

191  
2ej.



**Universidad Nacional Autónoma  
de México**

---

---

**FACULTAD DE CIENCIAS**

**QUIMIOSENSIBILIDAD IN VITRO EN MEDIO LIQUIDO  
EN CELULAS CANCEROSAS Y NORMALES**

**T E S I S**  
Que para obtener el título de  
**B I O L O G O**  
p r e s e n t a

**MARIA ISABEL SOTO CRUZ**

**México, D. F.**

**1987**



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

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

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

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

## I N D I C E

### INTRODUCCION

Características generales del cáncer- - - - -	1
Anormalidades cromosómicas en las células cancerosas- - -	10
Cultivo de tejidos- - - - -	12
Quimiosensibilidad- - - - -	19
Pruebas de quimiosensibilidad <u>in vitro</u> - - - - -	26
METODOLOGIA- - - - -	30
RESULTADOS- - - - -	35
DISCUSION- - - - -	54
CONCLUSIONES- - - - -	63
APENDICES- - - - -	64
REFERENCIAS- - - - -	67

## RESUMEN

Durante más de dos décadas, los investigadores han perseguido el objetivo de desarrollar una prueba in vitro que pueda predecir de una manera efectiva la quimiosensibilidad de un tumor maligno. Uno de los principales problemas ha sido la baja eficiencia de proliferación de las células cancerosas. En el presente trabajo se estableció una técnica in vitro utilizando medio líquido para realizar pruebas de quimiosensibilidad. Para ello se sembraron 4 biopsias de distintos tipos de tumores y 1 biopsia de encia, sana, llevándose hasta la resiembra 2. En general, se obtuvo una alta eficiencia de proliferación celular y se realizaron los ensayos cultivando las células tanto en ausencia como en presencia de Cisplatino, Metotrexate y Bleomicina. En los ensayos realizados con epitelio normal se obtuvieron las concentraciones en las cuales la potencia de los fármacos in vitro es equivalente a las dosis utilizadas con los pacientes (equidosis). A tales concentraciones el daño causado por los tres agentes fue igual en epitelio sano, no siendo así para las células tumorales en las cuales hubo variabilidad en la sensibilidad de las células hacia los fármacos, esto es, una selectividad en la inhibición tanto en un mismo carcinoma como entre los demás. Por otro lado, se encontraron cambios en las características originales de las células normales mantenidas durante un período largo en cultivo (resiembra 20), como son, variación en la sensibilidad, disminución en la Tasa de Proliferación Celular (TPC) y alteraciones en el número cromosómico. Así mismo, para corroborar la malignidad de las células tumorales se realizaron análisis cromosómicos en células de la segunda resiembra y se encontró que el 78% de las metafases analizadas fueron aneuploides, indicándonos ésto la inestabilidad de su material genético.

## INTRODUCCION

El cáncer es tan antiguo como la historia de la humanidad. - Su existencia ha despertado especial inquietud en la sociedad industrializada que ha encontrado la forma de eliminar otras enfermedades y no ésta. En la actualidad, el cáncer es una causa muy común de muerte, y a pesar del gran progreso que ha habido en el conocimiento de la estructura y función de las células, aún para el observador más astuto de los procesos biológicos, el cáncer es un fenómeno confuso que desafía una simple categorización. Es una enfermedad multifactorial y depende de la naturaleza de la población de riesgo y del ambiente (1).

El crecimiento normal esta regulado de manera que la proporción de células en proliferación en un organo se incrementa o decrece para balancear la tasa de pérdida celular, manteniendo así el tamaño constante del mismo. Las células cancerosas no responden normalmente a tal regulación, en consecuencia, algunas o todas sus descendientes pueden proliferar de una manera no apropiada y producir tumores. Todas las células cancerosas descienden de una sola célula "fundadora", este único ancestro fue una célula normal, con una función normal en un tejido en particular, y de alguna manera sufrió un cambio fundamental y como resultado de ese cambio empezó a dividirse y a proliferar en respuesta a un mandato propio más que en respuesta a un estímulo externo ordinario requerido para la proliferación celular, originando los billones de células alteradas de manera similar, que constituyen la masa tumoral (2). El crecimiento referido como

un tumor puede ser causado por proliferación celular, inflamación o infección. Un tumor causado por proliferación celular se llama neoplasia (crecimiento nuevo). Se puede definir una neoplasia como una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede y no esta coordinado con el de los tejidos normales y persiste de la misma manera excesiva aún después de haber cesado el estímulo que lo provocó (3). Las neoplasias que no estan diferenciadas, que presentan un gran número de células en división, que invaden los tejidos circundantes y se diseminan a otros sitios distantes del cuerpo vía vasos sanguíneos y linfáticos son llamadas neoplasias malignas o cánceres. Las neoplasias benignas tienen una estructura que es típica del tejido de origen, estan bien diferenciadas, crecen lentamente y no presentan figuras mitóticas frecuentes; si las hay, generalmente son normales. Los tumores que surgen a partir de células epiteliales se llaman carcinomas, y los que surgen a partir de células del estroma o mesenquima se llaman sarcomas (4).

El cáncer surge de la inducción de un cambio heredable en una célula dando como resultado la producción de células hijas que escapan al control que limita el crecimiento de tejidos adultos diferenciados. Una vez que la célula se ha transformado puede continuar dividiéndose ad infinitum limitada solamente por la disponibilidad de nutrientes y posiblemente por la habilidad del huésped para montar una defensa inmunológica (5). El crecimiento de los tumores sólidos esta limitado de alguna manera por la disponibilidad de nutrientes, los tumores pequeños depen

den de la difusión del oxígeno y otros nutrientes y de la remoción de desechos mientras que las células se encuentren aproximadamente a 150 u de un capilar. Debido a este crecimiento limitado por difusión se alcanza eventualmente un estado estable en el cual se generan células nuevas que se balancean con las células muertas y los tumores pueden permanecer en este estado de letargo durante años (6). Aún no son claros los eventos críticos que inician la progresión de una neoplasia pequeña a una grande, clínicamente detectable, pero se han obtenido evidencias de que los tumores, posiblemente estimulados por la anoxia, pueden liberar una sustancia difundible, el factor de angiogénesis tumoral, el cual induce el crecimiento de capilares del tejido circundante hacia el tumor. Una vez que ocurre esto, la neoplasia inicia un nuevo crecimiento que puede continuar hasta que el huésped muere. Conforme el tumor vascularizado crece, los aminoácidos, carbohidratos y otros nutrientes esenciales pueden ser consumidos rápidamente, llevando a uno de los signos más comunes de la enfermedad, la pérdida de peso. No todas las partes de un tumor sólido están bien vascularizadas y el tumor puede llegar a ser muy grande como para mantener el crecimiento de capilares. El resultado final es a menudo un tumor con un centro necrótico, rodeado por una capa de células inactivas y un borde exterior de células en división (7,8).

La célula cancerosa difiere frecuentemente de la normal en una variedad de características anatómicas, funcionales y bioquímicas que permiten distinguirla con relativa facilidad de los

elementos no alterados. La proliferación incontrolada es la característica más obvia de las células cancerosas, mostrando a menudo una forma que es muy diferente de su contraparte normal y no respetando las reglas territoriales que confinan a las células normales a tejidos particulares. Muchas de ellas utilizan una gran cantidad de moléculas de azúcar, dependen de una manera poco usual del metabolismo anaeróbico, la membrana exterior es diferente a la de las células normales y presenta antígenos tumorales especiales que dan a las células propiedades inmunológicas distintivas (2). También presentan cambios en los niveles de nucleótidos cíclicos celulares, fluidez de la membrana plasmática, proteínas secretadas, el citoesqueleto y el flujo de iones. Estas células están menos sujetas a los mecanismos de retroalimentación que controlan la división celular normal, tanto en los tejidos como en cultivo. Por ejemplo, las células cancerosas continúan dividiéndose generalmente en cultivo más allá del punto en que las células normales se detienen por inhibición por contacto, proliferando y apilándose una sobre otra. Además, las células cancerosas requieren menos factores de crecimiento que las células normales para poder sobrevivir y dividirse en cultivo, en algunos casos esto puede deberse a que producen sus propios factores de crecimiento. Las diferencias en el potencial de crecimiento entre las células cancerosas y las células normales en cultivo de tejidos a menudo están asociadas con cambios citoesqueléticos conspicuos. La reorganización del citoesqueleto que acompaña estas alteraciones en el comportamiento se re-



fleja en dos cambios: las células cancerosas generalmente son - más redondeadas y las fibras tensoras disminuyen o llegan a estar ausentes (9).

La carcinogénesis, el proceso por el cual surgen los cánceres, consiste de al menos tres grandes etapas involucradas: 1) inmortalización celular, (2) desarrollo de defectos en el control integrado de la proliferación y diferenciación celular, y (3) el desarrollo del control de crecimiento autorregulador (10). La secuencia precisa en la cual ocurren estas etapas no se ha probado, pero estudios in vivo sugieren que la inmortalización celular es evidente en las células preneoplásicas, y estudios que han empleado métodos de biología molecular apoyan el papel de la inmortalización celular temprana en la carcinogénesis (10). Aunque se han propuesto muchas teorías para explicar la carcinogénesis, ninguna ha tenido éxito ya que no han tomado en cuenta todos los aspectos observados en las neoplasias. Sin embargo, - algunas teorías forman las bases con los conceptos contemporáneos. Estas teorías se pueden agrupar bajo los mecanismos principales a que se refieren: mutación somática, diferenciación aberrante y activación por virus.

Teoría de la mutación somática. Esta teoría atribuye la - neoplasia a anomalías en uno o más de los genes que regulan el crecimiento y la diferenciación y que tales anomalías genéticas pueden ocurrir en cualquier momento de la vida. Hasta donde una o más de las mutaciones requeridas sea heredada vía el cigoto, la persona afectada será más susceptible al cáncer,

ya que pocas etapas mutacionales son necesarias para completar el proceso carcinogénico en una célula somática. La acción carcinogénica de agentes tales como radiación ionizante y químicos alquilantes se atribuye a sus efectos mutagénicos sobre las células expuestas. Algunas evidencias que apoyan la teoría de la mutación somática incluyen: la influencia de la constitución genética en la susceptibilidad al cáncer; la correlación positiva entre mutagenicidad y carcinogenicidad y la presencia frecuente de aberraciones cromosómicas en células cancerosas (11,12).

Teoría de la diferenciación aberrante. Esta teoría supone que no deben ocurrir anomalías en los genes o cromosomas. Postula que las perturbaciones en la regulación génica, a través de la represión o no-represión, puede causar un desarreglo en el crecimiento y la diferenciación expresados en forma de cáncer. Ya que el defecto involucra principalmente cambios en la regulación de los genes y no cambios en su estructura, se puede considerar como epigenética más que genética. Ya que los patrones estables de la expresión génica ocurren durante la diferenciación (y ya que los mecanismos teóricos posibles que existen muestran que la carcinogénesis puede causar cambios estables en la expresión génica a través de medios epigenéticos) sin alterar necesariamente el material genético, la distinción entre el mecanismo de diferenciación aberrante y el mecanismo mutacional requiere evidencias especiales. Algunas de las evidencias más convincentes son: la totipotencialidad del genoma de la célula cancerosa, la diferenciación de las células cance-

rosas in vivo, la asociación de alteraciones en el desarrollo - con el cáncer y la alta tasa de transformación in vitro (13,14).

Teoría viral. La tumorigénesis por ADN viral esta acompañada característicamente por la integración de genes virales en el genoma de la célula huésped. Después, los genes virales son - transmitidos y pueden ser expresados sin la producción de virus infecciosos. Existe la posibilidad de que cualquier ADN viral pueda ejercer sus efectos carcinogénicos bajo circunstancias - apropiadas, esto ha llevado a la demostración de la tumorigénesis por adenovirus y también la implicación de los virus herpes simple en la patogénesis de ciertos tipos de cáncer. También se ha visto que los ARN virales (oncornavirus), como sus contrapartes ADN, contribuyen con la información genética que va a - formar parte del genoma de la célula hospedera afectada (9,15). Con excepción del virus verrugoso, los agentes virales aún no están implicados de manera concluyente en la patogénesis de las lesiones neoplásicas en humanos. Sin embargo, esta bien documentada la susceptibilidad de las células humanas a la transformación "neoplásica" inducida por virus in vitro. Hay evidencias indirectas que implican a los virus en las neoplasias humanas, por ejemplo, la presencia frecuente de partículas virales características en las células de ciertas malignidades; la asociación de antígenos grupo-específicos mediados por virus con las células de algunas neoplasias; la presencia de reverso-transcriptasa del tipo oncornavirus en ciertas células cancerosas y la presencia en los núcleos de algunos tipos de células cancerosas de

secuencias de bases de ADN complementarias a las secuencias de bases de virus de tumores conocidos (16). Hay evidencias que favorecen el punto de vista de que los virus ejercen sus efectos oncogénicos a través de la integración de información genética codificada en su ácido nucléico en el genoma de la célula hospedera infectada. En el caso del ADN viral, la integración y - transcripción subsecuente del ácido nucléico viral puede ser - análogo al proceso que se ha caracterizado bien en los bacteriófagos lisogénicos. Por otro lado, en el caso de los ARN virales, se piensa que el proceso de integración involucra un intermedio de ADN, sintetizado a partir de ARN viral a través de la acción de una ADN polimerasa de un virus específico ARN dirigido o "reverso-transcriptasa" (17).

Se conocen dos mecanismos por medio de los cuales los virus alteran el control de la proliferación celular: (1) la integración del ADN viral en el genoma del huésped que por sí solo puede causar cambios en la estructura o nivel de expresión de genes importantes de la célula huésped. Este proceso se conoce como mutagénesis por inserción debido a que los cambios se heredan como las mutaciones inducidas por medios convencionales. Tales casos de mutagénesis por inserción se han documentado recientemente. Algunos de ellos involucran la inserción de un promotor viral altamente activo de ARN polimerasa II cercano al gene celular clave cuya hiperexpresión conduce al fenotipo canceroso. Debido a que las cadenas de ARNm iniciadas sobre el promotor viral incorporan la secuencia codificadora del gene adyacente, se

sintetiza en la célula una cantidad mucho mayor a la normal de la proteína del control celular. (2) Muchos virus tumorales portan uno o varios loci genéticos, los oncogenes, que son los responsables únicos y directos de la transformación neoplásica en la célula huésped; no hay necesidad en éste caso de alterar un gene de la célula huésped (9,18). Cada oncogene tiene una secuencia de nucleótidos específica, y ya que no son necesarios para la replicación viral frecuentemente son borrados. Una de las propiedades más interesantes de los oncogenes es su tumorigenicidad selectiva, esto es, la especificidad de su efecto transformante el cual depende del tipo celular y probablemente de la etapa de diferenciación (18). Los oncogenes pueden perturbar el mecanismo normal de regulación del crecimiento impidiendo la diferenciación normal de una célula con un potencial limitado de crecimiento. De hecho, muchas células tumorales están menos diferenciadas que sus equivalentes normales. Este es un rasgo especialmente notable de las leucemias humanas y ha conducido a pensar que estos tumores se producen debido a que las células de un determinado linaje no consiguen terminar su maduración. Puesto que al parecer los precursores de los glóbulos sanguíneos son capaces de dividirse incesantemente, el resultado de éste proceso es una población en continua expansión, un tumor (19). La comparación molecular de los retrovirus mutantes que han borrado la mayoría de sus oncogenes con retrovirus que contienen oncogenes intactos, llevó al aislamiento de pruebas de ADN específicas para oncogenes retrovirales. Con estas pruebas se descu

brío que las células normales contenían secuencias de ADN homólogas a los oncogenes virales. Estas secuencias de ADN homólogas se han denominado oncogenes celulares o proto-oncogenes. En el genoma de las células normales los proto-oncogenes no parecen estar unidos a los homólogos de ningún gene replicativo viral. Algunos de los proto-oncogenes están incompletos, es decir, están parcialmente relacionados con los oncogenes retrovirales correspondientes. Estos proto-oncogenes no se encuentran cercanos uno con otro en el genoma humano y cuando se comparan con otros genes no parecen tener ninguna propiedad peculiar en común. Varios proto-oncogenes se han encontrado en Drosophila, lo cual indica un alto grado de conservación durante la evolución y abre la posibilidad de estudiar sus características estructurales esenciales y su función durante el desarrollo de este organismo (18,20).

#### ANORMALIDADES CROMOSOMICAS EN LAS CELULAS CANCEROSAS

Las células de casi todos los tumores sólidos malignos humanos presentan anomalías cromosómicas, y el grado de anomalía tiende a ser paralelo con el estado de progresión del tumor (21). Los cromosomas en la malignidad son diferentes de los normales, no solo en su número sino también en su constitución. La aneuploidia puede ocurrir por error mitótico, y éstas células se consideran como no viables. Un análisis estadístico de aneuploidias y poliploidias puede apayar el diagnóstico de malignidad aún en números pequeños de cromosomas cuando se encuen

tra una aparente aberración cromosómica. En mitosis anormales - se encuentran distintos tipos de aberraciones en el número y la estructura de los cromosomas tales como translocaciones, rompimientos, no disyunciones, endoreplicaciones, inversiones, fusiones anormales, deleciones, etc. (22). Las anomalías estructurales de los cromosomas no son características de los tumores individuales, sin embargo, cada tumor puede tener un crecimiento único y representar la línea original predominante por selección de algún número modal. En la carcinogénesis, la neoplasia maligna primaria se caracteriza por muchos tipos de células tumorales que tienen diferentes cariotipos. Frecuentemente los tumores malignos producen cromosomas anormales que son únicos, - por ejemplo, cromosomas anillados, cromosomas extraordinariamente grandes y cromosomas con varios centrómeros, los cuales son llamados cromosomas marcadores. La distribución del número modal de cromosomas en cánceres primarios humanos oscila entre hipodiploide y pseudotetraploide, sin embargo, altas ploidias celulares tienen más de 92 cromosomas y se han encontrado frecuentemente en efusiones malignas, estas son probablemente el resultado de endomitosis o endoreplicaciones (23).

En las leucemias, la presencia de anomalías cromosómicas es más variable, dependiendo del tipo hematológico y de la etapa de la enfermedad. Por ejemplo, en la Leucemia Mielocítica - Crónica (LMC), practicamente todos los casos muestran el cromosoma Filadelfia (Phi). De manera similar, la mayoría de las células del Linfoma de Burkitt (LB) contienen una translocación

característica 8:14. La frecuencia y tipos de anormalidades en otras leucemias humanas son más variables, aunque no al azar (24). También se ha observado que las células de neoplasias en animales contienen anormalidades cromosómicas, pero no tan frecuentemente como en sus contrapartes humanas. Tampoco se ha observado una forma particular de aberración en tumores animales de un tipo dado tan consistentemente como el cromosoma Phi en la LMC humana (25). Aunque microscópicamente la visibilidad de anormalidades cromosómicas no son detectables en todas las células cancerosas, la evidencia existente justifica ampliamente la generalización de que el cariotipo en las células neoplásicas tiende a ser inestable y variable. Sin embargo, en una neoplasia dada las células muestran frecuentemente la misma anormalidad cromosómica como sería consistente con su origen clonal (de una sola precursora), particularmente en el caso de las leucemias y linfomas. Con el tiempo, especialmente en tumores animales que son transplantados seriadamente a través de generaciones sucesivas, los clones de mayor anormalidad progresiva tienden a aparecer y a predominar sucesivamente (21). En otros tipos de leucemias diferentes a la LMC y el LB, se han observado recurrentemente tipos específicos de anormalidades citogenéticas, tanto en humanos como en animales experimentales (26).

#### CULTIVO DE TEJIDOS

La mayoría de células tanto vegetales como animales con las condiciones apropiadas, sobrevivirán, se multiplicarán y expresarán sus propiedades diferenciadas en una caja de cultivo de



tejidos. En consecuencia, es posible determinar los efectos en el comportamiento celular al agregar o quitar moléculas específicas tales como hormonas o factores de crecimiento y de obtener poblaciones homogéneas de células para análisis bioquímico o para estudiar las interacciones entre un tipo celular y otro. Aunque es una gran ventaja el poder estudiar el comportamiento complejo de las células en las condiciones estrictamente definidas de una caja de cultivo, las observaciones tarde o temprano deben ser verificadas contra el comportamiento de las células en su ambiente natural in vivo. Puesto que el cultivo celular es el único método que permite el estudio del comportamiento de las células individuales en condiciones ambientales más o menos controladas, no sería una exageración el decir que los principales logros de la biología del cáncer durante las últimas décadas están asociados con el uso de cultivo de tejidos (27).

Uno de los primeros intentos para tratar de establecer cultivos se realizó en 1866 por F. D. von Recklinghausen (28) quien mantuvo vivas células sanguíneas de anfibio en recipientes estériles bajo diferentes condiciones durante 35 días. Pero los primeros experimentos organizados de cultivos con tejidos fueron realizados por Wilhelm Roux en 1885 (29). El hizo la transferencia de la placa neural de un embrión de pollo a una solución salina tibia y así pudo probar que el cierre del tubo neural es principalmente una función de las células que lo constituyen y no, como se suponía, el efecto directo de la presión mecánica ejercida por las estructuras adyacentes. Casi al mismo tiempo -

Arnold (1887) (30), mezcló fragmentos de pulpo en el humor acuoso de ranas y los implantó bajo la piel en la cavidad peritoneal de las ranas, donde fueron invadidos por leucocitos. Después removió los fragmentos de pulpo y los colocó en cajas que contenían humor acuoso o solución salina y pudo estudiar las actividades de las células que migraron de allí. En 1898 Ljunggren - (31) realizó con éxito trasplantes de piel humana que había mantenido viva durante semanas en el fluido ascítico. En 1903, Jolly (32) realizó experimentos que marcaron las primeras observaciones detalladas acerca de la sobrevivencia y división celular in vitro. Mantuvo leucocitos de salamandra en gotas suspendidas durante un mes. En 1907, el experimento de Ross Harrison (33) demostró casi inequívocamente la continuación de la función normal in vitro y ofreció una técnica reproducible que se ha aceptado generalmente como el verdadero inicio del cultivo de tejidos. - Los experimentos originales en 1907 involucraron el cultivo de pequeños fragmentos de tejido o explantes, en la actualidad los cultivos se hacen más comunmente a partir de suspensiones de células disociadas de los tejidos. Tales cultivos de células disociadas tienen la gran ventaja de permitir al investigador purificar tipos celulares individuales, de la mezcla de tipos celulares siempre presentes en un tejido y así poder examinarlas aisladamente. A diferencia de las bacterias, la mayoría de las células de los tejidos no están adaptadas al crecimiento en suspensión y requieren una superficie sólida en la cual crecen y se dividen. Este soporte mecánico estaba dado originalmente por

el plasma coagulado, pero en la actualidad se reemplaza generalmente por la superficie de una caja de cultivo de tejidos de plástico. Sin embargo, las células varían en sus requerimientos y algunas no crecerán o se diferenciarán a menos que la caja de cultivo este cubierta con componentes de la matriz extracelular, tal como la colágena (34). Los cultivos preparados directamente de los tejidos de un organismo son llamados cultivos primarios. En la mayoría de los casos las células en cultivos primarios pueden ser removidas de la caja de cultivo y utilizadas para formar un gran número de cultivos secundarios, éstos pueden ser subcultivados de manera repetida durante semanas o meses, en tales cultivos las células pueden permanecer diploides y retener muchas características del explante inicial dando lugar a una línea celular (35). Estas células a menudo muestran las propiedades diferenciadas del tejido del cual se obtuvieron: los fibroblastos continúan secretando colágena; las células derivadas del músculo esquelético embrionario se fusionarán para formar fibras musculares gigantes, las cuales se contraen espontáneamente en la caja de cultivo; las células nerviosas extienden axones que son eléctricamente excitables y realizan la sinapsis con otras células nerviosas; y las células epiteliales forman hojas extensivas con muchas de las propiedades de un epitelio intacto. Ya que este fenómeno se presenta en cultivo, son accesibles para estudiarlas de una manera que no es posible en los tejidos intactos (36). Sin embargo, en el curso del cultivo, las propiedades de fibroblastos y epitelio pueden presentar alteraciones y sus caracte-

rísticas vienen a ser diferentes de aquellas de los cultivos primarios aislados de tejidos normales. Las alteraciones del cultivo se pueden originar espontáneamente o después del tratamiento con carcinógenos químicos o con virus oncogénicos. La combinación de estas alteraciones puede ser designada por un término en común: evolución neoplásica de los cultivos. Las principales manifestaciones de esta evolución incluye los siguientes cambios celulares: 1) desarrollo de oncogenicidad; 2) cambios morfológicos; 3) desarrollo de vida ilimitada (inmortalización); 4) cambios cariotípicos; 5) aglutinación de células. En el desarrollo de la evolución neoplásica de un cultivo, una serie de transformaciones puede ocurrir. El cultivo normal puede dar origen a un cultivo transformado (37). Los cultivos que han adquirido una vida ilimitada son usualmente denominados líneas celulares. La inmortalización es uno de los síntomas de la evolución neoplásica, por tanto no es correcto hablar de éstos como líneas celulares normales, ya que presentan caracteres transformados como lo sería un cariotipo diferente (38). Ahora bien, durante las primeras etapas del cultivo, las células presentan un número correcto de cromosomas, pero posteriormente se tornan aneuploides. Muy ocasionalmente una de estas células aneuploides sobrevivirá y continuará su crecimiento, este es el fenómeno que conduce a la formación de una cepa celular. El patrón cromosómico de estas células es marcadamente aneuploide y variable. Por ejemplo, el complemento cromosómico de células L929 varía entre 56 y 241 con una moda de 66. Una cepa celular presenta características

específicas las cuales persisten durante el cultivo continuo. Muchas cepas celulares establecidas tienen la capacidad de crecer y dividirse indefinidamente en cultivo y en general esto está asociado con un cariotipo aneuploide (38). Después de un período inicial de adaptación a las condiciones de cultivo (fase 1) los cultivos primarios de fibroblastos y epitelio pueden entrar en una fase de crecimiento estable (fase 2). Esta fase es seguida por un período de descenso gradual en la tasa de crecimiento y en un deterioro progresivo del cultivo; este período es designado fase 3 ó senescencia. La duración en cultivo varía considerablemente, dependiendo de la especie animal de la cual se tomaron las células; se ha reportado que en fibroblastos de embrión humano es de 50 generaciones. Los fibroblastos humanos de varios tejidos y de personas de edad diferente pueden tener diversas duraciones de vida promedio en cultivo. Por otra parte, la formación de una línea celular inmortal es una alternativa a la senescencia y muerte celular. La formación de una línea celular viene a ser evidente durante el período de crecimiento estable o durante la fase de senescencia. Probablemente cada línea es el resultado de la proliferación selectiva de una clona de células alteradas. Las alteraciones del cariotipo son una característica general de todas las líneas celulares espontáneamente establecidas. Comúnmente, las células de estas líneas tienen cariotipos heteroploides o pseudoploides y se revelan numerosos rearrreglos cromosómicos (39).

El medio es el factor único más importante en el cultivo de

de células y tejidos. La función de este medio es el de proveer las condiciones físicas de pH, presión osmótica y sustancias químicas requeridas por el tejido para su sobrevivencia, y que no puede sintetizar por si solo tal como aminoácidos, carbohidratos y vitaminas (40). Hasta hace poco, el medio nutritivo empleado para el cultivo de células animales in vitro se derivaba casi exclusivamente del organismo y consistía de plasma sanguíneo, suero sanguíneo, otros fluidos y exudados del cuerpo, y extractos de tejidos y órganos. Pero la complejidad y la variabilidad de esos materiales hacía difícil utilizarlos en experimentos diseñados para determinar las sustancias nutritivas requeridas por las células y el efecto de esas sustancias en particular sobre ellas. Por esta razón se han hecho intentos para desarrollar un medio compuesto totalmente de componentes definidos. Al principio, se hicieron intentos para analizar el medio e identificar los componentes esenciales. Posteriormente se vió que metabolitos eran esenciales o útiles para la sobrevivencia y desarrollo del organismo intacto, y se combinaron para elaborar un medio con el cual se probó su habilidad para mantener a las células vivas (41). En 1955 Eagle (42) identificó los requerimientos para el crecimiento de varias líneas celulares de mamífero en términos tanto cualitativos como cuantitativos y pudo propagar estas líneas celulares en presencia de una mezcla definida de aminoácidos, vitaminas, sales y carbohidratos suplementados con una pequeña cantidad de suero dializado de caballo o suero humano. Se produjeron deficiencias nutricionales específicas por

la omisión de aminoácidos particulares o vitaminas y esto pudo ser solucionado agregando los componentes faltantes. Se definieron 27 factores como esenciales para el crecimiento y formaron las bases del medio conocido como "Medio Basal de Eagle". Encontró que 13 aminoácidos eran esenciales, los seis aminoácidos restantes no esenciales eran sintetizados a partir de otras fuentes de carbón. La omisión de cualquiera de las 7 vitaminas llevó a síntomas de deficiencia, con esto Eagle utilizando las técnicas de cultivo pudo demostrar los requerimientos nutricionales de células de ratón y humanas. Este medio basal requería un reemplazo frecuente para que las células continuaran creciendo y poco después fue reemplazado por el "Medio Mínimo Esencial" de Eagle en el cual las concentraciones de los distintos componentes se incrementaron para permitir a las células continuar creciendo en cultivo durante varios días entre los distintos cambios de medio (43).

#### QUIMIOSENSIBILIDAD

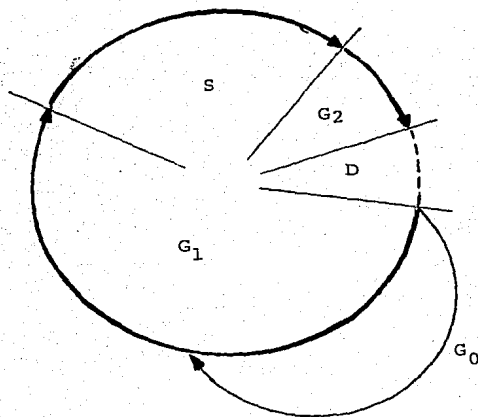
El concepto de tratamiento del cáncer con drogas se remonta a hace al menos 500 años cuando se usaban preparaciones de plata, zinc y mercurio, pero la utilidad de las drogas en el tratamiento sistémico del cáncer se reporta en 1865 cuando Lissauer (44) dió arsenito de potasio (solución de Fowler) a un paciente con leucemia y noto un efecto positivo. Sin embargo, la quimioterapia sistémica exitosa del cáncer no se desarrolló sino casi 80 años después. Es irónico que la primera droga efectiva anticancer apareció en el contexto de la guerra y no de la medicina.

Esta droga fue la mostaza nitrogenada, cuyo precursor, mostaza sulfurada (H-gas), se había utilizado en el campo de batalla en 1917 (45). En 1931, se aplicó mostaza sulfurada a un carcinoma escamoso y también se inyectó directamente en tumores en humanos, pero ésto fue considerado muy tóxico para uso sistémico. En 1942 se realizó el primer ensayo clínico de mostaza nitrogenada en un paciente con linfosarcoma. Ya que era tiempo de guerra y toda la información obtenida sobre este compuesto estaba clasificada, su utilidad en el tratamiento del cáncer no se conoció sino hasta 1946, cuando Gilman y Phillips (46) publicaron una revisión. Esta revisión marca el comienzo de la moderna quimioterapia del cáncer. Posteriormente Farber obtuvo las primeras remisiones en niños con leucemia aguda con ameenopterina en 1948 y demostró el valor clínico de la actinomicina D, generando así gran interés en las sustancias producidas por microorganismos (47). Aún están apareciendo nuevas drogas, pero la mayoría de ellas descienden de compuestos originales desarrolladas hace 20 años o más. Las drogas antitumorales se utilizaron en un período relativamente rápido entre 1955 y 1970, desde ese momento la aceptación de nuevas drogas anticancerosas ha disminuido un poco, pero se ha probado un vasto número de nuevos componentes con la esperanza de encontrar drogas que sean selectivamente tóxicas a las células cancerosas.

Para entender por qué ciertas células en un tumor son susceptibles a las drogas y como actúan las diferentes drogas, se deben considerar las fases del ciclo celular. El ciclo celular se



divide en varias fases diferentes. La fase  $G_1$  (gap) en donde ocurre la síntesis de ARN y de proteínas, durante esta fase no ocurre la síntesis de ADN para la replicación. La fase S en la cual ocurre la síntesis de ADN, el tiempo que pasan las células normales y las malignas en esta fase generalmente es diferente. Después la fase  $G_2$ , aquí continúa la síntesis de ARN y de proteínas. Las etapas finales de la replicación y segregación de cromosomas ocurren durante la fase D (división) cuando se da la mitosis o meiosis. En todos los tejidos adultos diferenciados normales y en la mayoría de los tumores hay una población de células viables que no están proliferando, se dice que estas células están en una fase de descanso referida como  $G_0$  (48,49).



Esquema del ciclo celular

Una consideración importante es que hay, en todos los tejidos normales y en los tumores, cierto número de células viables que pueden proliferar, pero que no van a duplicar su contenido de ADN ni a dividirse durante días, meses o quizás años bajo circunstancias normales. Estas son las células que con mayor probabilidad sobreviven a la quimioterapia, también son las células que van a repoblar los tejidos normales (e.g. médula ósea) y que regeneran el tumor después del tratamiento. Por tanto, un objetivo de la quimioterapia es el de ser selectivamente tóxico para las células del tumor que estén en descanso (así como para las células en proliferación del tumor) y que le permita a las células normales en descanso sobrevivir (50). La efectividad clínica de cualquier droga anticancer requiere que mate a las células tumorales malignas in vivo a dosis que permitan que suficientes células en los tejidos críticos del paciente (como médula ósea y tracto gastrointestinal) sobrevivan de manera que pueda ocurrir una recuperación. Se sabe que los tejidos que tienen una alta proporción de células en división son más susceptibles a los efectos citotóxicos de las drogas anticancer que los tejidos con una proporción baja de tales células. La proporción de las células en división en un tumor o en un tejido normal se llama fracción de crecimiento, o sea, la fracción de la población celular total viable que se encuentra en el ciclo activo de división (51). La población celular viable del tumor está formada por células en división más las células que están en descanso que tienen el potencial de dividirse con la es-

timulación apropiada. Sin embargo, es muy difícil distinguir entre una célula que no está en división pero que tiene el potencial para dividirse y una célula diferenciada que no está en división en un tumor o en el tejido normal in vivo. Ya que es la célula en división la que es más sensible a la mayoría de las drogas anticancerosas, entonces los tejidos normales y los tumores con fracciones de crecimiento altas son más susceptibles a los efectos tóxicos de esas drogas y puesto que el tiempo de doblaje de una neoplasia maligna es inversamente proporcional a la fracción de crecimiento, entonces los tumores con tiempos de doblaje de masa pequeños son más accesibles al tratamiento con drogas (50,52). Como el tiempo de doblaje de la masa depende del número de células en división más que del número total de células en un tumor, el tiempo de doblaje de la masa y el tiempo del ciclo celular no son iguales a menos que la fracción de crecimiento se aproxime al 100% y la pérdida celular sea mínima. Una fracción de crecimiento como ésta se puede encontrar en ciertos tumores que crecen en cultivo, pero rara vez sucede in vivo (51). El tamaño del tumor es un factor limitante para la quimioterapia en los cánceres, un gran porcentaje de las células en un tumor pueden no estar en una etapa no proliferativa durante el tratamiento y pueden sobrevivir para reestablecer la masa tumoral. Es claro que mientras más células haya para matar, la terapia debe ser más prolongada, pero la droga debe erradicar las células tumorales sin un daño irreparable para el huésped. La acción de las drogas sobre las células tumorales parece seguir la

cinética de primer orden, asumiendo que la fracción de crecimiento y el tiempo del ciclo celular permanecen constantes. Esto significa que un regimen de una droga dada eliminará una proporción constante de células neoplásicas más que un número constante de células. Esto quiere decir que se utilizará la misma cantidad de drogas para reducir el número celular del tumor de  $10^6$  células a  $10^3$  células (una reducción de menos de 1 mg de tejido) que para reducir el número de  $10^9$  a  $10^6$  células (una reducción de 1 g de tejido) (53). Los tumores son generalmente poblaciones heterogeneas de células, algunas células están proliferando, algunas pueden proliferar pero están en letargo, y otras están muriendo. Dentro de las dos primeras categorías, algunas células proliferan durante una o varias generaciones pero eventualmente se detendran y otras pueden producir una línea ilimitada de descendientes (células "clonogénicas"). Para que cualquier terapia tumoral sea completamente efectiva, se debe matar a las células clonogénicas, de hecho el principal obstáculo para curar la enfermedad neoplásica avanzada es la persistencia de células clonogénicas (54).

Algunas drogas anticancerosas son más efectivas contra las células en una fase del ciclo celular. Sin embargo, generalmente es cierto que aún para aquellas drogas que no tienen una citotoxicidad específica estricta para una fase del ciclo celular las drogas anticancerosas son más efectivas contra las células en proliferación que frente a las células que no están proliferando. Los agentes citotóxicos se han clasificado de acuerdo a

su efecto en el ciclo celular, las drogas que afectan a las células a lo largo del ciclo se consideran ciclo dependientes y si su efecto está limitado a una fase particular del ciclo se clasifican como agentes fase dependientes (55).

Mecánismo de acción de las drogas antineoplásicas utilizadas en este ensayo.

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

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

**Metotrexate.** Es un antimetabolito que inhibe la conversión de ácido fólico en ácido tetrahidrofólico por unión a la enzima dehidrofolato reductasa. Esto inhibe la síntesis de timidina y purinas, las cuales son esenciales para la síntesis de ADN. Es fase específico del ciclo celular y actua en la fase S.

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

**5- Fluorouracilo.** Es un antimetabolito pirimídico que bloquea la reacción de metilación del ácido dioxiuridilico interfiriendo con la síntesis de ADN. También se incorpora Al ARN e interfiere con su función.

Pruebas de quimiosensibilidad in vitro.

El desarrollo significativo de la quimioterapia del cáncer - durante la última década ha permitido el desarrollo de nuevas - drogas y combinaciones de drogas con un éxito clínico considera- ble. Actualmente, la selección de agentes quimioterapéuticos pa- ra pacientes individuales se hace empíricamente con base a res- puestas previas de otros pacientes con el mismo tipo de cáncer. Sin embargo, debido a que los tumores del mismo origen y tipo histológico pueden responder de manera diferente a fármacos an- ticancerosos, se necesita realizar pruebas accesibles y confia- bles capaces de evaluar la sensibilidad del tumor de un pacien- te en forma individual a drogas específicas. Es por ésto que el interés en el uso de las pruebas predictivas in vitro para la determinación de la quimiosensibilidad de tumores ha aumentado en años recientes (57, 58).

Muchos investigadores han intentado establecer sistemas in vitro para el análisis de la población celular tumoral y, en par- ticular, la respuesta de células tumorales de pacientes indivi- duales a la gran variedad de agentes quimioterapéuticos disponi- bles (59, 60, 61, 62). Este método debe distinguir entre la proli- feración de células normales y tumorales y los resultados se ne- cesitan obtener lo suficientemente rápido para permitir a los clínicos decidir el tratamiento requerido. Dicho ensayo no to- mara en cuenta las diferencias en la conversión del paciente ni la eficiencia de destoxicación para la droga, la acumulación específica en el tejido, ni los efectos inmunosupresores, pero

esta prueba in vitro debe al menos dar un indicio inicial de la efectividad relativa contra una población celular tumoral humana específica (63, 64).

Los primeros métodos de cultivo de tejidos que se utilizaron para investigar el efecto de las drogas en las células normales y neoplásicas se realizaron en medios líquidos, principalmente con líneas ya establecidas tales como las HeLa y la Cepa L (65, 66). Sin embargo, debido a que el establecimiento de una línea celular requiere de períodos largos de adaptación, se ha encontrado que las células cultivadas han perdido algunas de sus características originales (67, 68), restando de esta forma confiabilidad a éste tipo de predicciones in vitro. Los métodos in vitro para probar la quimiosensibilidad de tumores humanos se desarrollaron principalmente para ayudar a los clínicos a seleccionar las drogas más útiles para pacientes individuales. Los métodos más ampliamente usados involucran clonación en medios semi-sólidos (69). Hamburger y Salmon (70) desarrollaron un método simple, el "ensayo clonogénico" que permite la formación de colonias de células madre de tumores humanos en agar suave. Sirve para determinar rápidamente el potencial clonogénico y la sensibilidad a las drogas citotóxicas de tumores individuales in vitro. Con base a este trabajo se han descrito varios ensayos de quimiosensibilidad. Von Hoff et al (71) lo utilizó para monitorear el efecto de los agentes antitumorales sobre la habilidad de clonación de las células tumorales; Shoemaker (72) y Salmon (73) para buscar agentes antitumorales; Trent et al (74)

para análisis citogenético; Moon et al (75) para probar la sensibilidad a las drogas de varios tumores humanos; Fan (76) y Cowan (77) para estudiar los efectos del oxígeno, vitaminas y hormonas en el desarrollo de las células tumorales. Sin embargo, a pesar del gran entusiasmo generado por la introducción del en sayo clonogénico, este método aún tiene grandes limitaciones como son la dificultad y posible alteración de la sensibilidad a las drogas en el proceso de disgregación de los tumores; la heterogeneidad citocinética de las células tumorales, la baja eficiencia de clonación y lo artificial de la exposición a las drogas in vitro (78,79,80,81). También hay otros ensayos que evalúan los cambios bioquímicos o morfológicos cuantitativos que ocurren en las células después de la exposición a agentes citotóxicos y otros que utilizan la incorporación relativa de precursores metabólicos radiomarcados para medir los cambios en el metabolismo celular después de la exposición a la droga (82). Estos métodos in vitro se pueden clasificar de una manera simple en: ensayos que utilizan cultivos a corto plazo de suspensiones celulares (83,84), ensayos que utilizan monocapas celulares (85,86) y ensayos que evalúan la sobrevivencia de las células clonogénicas (87,88).

Los mayores problemas de la eficacia de los sistemas in vitro para determinar la respuesta del tumor a las drogas quimioterapéuticas, han sido: la baja eficiencia de proliferación observada para muchas células tumorales, la creación de un medio restrictivo que dé a las células del tumor una ventaja selectiva



sobre las células normales y la contaminación de los cultivos con células no tumorales (70,89). Dado que la mayoría de los tumores consisten de una población heterogénea de células madre del tumor (las cuales poseen una habilidad proliferativa extensiva o aún indefinida). y otras que muestran poca o ninguna actividad proliferativa, probablemente representando estados más diferenciados o poblaciones genéticamente estériles. Por tanto, un tratamiento exitoso se debe basar en la eliminación de las células con habilidad reproductiva, las cuales representan solo una fracción de la población celular tumoral. Entonces idealmente, un sistema in vitro para la respuesta de las células tumorales a varias drogas, debe ser un sistema en el que la respuesta de las células con mayor habilidad proliferativa sea medida selectivamente (90,91). Desafortunadamente, a la fecha no se ha logrado establecer un método óptimo para la evaluación de la quimiosensibilidad de drogas efectivas para pacientes individuales.

El objetivo de este trabajo es contribuir al establecimiento de una técnica in vitro que pueda predecir de manera efectiva el efecto de drogas anticancerosas en pacientes individuales.

## METODOLOGIA

### Condiciones de cultivo

Se utilizó como medio de cultivo el Medio Mínimo Esencial de Eagle (ME) (Microlab, México) (Apéndice I) (42) suplementado con 20% de Suero Fetal de Bovino (SFB) (Microlab, México) previamente desactivado a 56 °C en baño de agua durante 30 min. Al ME se le adicionaron 100 U/ml de penicilina G (Sigma Chem Co, USA), - 100 µg/ml de estreptomycin (Sigma Chem Co, USA) como medida preventiva para una posible contaminación bacteriana, y 3.7 g/l de bicarbonato de sodio (J.T. Baker, México) para mantener un pH - fisiológico en los cultivos mediante el CO<sub>2</sub> de la atmósfera. Para brindar condiciones óptimas al cultivo se utilizó una incubadora con temperatura constante a 37 °C, con humedad a saturación y una atmósfera de 10% de CO<sub>2</sub> en aire (40).

### Obtención y sembrado de la biopsia

Las biopsias de neoplasias malignas se obtuvieron durante la cirugía a los pacientes. Las muestras fueron tomadas dentro del quirófano y depositadas en tubos de plástico que contenían 15 ml de medio de cultivo con 10% de SFB. La biopsia de epitelio normal se obtuvo cuando se practicó una cirugía de encia. Estas se transportaron en una hielera al Laboratorio de Diferenciación - Celular y Cáncer de la ENEP Zaragoza, UNAM para ser sembradas siempre dentro de las doce horas después de su obtención.

Una vez en el laboratorio, la biopsia fue colocada en una caja de Petri para diseccionarle áreas de degeneración y necrosis

lavándose por inmersión en Solución Salina Amortiguadora de Fosfatos (SAF) (Apéndice II). Después de esto, se seccionó el tejido en pequeñas porciones de aproximadamente  $1 \text{ mm}^3$  utilizando tijeras de punta fina y colocando 12 porciones de tejido en cada una de las cajas de cultivo de  $60 \times 15 \text{ mm}$  (Lux Scientific Co, - USA), dejándose secar al aire durante 15 min con el fin de que el tejido se adhiriera al sustrato de cultivo y agregando después 5 ml de medio de cultivo en forma cuidadosa para evitar el desprendimiento de los trozos (92). Cada tercer día se revisaron las cajas de cultivo al microscopio invertido para observar la superficie que ocupaban las células, limpiarlas y ver si no se había desarrollado una contaminación. Cuando las células ocupaban las tres cuartas partes de la superficie de la caja de cultivo se procedió al subcultivo de las mismas.

Para proceder al subcultivo, se desechó el medio de cultivo en que se encontraban las células y se agregaron 2 ml de Verseño (Apéndice III) lavando suavemente, con el fin de quitar desechos celulares, residuos de proteínas y cargas divalentes. Se eliminó el verseno y se adicionaron 3 ml de solución de tripsina al 0.025% (Apéndice IV) incubándose a  $37^\circ \text{C}$  durante 5 min. - Después de la incubación, se pipeteo ligeramente y se centrifugó la solución conteniendo las células a 500 g durante 5 min. Posteriormente se desechó el sobrenadante y el botón celular se resuspendió en 1 ó 2 ml de medio de cultivo (dependiendo del tamaño del botón), se repartieron alícuotas en las cajas de cultivo, agregando la cantidad de medio de cultivo necesario para te

ner 5 ml en la caja, procediéndose a incubarlas (93). Posteriormente, cada vez que la superficie de cultivo se saturaba, las células eran nuevamente subcultivadas.

#### Prueba de quimiosensibilidad

La prueba de quimiosensibilidad se realizó cultivando las células tanto tumorales como normales en presencia de diversos agentes antineoplásicos: Adriamicina (Adriablastina, Farmitalia Carlo Erba, México), Bleomicina (Blancoxan, Bristol Labs, USA), Cisplatino (Platinol, Bristol Labs, USA), 5-Fluorouracilo (5-FU, Roche, México), Metotrexate (Lederle Labs, USA), empleando concentraciones de 0.003, 0.03, 0.3, 0.1, 1.0 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$ . Estos agentes se diluyeron en ME siendo esterilizados por medio de filtros milipore de 0.22  $\mu$ . Como control se sembraron células a las que no se les agregó ningún agente. Todos los experimentos se realizaron por duplicado y un mínimo de dos veces. En los experimentos con carcinomas se utilizaron células de la segunda resiembra y en el caso de epitelio normal se utilizaron células de las resiembras 2, 10, 15 y 20. Se sembraron las células a una densidad aproximada de  $3 \times 10^4$  células en cada caja de cultivo. A las 24 hrs se procedió a evaluar el número total de células viables utilizando solamente 2 cajas y se agregaron los agentes antineoplásicos a las cajas restantes incubándose durante 7 días. Al 7º día se evaluó todo el experimento, realizando tripsinización de todas las cajas, centrifugando a 500 g durante 5 min y resuspendiendo en 1 ml de SAF. El número final de células por

cada caja fue evaluado utilizando una Cámara de Neubauer. Con los valores obtenidos se procedió a calcular la inhibición a la proliferación celular.

#### Número cromosómico

Cultivos celulares proliferando en fase exponencial fueron incubados de 2 a 12 hrs en presencia de colchicina (Sigma Chem Co, USA), a una concentración de 1.0  $\mu\text{g/ml}$  en el medio. Posteriormente, las células fueron tripsinizadas, centrifugadas durante 5 min a 500 g (las condiciones de centrifugación fueron las mismas en toda la técnica), y resuspendidas en 5ml de medio hipotónico compuesto por una parte de medio de cultivo y dos partes de agua bidestilada. Después de 12 min de este tratamiento, las células se centrifugaron y al botón obtenido se le adicionaron cuidadosamente, 2 ml de una solución fijadora compuesta por 3 partes de metanol puro y una parte de ácido acético glacial, en el cual se mantuvieron durante 10 min. Al cabo de este tiempo, se desechó el fijador y las células fueron lavadas 2 veces con fijador fresco, siendo finalmente resuspendidas en 0.5 ml de éste (94,95). En portaobjetos previamente almacenados en alcohol etílico al 70% se goteó desde 1 m de altura la solución conteniendo las células y se secaron rápidamente a la flama. Las preparaciones así obtenidas, fueron teñidas durante 10 min con Giemsa (Sigma de México, Méx.) al 10% en agua bidestilada y observadas al microscopio con el objetivo de 100X de inmersión - buscándose preferentemente mitosis dispersas que no tuvieran so

breposición de los brazos de los cromosomas. Se contaron de 30 a 50 mitosis, para registrar el número cromosómico (96) en cada experimento, no se consideraron mitosis con número cromosómico menor de 40.

## RESULTADOS

Se realizaron cultivos celulares in vitro en medio líquido a partir de diferentes biopsias procedentes de pacientes con diversos tumores así como de epitelio de encía proveniente de un paciente sano, en presencia de distintos agentes antineoplásicos, así como la determinación del número cromosómico de células de un carcinoma. Se sembraron las biopsias y mediante subcultivo fueron llevadas a la segunda resiembra con el fin de tener la cantidad suficiente de células para sembrar un número determinado en cada caja de cultivo. En todos los experimentos realizados se sembraron aproximadamente  $3 \times 10^4$  células. Se efectuaron pruebas de quimiosensibilidad en células epiteliales normales de la resiembra dos para encontrar las concentraciones en las cuales la potencia de los fármacos in vitro es equivalente a las dosis utilizadas con los pacientes (equidosis). Así mismo se cultivaron cuatro biopsias de diferentes tumores y en la segunda resiembra se evaluó el efecto inhibitor de los fármacos. Se utilizaron los agentes más comunmente usados en el tratamiento de dichas neoplasias. Para tener un valor promedio de velocidad de proliferación del tejido sano y de las células tumorales, se obtuvieron de 4 a 9 valores a partir de los cuales se calculo la Tasa de Proliferación Celular (TPC). La TPC más alta fue de 89 hrs para el carcinoma espinocelular y la más pequeña fue de 45 hrs para el carcinoma de pulmón.

## Inhibición a la proliferación de células epiteliales normales causada por diferentes agentes antineoplásicos

Para poder evaluar el efecto inhibitor que tienen los diferentes agentes antineoplásicos sobre la proliferación de las células epiteliales normales, se sembraron células de la segunda re siembra en presencia de Cisplatino, Metotrexate y Bleomicina a las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$  y se mantuvieron en cultivo durante 7 días. Estas concentraciones han sido utilizadas en experimentos anteriores, siendo determinadas en base a una equivalencia a las dosis aplicadas a los pacientes.

Al utilizar estas concentraciones se observó que Cisplatino casi no tuvo efecto inhibitor (4%, 7%, 25%), en cambio Bleomicina fue el que causó mayor inhibición aún con la concentración más pequeña (53%, 80%, 91%), el efecto de Metotrexate fue similar al de Bleomicina en las concentraciones de 1.0 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$  (84% y 89%) (Fig. 1) Para encontrar la equidosis de los fármacos se realizaron ensayos variando las concentraciones hasta encontrar un punto en el cual la actividad de los fármacos fuera la misma en el epitelio sano. Se encontró que las concentraciones equivalentes son de 0.3, 0.03, y 0.003  $\mu\text{g/ml}$  para Cisplatino, Metotrexate y Bleomicina respectivamente. Con estas concentraciones se obtuvo un efecto inhibitor semejante de 19%, 20% y 21% para Cisplatino, Metotrexate y Bleomicina (Fig. 2).



Inhibición a la proliferación de células epiteliales normales causada por diferentes agentes antineoplásicos en distintas resiembras

Con el propósito de observar la diferencia en sensibilidad que presentan las células a través de los distintos pasajes, se realizaron ensayos de quimiosensibilidad en las resiembras 2, 10, 15 y 20 de células epiteliales normales utilizando Cisplatino (0.1, 1.0 y 10.0  $\mu\text{g/ml}$ ), Metotrexate (0.03, 0.3 y 3.0  $\mu\text{g/ml}$ ) y Bleomicina (0.003, 0.03 y 0.3  $\mu\text{g/ml}$ ). En general, la inhibición a la proliferación de las células causada por los fármacos fue variable en las distintas resiembras ya que la actividad que tuvieron los agentes en la resiembra 2 (R2) no se conserva a través de los diferentes pasajes. Esto es más evidente a las concentraciones de 0.1, 0.03 y 0.003  $\mu\text{g/ml}$  (Fig. 3).

En la R2 la actividad de los fármacos a las concentraciones más bajas fue la misma, esto es, el efecto inhibitorio que tienen sobre las células es casi igual, mientras que al aumentar 10 veces las concentraciones hubo una inhibición muy distinta entre los fármacos con 23% para Cisplatino, 45% para Metotrexate y 59% para Bleomicina. Lo mismo sucede al aumentar nuevamente las concentraciones en donde Bleomicina es el que causa una mayor inhibición 76%, mientras que Metotrexate de 68% y Cisplatino de 43% que fue el que menor efecto inhibitorio tuvo en las tres concentraciones usadas (Fig. 3).

En la R10 la inhibición causada por los tres agentes a las concentraciones más bajas ya no fue igual entre sí, ya que Bleo

micina causó mayor inhibición 45%, Metotrexate no presentó una inhibición muy diferente a la de la R2 con 25% de inhibición al igual que la causada por Cisplatino que fue casi la misma. Al aumentar la concentración, la inhibición causada por Cisplatino y por Bleomicina fue muy similar a la causada en la R2, no siendo así para Metotrexate que presentó una inhibición muy alta de 82%. Con las concentraciones mayores la inhibición causada por Bleomicina fue la misma que en la R2, en cambio Cisplatino y Metotrexate causaron mayor inhibición (Fig. 4).

En general, cuando se utilizaron células de la R15, nuevamente los agentes causaron una inhibición distinta a la observada en R2 y aún distinta de la R10. Es interesante notar que las células de R15 fueron más sensibles a Bleomicina en sus tres concentraciones que las células de R2 y R10 (Fig. 5).

Al estar expuestas las células de la R20 a las concentraciones más bajas de los fármacos, la inhibición que causaron fue muy distinta en comparación con la R2. De nuevo Bleomicina causó una mayor inhibición de 50% semejante a la causada por Metotrexate de 44% que fue muy diferente a la de las resiembras anteriores, Cisplatino no presentó una inhibición muy grande, 25%, disminuyendo poco con respecto a R2, R10 y R15 (Fig. 6). Es interesante hacer notar que la TPC de las células epiteliales disminuyó a través de las resiembras, esto es, que la división celular fue cada vez más rápida, siendo de 65 hrs para la R2, 50 hrs para la R10, 48 hrs para la R15 y de 46 hrs para la R20. En general se puede observar que conforme las células permanecen

cieron más tiempo en cultivo fueron más sensibles al efecto de las drogas (Figs. 3,4,5,6).

#### Inhibición a la proliferación de células tumorales por Cisplatino, Metotrexate y Bleomicina

Con el fin de evaluar la inhibición causada por las distintas drogas antineoplásicas sobre la proliferación de células provenientes de tumores, se obtuvieron células de la segunda resiem bra y se cultivaron durante 7 días en presencia de Cisplatino, Metotrexate y Bleomicina a las concentraciones de 0.3, 0.03 y - 0.003  $\mu\text{g/ml}$ . Las células se obtuvieron a partir de explantes - provenientes de biopsias de carcinomas espinocelular, basocelular y de pulmón.

En general, hubo variabilidad en la sensibilidad de las células hacia los fármacos, ésto es, que hubo una selectividad en - la inhibición tanto en un mismo carcinoma como entre los demás. Se puede observar que el agente más efectivo no fue el mismo pa - ra los tres casos, ya que la curva de inhibición fue diferente entre los distintos carcinomas (Fig. 7). En el carcinoma espi - nocelular, el Metotrexate fue el inhibidor menos efectivo con - 30% de inhibición mientras que Bleomicina fue el más efectivo - con 55% de inhibición. En éste caso las células tuvieron una - TPC de 89 hrs por lo que se consideraron de proliferación lenta. Es interesante hacer notar que Cisplatino causó una alta inhibi - ción de 43% a diferencia de los demás casos en que fue siempre el menos efectivo. La curva de inhibición que se presentó en el

carcinoma basocelular (TPC de 67 hrs) fue muy distinta a la del carcinoma espinocelular. En este caso el inhibidor más efectivo fue Metotrexate con 35% de inhibición a diferencia del caso anterior en que fue el menos efectivo. Bleomicina presentó una menor inhibición del 24% siendo distinta en relación a la presentada en el carcinoma espinocelular. La inhibición que presentaron los fármacos en el carcinoma de pulmón, que fue de proliferación rápida con una TPC de 45 hrs, fue muy semejante a la presentada en el carcinoma basocelular siendo la inhibición causada por Metotrexate de 38% y de 30% para Bleomicina. La inhibición que causó Cisplatino en el carcinoma basocelular y el carcinoma de pulmón fue muy similar entre sí y muy similar a la causada a las células epiteliales normales en R2 y R10. Debido a que son pocos los casos, no se puede decir que haya una asociación entre la TPC y el efecto inhibidor de los tres fármacos, pero es importante señalar que Metotrexate fue el más efectivo en el carcinoma de pulmón con TPC de 45 hrs y que se consideró como de proliferación rápida y el menos efectivo en el carcinoma espinocelular con TPC de 89 hrs y que se consideró como de proliferación lenta, y que por el contrario Bleomicina fue el más efectivo en el carcinoma de proliferación lenta.

También se evaluó el efecto inhibidor de Cisplatino, Adriamicina y 5-Fluorouracilo (5-FU) en células de la R2 provenientes de un carcinoma de mama. Se utilizaron estos fármacos debido a que son los más usados en el tratamiento de esta neoplasia. En este caso se usaron las concentraciones de 0.1, 1.0 y 10.0 µg/ml.

debido a que no se han realizado las evaluaciones del efecto inhibitorio que tienen estos fármacos sobre el epitelio normal. - En este carcinoma el fármaco que tuvo mayor poder inhibidor fue Adriamicina a las tres concentraciones usadas (Fig. 8). Con la concentración de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  Adriamicina causó una inhibición de 28% mientras que Cisplatino y 5-FU de 14%. Únicamente a la concentración de 1.0  $\mu\text{g/ml}$  el efecto que tuvieron los tres fármacos fue muy similar. Cisplatino y 5-FU tuvieron un comportamiento muy semejante en las dos primeras concentraciones y difirieron únicamente en la concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  resultando más efectivo Cisplatino. Es interesante notar que en el caso de Cisplatino y 5-FU el porcentaje de inhibición aumentó proporcionalmente al aumentar la concentración de los fármacos. Esto no ocurrió con Adriamicina ya que con la concentración de 0.1  $\mu\text{g/ml}$  produjo 28% de inhibición mientras que con 1.0  $\mu\text{g/ml}$  solo hubo 5% más de inhibición y a 10.0  $\mu\text{g/ml}$  la inhibición fue de 56%.

#### Determinación del número cromosómico

Se realizó la determinación del número cromosómico en el carcinoma basocelular en la resiembra 2 con el propósito de corroborar la malignidad de las células obtenidas in vitro, y en el epitelio normal en la resiembra 20 para observar si se presentaban anomalías cromosómicas en las células mantenidas durante largo tiempo en cultivo. Las células fueron tratadas con colchicina en un lapso de tiempo que dependió de su velocidad de proliferación celular.

Las células de carcinoma basocelular en la R2 fueron expuestas durante 2 y 8 horas al tratamiento con colchicina y presentaron una variación en el número cromosómico de 40 a 80, con un número modal de 46 (Tabla I).

Las células de epitelio normal en la R20, expuestas durante 2 y 4 horas al tratamiento con colchicina, presentaron una variación en el número cromosómico de 41 a 64, con un número modal de 46, siendo esto muy evidente ya que se encontró en 30 de las 50 mitosis contadas (Tabla I).

Se realizó un análisis estadístico (Tabla II) utilizando la prueba de análisis de varianza por rangos de una vía de Kruskal-Wallis que nos permite hacer una comparación entre el efecto que tienen los distintos fármacos. Se plantea una hipótesis nula ( $H_0$ ) y una hipótesis alternativa ( $H_1$ ).

$H_0$ : Los tres fármacos utilizados producen siempre la misma inhibición.

$H_1$ : Los tres agentes usados producen una inhibición celular muy diferente.

Para calcular el valor de H se utiliza la siguiente ecuación:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^K \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

donde  $R_i$  es la suma de los rangos asignados a las observaciones de la muestra  $i$ , y  $N$  es el número total de observaciones.

CELULAS EPITELIALES NORMALES (R 2)

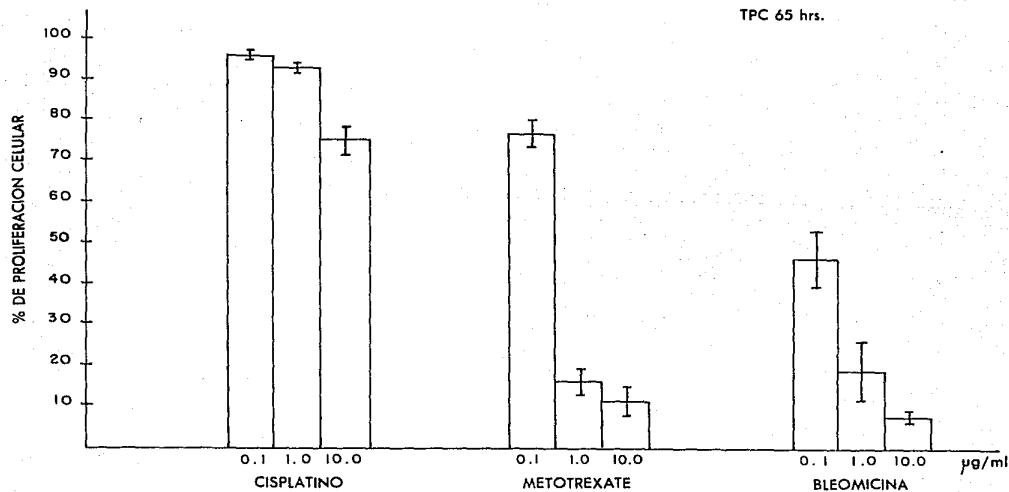


FIGURA 1 Inhibición a la proliferación celular *in vitro*, causada por Cisplatino, Metotrexate y Bleomicina a diferentes concentraciones en células de epitelio normal de la segunda resiembra.

CELULAS EPITELIALES NORMALES (R 2)

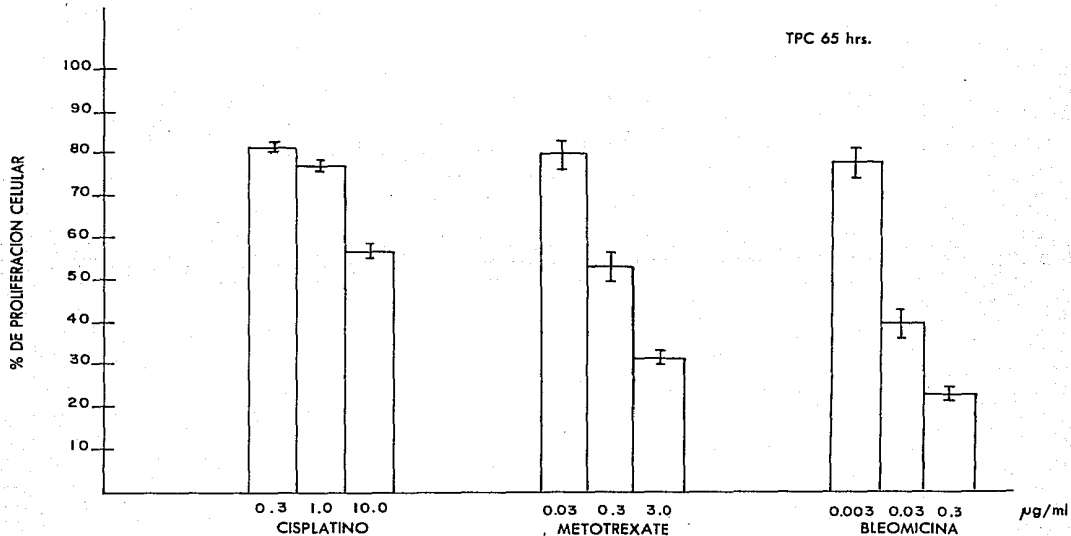


FIGURA 2 Inhibición a la proliferación celular *in vitro*, causada por Cisplatino, Metotrexate y Bleomicina a diferentes concentraciones en células de epitelio normal de la segunda resiembra.



CELULAS EPITELIALES NORMALES (R 2)

TPC 65 hrs.

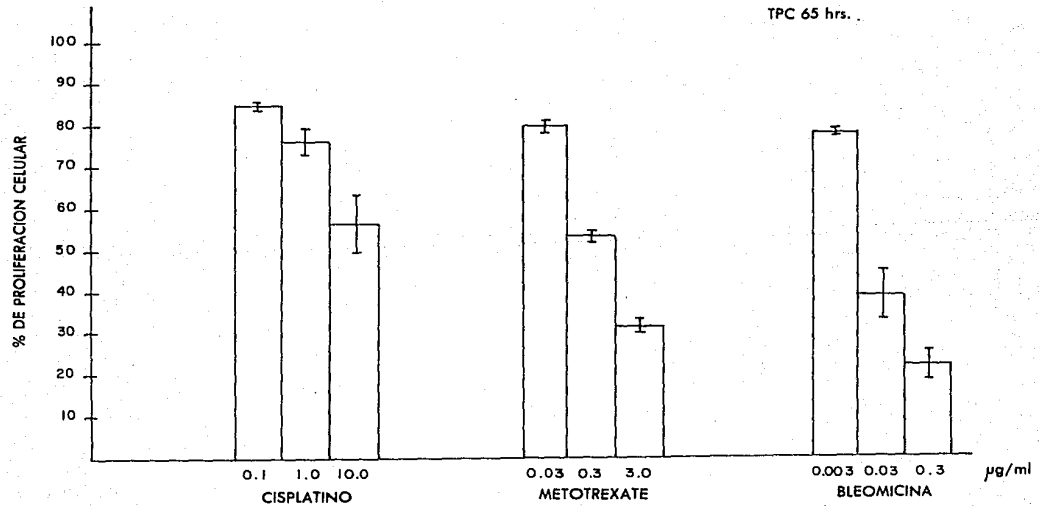


FIGURA 3 Inhibición a la proliferación celular *in vitro*, causada por Cisplatin, Metotrexate y Bleomicina a diferentes concentraciones en células de epitelio normal de la segunda resiembra.

CELULAS EPITELIALES NORMALES (R 10)

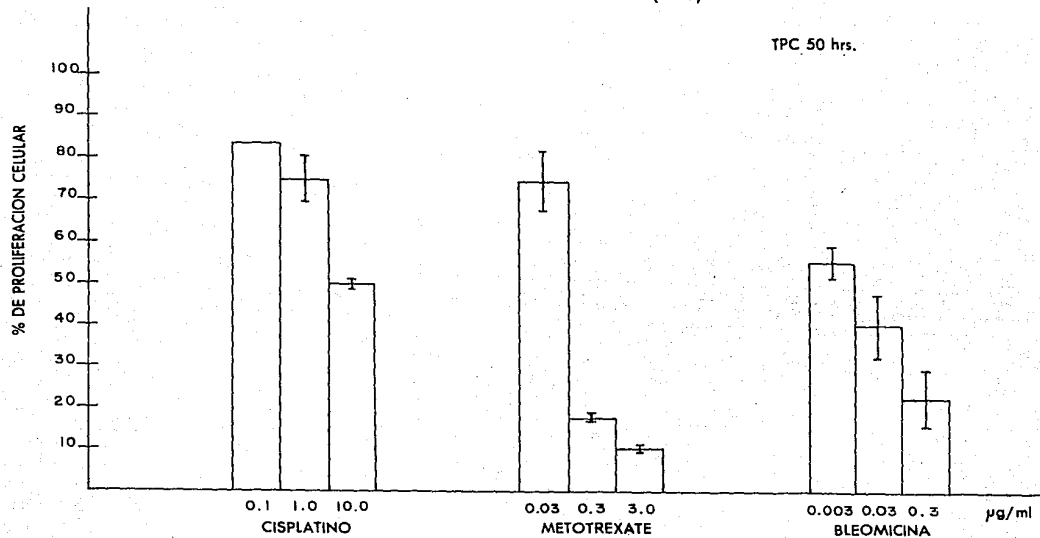


FIGURA 4

Inhibición a la proliferación celular in vitro, causada por Cisplatino, Metotrexato y Bleomicina a diferentes concentraciones en células de epitelio normal de la resiembra 10.

CELULAS EPITELIALES NORMALES (R 15)

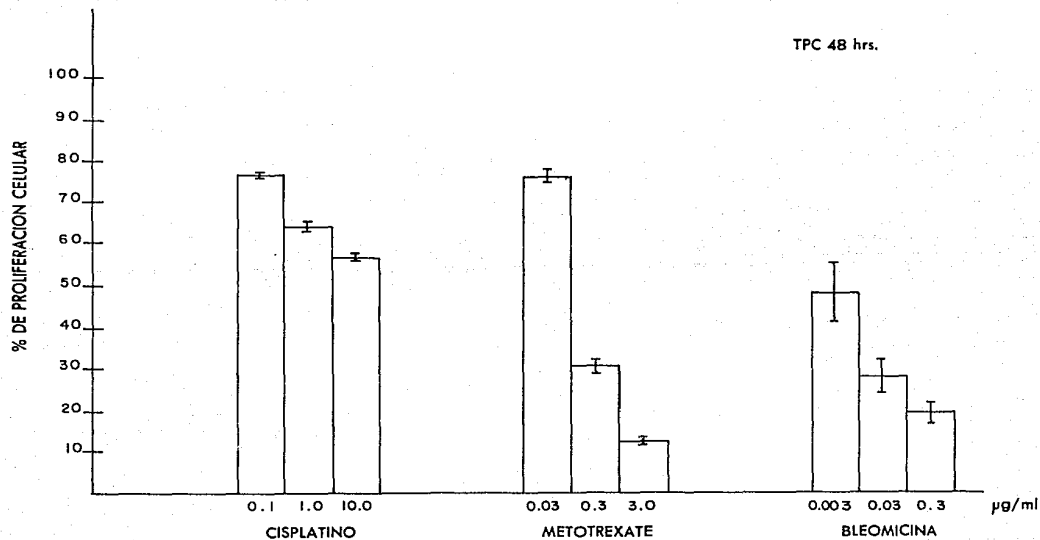


FIGURA 5 Inhibición a la proliferación celular *in vitro*, causada por Cisplatino, Metotrexate y Bleomicina a diferentes concentraciones en células de epitelio normal de la resiembra 15.

CELULAS EPITELIALES NORMALES (R 20)

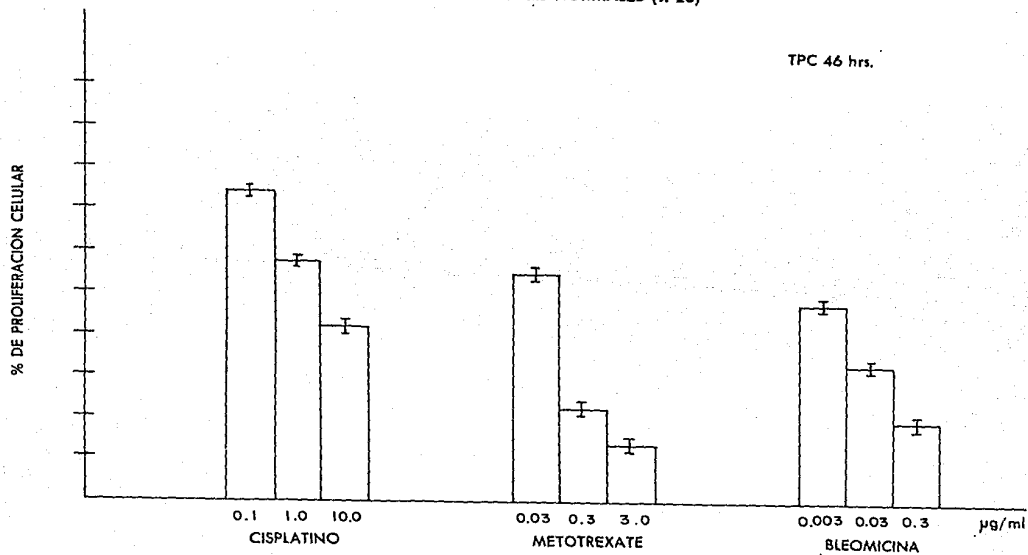


FIGURA 6 Inhibición a la proliferación celular *in vitro*, causada por Cisplatino, Metotrexate y Bleomicina a diferentes concentraciones en células de epitelio normal de la resiembra 20.

CELULAS EPITELIALES NORMALES

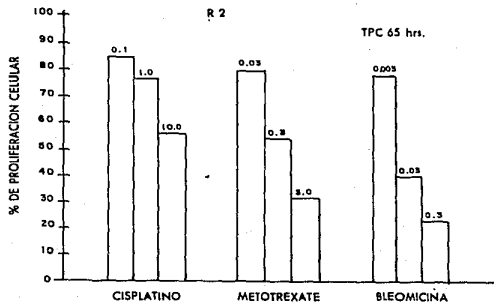


FIGURA 3

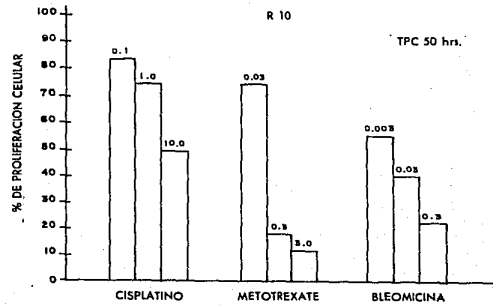


FIGURA 4

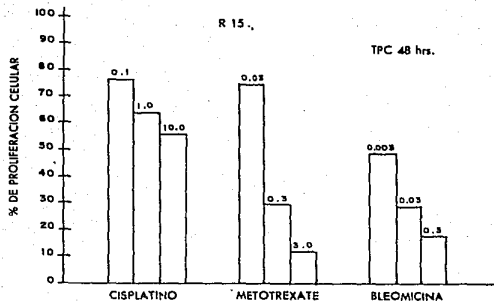


FIGURA 5

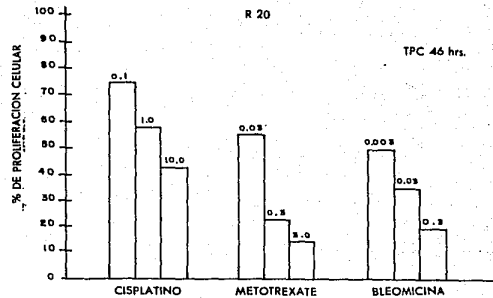


FIGURA 6

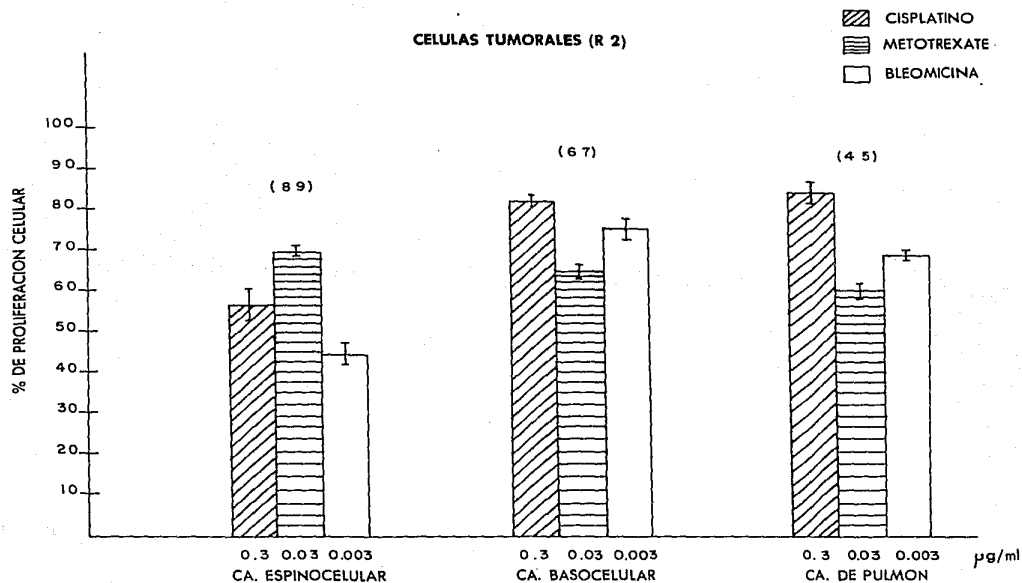


FIGURA 7

Inhibición a la proliferación celular *in vitro*, causada por Cisplatino, Metotrexate y Bleomicina a diferentes concentraciones en células de la segunda resiembra de distintos tipos de carcinomas. Los números entre paréntesis representan la TcC dada en horas.

CÁRCINOMA DE MAMA (R 2)

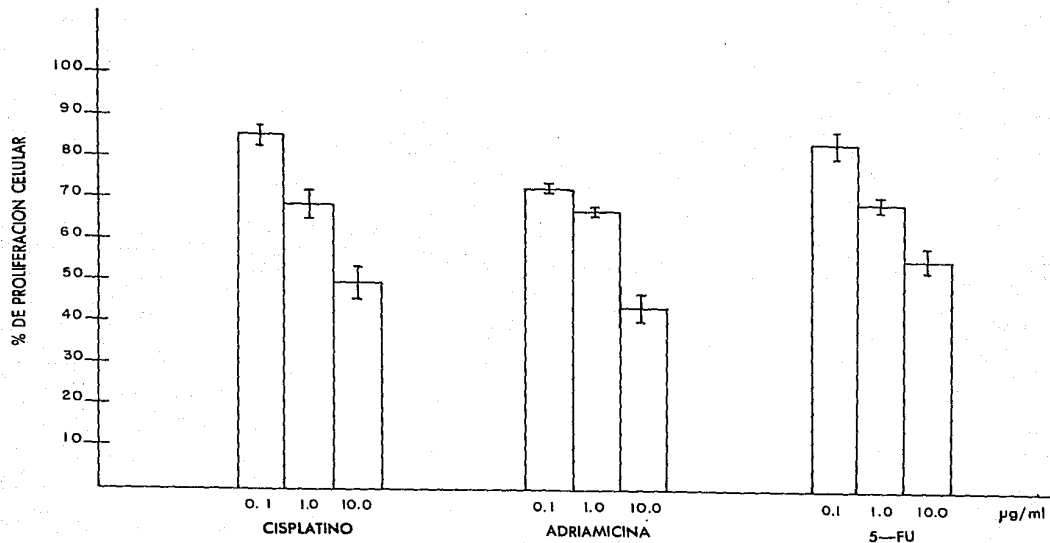


FIGURA 8 Inhibición a la proliferación celular *in vitro*, causada por Cisplatino, Adriamicina y 5-FU a diferentes concentraciones en células de la segunda resiembra de carcinoma de mama.

TABLA I

NUMERO CROMOSOMICO

NUMERO DE CROMOSOMAS	40	41	42	43	45	46	47	50	64	70	76	78	80	NUMERO DE MITOSIS CONTADAS
TIPO CELULAR														
CARCINOMA BASOCELULAR	1		3	4	2	11	2		3	4	5	6	9	50
CELULAS NORMALES (R20)		3	3	4		30	3	4	3					50



TABLA I  
 NUMERO CROMOSOMICO

NUMERO DE CROMOSOMAS	40	41	42	43	45	46	47	50	64	70	76	78	80	NUMERO DE MITOSIS CONTADAS
<hr/>														
TIPO CELULAR														
<hr/>														
CARCINOMA BASOCELULAR	1		3	4	2	11	2		3	4	5	6	9	50
CELULAS NORMALES (R20)		3	3	4		30	3	4	3					50

TABLA II  
ANALISIS DE VARIANZA POR RANGOS DE KRUSKAL-WALLIS

TIPO CELULAR Y NO. DE RESIEMBRA	VALOR CRITICO DE $X^2$ PARA 3 GRADOS DE LIBERTAD	VALOR DE H	NIVEL DE SIGNI- FICANCIA ( $\alpha$ )	DECISION
Epitelio normal (R2)	11.345	11.816	0.01	Se rechaza $H_0$
Epitelio normal (R10)	12.838	14.757	0.005	" " "
Epitelio normal (R15)	6.251	6.853	0.1	" " "
Epitelio normal (R20)	9.348	10.776	0.025	" " "
Carcinoma Espinocelular (R2)	9.348	11.088	0.025	" " "
Carcinoma Basocelular (R2)	9.348	11.228	0.025	" " "
Carcinoma de Pulmón (R2)	6.251	6.650	0.1	" " "

## DISCUSION

La quimioterapia es efectiva para tratar ciertos tipos de cáncer, pero la mayoría de los agentes antineoplásicos son altamente tóxicos. Esto ha creado la necesidad de desarrollar un método estandar para evaluar la sensibilidad de las células hacia las drogas. Se sabe que la biología de las células cancerosas humanas puede ser estudiada después de que éstas se han retirado del cuerpo, en un ambiente en el cual su comportamiento es muy semejante al que tienen in vivo (97,98). Esto ha llevado al desarrollo de pruebas in vitro que pueden predecir de una manera efectiva la quimiosensibilidad de un tumor maligno. Sin embargo, no se ha logrado aún la selección de una quimioterapia efectiva para pacientes individuales (99). Las pruebas de quimiosensibilidad in vitro pueden contribuir de una manera significativa en la predicción de la capacidad de una droga para inhibir la proliferación de células malignas in vivo y de esta manera contribuir en la selección del agente citotóxico más idóneo para cada tipo de cáncer. De esta forma se podría ayudar a evitar exposiciones innecesarias del paciente a drogas poco efectivas.

Se han desarrollado varias técnicas de ensayos in vitro para realizar estas pruebas, pero lo que se ha estudiado y utilizado más comunmente es el ensayo clonogénico, que utiliza medio semi-sólido para obtener crecimiento de colonias a partir de células de tumor humano derivados directamente de biopsias (100). El ensayo clonogénico tiene tanto ventajas como desventajas. Su prin

principal ventaja es el uso de explantes primarios de tumor como fuente de material celular. La mayor limitación del ensayo clonogénico es que un alto porcentaje de tumores (aproximadamente 50%) no produce colonias, y que las eficiencias de clonación son generalmente bajas (en el rango de 0.01 a 0.1%) (101). También se incluyen varias dificultades técnicas relacionadas con la preparación y procesamiento de la muestra, y los problemas asociados con el tiempo de duración del ensayo y los métodos de evaluación (102). Por otro lado, se han utilizado métodos de cultivo en medios líquidos (103) para ensayar el efecto de drogas sobre células normales y neoplásicas. Dichos ensayos se realizan con líneas celulares ya establecidas por lo que los resultados obtenidos no son muy confiables debido a que las células al estar en cultivo durante largos períodos han sufrido cambios o transformaciones (104). En el presente trabajo se utilizó medio líquido para cultivar células provenientes de explantes primarios como una alternativa para evaluar la quimiosensibilidad in vitro. Este método de cultivo en medio líquido se utilizó en ensayos anteriores (105,106) en los que se evaluó el efecto inhibitorio de la proliferación celular sobre explantes primarios obteniéndose una alta eficiencia de proliferación. Tomando en cuenta las ventajas que ofrece este método de cultivo, consideramos que se contaba con un ensayo útil para la evaluación de la quimiosensibilidad in vitro. En consecuencia decidimos continuar con otra serie de experimentos variando la técnica. En este trabajo no se utilizaron explantes primarios para la eva-

luación de la quimiosensibilidad sino células de la segunda re-  
siembra (R2) con el fin de sembrar un número determinado en las  
mismas ya que con el explante inicial no se tiene la certeza -  
del número inicial celular. Pensamos que cultivar las células -  
hasta R2 no produce un daño celular significativo que pueda al-  
terar la sensibilidad de las células hacia los fármacos. Dos pa-  
sajes celulares no implican un período prolongado de cultivo ni  
las células se han expuesto a muchos tratamientos enzimáticos -  
que son necesarios para el subcultivo, como es el caso de las -  
líneas celulares.

Además se pretende encontrar concentraciones de drogas antineo-  
plásicas in vitro, que sean equivalentes a las dosis toleradas  
por el paciente, ya que no existen concentraciones estandar que  
puedan ser utilizadas en las pruebas de quimiosensibilidad. Ca-  
da grupo de estudio emplea diferentes concentraciones para rea-  
lizar sus experimentos sin ninguna base en la posible toleran-  
cia del paciente hacia una droga. En nuestros experimentos de-  
terminamos las concentraciones equivalentes in vitro de tres -  
fármacos, Cisplatino (0.3  $\mu\text{g/ml}$ ), Metotrexate (0.03  $\mu\text{g/ml}$ ) y -  
Bleomicina (0.03  $\mu\text{g/ml}$ ), que son los más comunmente utilizados  
en quimioterapia de cabeza y cuello. Estas concentraciones cau-  
san una inhibición a la proliferación semejante en epitelio sa-  
no por lo que se obtuvo un punto de referencia para analizar -  
las mismas concentraciones sobre las células tumorales. Sería -  
muy conveniente que al efectuar el ensayo de quimiosensibilidad  
con las células malignas se realizara también con células nor-

males para tener una mejor evaluación del fármaco más activo en células tumorales y que no cause un gran daño en el epitelio normal.

En general, el patrón de inhibición celular sobre epitelio sano causado por los tres fármacos no se conservó a través de las resiembras ya que hay una diferencia notable entre la R2 y la R20. Para Metotrexate y Bleomicina ésto es evidente ya que hubo una variación en sensibilidad de las células y puede deberse a que la TPC disminuyó conforme avanzaron las resiembras, ésto es que las células se dividieron cada vez más rápido. Esto se ve apoyado por el hecho de que la acción citotóxica de un número de drogas que son utilizadas en quimioterapia depende de la tasa de división celular, lo que significa que mientras más rápido se dividen las células más rápido son inhibidas (107,108). Sin embargo, en el caso de Cisplatino no ocurrió así, ya que tal vez dicho fármaco no sea muy activo en las células que se dividen rápidamente. Además, el hecho de que las células de R20 hayan sido más sensibles que las células de R2, también podría deberse a que las células han envejecido ya que las células de R2 han tenido menor número de divisiones que las células de R20. Esto nos podría dar una idea de que las células más viejas son más sensibles que las células jóvenes.

Se sabe que el establecimiento de líneas celulares requiere de un largo período de adaptación, y cuando se realizan los experimentos, las células por lo general han sufrido muchos cambios en sus características originales.

El haber obtenido en nuestros resultados una variación en la - sensibilidad de las células hacia los fármacos en comparación - de la R2 con la R20, aunado a que hubo una disminución en la - TPC de 65 hrs en R2 a 46 hrs en R20 nos puede dar un indicio de que hubieron cambios en las características originales de las - células. Además al realizar el análisis del cariotipo se pudo - observar que hay algunas alteraciones en el número cromosómico ya que un 40% de las mitosis observadas no conservó el número diploide normal, por lo que consideramos que esto también apo-ya el hecho de que las células epiteliales normales pudieron ha-ber sufrido alteraciones en sus características originales. Por tanto, ésto nos parece indicar que al utilizar una línea celu-lar para realizar pruebas de quimiosensibilidad los resultados no van a ser tan confiables como cuando se utiliza el explante inicial o en células de la R1 o R2 que muy probablemente aún - mantienen sus características originales.

Con respecto a las células tumorales, es importante hacer no tar que sí hay una inhibición selectiva de los fármacos, ya que las concentraciones usadas de los tres agentes tuvieron el mis-mo efecto en el epitelio normal, y al actuar sobre las células tumorales el patrón de inhibición celular fue diferente. Se pue-de observar que hubo variabilidad en el patrón de inhibición en tre los distintos carcinomas y aún dentro de un mismo tipo celu-lar. Por tanto se puede decir que hay indicios de que la efecti-vidad de la quimioterapia varía de tumor a tumor y aún dentro - de tumores del mismo tipo histológico.

Metotrexate resultó ser el menos efectivo para las células de carcinoma espinocelular que tuvo una TPC alta y el más efectivo para las células de carcinoma de pulmón con una TPC baja. También observamos que Bleomicina fue más activo al inhibir las células de carcinoma espinocelular mientras que fue menos activo en las células de carcinoma de pulmón. No se puede establecer con claridad si existe una relación entre la TPC y la acción inhibidora de los fármacos, aunque los resultados que se han obtenido previamente, nos indican que Metotrexate es más activo con las células con TPC baja, es decir que proliferan rápidamente, y Bleomicina es más activo con las células en TPC alta, esto es, que son de proliferación lenta. Lo anterior nos induce a pensar que hay agentes antineoplásicos que son buenos inhibidores para las células de proliferación lenta y otros para los de proliferación rápida. Además, en nuestros resultados generalmente se ha observado que Cisplatino es un agente poco activo, pero en el caso de las células de carcinoma espinocelular resultó ser más activo. Consideramos que puede deberse a que estas células tienen una TPC alta o sea que se dividen lentamente y dado que Cisplatino es un agente fase-no específico pudo ejercer mejor su acción resultando de alguna manera más efectivo para las células de proliferación lenta.

En el caso del carcinoma de mama se sembraron once biopsias de las cuales sólo proliferaron cuatro, dos de ellas se contaminaron, otras no estábamos seguros de que las células fueran epiteliales pues tenían forma de fibroblastos y se decidió -



no utilizarlas, por lo que solo se realizó un ensayo con carcinoma de mama. Varios autores (109,110,111) han reportado que este tipo de carcinoma difícilmente prolifera *in vitro* dado que se necesitan factores que estimulen la proliferación (factores de crecimiento y hormonas). La mayoría de los ensayos de quimio sensibilidad se han realizado en agar semisólido, obteniéndose una muy baja eficiencia de clonación, sin embargo, con el método de cultivo en medio líquido los explantes que proliferaron lo hicieron sin necesidad de agregar factores de crecimiento por lo que creemos que existe la posibilidad de continuar realizando pruebas de quimiosensibilidad con este tipo de tumores. Será necesario investigar las condiciones óptimas de cultivo - particulares para éste tipo de carcinoma para obtener una mayor eficiencia de proliferación.

Con la finalidad de corroborar la malignidad de las células, se efectuó la determinación del número cromosómico de células del carcinoma basocelular, y no se encontró un número modal claro, indicándonos que hay inestabilidad en el material genético que presentan estas células. También se puede observar que hay alteraciones aneuploídicas, la mayoría de ellas de tipo hiperploide, lo cual es una característica común de las células de origen maligno. En nuestro análisis encontramos que casi el 50% de las metafases observadas presentaron entre 70 y 80 cromosomas. Lo anterior nos da un indicio de que en realidad las células obtenidas a partir de la biopsia del carcinoma basocelular son de origen maligno. El hecho de que se encontraran células -

con un complemento diploide o complementos con cambios menores nos podría inducir a pensar que estas células pueden constituir los remanentes de las precursoras de la línea de células malignas aneuploides que aún se encontraban presentes en el tumor. Lo ideal hubiera sido realizar el análisis cromosómico de todos los carcinomas utilizados pero no se logró obtener un número suficiente de metafases. Esto no fue posible debido a que aún no se ha logrado perfeccionar la técnica ya que es difícil obtener el número necesario de metafases de buena calidad que se requieren para el estudio, pues es inevitable el obtener metafases incompletas o metafases que no se dispersaron completamente. - Otro problema fue la falta de un número suficiente de células en la R2 para realizar el análisis cromosómico. Además, sería pertinente el realizar estudios cariotípicos en los cuales sea posible determinar en forma precisa la ausencia de algún o algunos cromosomas, así como posibles daños en éstos, para que pudiesen ser utilizados como marcadores específicos de estos tipos de carcinomas. Así mismo el realizar análisis cromosómicos para cada uno de los carcinomas que se utilicen.

Finalmente, pensamos que se ha avanzado en el establecimiento de la técnica, ya que al utilizar la R2 se conoce el número inicial y siempre se va a sembrar el mismo número de células, y la evaluación final de la inhibición a la proliferación es exacta, cosa que no sucede cuando se utiliza el explante primario - debido a que no se conoce el número inicial de células y la evaluación no es exacta y es más difícil de realizar pues hay que

teñir las colonias y realizar mediciones con vernier para obtener el área de proliferación. Además, se puede mencionar que - ésta técnica de cultivo en medio líquido puede ser muy útil para determinar cual ó cuales agentes son los más efectivos para el tratamiento oncológico en pacientes individuales, ayudando - de ésta manera a evitar que se den a los individuos fármacos - que no van a dar resultados óptimos para su neoplasia y en cambio le van a producir efectos tóxicos secundarios (mielosupresión, náusea, vómito, alopecia, etc.) que traen consigo el uso de cualquier agente anticanceroso. También con éste ensayo se podría seleccionar de manera eficaz las nuevas drogas antineoplásicas que se produzcan. Pero es claro que se necesita realizar una gran cantidad de trabajo adicional, tal como aplicar el ensayo de quimiosensibilidad en un mayor número de tumores de - diferentes tipos y comparar los resultados obtenidos in vitro - con las experiencias in vivo para que de ésta manera pueda ser utilizado en beneficio de pacientes individuales.

## CONCLUSIONES

- 1) Se determinaron las concentraciones in vitro de Cisplatino, Metotrexate y Bleomicina que son equivalentes a las dosis toleradas por los pacientes y que causan la misma inhibición a la proliferación en epitelio normal.
- 2) Al estar las células epiteliales normales durante un largo período en cultivo se produjeron alteraciones en las características originales.
- 3) Los distintos tipos celulares fueron inhibidos de manera diferente por los agentes anticancerosos utilizados.
- 4) Se apoya la idea de que hay agentes antineoplásicos que son buenos inhibidores para las células de proliferación lenta y otros que son buenos inhibidores para las células de proliferación rápida.
- 5) Es muy probable que las células obtenidas a partir de la - biopsia de carcinoma basocelular sean en realidad malignas.
- 6) Este ensayo puede ser muy útil para determinar cual o cuales agentes son los más efectivos para el tratamiento de pacientes individuales.

## APENDICE I

### Medio Mínimo Esencial de Eagle

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

AMINOACIDOS	CONCENTRACION (mg/l)
L-arginina	84.0
L-cistina	62.57
L-glutamina	584.0
Glicina	30.0
L-histidina HCL.H <sub>2</sub> O	42.0
L-iso-leucina	105.0
L-leucina	105.0
L-lisina.HCL	146.0
L-metionina	30.0
L-fenilalanina	66.0
L-serina	42.0
L-treonina	95.0
L-triptofano	16.0
L-tirosina (sal dis6dica)	104.0
L-valina	94.0

#### VITAMINAS

D-Ca pantotenato	4.0
Cloruro de Colina	4.0
Acido f6lico	7.2
Inositol	7.2
Nicotinamida	4.0
Piridoxal. HCL	4.0

VITAMINAS	CONCENTRACION (mg/l)
Rivoflavina	0.4
Tiamina	4.0

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

OTROS COMPUESTOS	
L-glucosa	4500.0
Rojo fenol	15.0

#### Preparación del Medio de Eagle:

Se mide un volúmen de agua bidestilada 5% menor al volúmen de medio total deseado. Se adicionan 13.4 g/l del medio de Eagle en polvo (Microlab, México) agitándose suavemente, además se agregan 3.7 g de bicarbonato de sodio, 100 U/ml de penicilina y 100 µg/ml de estreptomycin. Se complementa el volúmen deseado con agua bidestilada, se ajusta el pH entre 0.2 y 0.3 menor del que se desea, siendo éste de 7.2 (esto se hace con ácido clorhídrico) y se esteriliza por filtración con bióxido de carbono, pasándolo a través de una membrana con poro de 0.22 µ.

## APENDICE II

### Solución Amortiguadora de Fosfatos (SAF)

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

SALES	CONCENTRACION (g/l)
Cloruro de sodio	8.0
Cloruro de potasio	0.2
Fosfato de sodio monobásico	2.16
Fosfato de potasio	0.2

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

### APENDICE III

#### Preparación de Verseno:

Para preparar el verseno se agregan a 800 ml de agua bidestilada, las siguientes sustancias:

Tris base	3.04 g
Cloruro de sodio	8.00 g
Cloruro de potasio	0.40 g
Etilen-diamin-tetra-acético (EDTA)	0.20 g

Posteriormente se agita, se afora a 1 litro con agua bidestilada, se ajusta el pH a 7.7 con ácido clorhídrico 10 N y se esteriliza por medio de autoclave a 20 lb durante 20 min.

### APENDICE IV

#### Preparación de tripsina:

La solución de tripsina se prepara colocando 0.025 g de tripsina (Sigma Chemical, USA) en 100 ml de verseno, esto se mezcla y se filtra, utilizando un filtro milipore de 0.22  $\mu$ . Se recomienda colocarla en tubos pequeños y almacenarla a  $-4^{\circ}\text{C}$  para evitar su autodigestión.



## REFERENCIAS

- 1) Medrano, L. 1975. Células, virus y cáncer. Ed. H. Blume. España. pp. 75-107.
- 2) Weinberg, R. A., A molecular basis of cancer. Sci.Am., 249: 126-142, 1983.
- 3) De Vita, V.T., Hellman, S., Rosenberg, S.A. 1982. Cancer. Principles & practice of oncology. Ed. J.B. Lippincott Co. USA. pp. 33-82.
- 4) Hood, L.E., Weissman, I.L., Wood, W.B., Wilson, J.H. 1984. Immunology. Ed. The Benjamin/Cummings Pub. Co. California. pp. 488-509.
- 5) Pierce, G.B., Differentiation of normal and malignant cells. Fed. Proc., 29:1248, 1970.
- 6) Folkman, J., The vascularization of tumors. Sci. Am., 243: 58-74, 1976.
- 7) Folkman, J., Haudenschild, C., Angiogenesis in vitro. Nature, 288: 551-556, 1980.
- 8) Folkman, J., How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A. Clowes Memorial award Lecture. Cancer Res., 46:467-473, 1986.
- 9) Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J.D. 1983. Molecular biology of the cell. Ed. Garland Publishing Inc. USA. pp. 620-628.
- 10) Scott, R.E., A pathophysiological concept of carcinogenesis. Fed. Proc., 43:777, 1984.
- 11) Cairns, J., The origin of human cancers. Nature. 289:353-

- 357, 1981.
- 12) Knudson, A.G. Mutation and cancer. *Adv. Cencer Res.*, 17:317-352, 1973.
  - 13) Pitot, H.C., Heidelberger, C., Metabolic ragulatory circuits and carcinogenesis. *Cancer Res.*, 23:1694-1700, 1963.
  - 14) Mintz, B., Illmensee, K., Normal genetically mosaic mice produced from malignant teratocarcinoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72:3585-3589, 1975.
  - 15) Croce, C.M., Klein, G., Translocaciones cromosómicas y cáncer humano *Invest. y Ciencia*, 104:28-37, 1985.
  - 16) Bartram, C.R., *Oncogenes: Clues to carcinogenesis.* *Eur. J. pediatr.*, 141:134-142, 1984.
  - 17) Tooze, J. 1973. *The molecular biology of tumor viruses.* Ed. Cold Spring Harbor Lab. New York. pp. 350-402.
  - 18) Willecke, K., Schafer, R. Human oncogenes. *Hum. Genet.*, 66:132-142, 1984.
  - 19) Marx, J.L. Oncogene linked to cell regulatory sistem. *Science*, 226:527-528, 1984.
  - 20) Bishop, J.M. Cellular oncogenes and retroviruses. *Ann. Rev. Biochem*, 52:301-354, 1983.
  - 21) Nowell, P.C., The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194:23-28, 1976.
  - 22) Takahashi, M. 1981. *Color atlas of cancer cytology.* Ed. Igaku- Shein Ltd Tokyo. pp. 107-117.
  - 23) Sandberg, A.A. 1980. *The chromosomes in human cancer and leukemia.* Ed. Elsevier Publishing Co. New York. pp. 427-439.

- 24) Sasaki, M. Role of chromosomal mutation in the development of cancer. *Cytogenet Cell Genet.*, 33:160-168, 1982.
- 25) Makino, S. Some epidemiological aspects of venereal tumors of dogs as revealed by chromosome and DNA studies, *Ann. NY. Acad. Sci.*, 108:1106-1122, 1963.
- 26) Benedict, W.F., Forter, I.H., Brown, C.D. Cytogenetic diagnosis of malignancy in recurrent meningioma. *Lancet*, 1:971-973, 1970.
- 27) Vasiliev, J.M., Gelfand, I.M. 1981. Neoplastic and normal cells in culture. Ed. Cambridge University Press. Great Britain. pp. 3-56.
- 28) Von Recklinghausen, F.D. Ueber die erzeugung von tothen blutkorperchen en *Methods of tissue culture*. Ed. R.C. Parker. Harper & Brothers. USA. 1961.
- 29) Roux, W. Beitrage zur entwicklungs mechanik des embryo. *Ztschr. Biol.*, 21:411, 1985.
- 30) Arnold, J. Ueber theilungsvorgange an den wanderzellen ihre progressiven und regressiven metamorphosen en *Methods of tissue culture*. Ed. R.C. Parker. Harper & Brothers. USA. 1961.
- 31) Ljunggren, C.A. Von der fahigkeit des haute epithels, ausserhalb des organismus sein leben zubehalten mit berucksichtigung der transplantation en *Methods of tissue culture*. Ed. R.C. Parker. Harper & Brothers. USA. 1961.
- 32) Jolly, J. Sur la duree de la vie et de la multiplication des cellules animales en dehors de l'organisme. *Compt.*

- Rend. Soc. Biol., 55:1266, 1903.
- 33) Harrison, R.G. Observations on the living developing nerve fiber. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 4:140, 1907.
  - 34) Paul, J. 1975. Cell and tissue culture . Ed. Churchill Livingstone. New York. pp. 87-114.
  - 35) De Robertis, E.D.P., De Robertis, E.M.F. 1980. Biología celular y molecular. Ed. El Ateneo. Buenos Aires. pp. 44-45.
  - 36) Pollack, R. 1981. Readings in mamalian cell culture. Ed. Cold Spring Harbor Lab. New York. pp. 95-98.
  - 37) Freedman, V.H., Shin, S. Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-soli medium. Cell, 3:355-359, 1974.
  - 38) Hayflick, L., Moorhead, P.S. The serial cultivation of human diploid cell strains. Esp. Cell. Res., 25:385-621, 1961.
  - 39) Kruse, P.F., Patterson, M.K. 1973. Tissue culture methods and applications. Ed. Academic Press. New York. pp. 764-767.
  - 40) Adams, R.L.P. 1980. Cell culture for biochemist. Ed. Elsevier North Holland Biomedical Press. New York. pp. 23-65.
  - 41) Parker, R.C. 1961. Methods of tissue culture, Ed. Harper & brothers. New York. pp. 62-80.
  - 42) Eagle, H. Nutrition needs of mammalian cells in tissue culture. Science, 122:501-504, 1955.
  - 43) Ham, R., Mckeeham, N., Media and growth requirements, en Methods in Enzimology, Vol LVIII Cell Culture, Academic Press. New York. 1979. pp. 44-93.

- 44) Lissauer, I., Zwei falle von leucaemie. Berl. Klin. Wochenschr., 40:403, 1865.
- 45) Krumbhaar, E.B., Krumbhaar, H.D., The blood and bone marrow in yellow cross gas (mustard gas) poisoning: changes produced in the bone marrow of fatal cases. J. Med. Res., 40:497, 1919.
- 46) Gilman, A., Phillips, F.S. The biological actions and therapeutic applications of b-chloroethyl amines and sulfides. Science, 103:409, 1946.
- 47) Farber, S., Diamond, R.K., Mercer, R.D., Sylvester, R.F., Wolff, J.A. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-amino-pteroyl-glutamic acid (aminopterin). New Eng. J. Med., 238:787, 1948.
- 48) Prescott, D.M. 1976. Advances in genetics. Ed. E.W Caspari, Academic Press. New York. pp. 99-175.
- 49) Mazia, D. The cell cycle. Sci. Am., 230:54-64, 1974.
- 50) Pratt, W.B., Ruddon, R.W. 1979. The anticancer drugs. Ed. Oxford University Press. New York. pp. 29-41.
- 51) Shabel, F.M. Jr. The use of tumor growth Kinetics in planing "curative" chemotherapy of advanced solid tumors. Cancer Res, 29:2384, 1969.
- 52) Steel, G.G. Cytokinetics of neoplasia, en Cancer medicine. Ed. J.F. Holland and E. Frei III. Lea and Febiger. Philadelphia. 1973. pp. 125-140.
- 53) Frei, E. III. Combination cancer chemotherapy. Presidential address. Cancer Res., 32:2593, 1972.

- 54) Clarysse, A., Kenis, Y., Mathe, G. 1976. Cancer chemotherapy. Ed. Springer-Verlag. New York. pp. 22-32.
- 55) Knobf, T., Fischer, D.S. Welch-McCaffrey, D. 1984. Cancer Chemotherapy. Treatment and care Ed. G.K. Hall Medical Publishers. Boston. pp. 4-12.
- 56) Goodman, L.S., Gilman, A. 1984. Bases farmacologicas de la terapeutica. Ed. Interamericana, México, D.F., pp. 1047-1098.
- 57) Sobrero, A.F., Marsh, J.C. Chemosensitivity of human tumor clonogenic assay simultaneously assayed in agar diffusion chambers and in a two-layer agar culture system. Cancer Treat. Rep., 68:615-624, 1984.
- 58) Wilson, A.P., Ford, C.H.N., Newman, C.E., Howell, A. A. comparison of three assays used for the in vitro chemosensitivity testing of human tumours. Br. J. Cancer, 49:57-63, 1984.
- 59) Dendy, P. 1976. Human Tumors in short term culture, technical and clinical applications. Academic Press. London. pp. 55-62.
- 60) Holmes, H.L., Little, J.M. Tissue culture microtest for predicting response of human cancer to chemotherapy. Lancet, 2:985, 1974.
- 61) Knock, F.E., Galt, R.M., Oester, Y.T., Sylvester, R. In vitro estimate of sensitivity of individual tumours to antitumor agents. Oncology, 30:1, 1974.
- 62) Salmon, S.E., Hamburger, A.W., Sohnlen, B., Durie, B.G., Alberts, D.S., Moon, T. Quantitation of differential sensit-

- ivity of human tumor stem cells to anticancer drugs. N. Engl. J. Med., 298:1321-1327, 1978.
- 63) Fox, B.W., Dexter, T.M., Cancer chemotherapy: in vitro test. Nature, 274:315-316, 1978.
- 64) Shimizu, E., Saijo, N., Kanzawa, F., Hoshi, A., Eguchi, K. Correlation between drug sensitivity determined by clonogenic cell assay and clinical effect of chemotherapy in patients with primary lung cancer. Gann, 75:1030-1035, 1984.
- 65) Eagle, H., Foley, G.E. Drug assays on cultures of human tumours. Amer. J. Med., 21:739, 1956.
- 66) Cobb, J.P. The comparative cytological effects of several alkylating agents on human normal and neoplastic cells in tissue culture. Ann. NY. Acad. Sci., 84:513-542, 1960.
- 67) Wennerberg, J., Changes in growth pattern of human squamous cell carcinomas of the head and neck during serial passages in nude mice. Int. J. Cancer, 33:245-250, 1984.
- 68) Ponten, J., Saksela, E. Two established in vitro cell lines from human mesenchymal tumours. Int. J. Cancer, 2:434-447, 1967.
- 69) Pihl, A. UICC Study group on chemosensitivity testing of human tumors. Problems-applications-future prospects. Int. J. Cancer 37:1-5, 1986
- 70) Hamburger, A.W., Salmon, S.E. Primary bioassay of human tumor stem cells. Science, 197:461-463, 1977.
- 71) Von Hoff, D., Casper, J., Bradley, E., Sandbach, J., Jones, D., Makuch, R. Association between human tumor colony forming

- assay and response of an individual patient's tumor to chemotherapy. *Am. J. Med.*, 70:1027-1032, 1981.
- 72) Shoemaker, R.H., Curt, G.A., Carney, D.N., Evidence for multidrug resistant cells in human tumor cell populations. *Cancer Treat. Rep.* 67:883-888, 1983.
- 73) Salmon, S.E., Meyskens, F.L., Alberts, D.S., Soehnen, B., Young, L., New drugs in ovarian cancer and malignant melanoma: in vitro phase II screening with the human tumor stem cell assay. *Cancer Treat. Rep.*, 65:1-12, 1981.
- 74) Trent, J.M., Salmon, S.E. Potential applications of a human tumor stem cell bioassay to the cytogenetic assessment of human cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.*, 1:291-196, 1980.
- 75) Moon, T.E., Salmon, S.E., White, C.S., Chen, H. S. G., Meyskens, F.L., Durie, B.G.M., Alberts, D.S. Quantitative association between in vitro human tumor stem cell assay and clinical response to cancer chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 6:211-218, 1981.
- 76) Fan, D., Swinkin, C., Krishan, A. Soft-agar tumor stem cell assays : effect of oxygen. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 172: 270, 1983.
- 77) Cowan, J.D., Von Hoff, D.D., Dineswan, A., Clark, G. Use of a human tumor cloning system to screen retinoids for antineoplastic activity. *Cancer*, 51:92-96, 1983.
- 78) Editorial, Clonogenic assays for the chemotherapeutic sensitivity of human tumors. *Lancet*, 3:780-781, 1982.
- 79) Lieber, M., Kovach, J.S. Soft agar colony formation assay



- for chemotherapy sensitivity testing of human solid tumors. *Mayo Clin. Proc.*, 57:527-528, 1982.
- 80) Bertelsen, C. A., Sondak, V., Mann, B., Korn, E., Kern, D. Chemosensitivity testing of human solid tumors. *Cancer*, 53: 1240-1245, 1984.
- 82) Johonson, G.E., Glaubiger, D.L. Correlation of cellular tritiated thymidine incorporation with soft agar clonogenicity in chemosensitivity testing of human neuroblastoma cells. *Cancer Treat. Rep.*, 67:163-168, 1984.
- 83) Group for sensitivity testing of human tumours (KSST), In vitro short-term test to determine the resistance of human tumours to chemotherapy. *Cancer*, 48:2121-2135, 1981.
- 84) Volm, M., Wayss, K., Kaufmann, M., Mattern, J. Pretherapeutic detection of tumor resistance and the results of tumor chemotherapy. *Eur. J. Cancer*, 15:983, 1979.
- 85) Shrivastav, S., Bonar, R.A., Stone, K.R., Paulson, D. F., An in vitro assay procedure to test chemotherapeutic drugs on cells from human solid tumor. *Cancer Res.*, 40:4438, 1980.
- 86) Holmes, H.l., Little, J. M. Tissue culture microtest for predicting response of human cancer to chemotherapy. *Lancet*, ii:985, 1974.
- 87) Alberts, D.S., Chen, H.S.G., Soehnen, B., Salmon, S.E. In vitro clonogenic assay for predicting response of ovarian cancer to chemotherapy. *Lancet*, 2:340-342, 1980.
- 88) Sarosdy, M.F., Lamm, D.L., Radwin, H.M., Von Hoff, D.D. Clonogenic assay and in vitro chemosensitivity testing of

- human urologic malignancies. *Cancer*, 50:1332, 1982.
- 89) Zenner, H.P., Herrman, I.F., Bremer, W., Stahl-Mauge, C., Head and neck carcinoma models. *Acta Otolaryngol*, 95:371-381, 1983.
- 90) Alonso, K., Human tumor stem cell assay. *Cancer*, 54:2475-2479, 1984.
- 91) Sondak, V.K., Bertelsen, C.A., Kern, D.H., Morton, D.L. Evolution and clinical application of a rapid chemosensitivity assay. *Cancer*, 55:1367-1371, 1985.
- 92) Eisenger, M., Human lymph nodes in tissue culture, in *Tissue culture methods and applications*. Ed. P.F. Kruse and M.K. Patterson, Academic Press. New York. pp. 65-69
- 93) Lwitin, J., Trypsinization of diploid human fibroblasts, in *Tissue culture methods and applications*. Ed. P.F. Kruse and M.K. Patterson, Academic Press. New York. pp. 188-192.
- 94) Chapman, A.L. A study of a new human tumor cell line (rhabdomyosarcoma). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 146:1087-1092, 1974.
- 95) Gioanni, J., Courdi, A., Lalanne, C.M., Fischel, J.L., Zanghellini, E., Lambert, J.C., Ettore, F., Namer, M. Establishment, characterization, chemosensitivity, and radiosensitivity of two different cell lines derived from a human breast cancer biopsy. *Cancer Res.*, 45:1246-1258, 1985.
- 96) Him, T.J., Leavan, A. The chromosome number of man. *Hereditas*, 42:2-6, 1956.
- 97) Fan, D., Morgan, L.R., Schneider, C., Blank, H., Fan, S.

- Cooperative evaluation of human tumor chemosensitivity in the soft agar assay and its clinical correlations. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 109:23-28, 1985.
- 98) Riou, G. Drogues anticancereuses: une nouvelle methode de selection. *La Recherche*, 12:370-371, 1981.
- 99) Daidone, M.G., Silvestrini, R., Sanfilippo, o., Zaffaroni, N., Varini, M., Lena, M. Reliability of an in vitro short term assay to predict the drug sensitivity of human breast cancer. *Cancer*, 56:450-456, 1985.
- 100) Mattox, D.E., Von Hoff, D.D., Clark, G.M., Aufdemorte, T. Factors that influence growth of head and neck squamous carcinoma in the soft agar cloning assay. *Cancer*, 53:1736-1740, 1984.
- 101) Salmon, S.E. Development and applications of a human tumor colony assay for chemosensitivity testing. *Rec. Res. in Cancer Res.*, 94:8-16, 1984.
- 102) Cline, M.J., Rosenbaum, E. Prediction of in vivo cytotoxicity of chemotherapeutic agents by their in vitro effect on leukocytes from patients with acute leukemia. *Cancer Res.*, 28:2516-2521, 1968.
- 103) Ambrose, E.J., Andrews, R.D., Easty, D.M., Field, E.D., Wylie, J.A. Drug assays on cultures of human tumor biopsies. *Lancet*, 6:24-25, 1962.
- 104) Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H., Parks, W.P. In vitro: cultivation of human tumors: establishment of cell derived from a se-

- ries of solid tumors. J. Nat. Cancer Inst., 51:1417, 1973.
- 105) Manjarrez, H.A., 1986. Pruebas de quimiosensibilidad en canceres de cavidad oral y orofarínge in vitro. Tesis Profesional. Fac. de Ciencias, UNAM.
- 106) Urdiales, R.J., Bucio, O.L., Manjarrez, H.A., Rodríguez, C.S., Weiss-Steider, B. Quimiosensibilidad in vitro, en canceres de cavidad oral y orofarínge, en medio líquido. Rev. Fac. Med. UNAM, 29:73-78, 1986.
- 107) Lamerton, L.F. Cell proliferation and the differential response of normal and malignant tissues. Brit. J. Radiol., 45:161-170, 1972.
- 108) Meyers, F., Jawetz, E., Golfien, A. 1982. Farmacología clínica. Ed. El Manual Moderno, México. pp. 467-518.
- 109) Smith, H.E., Wolman, S.R., Hackett, A.J., The biology of breast cancer at the cellular level. Bioch et Bioph. Acta. 738:103-123, 1984.
- 110) Reddel, R., Sutherland, R. Tamoxifen stimulation of human breast cancer cell proliferation in vitro: a posible model for tamoxifen tumour flare. Eur. J. Cancer Clin. Oncol., 20:1419-1424, 1984.
- 111) Hug, V., Johnston, D., Finders, M., Hortobagyi, G. Use of growth-stimulatory hormones to improve the in vitro therapeutic index of doxorubicin for human breast tumors. Cancer Res., 46:147-152, 1986.

#### AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. Julia Urdiales - Ramos y al Dr. Benny Weiss Steider por la excelente asesoría y por el apoyo y las facilidades brindadas para la realización de éste trabajo.

De la misma manera, agradezco al M en C Mario Altamirano Lozano, a la Dra. Judith Guzmán Rincón, al Fis. Alberto Labiano - Cavagnaro, al Biol. Juan S. Nuñez Farfan y al Biol. Angel Manjarrez Hernández por la revisión crítica de la tesis, por sus acertadas observaciones y útiles consejos.

Así mismo, agradezco al Dr. Sergio Rodríguez Cuevas del Hospital de Oncología del Centro Médico Nacional del IMSS, por el material humano facilitado.

También doy las gracias a los Srs. Ranulfo Pedraza y José Chavarría por su valiosa colaboración técnica.

Finalmente, agradezco al CONACyT el financiamiento otorgado durante la elaboración del presente trabajo.