación de la muestra se realizó el examen microscópico mediante la observación del sedimento con la ayuda de un microscopio óptico marca Leica.

Los estudios mencionados (hemograma, bioquímica clínica y urianálisis) se realizaron conforme en los procedimientos estandarizados, certificados y descritos en el catálogo de técnicas métodos e instructivos del laboratorio de Patología Clínica FMVZ-UNAM.

➤ Necropsia

La necropsia fue realizada inmediatamente después de la eutanasia y en los casos de muerte espontánea, lo más pronto posible al hallazgo. Esta incluyó una revisión externa en busca de heridas o secreciones por algún orificio natural. Se realizó una incisión sobre la línea media desde la sínfisis mandibular hasta la sínfisis púbica (incisión primaria) posteriormente se revisó tejido subcutáneo y tejido muscular, se procedió a la apertura de cavidad torácica y abdominal. Fueron inspeccionados minuciosamente todos los órganos de los cuales fueron disecados e incluidos en formol al 10% amortiguado, pulmones, corazón, hígado, bazo, estomago, riñones y porciones de intestino grueso e intestino delgado.

➤ Estudio histopatológico

Los órganos fijados fueron cortados y procesados el laboratorio del departamento de Patología de la FMVZ. Para el procesamiento se utilizó un Histoquinet automático marca Leica (TP 1020). Después de incluir en parafina los tejidos mediante el uso de un incluidor Leica, se procedió a realizar los cortes utilizando

un micrótopo Leica (RM 2125 RT). Los cortes fueron montados en laminillas para su tinción (Hematoxilina y Eosina). Por último cada laminilla fue revisada mediante microscopia óptica.

➤ Análisis estadístico

En el estudio de toxicidad subcrónica se realizó un análisis de correlación de Pearson para determinar si existía asociación entre la administración del compuesto y variables consumo de alimento y peso.

Para determinar si existía o no una asociación entre las administración semanal del compuesto con las variables dependientes determinadas en el hemograma, bioquímica y urianálisis se utilizó la prueba de razón de verosimilitud de ji cuadrado basada en la teoría de máxima verosimilitud mediante el método de modelos lineales generalizados. Esta prueba contrasta la hipótesis de independencia de variables ( $H_0$ ), frente a la hipótesis alternativa ( $H_A$ ) de que una variable respuesta se distribuye de modo diferente para distintos niveles de la variable explicativa. En todos los casos el nivel de significancia establecido fue de 0.05.

### **6.2.3 Resultados Toxicidad Subcrónica Ratas Hsd:Wistar**

➤ Semiología de toxicidad, peso y consumo de alimento

Los grupos Control (agua destilada) y D1 (NF60 2.5mg/kg) no presentaron muertes durante los 90 días del estudio ( $n=10$ ). Del grupo D2 (NF60 4.5 mg/kg) tres animales murieron antes del segundo muestreo (rata 23 el día 26, rata 21 el día 35, rata 22 el día 40), entre el día 45 y el 90 fallecieron otros 4 animales de este mismo grupo (rata 26 el día 60, rata 29 el día 63, rata 24 el día 70) por lo que únicamente 3 animales del grupo D2 finalizaron el estudio. En el grupo D3 (NF60 6.5 mg/kg) de igual forma tres animales fallecieron antes del segundo muestreo (rata 34 el día 19, rata 32 el día 30, rata 37 día 42), posterior al muestreo del día 45 se decidió sacrificar a todos los animales sobrevivientes del grupo D3 aplicando los criterios para el punto de finalización humanitario.

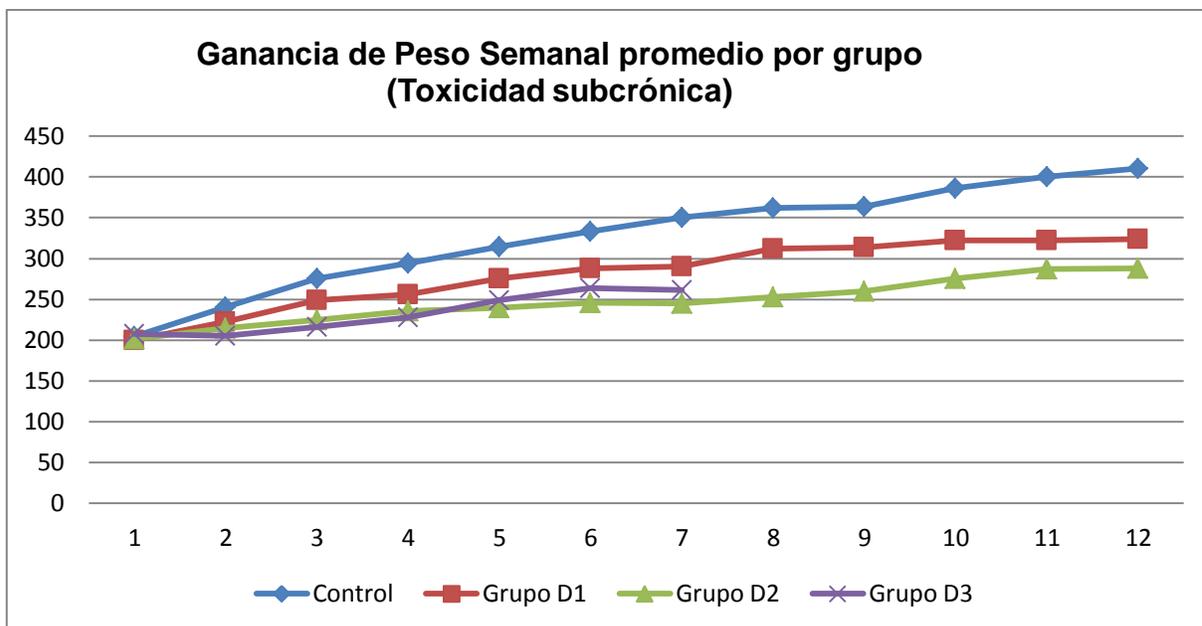
Los signos clínicos más comunes en los grupos D2 y D3 fueron asociados con alteraciones en el tracto digestivo, presentando principalmente diarreas, y distensión abdominal en distintos grados, estos cambios son compatibles con los hallazgos observados en la necropsia que se comentaran mas adelante.

Se observó semiología inespecífica en la mayoría de los animales tratados (acicalado pobre, pelo hirsuto, letargia, depresión, etc). Con excepción del individuo 13 y 17, ninguno los demás animales del grupo D1 presentaron alteraciones importantes antes de la décima semana del estudio.

No se observó pérdida de peso semanal en ninguno de los grupos (cuadro 12), sin embargo la ganancia de peso semanal fue evidentemente mayor en el grupo control que en los grupos con tratados con el NF60 (Gráfica 2).

<b>Cuadro 12. Peso semanal promedio en ratas Wistar</b>				
<b>Semana</b>	<b>Control (agua destilada)</b>	<b>Grupo D1 (NF60 2.5mg/kg)</b>	<b>Grupo D2 (NF60 4.5 mg/kg)</b>	<b>Grupo D3 ( NF60 6.5 mg/kg)</b>
1	204.15g ±3.28a	200.07g ±2.25a	201.12g ±2.15a	207.35g ±2.33a
2	240.62g ±5.37a	222.78g ±2.65b	214.3g ±2.73b	204.98g ±3.34b
3	275.12g ±6.72a	248.91g ±4.20b	225.15g ±5.28b	216.17g ±6.0b
4	294.54g ±7.9a	256.31g ±5.04b	235.73g ±7.42b	228.21g ±8.43b
5	314.58g ±8.89a	275.39g ±5.89a	239.67g ±7.19b	248.75g ±7.87b
6	333.13g ±10.46a	288.01g ±9.22a	245.74g ±8.85b	263.89g ±4.09b
7	350.06g ±12.22a	290.44g ±8.22b	245.41g ±6.84c	261.1g ±5.36bc
8	362.35g ±13.13a	312.53g ±8.48a	252.66g ±10.39b	ND
9	363.5g ±8.20a	313.44g ±11.45b	260.02g ±15.68c	ND
10	385.95g ±15.04	322.54g ±11.27b	275.53g ±16.61c	ND
11	400.5g ±15.84a	322.62g ±11.25b	287.33g ±10.12b	ND
12	410.07g ±16.58a	323.83g ± 13.27b	287.73g ± 12.62b	ND

ND: No determinado. Literales diferentes denotan diferencia significativa (P<0.05) entre los distintos grupos (no entre las distintas semanas).



**Gráfica 2.** Aunque ninguno de los grupos presenta pérdida de peso semanal, la ganancia de peso es considerablemente mayor en el grupo control, que en los grupos tratados con NF60.

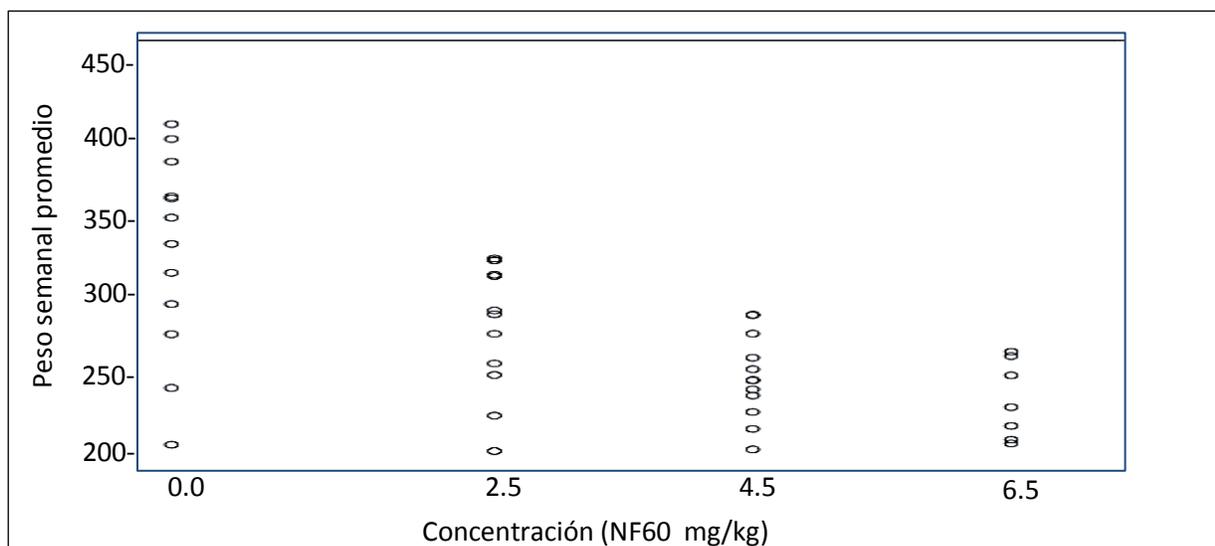
Semana	Control (agua destilada)	Grupo D1 (NF60 2.5mg/kg)	Grupo D2 (NF60 4.5 mg/kg)	Grupo D3 (NF60 6.5 mg/kg)
1	138.7g	125.8g	98.4g	76.2g
2	133.4g	149.9g	103.9g	89.5g
3	133.4g	129.9g	107.6g	109.4g
4	126.4g	94.1g	72.5g	83.6g
5	142.7g	111.8g	79.4g	106.3g
6	174.2g	137.5g	71.9g	92.3g
7	167.3g	132.1g	64.4g	78.2g
8	158.1g	118.9g	79.7g	ND
9	148.8g	105.8g	95.0g	ND
10	148.2g	115.7g	88.5g	ND
11	152.1g	102.1g	120g	ND
12	150.6g	100.9g	106.g3	ND

Se realizó un análisis de correlación de Pearson para determinar la existencia de una asociación lineal entre la administración del compuesto con el peso y consumo de alimento (cuadro 14).

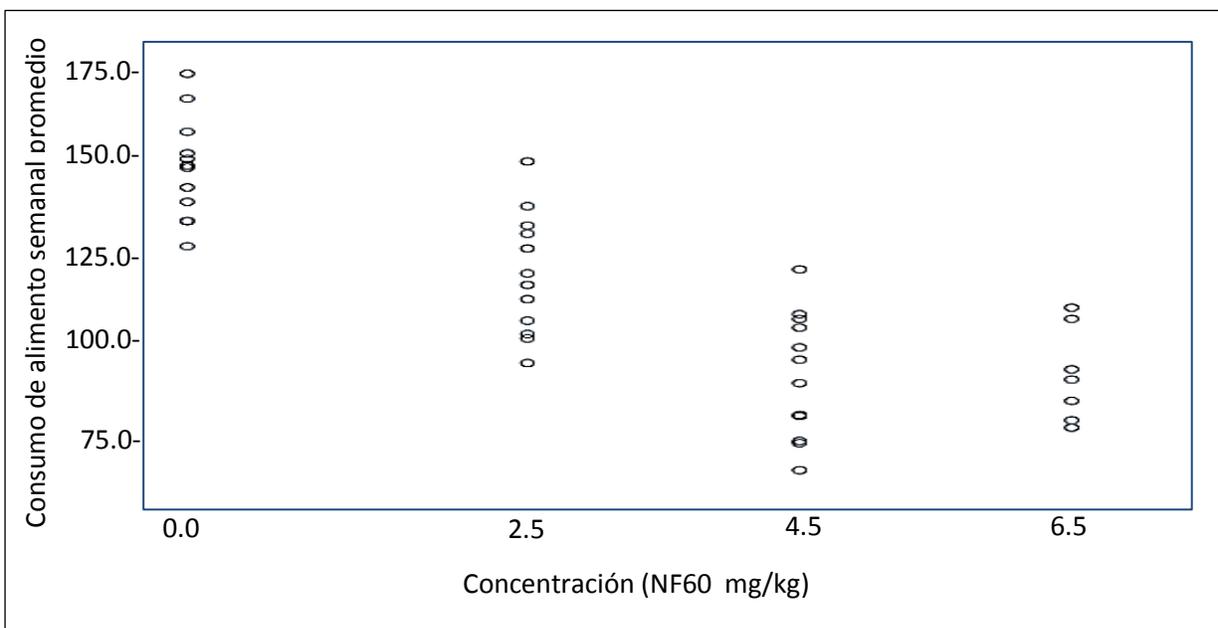
H0: No existe una asociación lineal entre la administración de compuesto NF60 con el peso y consumo de alimento.

HA: Si existe una asociación lineal entre la administración de compuesto NF60 con el peso y consumo de alimento.

Cuadro 14. Análisis de correlación de Pearson				
		Fármaco	Peso	C. alimento
Fármaco	C. Pearson	1	-.639	-.812
	Sig.		.000	.000
Peso	C. Pearson	-.639	1	.583
	Sig.	.000		.000
Consumo de alimento	C. Pearson	-.812	.583	1
	Sig.	.000	.000	



**Gráfica 3.** Puede apreciarse una correlación negativa entre la dosis administrada y el peso semanal promedio de los animales. A mayor concentración de compuesto menor peso.



**Gráfica 4.** Asociación negativa entre la administración del compuesto y el consumo de alimento. A mayor dosis menor consumo de alimento.

Posteriormente se compararon los grupos para determinar si existía o no diferencia significativa entre el control y los tres grupos tratados con NF60. (Cuadro 15).

<b>Cuadro 15. Comparación entre Grupos y razón de verosimilitud (peso corporal y consumo de alimento)</b>				
	C/D1	C/D2	C/D3	Razón de verosimilitud de ji cuadrado Tratamiento*Tiempo
Peso promedio	+	+	+	+
Consumo Promedio	+	+	+	+
(-- ) P>0.05, (+) P<0.05,				

## Hematología

En los cuadros 16 y 17 se muestran las medias de las variables que componen el hemograma por grupo y día de muestreo, en rojo se observan los valores que se encontraron por debajo del intervalo de referencia para la especie (Anexo 1) y en azul aquellos que estuvieron por encima del mismo. Literales diferentes denotan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los distintos días de muestreo de cada uno de los grupos (no entre los grupos). La variable plaquetas se omitió del análisis debido a la presencia de agregados plaquetarios en la gran mayoría de los muestreos.

<b>Cuadro 16. Resultados promedio de las variables que componen el hemograma por grupo y día de muestreo (línea roja)</b>							
Grupo	Día	Ht L/L	Hemo L/L	Eritrocitos L/L	VGM FL	CGMH g/L	Solidos T.
Control	0	0.46 a	145 a	6.9 a	65.4 a	318 a	60 a
	45	0.48 b	161 b	8.1 b	59.9 b	334 b	64 b
	90	0.5 c	172 c	8.6 c	58.3 b	341 c	68 c
D1	0	0.46 a	146 a	6.9 a	65.5 a	320 a	58 a
	45	0.45 a	150 b	7.6 b	58.8 b	332 b	59 b
	90	0.45 a	151 b	7.9 c	57.0	333 a	60 a
D2	0	0.46 a	145 a	6.7 a	65.0 a	326 a	58 a
	45	0.45 a	144 a	7.7 b	57.7 b	323 a	55 a
	90	0.49 b	158 b	8.2 b	59.0 b	324 a	59 a
D3	0	0.45 a	137 a	6.4 a	66.8 a	322 a	57 a
	45	0.43 a	141 a	7.4 b	58.2 b	324 a	54 a

En rojo se observan los valores que se encuentran por debajo del intervalo de referencia para la especie. Literales diferentes denotan diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre los días de muestreo en cada uno de los distintos grupos (no entre grupos).

<b>Cuadro 17. Resultados promedio de las variables que componen el hemograma por grupo y día de muestreo (línea blanca)</b>						
Grupo	Día	Leucocitos x $10^9/L$	Neutrófilos x $10^9/L$	Linfocitos x $10^9/L$	Monocitos x $10^9/L$	Eosinófilos x $10^9/L$
Control	0	9.7 a	1.1 a	8.3 a	0.2 a	0.1 a
	45	11.4 a	1.6 a	9.4 a	0.3 a	0.1 a
	90	9.6 a	1.9 a	7.1 b	0.3 a	0.1 a
D1	0	9.4 a	1.4 a	7.6 a	0.2 a	0.0 a
	45	14.1 a	3.5 b	10.3a	0.2 a	0.0 a
	90	15.3 b	6.5 b	8.2 a	0.6 b	0.1 a
D2	0	11.4 a	1.7 a	9.3 a	0.3 a	0.0 a
	45	9.9 a	4.3 b	5.1 b	0.3 a	0.0 a
	90	12.4 a	5.1 b	5.7 b	0.6 a	0.0 a
D3	0	8.8 a	1.2 a	7.4 a	0.3 a	0.0 a
	45	13.6 b	6.6 b	5.6 b	0.3 a	0.0 a

En rojo se observan los valores que se encuentran por debajo del intervalo de referencia para la especie y en azul aquellos que se encuentran por encima del mismo. Literales diferentes denotan diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre los días de muestreo en cada uno de los distintos grupos (no entre grupos).

En el cuadro 18 se muestra la comparación por grupos y día de muestreo así como la razón de verosimilitud para cada una de las variables determinadas el hemograma.

**Cuadro 18. Comparación por grupos y día de muestreo, así como la razón de verosimilitud para cada una de las variables que componen el hemograma**

Variables dependientes	Día 0			Día 45			Día 90		Razón de verosimilitud ji cuadrado Tratamiento*tiempo
	C/D1	C/D2	C/D3	C/D1	C/D2	C/D3	C/D1	C/D2	
Hematocrito	--	--	--	+	+	+	+	--	--
Hemoglobina	+	+	+	+	--	+	+	--	--
Eritrocitos	--	--	--	--	--	+	+	--	--
VGM	--	--	--	--	--	--	--	--	--
CGMH	--	--	--	--	+	+	+	+	+
Sólidos T.	--	--	--	--	+	+	+	+	+
Leucocitos	--	--	--	--	--	--	+	+	+
Neutrófilos	--	--	--	--	+	+	+	+	+
Linfocitos	--	--	--	--	+	+	--	--	--
Monocitos	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Eosinófilos	--	--	--	--	--	--	--	--	--
(-- ) P>0.05, (+) P<0.05,									

En el caso de las variables CGMH, sólidos totales, leucocitos y neutrófilos, se rechazó la H0 de independencia de variables (P<0.05) por lo que las diferencias observadas entre el grupo control y los grupos tratados con NF60, pueden asociarse a los tratamientos.

### Bioquímica Clínica

Las medias por grupo y día de muestreo para las variables urea, creatinina, ALT, FA, BT, BD se muestran en el cuadro 19. En azul se muestran aquellos valores que se encontraron por encima del intervalo de referencia para la especie (Anexo 1).

**Cuadro19. Resultados promedio de la bioquímica clínica por grupo y día de muestreo**

Grupo	Día	Urea	Creatinina	ALT	FA	B.T	B.D
Control	0	9.5 a	51.5 a	40.0 a	730.0 a	4.8 a	2.3 a
	45	7.5 b	47.6 a	49.8 b	449.0 b	7.8 b	4.9 b
	90	7.7 b	45.4 a	54.4 b	361.2 b	9.2 b	5.0 b
D1	0	8.3 a	50.3 a	42.8 a	777.9 a	5.4 a	2.1 a
	45	7.0 b	49.4 a	49.4 a	433.5 b	6.5 a	3.9 b
	90	7.4 b	48.6 a	58.0 b	371.4 b	6.8 a	3.2 b
D2	0	8.3 a	51.9 a	53.0 a	719.9 a	6.9 a	4.3 a

	45	7.3 a	49.8 a	49.7 a	408.6 b	7.0 a	4.3 a
	90	7.3 a	46.0 a	44.7 a	337.7 b	5.3 a	2.4 a
D3	0	6.9 a	49.4 a	51.2 a	878.0 a	5.7 a	3.4 a
	45	7.4 a	52.7 a	66.9 a	305.9 b	10.0 a	6.7 a

En azul se muestran aquellos valores que se encuentran por encima del intervalo de referencia para la especie. Literales diferentes denotan diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre los días de muestreo en cada uno de los distintos grupos (no entre los grupos).

En el cuadro 20 se muestra la comparación por grupos y día de muestreo así como la razón de verosimilitud para cada una de los analitos determinados en la bioquímica clínica.

<b>Cuadro 20. Comparación por grupos y día de muestreo, así como la razón de verosimilitud de la Bioquímica clínica</b>									
Variables dependientes	Día 0			Día 45			Día 90		Razón de verosimilitud de $\chi^2$ Tratamiento*tiempo
	C/D1	C/D2	C/D3	C/D1	C/D2	C/D3	C/D1	C/D2	
Urea	--	--	+	--	--	--	--	--	--
Creatinina	--	--	--	--	--	--	--	--	--
ALT	--	+	--	--	--	+	--	--	--
FA	--	--	+	--	--	--	--	--	--
BT	--	--	--	--	--	--	+	+	+
BD	--	--	--	--	--	--	+	+	+

(--)  $P > 0.05$ , (+)  $P < 0.05$

En este caso las únicas dos variables cuyas diferencias pueden estar relacionadas con la interacción tratamiento\*tiempo (razón de verosimilitud  $P < 0.05$ ) son las bilirrubinas total y directa en el día 90 de muestreo.

## Urianálisis

En cuanto al urianálisis solamente se analizaron las variables densidad urinaria (D.U), pH y proteínas dado que fueron las únicas que mostraron variaciones entre grupos y días de muestreo, los demás analitos determinados en escala numérica fueron de cero en prácticamente todos los muestreos. (Cuadro 21).

<b>Cuadro 21. Resultados promedio por grupo para las variables D.U, pH, proteínas del urianálisis</b>				
Grupo	Día	D.U	pH	Proteínas
Control	0	1.036 a	6.5 a	0.1 a
	45	1.029 b	8.0 b	0.06 b
	90	1.023 b	7.5 b	0.05 b
D1	0	1.038 a	6.5 a	0.21 a
	45	1.018 b	8.4 b	0.03 b
	90	1.017 b	7.5 c	0.03 b
D2	0	1.031 a	6.6 a	0.19 a
	45	1.013 b	8.3b	0.02 b
	90	1.016 b	7.8 b	0.05 b
D3	0	1.037 a	6.5 a	0.16 a
	45	1.025 b	7.7 b	0.02 b

Literales diferentes denotan diferencia estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ) entre los días de muestreo en cada uno de los distintos grupos (no entre los grupos).

En el cuadro 22 se muestra la comparación por grupos y día de muestreo así como la razón de verosimilitud para las variables analizadas del urianálisis.

<b>Cuadro 22. Comparación por grupos y día de muestreo así como la razón de verosimilitud para las variables analizadas del urianálisis.</b>									
Variables dependientes	Día 0			Día 45			Día 90		Razón de verosimilitud de ji cuadrado Tratamiento*Tiempo
	C/D1	C/D2	C/D3	C/D1	C/D2	C/D3	C/D1	C/D2	
D.U	--	--	--	--	--	--	--	--	--
pH	--	--	--	--	--	--	--	--	--
Proteínas	+	+	+	--	--	--	--	--	--

(--)  $P > 0.05$ , (+)  $P < 0.05$ ,

En el análisis de razón de verosimilitud en ninguno de los casos se rechazó la hipótesis nula de independencia de variables, lo que nos indica que las diferencias encontradas entre los distintos grupos se atribuyen al azar y no tienen una asociación con la administración semanal del compuesto.

## **Necropsias**

Las primeras muertes registradas durante el estudio se dieron entre la cuarta y sexta semana de administración en el grupo D2 (rata 21, 22 y 23) y el grupo D3 (rata 32, 34, y 37). Los hallazgos siguieron un mismo patrón en todos estos individuos:

### **Inspección Externa:**

- El hallazgo característico en todos los animales fue la distensión abdominal y en algunos casos fibrosis en el sitio del inóculo.

### **Aparato cardiorespiratorio:**

- Sólo se observó congestión pulmonar

### **Aparato digestivo:**

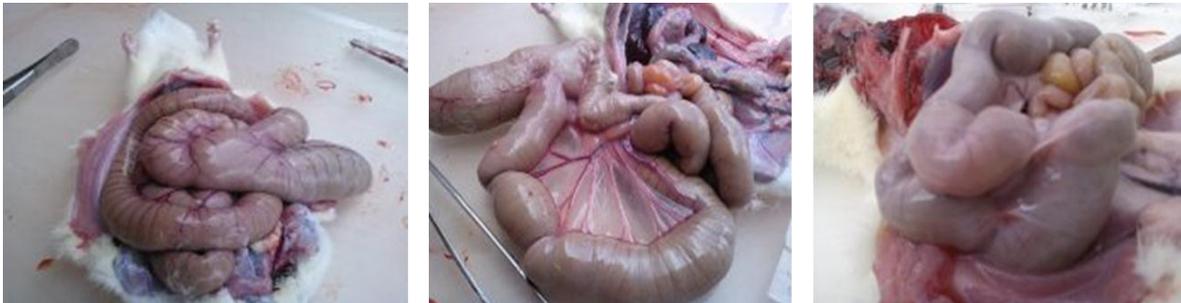
- La pared de la cavidad abdominal de la rata 32 presentó múltiples hemorragias. En los casos 22 y 32 se encontró alrededor de 1ml de líquido transparente en cavidad abdominal el cual fue clasificado como un exudado no séptico. En todos los casos el hígado se encontraba fuertemente adherido al diafragma, disminuido de tamaño, de consistencia firme con bordes redondeados, y superficie irregular, los lóbulos hepáticos no se encontraban bien definidos y en ocasiones mostraban pequeñas nodulaciones de consistencia firme que sobresalían del parénquima (Imagen 2). El bazo se encontró disminuido de tamaño con superficie irregular y de consistencia firme en todos los individuos (Imagen 2). Las asas intestinales de todos los individuos se encontraban distendidas, congestionadas, con presencia de gas y alimento de consistencia líquida (Imagen 3). También se observaron adherencias entre las asas intestinales así como impactación fecal a la altura del colon descendente y el recto. En el caso de la rata 34 se observó perforación intestinal a la altura del colon descendente.

### **Aparato urinario:**

- El único hallazgo encontrado fue congestión a nivel renal.



**Imagen 2:** Hígado y bazo, disminuidos de tamaño, con bordes redondeados, y superficie irregular, lóbulos hepáticos mal definidos con pequeñas nodulaciones de consistencia firme que sobresalían del parénquima.



**Imagen 3:** Asas intestinales distendidas, congestionadas, con presencia de gas y alimento de consistencia líquida, adherencias entre las asas intestinales.

Como se mencionó anteriormente después del día 45 del estudio los individuos del grupo D3 sobrevivientes (ratas 31, 33, 35, 36, 38, 39 y 40) fueron sacrificados y se les realizó la necropsia correspondiente. En cuanto al grupo D2 cuatro individuos más (ratas 24, 26, 28 y 29) murieron entre el día 45 y 90 del estudio, de estos, dos de ellos (ratas 28 y 29) murieron durante la noche presentando cambios autolíticos importantes por lo que no se tomaron en cuenta en esta descripción. Las ratas 25, 27 y 30 finalizaron el estudio y se les realizó la necropsia correspondiente. Los hallazgos encontrados en los individuos de ambos grupos en general coinciden con lo descrito anteriormente.

En cuanto a los grupos Control y D1, no hubo muertes durante los 90 días del estudio. En el grupo Control no se observaron alteraciones relevantes (Imagen 4).

El Grupo D1 presentó alteraciones que coinciden con los descrito para los otros grupos tratados con NF60 pero, de menor magnitud, observándose hígado y bazo disminuidos de tamaño, con bordes redondeados y de consistencia firme,

adherencias, distensión y congestión de asas intestinales (Imagen 5), hay que mencionar que en ninguno de los casos se observó impactación fecal.



**Imagen 4:** Grupos control y D1 sin alteraciones relevantes



**Imagen 5:** Distensión y congestión de asas intestinales, adherencias.

### **Estudio Histopatológico**

A continuación se describen de manera general los principales cambios histopatológicos encontrados en cada uno de los grupos (cuadro 23).

<b>Cuadro 23. Principales hallazgos histopatológicos post-mortem en ratas (Toxicidad Subcrónica)</b>	
<b>Grupo</b>	<b>Hallazgos</b>
<b>Control</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Corazón: Congestión</li> <li>• Pulmones: Congestión, neumonía intersticial incipiente, ligera hiperplasia linfoide.</li> <li>• Hígado: Congestión.</li> <li>• Bazo: Sin Alteraciones (SA)</li> <li>• Riñones: Congestión</li> <li>• Intestinos: SA</li> </ul>
<b>D1 2.5 mg/kg</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Corazón: Congestión</li> <li>• Pulmones: Congestión, ligera hiperplasia linfoide</li> <li>• Hígado: Engrosamiento localizado de la cápsula con presencia infiltrado inflamatorio, congestión, ligeros cambios degenerativos.</li> <li>• Bazo: Engrosamiento de la cápsula.</li> <li>• Riñones: Congestión.</li> <li>• Intestinos: Engrosamiento de la serosa, con proliferación de fibroblastos, ligera hiperplasia linfoide (intestino delgado).</li> </ul>
<b>D2 4.5 mg/kg</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Corazón: Congestión</li> <li>• Pulmones: Congestión, ligera hiperplasia linfoide, neumonía intersticial focal.</li> <li>• Hígado: Engrosamiento localizado de la cápsula con presencia infiltrado inflamatorio, vasos de neo formación y fibroblastos, congestión, ligera degeneración hidrópica.</li> <li>• Bazo: Engrosamiento de la cápsula, con presencia de infiltrado inflamatorio linfocítico, incremento en la cantidad de hemosiderina libre.</li> <li>• Riñones: Congestión.</li> <li>• Intestinos: Engrosamiento de la serosa intestinal y peritoneo, con proliferación de fibroblastos e infiltrado inflamatorio (histiocitos y linfocitos), ligera hiperplasia linfoide (intestino delgado).</li> </ul>
<b>D3 6.5 mg/kg</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Corazón: Congestión</li> <li>• Pulmones: Congestión, ligera hiperplasia linfoide, neumonía intersticial focal.</li> <li>• Hígado: Engrosamiento localizado de la cápsula con presencia infiltrado inflamatorio principalmente linfocítico, vasos de neo formación y fibroblastos, congestión, ligera degeneración hidrópica en la periferia de las venas centrales.</li> <li>• Bazo: Engrosamiento de la cápsula con presencia de infiltrado inflamatorio linfocítico, incremento en la cantidad de hemosiderina libre.</li> <li>• Riñones: Cápsula focalmente engrosada, en algunos casos presencia de hemorragias con presencia de infiltrado inflamatorio y ligera proliferación de células mesangiales.</li> <li>• Intestinos: Engrosamiento de la serosa y peritoneo, con proliferación de fibroblastos e infiltrado inflamatorio linfocítico, ligera hiperplasia linfoide.</li> </ul>

### 6.3 Discusión

Al rechazarse la hipótesis nula ( $P < 0.05$ ) en el análisis de correlación de Pearson, se tiene evidencia estadística suficiente para determinar la existencia de una asociación en estos casos negativa entre la administración del compuesto NF60 con las variables respuesta de consumo de alimento y por ende del peso de los animales. Además en ambas variables dependientes se encontró diferencia

significativa ( $P < 0.05$ ) entre el grupo control y los tres grupos tratados con NF60, de igual forma en la razón de verosimilitud se rechazó la hipótesis nula de independencia, lo que nos indica que dichas diferencias son atribuidas a los tratamientos.

En el análisis hematológico, el único grupo que presentó anemia (hematocrito de 0.43 L/L, intervalo de referencia: 0.45-0.52 L/L) fue el grupo D3 (NF60 6.5 mg/kg) al día 45 de muestreo, además de diferencia significativa con respecto al control ( $P < 0.05$ ). Sin embargo, tomando en cuenta los resultados de la razón de verosimilitud esta diferencia no estaría asociada con la interacción Tratamiento/Tiempo. Clínicamente esta anemia es marginal y puede atribuirse al proceso inflamatorio crónico con el que cursaron los individuos. La patogénesis de este tipo de anemia se explica por 3 mecanismos que ocurren simultáneos<sup>(69)</sup>:

- Disminución en la vida de los eritrocitos: incremento en los niveles de IL-1 secundario al proceso inflamatorio reduce el tiempo de vida de los eritrocitos, por otro lado en el microambiente inflamatorio se favorece el daño oxidativo a los eritrocitos con la subsecuente unión de inmunoglobulinas lo que induce la destrucción de estos eritrocitos por parte del sistema fagocítico mononuclear.
- Fallas en la movilización o utilización del hierro: la producción de IL-6 durante la inflamación crónica favorece la producción de hepcidina la cual se une a la ferroportina inhibiéndola, esta molécula es necesaria para la exportación del hierro fuera de los macrófagos para su posterior reutilización en la producción de hemoglobina. En general la producción de IL-1, IL-6, TNF, e interferón alteran la cinética del hierro en el organismo.
- Fallas en la producción de eritrocitos: la producción de IL-1, IL-6, TNF, interferón,  $TGF\beta$ , afectan la producción de eritropoyetina afectando la eritropoyesis.

En cuanto a la serie blanca se observó neutrofilia (intervalo de referencia para la especie  $0.4-2.6 \times 10^9/L$ ) los días 45 de muestreo en los grupos tratados con NF60

(D1:  $3.5 \times 10^9/L$ , D2:  $4.3 \times 10^9/L$ , D3:  $6.6 \times 10^9/L$ ) y 90 (D1:  $6.5 \times 10^9/L$ , D2:  $5.1 \times 10^9/L$ ), así como diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre el control y los 3 grupos con tratamiento durante el mismo periodo. De acuerdo con la razón de verosimilitud ( $P < 0.05$ ) estas diferencias si están relacionadas con los distintos esquemas de tratamiento.

Clínicamente en ratas y ratones incluso los incrementos ligeros en el conteo de neutrófilos (neutrofilia) son indicativos de un proceso inflamatorio activo<sup>(70)</sup>.

De acuerdo con el intervalo de referencia para la especie ( $6.1-18.0 \times 10^9/L$ ) se observó una linfopenia ligera en el grupo D2 los días 45 ( $5.1 \times 10^9/L$ ) y 90 ( $5.6 \times 10^9/L$ ) de muestreo y en el grupo D3 el día 45 ( $5.7 \times 10^9/L$ ), estadísticamente solo se observó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre el control y los grupos D2 y D3 en el segundo muestreo (día 45). Sin embargo según la razón de verosimilitud las diferencias entre grupos son independientes del tratamiento ( $P > 0.05$ ). Clínicamente esta ligera linfopenia podría ser provocada por cambios en la cinética linfocitaria, secundario a una mayor producción de glucocorticoides endógenos (estrés crónico). Uno de los efectos descritos de los glucocorticoides es que disminuyen el número de linfocitos que retornan a la sangre favoreciendo el secuestro de estos en los linfonodos. Por otro lado los glucocorticoides tienen un efecto por sí mismo linfotóxico pudiendo provocar una hipoplasia linfoide y por consiguiente linfopenia.

En las variables monocitos y eosinófilos no se encontró diferencia significativa entre el control y ninguno de los grupos tratados con NF60 ( $P > 0.05$ ). Sin embargo, clínicamente la monocitosis (intervalo de referencia  $0 - 0.5 \times 10^9/L$ ) al día 90 de muestreo en los grupos D1 y D2 ( $0.6 \times 10^9/L$  en ambos casos), en conjunto con la neutrofilia se asocian con un proceso inflamatorio crónico. Esta monocitosis es un reflejo de la demanda de macrófagos en los tejidos, estos hallazgos coinciden con lo observado en el estudio histopatológico, con presencia de infiltrado inflamatorio en los órganos de la cavidad abdominal.

En la bioquímica clínica las bilirrubinas fueron los únicos dos analitos donde se observaron diferencias significativas ( $P < 0.05$ ) asociadas a los tratamientos, esto entre el control y los grupos D1 y D2 al día 90 de muestreo, sin embargo la diferencia con el grupo D2 está dada por un incremento en la concentración del grupo control. Clínicamente el grupo D3 presentó hiperbilirrubinemia ( $10.0 \mu\text{mol/L}$ , intervalo de referencia para la especie.  $1.5\text{-}7.2 \mu\text{mol/L}$ ) al día 45.

Estadísticamente la FA solo presentó diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre el grupo control y grupo D3 el día cero (antes de iniciar los tratamientos), además de las diferencias entre grupos, se observó diferencia significativa entre el día cero y los días 45 y 90 de muestreo en todos los grupos, sin embargo estas diferencias son independientes de la interacción tratamiento\*tiempo.

Clínicamente los incrementos de FA con respecto al intervalo de referencia en todos los grupos y en todos los días de muestreo, podría atribuirse principalmente a un incremento de la isoenzima ósea relacionada con la actividad osteoblástica debido a que los individuos aún se encontraban aun en crecimiento<sup>(69)</sup>.

Al evaluar la función renal, no se observaron alteraciones relevantes en las concentraciones de urea y creatinina en ninguno de los días de muestreo en ninguno de los grupos tratados con NF60.

En el urianálisis la única variable que mostró diferencia significativa entre el grupo control y los grupos con tratamiento fueron las proteínas, únicamente antes de iniciar los tratamientos. Clínicamente esta ligera proteinuria se atribuye a la presencia de espermatozoides en las muestras.

Los cambios macro (necropsias) y microscópicos (histopatología) encontrados en los grupos con tratamiento son compatibles con la presencia de una serositis en cavidad abdominal, ocasionada por la aplicación repetida del compuesto, que al parecer provoca una irritación localizada en las membranas serosas de los órganos de la cavidad abdominal (engrosamiento y fibrosis de las capsulas) y el peritoneo, provocando una respuesta inflamatoria de curso crónico, evidenciada

con la presencia de células inflamatorias principalmente células histiocíticas, linfocitos y neutrófilos.

La irritación crónica de las membranas serosas con su consiguiente inflamación y posterior fibrosis favorecen la formación de adherencias en la cavidad abdominal, provocando alteraciones en la distribución normal del tubo digestivo y la formación de pliegues anómalos que impiden el tránsito intestinal adecuado (íleo mecánico extraluminal). Por otro lado esta fibrosis también favorece la disminución de los movimientos peristálticos intestinales (íleo paralítico) lo que en conjunto provoca la acumulación de las heces en el tracto intestinal y su posterior impactación (íleo mecánico intraluminal). Esta obstrucción u oclusión intestinal, provoca la detención del contenido intestinal en algún punto a lo largo del tubo digestivo, dicha detención puede ser completa o parcial (sub oclusión intestinal). La obstrucción mecánica de intestino delgado, produce acumulación de líquidos y gases en la porción proximal de la obstrucción, lo que produce distensión del intestino, iniciada por la acumulación del líquido ingerido, secreciones digestivas y gas intestinal. Esta distensión se perpetúa, como consecuencia del aumento de secreción intestinal y la disminución de la absorción. Estos fenómenos dan como resultado un acumulo de líquidos en el intestino proximal a la obstrucción. Por otro lado hay una proliferación rápida de las bacterias intestinales, secundaria a la disminución en los movimientos peristálticos

Cuando en el curso de un proceso obstructivo, se altera la circulación normal hacia el intestino el aumento de la presión intraluminal del segmento afectado, puede superar la presión de los vasos submucosos y producir isquemia, perforación y peritonitis generalizada.

Con todos los resultados del estudio de toxicidad subcrónica se puede establecer que las alteraciones ocasionadas por la administración del compuesto NF60, se debieron a un efecto irritativo de este, sobre las membranas serosas. Por otro lado su administración por esta vía no parece ocasionar alteraciones a nivel hepático o renal en estos animales.

## **7.0 Evaluación de actividad antineoplásica *in vivo***

### **7.1 Objetivo Específico**

Evaluar la actividad antineoplásica del compuesto de coordinación de estaño NF60 en un modelo de xenotransplatación con la línea tumoral HCT-15 (adenocarcinoma de colon) en ratones desnudos nu/nu, a diferentes dosis y esquemas de tratamiento.

### **7.2 Metodología**

#### *Cultivo Celular*

La línea celular HCT-15 se proliferó en el laboratorio de cultivo celular de la UNEXA con 90% de medio DMEM (4.5 g/l glucosa, L glutamina y 110mg de piruvato de Na) suplementado con 10% suero fetal bovino, 1% de aminoácidos y 1% de antibiótico.

Las células se proliferaron efectuando 2 pases antes de la implantación en ratones desnudos nu/nu.

#### *Implantación del tumor*

Después de los pases correspondientes, se inocularon subcutáneamente  $1 \times 10^6$  células de carcinoma de colon HCT-15 en 30 ratones desnudos nu/nu, en el flanco izquierdo inferior de cada ratón. Los tratamientos se iniciaron cuando los tumores midieron entre 2.5- 4mm de diámetro, considerando el día de inicio de tratamiento como el día 0 del estudio. De los 30 individuos, en un total de 23 ratones la implantación fue exitosa (n=23).

## *Plan de Prueba*

### *Animales*

- 23 ratones desnudos nu/nu
- Peso: 20- 25g
- Sexo: Machos
- Alojamiento: Máximo 6 ratones en jaulas de polipropileno de 18.4x 29.2x 12.7cm, estériles con filtro de aire.

### *Fármacos*

- Tanto el NF60 como el cisplatino se disolvieron en 5% de DMSO y 95% de agua inyectable estéril.

Los animales fueron distribuidos aleatoriamente en 4 grupos:

#### **Control negativo(C-):**

- Ratones: 5
- Agua inyectable estéril
- Volumen: 0.3 ml
- Vía: intraperitoneal
- Medición de peso y VT: diario
- Esquema intermitente: días 0, 4 y 8

#### **Control positivo (C+):**

- Ratones: 6
- Cisplatino: 4.0 mg/kg
- Volumen: 0.3 ml
- Vía: intraperitoneal
- Medición de peso y VT: diario
- Esquema intermitente: días 0, 4 y 8

#### **Tratamiento Crónico NF60 (T.C)**

- Ratones: 6
- NF60: 2.8 mg/kg
- Volumen: 0.3 ml
- Vía: intraperitoneal
- Medición de peso y VT: diario
- Esquema crónico: días 0 al 8

## Tratamiento intermitente NF60 (T.I)

- Ratones: 6
- NF60: 8.5 mg/kg (ajuste a 6.0 mg/kg)
- Volumen: 0.3 ml
- Vía: intraperitoneal
- Medición de peso y VT: diario
- Esquema intermitente: días 0, 4, 8

## Evaluación

Todos los animales fueron pesados diariamente entre las 8:00 y 10:00 horas utilizando una balanza OHAUS SOCOUT PRO® previamente calibrada con una sensibilidad de 0.01-1.0 g y un rango de pesaje de 200 a 6000 g. Los tumores fueron medidos a lo largo y a lo ancho mediante el uso de un calibrador Vernier diariamente hasta la finalización del experimento (día 20). Posteriormente se calculó el volumen tumoral (VT) individual por día mediante el uso de la siguiente fórmula<sup>(71)</sup>:

$$VTmm^3 = (\text{Largo})(\text{Ancho}^2/2)$$

Utilizando las medias del VT de los días 0, 5, 10, 15 y 20 se determinó la inhibición del crecimiento tumoral (ICT) en cada uno de los días mencionados mediante el uso de la siguiente fórmula<sup>(72)</sup>:

$$ICT = \frac{(\text{VT control día } x - \text{VT control día } 0) - (\text{VT tx día } x - \text{VT tx día } 0) * 100}{\text{VT control día } x - \text{VT control día } 0}$$

De acuerdo con el NCI este índice debe ser menor a 42 para considerar al compuesto con actividad antineoplásica. Se considera una actividad antitumoral alta cuando el valor de ICT es menor a 10.

Con el peso promedio de cada uno de los grupos se calculó el porcentaje de pérdida de peso como indicador de toxicidad, utilizando la siguiente fórmula<sup>(72)</sup>:

$$\% \text{ de pérdida de peso} = \left[ \left( \frac{\text{peso al día 20}}{\text{peso al día 0}} - 1 \right) \right] * 100$$

Para que un ensayo se considere tóxico el porcentaje de pérdida de peso debe ser mayor a 20%<sup>(72)</sup>.

### **Estudio Histopatológico**

Posterior a la última medición (día 20) todos los animales fueron sacrificados mediante el uso de cámara de CO<sub>2</sub>.

Los tumores fueron disecados y preservados en formol amortiguado al 10 %. El procesamiento de las muestras se realizó mediante la misma metodología antes descrita para el estudio de toxicidad subcrónica.

Además de la descripción microscópica de cada tumor se determinó el índice mitótico tumoral. Este se obtuvo promediando el número de mitosis observadas por campo (40x) en 10 campos aleatorios. A su vez se obtuvo el índice mitótico por grupo promediando los índices mitóticos individuales.

### **Inmunohistoquímica (IHQ)**

En este trabajo se utilizó un método de detección indirecto mediante el sistema Biotina-Estreptavidina/Peroxidasa para la detección de marcadores de Ki67, p53, Caspasa 3 y Factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) en los tumores xenotransplantados.

Las preparaciones histológicas fueron cortadas en un micrótopo marca Leica y montadas en laminillas previamente tratadas con poli-lisina.

<b>Cuadro 24. Metodología IHQ</b>		
Paso	Procedimiento	Tiempo
Hidratación	Xilol (desparafinar), EtOH (100,96,80,70,60,50 %) agua destilada	Xilol-5 minutos, EtOH: 30 segundos cada uno A. destilada: 5 minutos
Desenmascaramiento	Recuperador antigénico comercial marca BIO SB® 1xpH 6.0. Olla de presión (120°C 15 libras presión).	15 minutos
Reposo	Sumergir las laminillas en agua fría	10 minutos
Lavado	Agua destilada	30 segundos
Bloqueo peroxidasa endógena	Peróxido de hidrogeno 0.9%	5 minutos
Lavado	PBST 1x (pH 7.6)	3 minutos
Bloqueo de proteínas	BSA al 1%	5 minutos
Anticuerpo primario (solo en problema)	Ki67, p53 y VEGF: BIO SB®. Caspasa 3: BIO VISION®	30 minutos
Lavado	PBST 1x (pH 7.6)	3 minutos
Anticuerpo biotinilado	Temperatura ambiente	15 minutos
Lavado	PBST 1x (pH 7.6)	3 minutos
Estreptividina-peroxidasa	Temperatura ambiente	15 minutos
Lavado	PBST 1x (pH 7.6)	3 minutos
Revelado	Diaminobencidina Temperatura ambiente	Monitoreo al microscopio
Lavado	Agua corriente	--
Tinción de contraste	Hematoxilina de Hill	5 minutos
Degradación de color	Hidróxido de amonio	30 segundos
Lavado	Agua corriente	--
Secado	Temperatura ambiente	24 horas
Montar y cubrir	Cubreobjetos y resina sintética	--
Observar al microscopio		

Posteriormente se determinó el porcentaje de positividad mediante el uso del programa computacional IMAGE J. También se evaluó la intensidad de la reacción considerando los siguientes parámetros: 0+= ausencia de reacción, 1+ reacción débil, 2+= reacción moderada, 3+= reacción fuerte

### **Análisis estadístico**

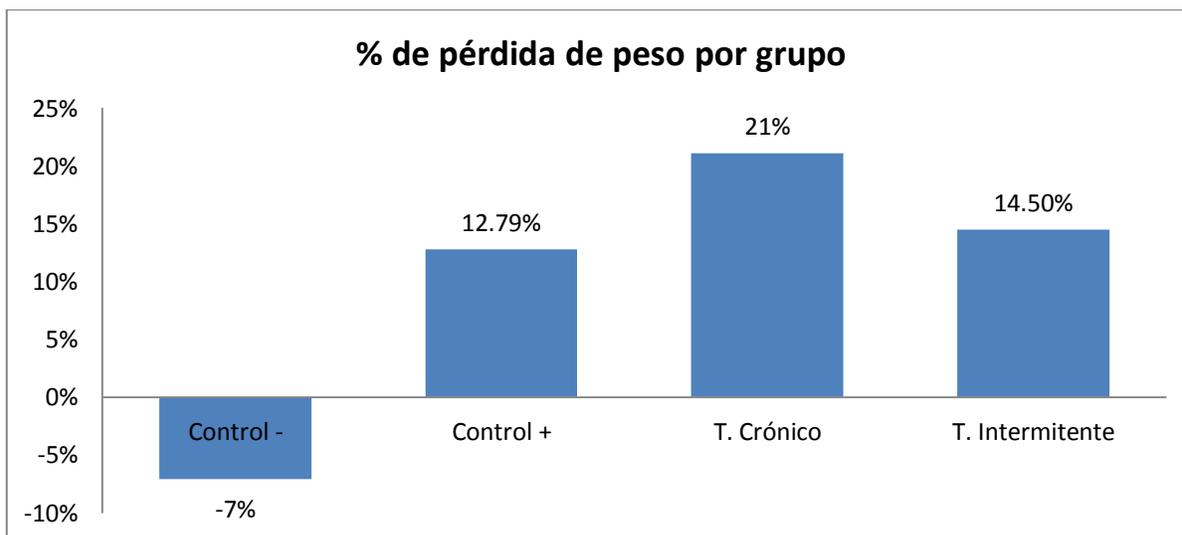
Para determinar si existía o no una asociación entre los distintos esquemas de tratamiento con el volumen tumoral en los distintos grupos se utilizó la prueba de razón de verosimilitud de ji cuadrado basado en la teoría de máxima verosimilitud mediante el método de modelos lineales generalizados (GLMZ). Esta prueba contrasta la hipótesis de independencia de variables (H0), frente a la hipótesis alternativa (HA) de que una variable respuesta se distribuye de modo diferente

para distintos niveles de la variable explicativa. En todos los casos el nivel de significancia establecido fue de 0.05.

Las comparaciones entre grupos, en cuanto al índice mitótico y porcentaje de positividad en la IHQ se realizaron mediante un análisis de varianza de un solo factor (ANOVA).

### 7.3 Resultados

Se determinó el porcentaje de pérdida de peso en cada grupo al finalizar el estudio con respecto al peso que presentaron los animales antes de la primera aplicación de los tratamientos. El único grupo que no presentó pérdida de peso durante el estudio fue el control negativo. Por otro lado el único grupo que sobrepasó el límite de toxicidad del 20 % en la pérdida de peso fue el grupo tratado con NF60 tratamiento crónico (gráfica 5)



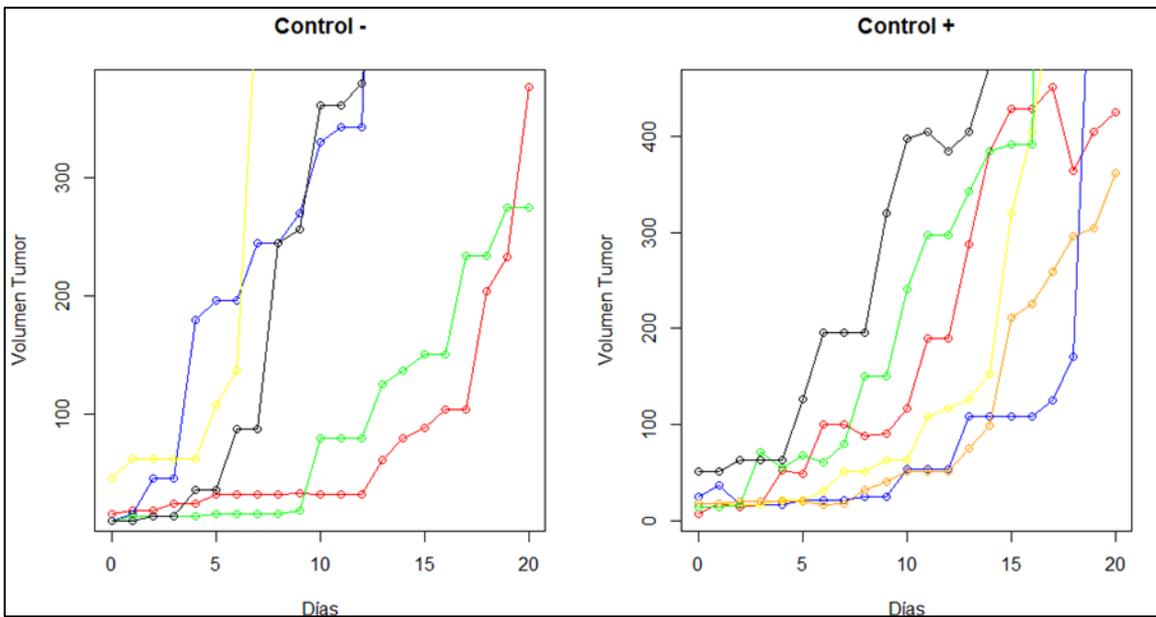
**Gráfica 5.** El único grupo sin pérdida de peso fue el control negativo. El grupo con mayor porcentaje de pérdida de peso fue el tratado con NF60 en esquema crónico.

Estadísticamente se encontró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre todos los grupos, de igual forma en la razón de verosimilitud se rechazó la hipótesis nula de independencia por lo que las diferencias pueden atribuirse a los distintos esquemas de tratamiento.

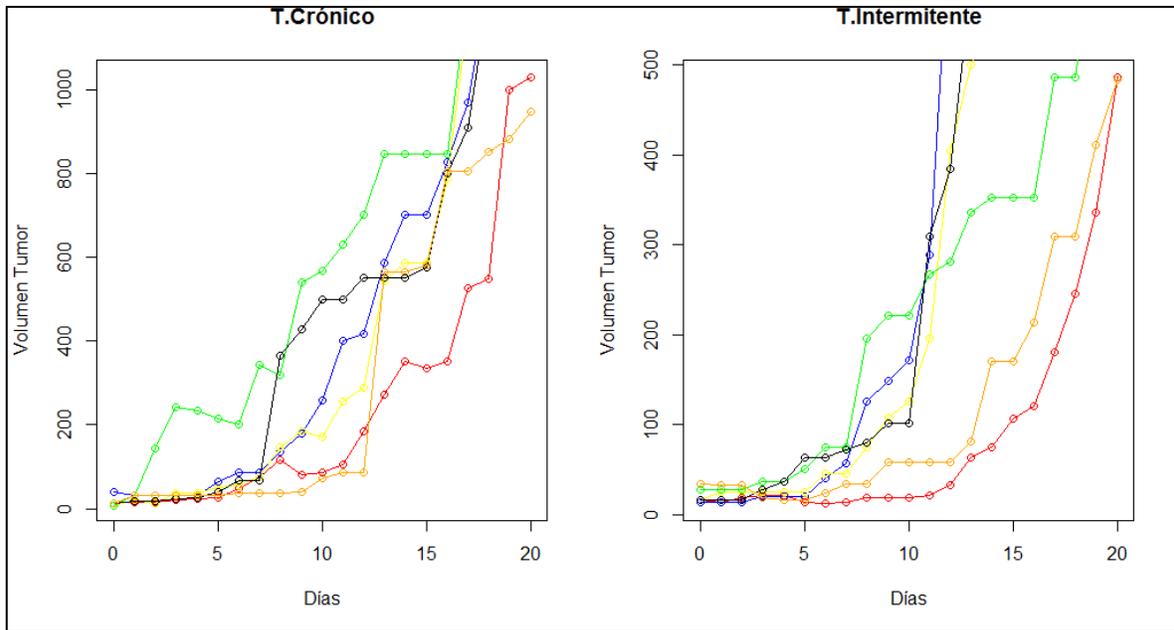
Cuadro 25. Comparación entre grupos (peso semanal promedio)							
Comparación por pares							Razón de verosimilitud de ji cuadrado Tratamiento*tiempo
Variable dependiente	C-/C+	C-/T.C	C-/T.I	C+/T.C	C+/T.I	T.C/T.I	
Peso	+	+	+	+	+	+	+
(-- ) P>0.05, (+) P<0.05, (+)							
Se observó diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos del estudio.							

### Inhibición del crecimiento tumoral

En las gráficas 6 y 7 podemos observar la distribución del VT por individuo en cada uno de los grupos del estudio.



**Gráfica 6.** Se observa el crecimiento tumoral en cada uno de los animales con respecto al tiempo. Control negativo (agua destilada), Control positivo (cisplatino 4.5 mg/kg)



**Gráfica 7.** Se observa el crecimiento tumoral en cada individuo con respecto al tiempo. NF60 esquema crónico (4.5 mg/kg), NF60 esquema intermitente (6.5 mg/kg).

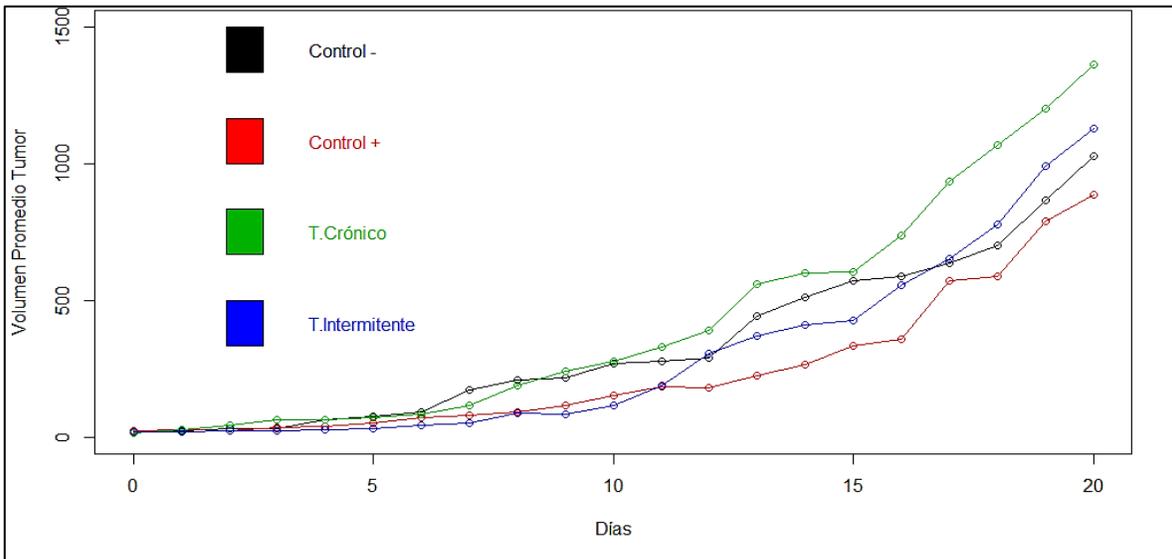
En el cuadro 26 se muestran las medias del VT de todos los grupos para los días 0, 5, 10, 15 y 20 del estudio, a partir de las cuales, mediante la fórmula antes mencionada se calculó el índice de Inhibición del crecimiento tumoral en cada uno de estos días (cuadro 27).

<b>Cuadro 26. Medias del volumen tumoral por grupo y día de medición (mm<sup>3</sup>)</b>				
Día de muestreo	Grupo			
	Control -	Control +	T. crónico	T. Intermitente
Día 0	17.88 ± 7.02 a	21.93 ± 6.20 a	15.93 ± 5.03 a	20.36 ± 3.41 a
Día 5	77.45 ± 33.63 a	50.93 ± 17.05 b	72.06 ± 29.32 a	31.17 ± 8.31 b
Día 10	270.66 ± 95.62 a	153.54 ± 56.94 b	276.05 ± 86.18 a	116.68 ± 30.20 b
Día 15	572.30 ± 200.61 a	334.95 ± 64.65 b	604.43 ± 68.73 a	425.25 ± 107.13 a
Día 20	1026.54 ± 311.20 a	885.75 ± 213.97b	1362.61 ± 125.56c	1128.33 ± 289.03a

Literales diferentes denotan diferencia significativa (P<0.05) entre los distintos grupos en cada uno de los días de muestreo.

<b>Cuadro 27. Índice de Inhibición del Crecimiento Tumoral</b>			
Día de muestreo	Grupos		
	Control +	T. crónico	T. Intermitente
Día 5	48.68	94.23	<b>18.15</b>
Día 10	52.07	102.90	<b>38.10</b>
Día 15	56.46	106.15	73.03
Día 20	85.64	133.51	109.85

Valor < a 42 se considera con actividad antineoplásica (NCI).



**Gráfica 8.** Volumen tumoral promedio por grupo y día medición. Hasta el día 10 del estudio el grupo que presenta un menor crecimiento tumoral es aquel tratado con NF60 a esquema intermitente. Por el contrario el grupo tratado con NF60 en esquema crónico es aquel que durante todo el estudio presentó un volumen tumoral promedio mayor.

Al comparar el VT promedio de cada grupo, encontramos que el único grupo que no presentó diferencia significativa ( $P > 0.05$ ) con respecto al control negativo fue el tratado con NF60 en esquema intermitente (Cuadro 28). Sin embargo, si analizamos los datos obtenidos hasta el día 10 del estudio (2 días posteriores a la última administración) si existe diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre estos grupos (cuadro 29).

<b>Cuadro 28. Comparación por Grupos del VT al finalizar el estudio</b>						
	Comparación por pares					
	C-/C+	C-/T.C	C-/T.I	C+/T.C	C+/T.I	Razón de verosimilitud de ji cuadrado Tratamiento*Tiempo
Volumen Tumoral	+	+	--	+	+	+
(-- ) $P > 0.05$ , (+) $P < 0.05$						

<b>Cuadro 29. Comparación por Grupos del VT al día 10 del estudio</b>						
	Comparación por pares					
	C-/C+	C-/T.C	C-/T.I	C+/T.C	C+/T.I	Razón de verosimilitud de ji cuadrado Tratamiento*Tiempo
Volumen Tumoral	+	--	+	+	--	+
(-- ) $P > 0.05$ , (+) $P < 0.05$						

Por otro lado los tumores que presentaron una menor tasa de crecimiento durante el estudio fueron los tratados con NF60 esquema intermitente (cuadros 30 y 31).

<b>Cuadro 30. Tasas de Crecimiento Tumoral por Grupo al día 20</b>			
<b>Grupos</b>			
Control -	Control +	T. Crónico (NF60)	T. Intermitente (NF60)
24.19 %	22.37 %	30.35 %	20.01 %

<b>Cuadro 31. Tasas de Crecimiento Tumoral por Grupo al día 10</b>			
<b>Grupos</b>			
Control -	Control +	T. Crónico (NF60)	T. Intermitente (NF60)
30.08 %	19.51 %	32.11 %	12.44 %

### **Necropsias**

El hallazgo macroscópico más evidente fue una ictericia generalizada en todos los grupos con excepción del control negativo, como se mencionó anteriormente esto correspondería con un efecto tóxico importante a nivel hepático o hemolítico. Otro hallazgo con gran relevancia en cuanto a la actividad antineoplásica del compuesto, fue la diseminación del tumor en toda la cavidad abdominal en los ratones 1, 2, 4 y 5 del control negativo (imagen 6), en los ratones 6 y 10 del control positivo y únicamente en los ratones 17 y 22 de los grupos tratados con NF60 tratamientos crónico e intermitente respectivamente.



Imagen 6. Diseminación en cavidad abdominal con metástasis a hígado e intestino en el grupo sin tratamiento.

### **Estudio Histopatológico**

En todos los casos se observó un mismo patrón, con tumores encapsulados o parcialmente encapsulados con tejido conectivo y en algunos casos presencia de vasos sanguíneos de neo formación, células dispuestas en mantos solidos

sostenidas por fino estroma fibrovascular, dichas células eran poliédricas con citoplasma de bordes mal definidos, ligeramente eosinofílico y granular, con núcleos pleomórficos de cromatina fina granular y 2 a 3 nucleolos evidentes, anisocitosis y anisocariosis , así como presencia de múltiples figuras mitóticas atípicas por campo. Las diferencias más importantes entre grupos fueron las siguientes:

- Zonas más amplias de necrosis, con un patrón multifocal coalescente, más extensas en el grupo control negativo que en los grupos con tratamiento.
- Células neoplásicas infiltrando músculo esquelético y tejido adiposo con presencia de células inflamatorias en el grupo control negativo.
- Zonas más amplias compatibles con apoptosis (presencia de cuerpos apoptóticos,) en los grupos con tratamiento.
- Múltiples áreas de apoptosis con un patrón centro zonal que van del estroma fibrovascular hacia las células neoplásicas, este patrón se observó con mayor frecuencia en el grupo con tratamiento intermitente.

### Índice Mitótico

En cuadro 32 se muestra el índice mitótico promedio por grupo, no se encontró diferencia significativa entre ninguno de los grupos del estudio ( $P > 0.05$ ).

<b>Cuadro32. Índice mitótico promedio por grupo</b>			
Control -	Control +	T. Crónico (NF60)	T. Intermitente (NF60)
7.5 a	5.67 a	5.33 a	5.00 a

Literales diferentes denotan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los distintos grupos

### Inmunohistoquímica

Los resultados de la IHQ se muestran en el cuadro 33, en todos los marcadores se encontró diferencia significativa entre los distintos grupos ( $P < 0.05$ ), con excepción del control positivo y el grupo tratado con NF60 en esquema intermitente en el caso del marcador VEGF.

<b>Cuadro 33. Resultados del estudio inmunohistoquímica</b>			
Marcador	Grupo	% Positividad	Intensidad
Ki-67	Control negativo	71.6 a	3+
	Control Positivo	44.5 b	3+
	T. Crónico	88.6 c	3+
	T. Intermitente	59.3 d	3+
p53	Control negativo	35.4 a	3+
	Control Positivo	15.7 b	3+
	T. Crónico	69.2 c	3+
	T. Intermitente	17.1 d	3+
Caspasa 3	Control negativo	5.2 a	2+
	Control Positivo	7.9 b	2+
	T. Crónico	4.3 c	2+
	T. Intermitente	6.5 d	2+
VEGF	Control negativo	20 vasos/campo (a)	2+
	Control Positivo	30 vasos/campo (b)	2+
	T. Crónico	35 vasos/campo (b)	2+
	T. Intermitente	30 vasos/campo (c)	2+

Literales diferentes denotan diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) entre los distintos grupos para cada uno de los marcadores determinados.

## 7.5 Discusión

Según los protocolos del *Cáncer Chemotherapy National Service Center*, para que un compuesto se considere con actividad antineoplásica el índice de inhibición del crecimiento tumora (ICT) debe ser menor a 42. El único grupo que cumplió con este parámetro fue el tratado con el compuesto NF60 en esquema intermitente, a dosis de 6.5 mg/kg los días 5 y 10 de medición. La estadística muestra que si comparamos los grupos con el total de los datos, no encontramos diferencia estadísticamente significativa entre el control y el tratamiento intermitente con NF60, sin embargo al realizar este mismo análisis utilizando únicamente los datos obtenidos hasta el día 10, es decir dos días posteriores a la última dosis administrada del compuesto, la actividad antineoplásica del NF60 a dosis de 6.5 mg/kg esquema intermitente se manifiesta con diferencia significativa con respecto al control negativo, por otro lado este mismo grupo fue el que mostró una menor tasa de crecimiento.

Posterior al día 11 el compuesto con una mejor actividad es el cisplatino lo que concuerda con los resultados de la IHQ ya que este grupo mostró un menor porcentaje de positividad a Ki67, esto podría relacionarse probablemente con el

tiempo de vida media de los compuestos y hace suponer que probablemente la vida media del NF60 sea menor que la del cisplatino. Cuando el cisplatino alcanza el pico de concentración plasmática, tiene una vida media de aproximadamente 30 minutos en plasma, sin embargo se ha demostrado que cierta porción del compuesto se une a proteínas plasmáticas incrementado su vida media hasta en 7 días.

Por su parte, el grupo al cual se le aplicó el tratamiento crónico de NF60 fue el que mostró menor actividad antineoplásica durante todo el estudio y el que tuvo una mayor tasa de crecimiento. Esto puede explicarse mediante la aplicación del concepto de “intensidad de dosis”, que plantea que los mismos fármacos administrados con distinta intensidad de dosis y diferentes periodos de tiempos entre ellos o con alternancia en su aplicación, conllevan diferencias importantes en tasas de respuesta y supervivencia, incluso la aplicación de dosis sub umbrales pueden favorecer el crecimiento tumoral ya que este se enriquece con subclones más resistentes y mejor adaptados, esto también explicaría por qué, una vez que se dejó de aplicar el NF60 en el grupo intermitente el crecimiento del tumor se aceleró.

Hay que mencionar que la diseminación del tumor en cavidad abdominal de prácticamente todos los animales sin tratamiento causó una subestimación del VT de este grupo ya que todas estas masas intracavitarias no pudieron ser medidas durante el estudio y por lo tanto no forman parte del análisis. Por otro lado la ausencia de diseminación en ambos grupos tratados con NF60 (con excepción de 2 individuos), sugeriría que al parecer el compuesto NF60 cuenta con actividad antimetastásica independientemente de la dosis y la frecuencia de administración utilizada. Como se mencionó en la introducción el proceso metastásico es complejo y requiere de distintas alteraciones tanto celulares como del medio extracelular para llevarse a cabo, por lo que poder determinar si efectivamente el compuesto inhibe este proceso requiere de estudios más detallados para poder confirmarlo. Otra explicación de este hallazgo se relaciona directamente con la vía de administración utilizada. En la actualidad uno de las técnicas más efectivas

para tratar la diseminación tumoral intraperitoneal en tumores intracavitarios o de localización pélvica, consiste en la aplicación de dosis altas de quimioterapia regional en perfusión hipertérmica posterior a la cirugía. El principio de esta técnica está basado en que debido a la presencia de la barrera peritoneo-plasmática, las sustancias de alto peso molecular como mitomicina C, 5-fluorouracilo, cisplatino o doxorubicina, permanecen largo tiempo dentro del abdomen antes de su eliminación a través de la sangre, lo que las hace especialmente indicadas en esta modalidad terapéutica<sup>(73; 74)</sup>. Esto podría explicar la ausencia de diseminación intracavitaria en los grupos con tratamiento, efecto que no fue observado en el control negativo.

Lo observado en la IHQ respalda en gran medida los resultados antes mencionados, a continuación se explican con más detalle cada uno de estos.

#### ➤ **Ki-67**

De manera general los altos porcentajes de expresión de la proteína Ki67 se ha relacionado con la presencia de tumores poco diferenciados, de gran tamaño, recurrencia temprana y pobre supervivencia<sup>(75)</sup>. El volumen tumoral promedio de cada uno de los grupos se correlacionó con la expresión de este marcador, como se mencionó anteriormente el grupo con mayor volumen tumoral, mayor tasa de crecimiento y porcentaje más alto de expresión de Ki67 fue aquel tratado con NF60 esquema crónico, por otro lado el grupo que mostró un menor porcentaje de expresión de Ki67 fue el grupo tratado con cisplatino seguido del grupo al que se le administró NF60 en esquema intermitente, siendo este último el que tuvo un índice mitótico promedio más bajo y tasas de crecimiento menores. Con estos resultados se demuestra que a dosis adecuadas el compuesto NF60 tiene efecto antiproliferativo sobre la línea celular HCT-15 de adenocarcinoma de colon.

Hay que mencionar que los datos más consistentes para un valor pronóstico negativo de un alto porcentaje de Ki-67 se han reportado en cáncer de mama, cáncer de pulmón, y sarcomas (Baak et al; 2009). Sin embargo en cáncer colorrectal, los datos son contradictorios. Varios estudios han informado de ningún

valor pronóstico de la expresión de Ki-67 (Padilla et al; 2012). Mientras que otros reportaron un valor pronóstico negativo de un alto porcentaje de Ki-67 después de la resección curativa y quimioterapia para cáncer colorrectal (Kimura et al; 2000). Estudios mas recientes mencionan que pacientes con cáncer de colon en etapa II y III, tratados con cirugía con o sin quimioterapia adyuvante, y con un alto porcentaje de Ki67 mostraron un mejor resultado que aquellos con un porcentaje menor (Fluge et al, 2009).

Debido a esto, el valor pronóstico y predictivo de este marcador en este tipo de cáncer en particular, está en discusión por la falta de homogeneidad en los diferentes resultados reportados <sup>(76; 77)</sup>.

### ➤ **p53**

La proteína normal del gen TP53 tiene una vida media de 15 a 20 min, esto determina que en condiciones normales no pueda ser detectada inmunohistoquímicamente. Sin embargo, al mutar el gen se produce una proteína defectuosa que no puede ser degradada acumulándose por aumento de su vida media, permitiendo de esta manera su inmunodetección <sup>(78)</sup>. El 60 % de los casos de carcinoma de colon presentan mutaciones puntuales en el gen p53 <sup>(78)</sup>. En este estudio se observó un porcentaje de positividad mayor (>50%) en el grupo control negativo en comparación con los grupos con tratamiento, en pacientes humanos Padilla et al 2012 reportan un rango de positividad para p53 en este tipo de cáncer entre 47 y 80% con una media de 63%. Diversos estudios han reportado asociación directa entre el porcentaje de positividad a p53 con el tamaño tumoral, grado de infiltración del tumor y en general un peor pronóstico <sup>(79; 80; 78)</sup>. En este trabajo los ratones tratados con una dosis menor de NF60 fueron los que mostraron un mayor porcentaje de positividad a p53, respaldando la teoría de que las clonas más resistentes con mutaciones en el gen p53 y con mayor capacidad de proliferación fueron las que lograron sobrevivir a estas dosis “subumbrales” del compuesto viéndose esto reflejado en un mayor VT promedio.

Hay que mencionar que si bien de manera general la inmunotinción de p53 se considera como un marcador indirecto de mutación, en algunas publicaciones no se ha demostrado una estricta relación entre la expresión inmunohistoquímica y mutación del gen ya que algunos cambios genéticos de p53 no se traducen forzosamente en la sobreexpresión de p53, y al contrario, la expresión positiva de p53 puede ocurrir en ausencia de mutaciones de p53 <sup>(81; 82)</sup>.

### ➤ **Caspasa 3**

La caspasa más prevalente en la célula es la caspasa-3, está es la responsable de la mayoría de los efectos apoptóticos junto con la caspasa-6 y la caspasa-7 <sup>(83)</sup>. La determinación de la expresión de caspasa 3 por medio de inmunohistoquímica es una forma de estimar el nivel de apoptosis en un tejido. La alta actividad de la caspasa-3 se correlaciona significativamente con un mayor riesgo de recurrencia y mayor capacidad de infiltración del tumor <sup>(84)</sup>, por otro lado los niveles bajos de caspasa 3 pos tratamiento se relacionan con una mejor respuesta a la quimo y radioterapia. Esto se debe a que la caspasa 3, sirve como un vínculo directo entre la muerte celular y la repoblación tumoral, se ha propuesto que las células apoptóticas estimulan una llamada "proliferación compensatoria" para regeneración de tejido <sup>(85)</sup>. Los mecanismos implicados en esas circunstancias no son del todo claros, sin embargo se propone la estimulación de la producción de factores de crecimiento como la prostaglandina E2. Otras investigaciones más recientes vinculan una alta expresión de caspasa-3 con un mejor pronóstico. Esta discrepancia puede deberse a que el gen que codifica para la caspasa 3 puede dar lugar a una proteína variante conocida como la caspasa-3s, que tiene efecto antiapoptótico. La Co-expresión de la caspasa-3 y su variante se ha encontrado en diversas líneas de células tumorales <sup>(83)</sup>.

Según lo reportado por Huang et al; 2011, en la actualidad, el papel de la caspasa-3 en la formación/ progresión del tumor y la sensibilidad del tumor al tratamiento aún no está del todo clara.

En este estudio se observó en todos los casos que la expresión de caspasa 3 fue baja, siendo el grupo con menor porcentaje el grupo con tratamiento crónico (NF60) esto concuerda con los resultados del marcador p53 ya que las células de estos tumores con un p53 mutado no llevaran a cabo el proceso de apoptosis en caso de un daño en su ADN, viéndose esto reflejado en la menor expresión de caspasa 3. Por el contrario los animales tratados con cisplatino (Control positivo) y NF60 (esquema intermitente), mostraron un menor porcentaje de p53 mutado y por consiguiente una mayor expresión de caspasa 3. Sabemos que el cisplatino induce la muerte celular al interaccionar con el ADN de las células neoplásicas, esto nos hace suponer que tal vez el mecanismo de acción del NF60 sea la inducción de la apoptosis provocado por un daño o alteración sobre la cadena de DNA.

#### ➤ **Factor de Crecimiento Endotelial Vascular (VEGF)**

La evidencia de los estudios preclínicos y clínicos indica que el VEGF es el factor angiogénico predominante en el cáncer de colon humano y se asocia con la formación de metástasis y mal pronóstico<sup>(86)</sup>.

Tanigawa et al; 1997, observaron que un recuento alto (>50/campo 400x) de microvasos se correlacionó significativamente con metástasis hematológica<sup>(87)</sup>. Del mismo modo, Ishigami et al; 1998, et al demostraron que la alta expresión de VEGF se correlacionó significativamente con la profundidad de la infiltración del tumor, metástasis a hígado, y linfonodos<sup>(88)</sup>. De manera general la expresión de VEGF se relaciona con la progresión, invasión y metástasis en cáncer de colon.

En este trabajo no se encontró una alta expresión de VEGF en ninguno de los grupos (< 50 promedio vasos/campo 400x).

En cuanto a la presencia de metástasis Tanigawa et al; 1997, demostraron que el aumento de los recuentos de microvasos se correlacionaron significativamente con la metástasis hematológica en pacientes humanos con cáncer colorrectal, otros estudios reportan que con un conteo de microvasos <50 en el tumor primario, 45

% de los pacientes presentaron metástasis a linfonodos regionales, 15 % metástasis hematológica y en ninguno de los casos se observó metástasis a cavidad peritoneal <sup>(89)</sup>. Tomando esto como base y partiendo del hecho de que el tumor xenotrasplantado se implantó subcutáneamente en el área inguinal, parece ser que la administración del compuesto logró inhibir el crecimiento y la proliferación de las células tumorales en la cavidad peritoneal, sin embargo no hay evidencia que sugiera que la administración del compuesto interfiere con la angiogénesis tumoral.

## 8.0 Conclusiones

- El compuesto de coordinación de estaño NF60 presentó una gran actividad antineoplásica *in vitro* sobre la línea tumoral murina Melanoma B16F10, superando por mucho la efectividad de los compuestos utilizados como controles (ciclofosfamida y 5-fluorouracilo) así como la del cisplatino de acuerdo con los valores reportados en estudios previos.
- La actividad mostrada por el compuesto en los estudios *in vitro* sobre la línea murina, se vio reflejada en el estudio *in vivo* sobre la línea tumoral HCT15, ya que con el esquema de administración intermitente (0,4,8) a dosis de 6.5 mg/kg, se logró inhibir el crecimiento tumoral durante el periodo de administración cumpliendo con los estándares exigidos por el NCI para determinar actividad antineoplásica de un compuesto. Este efecto inhibitorio se manifestó con la presencia de un menor índice mitótico y menor expresión del marcador de proliferación celular Ki67.
- Los efectos toxicológicos a largo plazo en la rata no parecen ser tan severos como podría esperarse en un compuesto con tal actividad citotóxica ya que no se encontró evidencia de toxicidad a nivel hepático ni renal, en ninguna de las dosis estudiadas en ratas Wistar, sin embargo es necesario realizar estudios de toxicidad en otra especie no roedores.

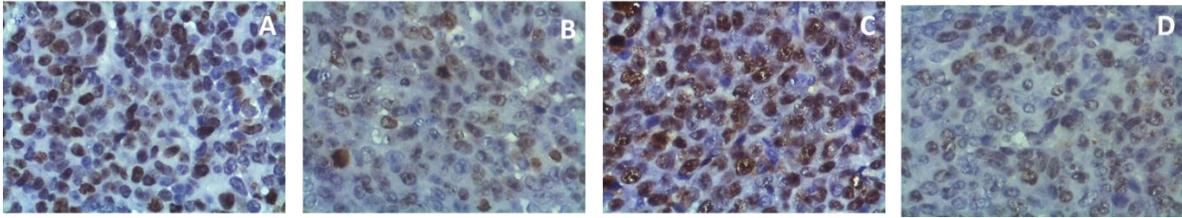
- Los resultados obtenidos en este trabajo son prometedores por lo que se recomienda la realización de estudios más específicos sobre el compuesto (administración, distribución, metabolismo, excreción y mecanismo de acción), así como continuar con ensayos de actividad antineoplásica y toxicidad utilizando distintas especies, esquemas de tratamiento, vías de administración y líneas celulares.

## ANEXO 1

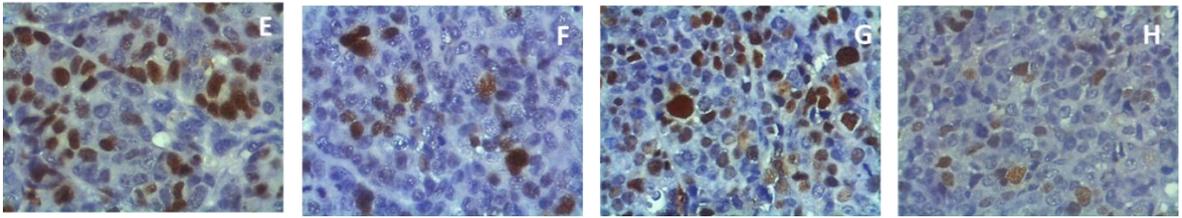
<b>Intervalos de Referencia del hemograma para ratas Wistar machos</b>	
Hematocrito	0.45-0.52 L/L
Hemoglobina	137-200 g/L
Eritrocitos	6.5-9.6 x 10 <sup>12</sup> /L
VGM	51-70 FL
CGMH	306-413 g/L
Plaquetas	474-1177 x 10 <sup>9</sup> /L
Sólidos T.	45-85 g/L
Leucocitos	6.6-20.3 x 10 <sup>9</sup> /L
Neutrófilos	0.4-2.6 x 10 <sup>9</sup> /L
Linfocitos	6.1-18 x 10 <sup>9</sup> /L
Monocitos	0-0.5 x 10 <sup>9</sup> /L
Eosinófilos	0-0.3 x 10 <sup>9</sup> /L

<b>Intervalos de referencia bioquímica clínica para ratas Wistar machos</b>	
Urea	2.5-11.3 mmol/L
Creatinina	35.4-132.6 µmol/L
ALT	34-83 U/L
FA	170-309 U/L
B.T	1.5-7.2 µmol/L
B.D	--

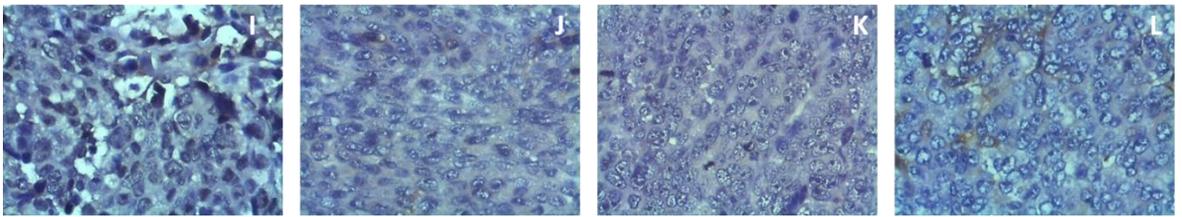
## ANEXO 2



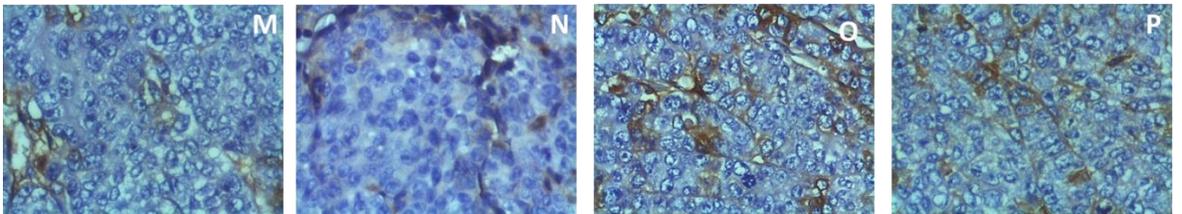
Resultados IHQ Ki67: A (control negativo), B (control positivo cisplatino), C (NF60 esquema crónico), D (NF60 esquema intermitente).



Resultados IHQ p53: E (control negativo), F (control positivo cisplatino), G (NF60 esquema crónico), H (NF60 esquema intermitente).



Resultados IHQ Caspasa 3: I (control negativo), J (control positivo cisplatino), K (NF60 esquema crónico), L (NF60 esquema intermitente).



Resultados IHQ VEGF: M (control negativo), N (control positivo cisplatino), O (NF60 esquema crónico), P (NF60 esquema intermitente).

## BIBLIOGRAFÍA

1. **INSTITUTO NACIONAL DE ESTADÍSTICA Y GEOGRAFÍA (INEGI)**. Estadísticas a propósito del día mundial del cáncer. [En línea] INEGI, 2012. [Citado el: 20 de DICIEMBRE de 2013.] <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/>.
2. **MORTON LT, MOORE JA**. Cronology of medicine and related science. s.l. : Med Hist. 1998 October; 42(4): 541–542.
3. *The history of cancer*. **THE AMERICAN CANCER SOCIETY**. 2005.
4. **INSTITUTO NACIONAL DEL CANCER**. Instituto Nacional del cancer de los institutos nacionales de salud de los EE.UU. [En línea] [Citado el: 20 de octubre de 2013.] <http://www.cancer.gov/espanol/cancer/que-es>.
5. **STRICKER TP, KUMAR V**. Neoplasias. [aut. libro] - Fausto N. Aster J. Kumar V. Abbas A. *Patología estructural y funcional*. 8va. Madrid : Elsevier, 2010, 7.
6. **WILLIS R**. The Spread of Tumor in the Human Body. Londres : s.n., 1952.
7. **MORGAN D et al**. The cell cycle. [aut. libro] JONSHON A, LEWIS J, ROBERTS K, WALTER P ALBERTS B. *Molecular biology of the cell*. 5ta. New York : Garland Science, 2008, 17.
8. **REED SI**. Ratchets and clocks: the cell cycle, ubiquitylation and protein turnover. s.l. : Nature Reviews Molecular Cell Biology 4, 855-864 (November 2003).
9. **SHAFER KA**. The cell cycle: a review. s.l. : Vet Pathol. 1998;35(6):461-78.
10. **OSORIO G, ALARCON G, MAJLIS A**. Quimioterapia antineoplásica en hematología. [aut. libro] GUIDO OORIO G. *Hematología diagnóstico y terapéutica*. tercera. s.l. : Mediterraneo, 2008, 44, págs. 625-635.
11. **VERMEULEN K, VAN BOKSTAELE DR, BRENEMAN ZN**. The cell cycle:a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. s.l. : Cell Prolif. 2003 Jun;36(3):131-49.
12. **GORDON DJ, BARBIE DA, D"ANDREA DD, PELLMAN D**. Mechanism of genomic instability. [aut. libro] HELLMAN TS, ROSENBERG SA DeVITA VT. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 9na. Philadelphia : LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2011, 2.
13. **LARA PC, NAVARRO D, SAEZ M**. Genética del Cancer. s.l. : Biocancer, 2004.
14. **WANG YZ, WONG YC**. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Cancer: A Review. s.l. : Urol Oncol. 2007 ;3(2):41-6.

15. **MURRAY RK.** Cancer, genes cancerígenos y factores de crecimiento. [aut. libro] Bioquímica de harper. *MURRAY RK, GRANNER DK, MAYES PA, RODWELL VW.* 15a. México D.F : Manual Moderno, 2000, 62.
16. **HARBERT N, et al.** Mechanism of cell communication. [aut. libro] JONSHON A, LEWIS J, ROBERTS K, WALTER P ALBERTS B. *Molecular biology of the cell.* 5ta. New York : Garland Science, 2011.
17. **WEINBERG RA.** Cellular Oncogenes. [aut. libro] WEINBERG RA. *The biology of Cancer.* New York : Garland Science, 2007, 4.
18. **HERNANDEZ M M, HERNANDES RA.** ONCOGENES Y CÁNCER. s.l. : Rev Cubana Oncol 1999;15(2):131-9.
19. **CROCE CM.** Oncogenes and Cancer. s.l. : N Engl J Med 2008; 358:502-511.
20. **MALUMBRES M, BARBACID M.** RAS oncogenes: the first 30 years. s.l. : Nat Rev Cancer. 2003 Jun;3(6):459-65.
21. **CANTLEY LC, CARPENTER CL, HABN WC, MEYERSON M.** Cell Signaling Growth Factors and their receptors. [aut. libro] HELLMAN TS, ROSENBERG SA DeVITA VT. *Cancer: Principles & Practice of Oncology.* Philadelphia : LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2011, 5.
22. **COLE DM, HENRRIKSON M.** 25 years of the c-Myc oncogene. s.l. : Seminars in Cancer Biology 16 (2006) 241.
23. **ATTARDI L, et al.** Cancer. [aut. libro] JONSHON A, LEWIS J, ROBERTS K, WALTER P ALBERTS B. *Molecular biology of the cell.* 5. New York : Garland science, 2011, 20.
24. **KNUDSON AG.** Antioncogenes and human cancer. s.l. : Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 December 1; 90(23): 10914–10921.
25. **GIACINTI C, GIORDANO A.** RB and cell cycle progression. s.l. : Oncogene (2006) 25, 5220–5227.
26. **CLASSON M, HARLOW E.** The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. Masachusets : Nat Rev Cancer. 2002;2(12):910-7.
27. **HOFSETH LJ, PERWEZ H S, CURTIS HC.** p53: 25 years after its discovery. s.l. : Trends Pharmacol Sci. 2004 Apr;25(4):177-81.
28. **WEINBERG RA.** p53 and apoptosis: Master guardian and executioner. [aut. libro] WEINBERG RA. *The biology of Cancer.* New York : Garland Science, 2007.
29. **SOSA RD, BRANDAN N, JEREZ J.** *Catedra bioquímica: Apoptosis.* Corrientes. Argentina : universidad nacional del noreste, 2012.

30. **KARANTZA V, WHITE E.** Mechanism of cell death. [aut. libro] HELLMAN TS, ROSENBERG SA DeVITA VT. *Cancer: Principles & Practice of Oncology*. 9na. Philadelphia : LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS, 2011, 7.
31. **WANG X, et al.** Apoptosis. [aut. libro] JONSHON A, LEWIS J, ROBERTS K, WALTER P ALBERTS B. *Molecular biology of the cell*. 5a. New York : Garland Science, 2011, 18.
32. **HAIL N, CARTER BZ, KONOPLEVA M. ANDREFF M.** Apoptosis effector mechanisms: A requiem performed. s.l. : Apoptosis. 2006 Jun;11(6):889-904.
33. **LLAMBI F, GREEN DR.** Apoptosis and oncogenesis: give and take in the BCL-2 family. s.l. : Curr Opin Genet Dev. 2011 Feb;21(1):12-2.
34. **FORONDA M, DONANTE LE, BLASCO MA.** *Importancia de los telomeros y la telomerasa en cancer, envejecimiento y medicina regenerativa*. Madrid : centro nacional de investigaciones oncológicas, 2010.
35. **KEWEIA KA, KUNGA Y, SALARI K, HOLCOMBA IL, POLLACKA JR, y KEWEIA KA, KUNGA Y, SALARI K, HOLCOMBA IL, POLLACK.** Genomic instability in breast cancer: Pathogenesis. s.l. : Mol Oncol. 2010 June; 4(3): 255–266.
36. **FUNDIA AF, LARRIPA I, SLAVUTSKY I.** Alteraciones genéticas, inestabilidad genómica y cancer en enfermedad celiaca. s.l. : Acta Gastroenterol Latinoam 2009;39:55-62.
37. **SERRANO JJ.** Metabolismo y cáncer. s.l. : Encuentros en Biología.2009;5(138-139):35-38.
38. **PEREZ-GUISADO J.** Hidratos de carbono metabolismo de la glucosa y cáncer. s.l. : Endocrinol Nutr.2010.53;252-5.
39. **GONZALES RF, GONZALES CC, GUERINONI ED, TUBEH RC.** Sobreexpresión de genes de las enzimas de la vía glucolítica en células cancerígenas. s.l. : Acta méd. peruana [online]. 2007; 24, 3 :187-197.
40. **MARTÍNEZ-EZQUERRO JD, HERRERA LA.** ANGIOGÉNESIS:VEGF/VEGFRs como blancos terapéuticos en el tratamiento contra el cancer. s.l. : Cancerología 1 (2006) : 83-96.
41. **GORRIN-RIVAS MJ.** Cáncer y angiogenesis. s.l. : Facultad de medicina universidad de Kyoto, 2010.
42. **FIDLER IJ.** The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. s.l. : Nat Rev Cancer. 2003 Jun;3(6):453-8.
43. **NAGUYEN DX, BOS PD, MASSAGUÉ J.** Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. s.l. : Reviews Cancer.2009; 9: 274–284.
44. **CORONATO S, LAGUENS G, GIROLAMO G.** ROL DE LAS METALOPROTEINASAS Y SUS INHIBIDORES EN PATOLOGÍA TUMORAL. s.l. : MEDICINA (Buenos Aires) 2012; 72: 495-502.

45. **ESTELLER M.** Epigenetics in Cancer. s.l. : N Engl J Med 2008;358:1148-59.
46. **HAKES SB, XIAO A, ALLIS CD.** Linking the epigenetic 'language' of covalent histone modifications to cancer. s.l. : Br J Cancer. 2004 Feb 23;90(4):761-9.
47. **AMERICAN CANCER SOCIETY.** *Principios de la quimioterapia: Un análisis exhaustivo de las técnicas y su tratamiento del cancer.* New York : American cancer society, 2013.
48. **GONZALES SW, RIVAS V S, MARTINEZ-MURILLO C, MONTAÑO, FE, RAMOS PC, COLLAZO JJ.** Principios de los quimioterapeúticos. [aut. libro] MONTAÑO, FE, RAMOS PC, COLLAZO JJ MARTINEZ-MURILLO C. *Quimioterapia en hematología y oncología.* Primera. México : Health Bussines Group, 2011, 3.
49. **FLOREZ J.** Quimioterapia antineoplásica. [aut. libro] ARMIJO J, MEDIAVILLA A FLOREZ J. *Farmacología Humana.* 5a. Madrid : Masson, 2008.
50. **TESSLER J, VARELA M.** *Quimioterapeúticos, Antineoplásicos e Inmunosupresores.* Buenos Aires : s.n., 2004.
51. **CASTELLANOS SH.** ALCALOIDES DE LA VINCA. [aut. libro] RAMOS PC, MONTAÑO FE MARTINEZ-MURILLO C. *Quimioterapia en hematología y oncología.* Primera. México : Health Bussines Group, 2011, 7.
52. **VAZQUEZ ZF.** Epidiofiloptoxinas. [aut. libro] RAMOS PC, MONTAÑO FE MARTINEZ-MURILLO C. *Quimioterapia en hematología y oncología.* primera. México : Health Bussines Group, 2011, 11.
53. **DELA MORA EM, PACHECO SM.** Multiresistencia a quimioterapéuticos. [aut. libro] RAMOS PC, MONTAÑO FE MARTINEZ-MURILLO C. *QUIMIOTERAPIA EN HEMATOLOGÍA Y ONCOLOGÍA.* primera. México : Health Bussines Group, 2011, 4.
54. **GAD SC.** Strategy and Phasing for Drug Safety Evaluation in the discovery and development of pharmaceuticals. [aut. libro] GAD SC. *DRUG SAFETY EVALUATION.* New York : WILEY-INTERSCIENCE, 2003, 1.
55. **RYDER S, WEINER E.** Desarrollo de los Fármacos. [aut. libro] TERZIC A WALDMAN SA. *Farmacología y terapéutica: principios para la práctica.* s.l. : Manual Moderno, 2010, 2.
56. **BERKOWITZ BA.** Desarrollo y regulación de fármacos. [aut. libro] MASTERS SB, TREVOR AJ KATZUNG BG. *Farmacología básica y clínica.* 11a. s.l. : Mac graw hill, 2010.
57. **RICHMOND A, YINGJUN S.** Mouse xenograft models vs GEM model for human cancer therapeutics. s.l. : Dis Model Mech. 2008 Sep-Oct;1(2-3):78-82.
58. **KERBEL RS.** Human tumor xenografts as predictive preclinical Models for anticancer drug activity in humans. Toronto : Cancer biology and therapy. 2003.2:4;134-139.

59. **KELLAND LR.** Of mice and men: values and liabilities of the athymic nude mouse model in anticancer drug development. s.l. : Eur J Cancer. 2004 Apr;40(6):827-36.
60. **SUGGITT M, BIBBY MC.** 50 years of preclinical anticancer drug screening: empirical to target-driven approaches. s.l. : Clin Cancer Res 2005;11:971-981.
61. **KORNECK P.** Metales en Medicina y su Aplicación en Diagnóstico y Terapia. [aut. libro] KRONECK P. *Química bioinorganica*. México : UNAM, 2012.
62. **HUANG R, WALLQVIST A, COVELL D.** Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: putative mode of action. s.l. : Biochemical Pharmacology 69 (2005) 1009–1039.
63. **DESOIZE B.** Cancer and metals and metal compounds. Cancer. s.l. : Crit Rev Oncol Hematol .42(3):213–5., 2002.
64. **BARRAGAN VN.** Evaluación de la actividad antineoplásica in vitro de compuestos pentacoordinados de estaño en las líneas celulares Hela y HCT.15. México : UNAM. Facultad de Química, 2013.
65. **KOBAKHIDZE N, FARFAN N.** New pentacoordinated Schiff-base diorganotin (IV) complex derived from non polar side chain alpha-amino acids. s.l. : Journal of Organometallic Chemistry.01/2010; 695(8):1189-119.
66. **VICENTE et al.** *Evaluación de la actividad antineoplásica de dos nuevos compuestos de coordinación en un modelo murino de isotransplatación (melanoma B16)*. México : UNAM, Facultad de Química., 2012.
67. **GAD SC.** Introduction. *Animal models in toxicology*. Boca raton : Taylor and Francis Group, 2007, 1, págs. 10-15.
68. **al, JENNINGS et.** Guía para el punto final humanitario en la experimentación animal para la investigación biomédica: aspectos éticos, legales y prácticos. s.l. : Laboratory animals. 2005; 8: 5-12.
69. **STOCKHAM SL.** Erythrocytes. [aut. libro] STOCKHAM SL SCOTT MA. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*. segunda. s.l. : Black Well Publishing, 2008, 3.
70. **PROVENCER BA, EVERDS NE, ZIMMERMAN KL, MOORE DM, SMITH SA, BARNHART KF.** Hematology of laboratory animals. [aut. libro] WRDROPE KJ, ED WEISS DJ. *SCHALMS VETERINARY HEMATOLOGY*. SIX. Iowa : WILEY-BLACKWELL, 2010, 110, págs. 852-861.
71. **PEARSON H, WOLFF R, VON HOFF DD.** Enhanced anti-tumor activity of nktr-102, a novel pegylated-irinotecan, when administered in combination with bevacizumab in a mouse model of human colorectal tumors. Phoenix : Nektar Therapeutics, 2008.

72. **KUMER J, HOTCH H, SILVERMAN J, HOWLETT A, SCATENA** . SNS-595 potentiates the in vivo anti-tumor activity of carboplatin, cisplatin, and gemcitabine in solid tumor xenografts. s.l. : Sunesis Pharmaceuticals.2012., 2010.
73. **ALEGRE FJ, BRETCHA BO, MARTIN ML, SUREDA A, BRUGARLOAS A**. Carcinomatosis peritoneal. Quimioterapia intraperitoneal con hipertermia. Alicante : Oncología, 2004; 27 (4):262-266.
74. **GARCÍA MR**. Quimioterapia intraperitoneal. México : Cancerología 3 (2008): 125-130.
75. **BURCOMBE R, WILSON GD, DOWSETT, KHAN I, RICHMAN P, DETRE S, MAKRIS A**. Evaluación de Ki-67 y la proliferación índice apoptótico antes, durante y después de quimioterapia neoadyuvante para el cáncer de mama primario. s.l. : Breas cancer research, 2006 8 (3): R31-R31.
76. **OSHIMA CT, IRIYA, FORONES NM**. Ki-67 as a prognostic marker in colorectal cancer but not in gastric cancer. Sao paulo : Neoplasma. 2005;52(5):420-4.
77. **GOTTWALDL et al**. The value of ki67 antigen expresión in tissue microarray method in prediction prognosis of patients with endometrioid endometrial cancer. s.l. : Ginekol Pol. 2013: 84(6):444-9.
78. **ROAS SJ et al**. Mutación del gen p53 en el cancer de colon y recto. s.l. : Rev.med.Chile. 2000;128,9: 996-1004.
79. **HAMELLIN et al**. Association of p53 mutations with short survival in colorectal cancer. s.l. : GASTROENTEROLOGY 1994;106:42-48.
80. **PADILLA AF, CARRILLO OG, MARTINEZ GR**. Inmunohistoquímicos p53 y ki 67: utilización diagnóstica y pronóstica en el cancer de colon. granada : RAP ONLINE vol.35 no 3, 2012.
81. **MUNRO AJ, LAIN S, LANE DP**. P53 abnormalities and outcomes colorectal cancer: a sitemyc review. s.l. : Cancer 2005; 92: 434.
82. **DIEZ M et al**. Variation in The prognostic value of p53 protein in relation to tumoral stage in patients with colorectal adenocarcinoma. s.l. : Cir Esp. 2005;77(4):213-20.
83. **OLSSON M, ZHIVOTOVSKI B**. Caspases and cancer. s.l. : Cell Death Differ. 2011; 18(9): 1441–1449.
84. **JONGES LE et al**. Caspase-3 activity as prognostic factor in colorectal carcinoma. s.l. : lab invest 2010 may; 81(5):681-88.
85. **al, Huang Q et**. Caspase 3-mediated stimulation of tumor cell repopulation during cancer radiotherapy. s.l. : Nat Med. 2011 July 3; 17(7): 860–866.
86. **ELLIS LM, TAKANASHI Y, LIU W, SHAHEEN M**. Vascular Endothelial Growth Factor in Human Colon Cancer: Biology and Therapeutic Implications. s.l. : The Oncologist 2000, 5:11-15.

87. **TANIWAGA N et al.** Correlation between expression of vascular endothelial growth factor and tumor vascularity, and patient outcome in human gastric carcinoma. s.l. : JCO, 1997:826-32.

88. **ISHIGAMI et al.** Predictive value of vascular endothelial growth factor (VEGF) in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. s.l. : Br J Cancer. 1998 Nov;78(10):1379-84.

89. **DES GUEZT G.** Microvessel density and VEGF expression are prognostic factors in colorectal cancer. Meta-analysis of the literature. s.l. : Br J Cancer. 2006 Jun 19;94(12):1823-32.