

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN**  
**FACULTAD DE MEDICINA**



**POTENCIAL TERAPÉUTICO DE MEDICAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS  
ALTERNATIVOS SOBRE LA LÍNEA COLO 320 Y CULTIVOS  
PRIMARIOS DE ADENOCARCINOMA COLORRECTAL**

POR:

Q.B.P. MARTHA SOFÍA RODRÍGUEZ GONZÁLEZ

Como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias con Especialidad en  
Biología Molecular e Ingeniería Genética.

Octubre 2012

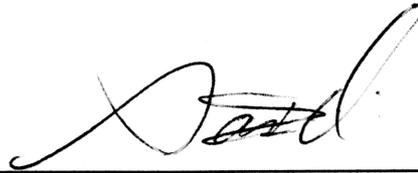
**POTENCIAL TERAPÉUTICO DE MEDICAMENTOS ANTINEOPLÁSICOS  
ALTERNATIVOS SOBRE LA LÍNEA COLO 320 Y CULTIVOS PRIMARIOS DE  
ADENOCARCINOMA COLORRECTAL**

Aprobación de tesis:



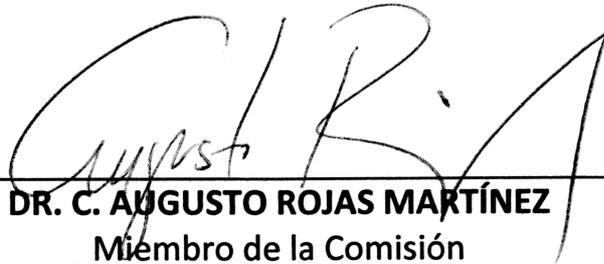
---

**DRA. C. HERMINIA GUADALUPE MARTÍNEZ RODRÍGUEZ**  
Directora de Tesis



---

**DR. C. SALVADOR LUIS SAID Y FERNÁNDEZ**  
Co-Director de Tesis



---

**DR. C. AUGUSTO ROJAS MARTÍNEZ**  
Miembro de la Comisión



---

**DR. med. GERARDO ENRIQUE MUÑOZ MALDONADO**  
Subdirector de Estudios de Posgrado

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, bajo la Dirección de la Dra Herminia Guadalupe Martínez Rodríguez y la Co-Dirección del Dr Salvador Luis Said y Fernández.

## AGRADECIMIENTOS

A CONACyT por la beca-apoyo otorgada con número de registro 370650

A la Dra Herminia por darme la confianza y permitir que elaborara la tesis en su laboratorio, así como sus enseñanzas al realizarlo.

Al Dr. Said por sus enseñanzas en el transcurso de la elaboración de la tesis.

Al Dr. Augusto Rojas y al personal de su laboratorio por prestarnos parte de los equipos requeridos para la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Julio Sepúlveda y Dr Adolfo Soto, por sus múltiples consejos e infinita ayuda en la elaboración de las diferentes inmunocitoquímicas de los diferentes tipos celulares.

Al Dr. Juan Francisco González Guerrero por amablemente donar los agentes quimioterapéuticos utilizados en esta tesis.

Al Dr. Gerardo Muñoz, Dr. Juan Bautista y residentes del departamento de cirugía general , así como a la Dra. Irma Sandra García y a sus residentes del departamento de oncología del IMSS por su amable colaboración al momento de realizar la recolección de los tejidos tumorales y tejido sano utilizados en esta tesis.

Al Dr. Juan Pablo y residentes del departamento de patología anatómica por su colaboración en este estudio.

A la MC. Elsa Garza y M.C.P. Paulina Delgado por su ayuda y colaboración en este proyecto.

A las personas que laboran en la parte administrativa el Departamento de Bioquímica, por facilitarnos y estar al pendiente de los trámites de toda la estancia de posgrado.

A mis compañeros de generación por cada una de las experiencias vividas, por escucharme en mis momentos de frustración, por tener una palabra de aliento o consejo siempre.

A mi familia y amigos, por acompañarme en este sendero que elegí vivir para aprender, conocer y ayudar, por ser mi soporte, por recordarme de lo que sé que soy capaz, por la sonrisa, la palabra de aliento y permitirme vivir con ustedes pruebas y experiencias.

## ÍNDICE

- ÍNDICE DE TABLAS.....	ix
- ÍNDICE DE FIGURAS.....	x
- ABREVIATURAS.....	xii
- RESUMEN.....	xiv
- INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal.....	1
1.2 Carcinogénesis colorrectal.....	1
1.3 Factores de Riesgo del CCR.....	2
1.4 Características anatomopatológicas del cáncer colorrectal.....	3
1.5 Histopatología de CCR.....	3
1.6 Clasificación del CCR por estadios.....	4
1.7 Sintomatología del CCR.....	6
1.8 Diagnóstico del CCR.....	7
1.9 Tratamiento del CCR.....	7
1.10 Búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de CCR.....	9
1.11 Efectos secundarios no deseados de la quimioterapia.....	11
1.12 Pruebas de sensibilidad a la quimioterapia.....	12
1.13 Aislamiento y caracterización de células de CCR.....	13
- JUSTIFICACIÓN.....	16
- HIPÓTESIS.....	17
- OBJETIVOS.....	18
4.1 Objetivo general.....	18
4.2 Objetivos particulares.....	18
- MATERIAL Y MÉTODOS.....	19
5.1 Material biológico.....	19

5.1.1 Línea celular de adenocarcinoma COLO 320DM.....	19
5.1.1.1 Mantenimiento de COLO 320DM.....	19
5.1.1.2 Resiembras de COLO 320DM.....	19
5.1.2 Células madre mesenquimales humanas de tejido adiposo (CMMH).....	20
5.1.2.1 Aislamiento de CMMH.....	20
5.1.2.2 Resiembras de CMMH.....	21
5.1.2.3 Caracterización por inmunocitoquímica.....	21
5.1.3 Células colorrectales de tejido tumoral y tejido sano.....	22
5.1.3.1 Pacientes.....	22
5.1.3.2 Cultivo primarios de ACCR y de tejido sano de colon.....	23
5.1.3.3 Caracterización de las células de cultivos primarios de ACCR y tejido de colon sano por inmunocitoquímica.....	24
5.2 Fármacos anti-neoplásicos seleccionados. ....	24
5.3 Determinación de curvas dosis-respuesta en COLO 320DM.....	25
5.4 Determinación de la citotoxicidad de los fármacos y combinaciones en CMMH.....	27
5.5 Determinación de curvas dosis-respuesta de los fármacos y sus combinaciones sobre cultivos primarios de CCR y cultivos primarios de colon.....	27
5.6 Bioensayo de ATP-CRA.....	27
5.6.1 Análisis de resultados de luminiscencia.....	28
5.7 Determinación de la $\Delta$ del porcentaje de muerte de las células tratadas con los fármacos.....	28
5.8 Análisis estadístico.....	29
- RESULTADOS.....	30
6.1 Citotoxicidad sobre COLO 320DM de los fármacos con de manera individual.....	30
6.1.1 Estándares.....	30
6.1.2 Efecto de citotoxicidad de los fármacos nuevos propuestos.....	31
6.2 Citotoxicidad sobre COLO 320DM fármacos evaluados en combinación.....	33
6.3. Caracterización de las células madre mesenquimales humanas (CMMH) obtenidas a partir de tejido adiposo.....	35

6.4. Citotoxicidad de los fármacos de manera individual sobre CMMH.....	36
6.5 Citotoxicidad de los estándares y de las combinaciones de los fármacos sobre CMMH.....	37
6.6 Comparación en la citotoxicidad de los fármacos y sus combinaciones en COLO 320DM y CMMH.....	38
6.7 Determinación del potencial terapéutico de los fármacos experimentales en las líneas celulares.....	41
6.8 Caracterización inmunocitoquímica de los cultivos primarios de ACCR y colon sano....	43
6.9 Citotoxicidad de los fármacos de manera individual sobre cultivos primarios de ACCR y de tejido de colon sano.....	46
6.10 Citotoxicidad de las combinaciones de los fármacos sobre cultivos primarios de ACCR y de tejido de colon sano.....	47
6.11 Determinación del potencial terapéutico de los fármacos experimentales en los cultivos primarios de ACCR y colon sano.....	48
- DISCUSIÓN.....	49
7.1 Razonamientos sobre la estrategia empleada.....	49
7.2 Caracterización por inmunocitoquímica de CMMH, cultivos primarios de ACCR y colon sano.....	50
7.3 Correlaciones de nuestros hallazgos sobre resistencia y sensibilidad a los fármacos analizados y con otros reportes.....	51
7.4 Eficacia antineoplásica de las combinaciones de fármacos evaluadas en este trabajo.....	52
- CONCLUSIONES.....	56
- PERSPECTIVAS.....	57
- BIBLIOGRAFÍA.....	58
- ANEXOS.....	64
10.1 Origen de material, reactivos y equipos utilizados.....	64

10.1.1 Material.....	64
10.1.2 Reactivos.....	64
10.1.3 Equipos.....	65
10.2 Preparación de soluciones.....	66
- BIOGRAFÍA.....	69

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Clasificación del CCR. ....	6
Tabla 2. Agentes quimioterapéuticos probados en cultivos primarios de diferentes tipos de cáncer y que no han sido probados en cultivos primarios de CCR.....	9
Tabla 3. Criterios que se tomaron para la recolección de tejido de cáncer colorrectal.....	23
Tabla 4. Fármacos seleccionados para la evaluación.....	25
Tabla 5. Rango de concentraciones de fármacos a evaluar y concentración máxima que alcanzan en plasma.....	25
Tabla 6. Combinaciones sometidas a los bioensayos.....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Mecanismo de acción de la aspirina y sus efectos fisiopatológicos.....	10
Fig. 2. Mecanismo del 3-3dindolilmetano (DIM) por inactivación de la vía AKT.....	11
Fig. 3. Curva dosis-respuesta de 5-FU en la línea celular COLO 320DM.....	30
Fig. 4. Curva dosis-respuesta de oxaliplatino en la línea celular COLO 320DM.....	30
Fig. 5. Curva dosis-respuesta de cisplatino en la línea celular COLO 320DM.....	31
Fig. 6. Curva dosis-respuesta de carboplatino en la línea celular COLO 320DM.....	32
Fig. 7. Curva dosis-respuesta de doxorubicina en la línea celular COLO 320DM.....	32
Fig. 8. Curva dosis-respuesta de aspirina en la línea celular COLO 320DM.....	33
Fig. 9. Curva dosis-respuesta de DIM en la línea celular COLO 320DM.....	33
Fig. 10. Efecto de citotoxicidad sobre COLO 320DM de las combinaciones que tienen como base los fármacos de primera línea (5-FU y oxaliplatino).....	34
Fig. 11. Efecto de citotoxicidad sobre COLO 320DM de las combinaciones que tienen solo los fármacos propuestos (carboplatino, cisplatino, doxorubicina, aspirina y DIM).....	35
Fig.12. Controles internos de la técnica de inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-CD105.....	35
Fig.13. Caracterización inmunocitoquímica de las CMMH.....	36
Fig.14. Efecto citotóxico sobre CMMH de los fármacos evaluados en la concentración máxima alcanzada en plasma.....	36
Fig. 15. Efecto citotóxico sobre CMMH de las combinaciones compuesta por los estándares (5-FU y oxaliplatino) en combinación con uno o más de los compuestos experimentales.....	37
Fig.16. Efecto de citotoxicidad sobre CMMH de las combinaciones que tienen solo los fármacos propuestos (carboplatino, cisplatino, doxorubicina, aspirina y DIM).....	38
Fig.17. Citotoxicidad de los cinco fármacos experimentales y de los dos estándares sobre COLO 320DM y CMMH .....	39
Fig.18. Citotoxicidad de las combinaciones que tienen como base los agentes quimioterapéuticos de primera línea y los fármacos nuevos a evaluar en las células de COLO 320DM y las CMMH.....	40

Fig.19. Citotoxicidad de las combinaciones que solo tienen los fármacos nuevos a evaluar en las células de COLO 320DM y las CMMH.....	41
Fig.20. Potencial terapéutico de los fármacos estándar y de los experimentales sobre COLO 320DM y CMMH.....	42
Fig.21. Potencial terapéutico o efecto neto de las combinaciones evaluadas en la línea de COLO 320DM y CMMH.....	43
Fig.22. Testigos positivos y negativos para los marcadores utilizados en la caracterización de los cultivos primarios de ACCR y colon sano.....	44
Fig.23. . Visualización de la reacción positiva para el marcador CK-20 en las células aisladas de tejido de ACCR y colon sano.....	45
Fig.24. Reacción positiva para el marcador Ck-17 en las células aisladas de tejido de ACCR y reacción negativa para el marcador Ck-17 en colon sano.....	45
Fig.25. Reacción positiva para el marcador EFGR en las células aisladas de tejido de ACCR y reacción negativa para el marcador EFGR en colon sano.....	46
Fig.26. Efecto citotóxico con los fármacos de manera individual para las células de los cultivos primarios de CCR y tejido sano.....	46
Fig.27. Efecto de citotoxicidad de las combinaciones de los fármacos sobre las células de los cultivos primarios de ACCR y tejido sano.....	47
Fig.28. Potencial terapéutico de las combinaciones evaluadas que presentaron tener citotoxicidad en todos los cultivos primarios de CCR.....	48

## ABREVIATURAS

[ ]	concentración
%	por ciento
°C	grados centígrados
α-MEM	alfa Minimum Essential Media
Δ	Delta
μg	microgramos
μL	micro litro
μM	micro molar
nM	nano molar
pg	pico gramos
5-FU	5-fluorouracilo
ADN	ácido desoxirribonucleico
APC	adenomatous polyposis coli
Asp	aspirina
ATP	adenosin trifosfato
ATP-CRA	Adenosin triphosphate chemosensitivity response assay
Car	carboplatino
CCR	cáncer colorrectal
Ck-17	citoqueratina 17
Ck-20	citoqueratina 20
Cis	cisplatino
cm	centímetro
CMMH	células madre mesenquimales humanas
CMP	concentración máxima en plasma
CO <sub>2</sub>	dióxido de carbono
DIM	3-3dindolilmetano
Dox	doxorrubicina
EGFR	receptor del factor de crecimiento epidérmico
EM	efecto máximo
fig.	Figura
g	gramo
GPA	proteína aceleradora de la actividad GTPasa
h	Hora
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
DI <sub>50</sub>	dosis inhibitoria media
IMDM	Iscoves Modified Dulbeccos Media
Log	logaritmo base 10
min	minuto
mg	miligramo

mL	Mililitro
mm	Milímetro
MTT	metil-tiazol- tetrazolium
PBS	amortiguador de fosfatos
PCR	reacción en cadena de la polimerasa
PMC	porcentaje de muerte celular
Oxa	oxaliplatino
RPMI	medio Roswell Park Memorial Institute
RT	transcripción reversa
SFB	suero fetal bovino
TBSE	solución amortiguadora tris-salino con tween 20
Tum	Tumor
UMAE	Unidad Médica de Atención Especializada

## RESUMEN

Martha S. Rodríguez González

Universidad Autónoma de Nuevo León

Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular, Facultad de Medicina

Título del estudio: Potencial terapéutico de medicamentos antineoplásicos alternativos sobre la línea COLO 320DM y cultivos primarios de adenocarcinoma colorrectal.

Área de estudio: Terapia Celular

**Introducción.** El adenocarcinoma colorrectal (ACCR) tiene una alta prevalencia en el Noreste de México. Los esquemas quimioterapéuticos de primera línea no siempre son eficaces, debido a la presencia de células tumorales resistentes. Por otro lado, algunos agentes que no son de primera línea para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer, han mostrado iguales o mejores resultados que los medicamentos de primera línea. Entonces, es mandatorio identificar nuevos compuestos para el tratamiento de ACCR y contar con un bioensayo adecuado. El ATP-CRA (*Adenosin Triphosphate-Based Chemotherapy Response Assay*) requiere muy pocas células, lo que es ideal en la práctica clínica. **Hipótesis.** Algunos medicamentos antineoplásicos utilizados para el tratamiento de cáncer no-CCR o sus combinaciones, tienen valor terapéutico *in vitro* contra cultivos primarios de ACCR (CP-ACCR). **Objetivo.** Determinar el potencial terapéutico *in vitro* de agentes antineoplásicos utilizados para tratar el cáncer no-CCR sobre la línea COLO 320 DM y CP-ACCR, mediante el ATP-CRA. **Material y métodos.** Mediante el uso del método de ATP-CRA se evaluó la citotoxicidad de cinco fármacos y sus combinaciones con actividad antineoplásica (doxorubicina, cisplatino, carboplatino, aspirina y DIM (3,3'-diindolimetano), dos agentes quimioterapéuticos de primera línea para el tratamiento de CCR (5-FU y Oxaliplatino). Utilizamos éstos últimos como estándares. Determinamos la eficacia antitumoral (Dosis inhibitoria 50% [DI<sub>50</sub>]) de estos fármacos sobre los pares a) COLO 320 DM/línea de células mesenquimales humanas (CMMH) que nosotros aislamos y caracterizamos y b) CP-ACCR/colon sano. Conocida la DI<sub>50</sub> de los fármacos de interés y de sus combinaciones, determinamos el potencial terapéutico de cada uno de éstos para identificar los fármacos y su combinación con el mayor potencial terapéutico para el tratamiento de ACCR (mortalidad alta contra células cancerosas y baja contra células normales). **Resultados y conclusiones.** El DIM y la aspirina mostraron una pequeña actividad antineoplásica contra COLO 320DM pero no potenciaron el efecto de los otros fármacos de interés. La combinación carboplatino/cisplatino presentó una citotoxicidad tres veces mayor que el esquema estándar contra COLO 320DM. En general, los CP-ACCR mostraron una sensibilidad heterogénea a los fármacos analizados o sus combinaciones. Sin embargo, la combinación carboplatino/ cisplatino/ doxorubicina formulada con una concentración equivalente a la DI<sub>50</sub> de cada fármaco contra COLO 320DM mató entre un 20 a un 50% de CP-ACCR; estos mismos cultivos fueron resistentes al tratamiento estándar prescrito a los pacientes donadores de los tumores ensayados. La combinación de los fármacos carboplatino/cisplatino/ doxorubicina tiene un potencial terapéutico mayor que el tratamiento estándar. Esto refuerza la idea de que deben hacerse ensayos personalizados para cada paciente, así como seguir en la búsqueda de nuevos medicamentos.

Dra. Herminia G. Martínez Rodríguez  
Directora de Tesis

Dr. Salvador L. Said y Fernández  
Co-Director de Tesis

## **CAPÍTULO I**

### **INTRODUCCIÓN**

#### **1.1 Epidemiología del cáncer colorrectal.**

El cáncer colorrectal (CCR) es la segunda causa de muerte por cáncer en el mundo. Ocupa el tercer lugar en prevalencia entre las neoplasias malignas de tejido epitelial. Además, el CCR forma parte de los tipos de cáncer maligno con mayor tasa de morbi-mortalidad en poblaciones de los países del occidente.

En el ámbito mundial se registran anualmente aproximadamente un millón de nuevos casos de CCR y 500,000 muertes asociadas a esta enfermedad [1]. En Europa y Estados Unidos el CCR representa una de las principales causas de muerte por cáncer, mientras que para Asia es una de las cuatro principales causas de muerte por neoplasias malignas [1].

En México, el CCR ocupa el décimo lugar entre las neoplasias en general y el segundo lugar entre las neoplasias malignas gastrointestinales [2], las cuales son diagnosticadas en etapas clínicas avanzadas (III o IV) [3], donde la supervivencia a 5 años es menor al 10% de los casos [4]. En el 2005 en el país se reportaron 17 mil casos de CCR ocupando Nuevo León el segundo lugar, con aproximadamente 550 casos (Secretaría de Salud de Nuevo León, reporte de prensa).

El CCR afecta a hombres y mujeres por igual. En años anteriores el CCR afectaba principalmente a personas mayores de 55 años; sin embargo, en los últimos años esta enfermedad ha presentado un incremento en la incidencia en personas menores de 51 años, teniendo una progresión mucho más agresiva [5-6]. La probabilidad de desarrollar CCR a lo largo de la vida es de 1 por cada 17 individuos [7-8].

#### **1.2 Carcinogénesis colorrectal.**

En la actualidad se cree que existen dos vías patogénicas distintas para el desarrollo del cáncer de colon, y en ambas intervienen la acumulación progresiva de múltiples mutaciones [9].

La primera vía es la llamada APC/ $\beta$ -catenina, que conduce a la acumulación progresiva de mutaciones en una serie de oncogenes y genes supresores de tumor.

Ésta comienza con la formación de pequeños adenomas o pólipos adenomatosos, que aumentan progresivamente de tamaño, se convierten en células displásicas para finalmente desarrollar un cáncer invasivo [9].

Se cree que en esta vía la pérdida del gen APC (poliposis adenomatosa de colon) es el evento más temprano en la formación del adenoma, ya que la ausencia de la proteína codificada por este gen, conduce a la disminución de la adherencia celular y al aumento en la proliferación de las células [9-10].

Posterior a la pérdida de APC, se lleva a cabo la activación del oncogén k-ras, el cual juega un papel muy importante en la traducción de la señal intracelular. Este oncogén ha mostrado estar presente en cerca del 50% de los adenocarcinomas [9-10].

La pérdida SMAD y p-53 se lleva a cabo en etapas tardías, en donde la región del cromosoma 18q21 se pierde, provocando la pérdida de los genes SMAD2 y SMAD4 que participan en los procesos de señalización de TGF- $\beta$ . Por otra parte, la deleción del cromosoma 17p lleva a la pérdida del gen p-53, esta deleción se ha encontrado en el 70-80% de los casos de cáncer de colon [9-10].

La segunda vía se caracteriza por las lesiones genéticas en los genes de reparación de los errores en el ADN. Generalmente esto es debido a mutaciones hereditarias (de línea germinal) en cualquiera de los cinco genes que participan en la reparación del ADN como lo son hMSH2 (cromosoma 2p22), el hMLH1 (cromosoma 2q21), el hPMS1 (cromosoma 2q31-33) y el hPMS2 (cromosoma 7p22) presentándose el 90% de las mutaciones en los genes MSH2 y MLH1. La pérdida de la capacidad de reparación de los errores conduce a la acumulación de mutaciones en éstos y otros genes reguladores del crecimiento, que culmina en la emergencia de carcinomas colorrectales [9-10].

### **1.3 Factores de Riesgo del CCR.**

Entre los factores que incrementan el riesgo de desarrollar CCR se encuentra la edad, antecedentes de haber padecido otros tipos de cáncer, historia familiar de cáncer, síndromes asociados a CCR como *FAP (Family Adenomatous Polyposis)* y *HNPCC (Hederitary Nonpolyposis)*, diabetes tipo I, consumo excesivo de carnes rojas, carne industrializada o grasa animal, baja ingesta de fibras vegetales, disminución de

la ingesta de micronutrientes protectores (vitamina A, C y E), alcoholismo, tabaquismo y vida sedentaria [9-12].

#### **1.4 Características anatomopatológicas del cáncer colorrectal.**

El CCR generalmente se origina en las estructuras epiteliales de la mucosa del intestino grueso del colon o del recto. El CCR puede comenzar como un pólipo (adenomatoso o hiperplásico) que crece en la parte superficial del colon o del recto; este pólipo adenomatoso es el resultado de anomalías en la maduración o la arquitectura de la mucosa o de un proceso de inflamación [8-9]. En años más recientes a este tipo de cáncer se le ha considerado como una mezcla compleja y heterogénea de diferentes tipos celulares que incluyen células epiteliales, fibroblastos, miofibroblastos, inmunocitos y células endoteliales; evidenciando que la interacción entre estos diferentes tipos celulares juegan un rol esencial en el desarrollo, crecimiento y propagación de este tipo de cáncer [13].

#### **1.5 Histopatología de CCR.**

De acuerdo a las características histopatológicas el CCR se puede clasificar en epidermoide (incluido el de transición y carcinomas de células escamosas), adenocarcinoma (carcinomas que secretan mucina, hormonas o forman estructuras similares a la glándula), otros carcinomas especificados (se trata de cáncer sitio específico, por ejemplo carcinoide) y carcinomas no especificados [14].

En un estudio realizado de 1998 a 2001 se analizó la población estadounidense que presentó CCR, dividiéndose en cuatro grandes grupos de acuerdo a las características histológicas (carcinoma, sarcoma, otros tipos específicos como melanoma y tipos inespecíficos). El carcinoma se subdividió a su vez en carcinoma epidermoide (células escamosas), carcinoide, carcinoma de células pequeñas, adenocarcinoma en el que se encuentran las subdivisiones de adenocarcinoma adenomatoso, papilar, vellosos, tubularvellosos, mucinosos. Se encontró que aproximadamente el 96% de los CCR son adenocarcinomas, el 2% son otros tipos de carcinomas, 0.4% son carcinomas epidermoides y el 0.08% son sarcomas. El adenocarcinoma de CCR se presenta en una frecuencia similar para

personas con ascendencia caucásica (96.01%), sudafricana (93.65%) e hispana (94.02%) [15].

Los adenocarcinomas son tumores con diferenciación glandular que suelen surgir a partir del epitelio glandular. De acuerdo al grado de conservación de la arquitectura normal, los adenocarcinomas se pueden clasificar en diferenciados y no diferenciados. Los adenocarcinomas diferenciados forman estructuras glandulares bien definidas conocidas como acinos; mientras que en las formas poco diferenciadas se presentan escasas estructuras glandulares [12]. Se sabe que cerca del 20% del CCR corresponde a neoplasias con poco grado de diferenciación [16], el 70% de los adenocarcinomas diagnosticados presentan una arquitectura moderadamente diferenciada y la localización de mayor frecuencia fue en la región sigmoide del colon (22%), seguida por el recto (18%) y el ciego (17%) [15].

Los adenocarcinomas debido a su origen glandular pueden llevar a cabo la producción de mucina; y cuando existe una gran producción de ella, se les denomina como carcinomas mucinosos o coloides [12]. La acumulación de mucina puede ser extracelular o intracelular. Aproximadamente el 15% de los casos de CCR clasificados como de este tipo, muestran una alta acumulación intracelular de mucina y son mucho más agresivos [7].

### **1.6 Clasificación del CCR por estadios.**

La clasificación de los tipos de CCR se basa en gran medida en las características histológicas del tumor, determinando el estadio de diferenciación; el estadio del tumor, el cual depende de la profundidad de la invasión tumoral, la afectación de los ganglios linfáticos regionales y la aparición de metástasis a otros órganos. Estos sirven como factores pronósticos para la supervivencia del paciente y muy a menudo determinan el tipo de terapia que se indicará al paciente [17].

Con base en el estadio del tumor, según el sistema AJCC/TNM (tumor-ganglios-metástasis (TNM) y el sistema de estadificación de la American Joint Commission on Cancer), que es el más ampliamente usado, el CCR se puede clasificar del 0 al IV según las siguientes características.

0.- Carcinoma *in situ*, las células anormales se encuentran en el revestimiento más profundo del colon, es decir las células cancerosas se encuentran solo en la mucosa (la capa interna) del colon o del recto.

I.- El cáncer se ha formado y diseminado más allá de la capa de tejido más profunda de la pared del colon hasta las capas intermedias del mismo.

II.- Esta etapa se subdivide en los estadios IIA y IIB.

IIA.- El cáncer se ha diseminado más allá de la capa de tejido más profunda del colon hasta las capas medias de la pared del colon, o hasta tejidos cercanos alrededor del colon o del recto.

IIB.- El cáncer se ha diseminado más allá de la pared del colon hasta los órganos cercanos, o a través del peritoneo.

III.- Éste se subdivide en IIIA, IIIB y IIIC.

IIIA.- El cáncer se ha diseminado desde la capa de tejido más profunda de la pared del colon hasta las capas intermedias y ha tomado hasta tres ganglios linfáticos.

IIIB.- El cáncer se ha diseminado hasta tres ganglios linfáticos cercanos y ha llegado más allá de las capas de tejido del colon, de los tejidos cercanos alrededor del colon o el recto, o de la pared del colon, hasta órganos cercanos o a través del peritoneo.

IIIC.- El cáncer se ha tomado cuatro o más ganglios linfáticos circundantes y ha llegado hasta las capas de tejido de la pared del colon o más allá del mismo, los tejidos cercanos alrededor del colon o el recto, o los órganos cercanos o a través del peritoneo.

IV.- El cáncer puede haberse diseminado hasta los ganglios linfáticos cercanos y hasta otras partes del cuerpo, como el hígado o los pulmones.

Existe otra forma de clasificación ampliamente utilizada, la cual fue propuesta por Dukes et al (1932); clasificando al cáncer colorrectal de la siguiente manera de acuerdo al grado de invasión del tumor:

Dukes A.- El tumor no se encuentra invadiendo la pared del intestino.

Dukes B.- El tumor se encuentra invadiendo la pared intestinal, pero no involucran los ganglios linfáticos.

Dukes C.- El tumor se encuentra diseminado a los ganglios linfáticos.

Dukes D.- El tumor se encuentra en metástasis.

Otra que no es muy utilizada, es la propuesta por Astler-Coller [18], la cual es muy semejante a la clasificación de Dukes, solo que en esta se consideran varias sub-etapas.

Etapa A.- el tumor se limita a la mucosa.

Etapa B1.- el tumor se encuentra extendido a la capa muscular propia, pero no penetra a través de ella, no se encuentran involucrados ganglios linfáticos.

Etapa B2.- el tumor penetra a través de la capa muscular propia, pero no se encuentran involucrados ganglios linfáticos.

Etapa C1.- el tumor se extiende a la capa muscular propia pero no penetra a través de ella, pero los ganglios linfáticos si se encuentran involucrados.

Etapa C2.- el tumor penetra a través de la capa muscular propia y los ganglios linfáticos se encuentran involucrados.

Etapa D.- el tumor se encuentra con metástasis a distancia.

De las clasificaciones anteriormente mencionadas, en la actualidad el sistema más ampliamente usado es el ya descrito AJCC/TNM [9].

**Tabla 1.** Clasificación del CCR.

TNM	Dukes	Astler-Coller
0	-	-
I	A	A, B1
II A	B	B2
II B	B	B2
II C	B	B3
III A	C	C1
III B	C	C1, C2
III C	C	C2, C3
IV	-	D

### 1.7 Sintomatología del CCR.

El CCR no suele dar síntomas, permaneciendo en fase asintomática durante años, cuando presenta sintomatología el CCR generalmente se encuentra en fases

muy avanzadas; sin embargo, éstos son variables e inespecíficos y dependen del sitio del tumor y de la extensión de la enfermedad.

La principal sintomatología causada por el CCR es el sangrado intermitente, observándose manchas oscuras en las heces fecales (melena), lo cual permite orientar el diagnóstico de la enfermedad. Entre otras sintomatologías se encuentran dolor abdominal, cambio en la actividad intestinal (diarrea o estreñimiento), pérdida inexplicable de peso, fatiga, cólicos, anemia [7, 11].

### **1.8 Diagnóstico del CCR.**

En los países en desarrollo el CCR generalmente se detecta en estadios avanzados, mientras que en los países desarrollados se diagnostica en estadios más tempranos, lo cual permite iniciar un tratamiento específico de forma más oportuna y lograr un mayor porcentaje de éxito en el tratamiento [19-20].

Entre los métodos de diagnóstico clásico está la identificación de sangre oculta en las heces fecales, este es uno de los procedimientos más utilizados por ser no invasivo. Después se encuentra la colonoscopia o sigmoidoscopia, estos procedimientos permiten observar directamente las lesiones aunque los exámenes son costosos e invasivos [1, 21]; sin embargo, mediante la detección temprana de la masa tumoral y su remoción quirúrgica oportuna disminuye el riesgo de muerte por CCR [1].

A pesar de que la morbi-mortalidad del CCR en el ámbito mundial ha mostrado una ligera disminución, los niveles siguen siendo muy altos. Esto es debido a que un 70% de los casos de CCR son diagnosticados en etapas tardías (III y IV), siendo desfavorable el pronóstico en estos casos. La supervivencia del paciente que se diagnostica en una etapa temprana (I) es de un 90%, y se reduce a un 63% si el diagnóstico se hace en una etapa avanzada (III) [21].

### **1.9 Tratamiento del CCR**

Uno de los factores importantes a considerar para elegir el tratamiento adecuado dependerá del estado de salud del paciente, así como de su respuesta inmunológica frente a la neoplasia y de los efectos secundarios a corto y largo plazo con el empleo de quimioterapia o inmunoterapia.

Principalmente el CCR se trata con remoción quirúrgica cuando su diagnóstico se realiza en etapas tempranas. Cuando esta neoplasia se detecta en etapas tardías, la cirugía no es una buena opción de tratamiento. Por lo menos el 40% de los pacientes con CCR desarrollan metástasis, siendo la quimioterapia la única forma de tratamiento, aunque a veces se incluyen ciclos de radioterapia como adyuvante. Sin embargo, ningún tratamiento es efectivo cuando el cáncer se ha diseminado, ya que muchas veces las células neoplásicas son resistentes al tratamiento [22].

Cuando se realiza la extirpación quirúrgica de las zonas afectadas, usualmente se prescribe una fluoropirimidina del tipo 5-FU o capecitabina más oxaliplatino o irinotecan cuando el CCR es metastásico [23-24].

Los esquemas quimioterapéuticos más usados en la quimioterapia del CCR por estadios son los siguientes:

Estadio 0 se recomienda una polipectomía simple, o una resección y anastomosis, que se realiza cuando el tumor es demasiado grande para extirparse por escisión local.

Estadio I el tratamiento generalmente comprende resección y anastomosis.

Estadio II 5FU+ ledefolin con irinotecan u oxaliplatino.

Estadio III 5FU+ levamisole, 5FU+ irinotecan u oxaliplatino

Estadio IV 5-FU/ irinotecan, oxaliplatino y capecitabina que han sido probados contra CCR o contra otros tipos de cáncer.

La supervivencia de los pacientes con CCR que se han sometido a tratamiento quirúrgico o de quimioterapia dependerá mucho del estado de avance de la enfermedad. Los pacientes que se diagnostican en estadios 0 y I solamente son sometidos a cirugía teniéndose una expectativa de vida de cinco años para el 53% de los pacientes [25]; mientras que para los diagnosticados en grados II a IV que recibieron quimioterapia, su promedio de supervivencia es de 11.7 a 20 meses [26-27].

### 1.10 Búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de CCR.

Debido a que el cáncer tiene escasa esperanza de vida en etapas avanzadas, y a que generalmente esta enfermedad se acompaña de poca calidad de vida, la búsqueda de nuevos agentes con actividad antineoplásica, que superen las desventajas que tienen los tratamientos actuales; así como la evaluación de agentes quimioterapéuticos de segunda o tercera línea para otros tipos de cáncer se ha convertido en una estrategia prioritaria para la humanidad.

Algunos de los medicamentos utilizados en la quimioterapia o como tratamiento estándar para metástasis en tumores agresivos que han sido estudiados en líneas celulares de cáncer son paclitaxel [28-29], irinotecan [30-31], capecitabina con y sin mitomicina C [32], ixabepilone [33] y temozolomida [34].

Existen estudios que relacionan la sensibilidad de las células neoplásicas de diferentes tipos de cáncer con diferentes agentes quimioterapéuticos, como se muestra en la tabla 2, observándose un efecto citotóxico a pesar de que no se encuentran dentro de los esquemas de tratamiento de primera línea. Sugiriendo la importancia de probar diferentes fármacos que no se encuentren dentro de los esquemas de tratamiento para el CCR.

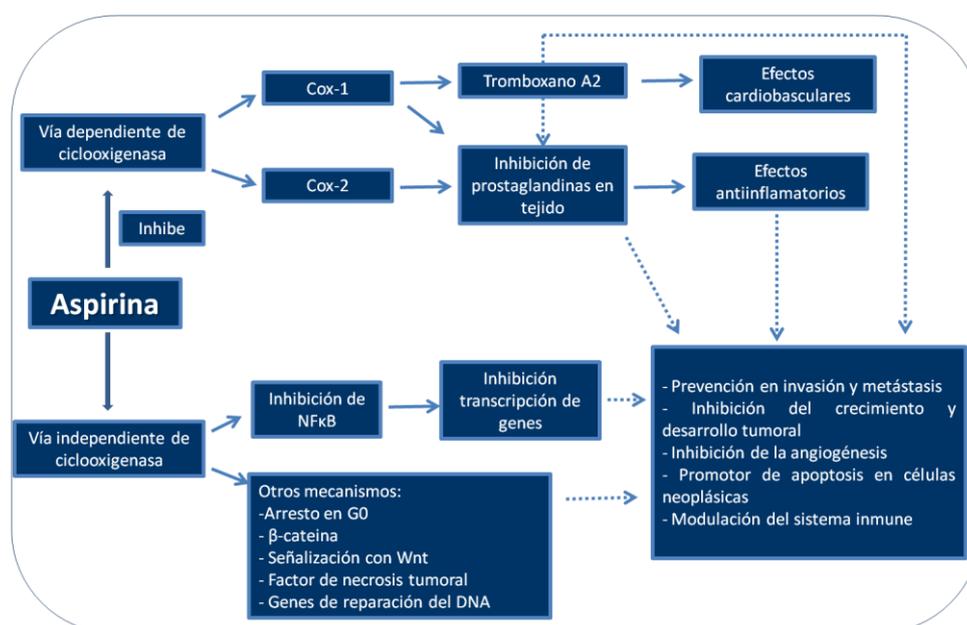
**Tabla 2.** Agentes quimioterapéuticos probados en cultivos primarios de diferentes tipos de cáncer y que no han sido probados en cultivos primarios de CCR.

Fármaco	Tipo de cáncer	Mecanismo de acción
<b>cisplatino</b>	Pulmón (Moon <i>et al</i> , 2007) Gástrico (Park <i>et al</i> , 2010) (Lee <i>et al</i> , 2011) Sarcoma (Lehnhardt <i>et al</i> , 2005)	Unión al ADN provocando uniones cruzadas entre hebras
<b>carboplatino</b>	Pulmón (Moon <i>et al</i> , 2007) Gástrico (Park <i>et al</i> , 2010) (Lee <i>et al</i> , 2011)	
<b>Docetaxel</b>	Pulmón (Zhu <i>et al</i> , 2010) Gástrico (Park <i>et al</i> , 2010) Mama (Kim <i>et al</i> , 2008)	Unión a tubulina
<b>doxorubicina</b>	Pulmón (Zhu <i>et al</i> , 2010) Gástrico (Park <i>et al</i> , 2010) Mama (Kim <i>et al</i> , 2008) Sarcoma (Lehnhardt <i>et al</i> , 2005)	Intercalación con el ADN

También en algunas ocasiones se prescriben moduladores de la respuesta inmunológica como leucovorina, levamisol o ácido fólico; los cuales potencian la actividad antineoplásica de los tratamientos convencionales.

Existen nuevos agentes que poseen actividad antineoplásica, entre ellos se encuentran algunos compuestos de cobre [35], mebendazole [36], ácido acetilsalicílico [37], licopenos [38], resveratrol [38] y 3-3diindolilmetano [38].

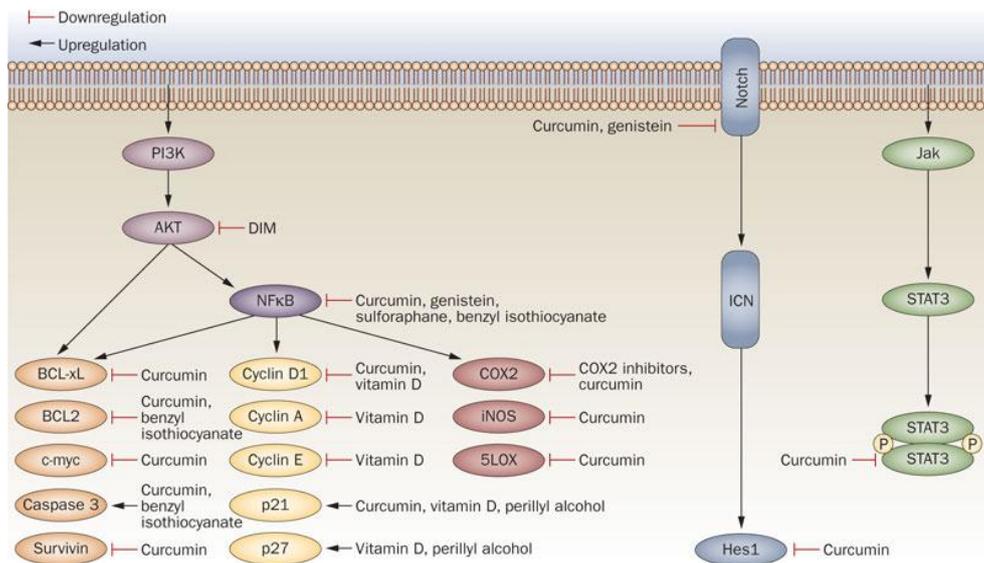
En el caso del ácido acetilsalicílico o aspirina se ha observado que inhibe a la enzima ciclooxigenasa (Cox) y se ha demostrado que el uso regular de aspirina se encuentra asociado con un decremento en el desarrollo del cáncer; ya que, además de la inhibición de la Cox se ha observado que posee diversos mecanismos que contribuyen a tener un efecto antiproliferativo y antiangiogénico, permitiendo que la célula tumoral entre en un proceso de apoptosis crucial para inhibir el desarrollo y crecimiento tumoral (*fig. 1*). El efecto antitumoral de la aspirina solo ha sido evaluado en diferentes líneas celulares de CCR [39] y en modelos murinos.



**Fig. 1.** Mecanismo de acción de la aspirina y sus efectos fisiopatológicos. Las flechas oscuras indican los mecanismos que se conocen y las punteadas indican los mecanismos potenciales que pueden contribuir al efecto antitumoral. Tomado de: Langley RE, et al. Aspirin and cancer: has aspirin been overlooked as an adjuvant therapy? *Br J Cancer*. 2011.105(8):1107-13.

Otro compuesto que presenta una actividad antitumoral es el 3-3,diindolilmetano (DIM), el cual es un indol-derivado, producido en el estómago

después del consumo de brócoli o de otros vegetales pertenecientes a las crucíferas, que ha demostrado tener un efecto antitumoral tanto en modelos *in vivo* como *in vitro* [40]. Este compuesto se ha observado que inhibe la vía de AKT (fig. 2), promoviendo que la célula desencadene mecanismos de arresto del ciclo celular y apoptosis. Al igual que la aspirina, este compuesto solo ha sido probado en diferentes líneas celulares de cáncer de colon [40-43] y en modelos murinos.



**Fig. 2.** Mecanismo del 3-3dindolilmetano (DIM) por inactivación de la vía AKT. Tomado de: Stan, S. D., S. V. Singh, et al. (2010). "Chemoprevention strategies for pancreatic cancer." *Nat Rev Gastroenterol Hepatol* 7(6): 347-356.

Sin embargo no se ha evaluado la actividad antitumoral de ninguno de los dos compuestos en cultivos primarios de adenocarcinoma de cáncer colorrectal, por lo cual, sería interesante probar su actividad antitumoral para valorar si puede ser considerado como una terapia adyuvante.

### 1.11 Efectos secundarios no deseados de la quimioterapia.

En la quimioterapia se utilizan agentes citotóxicos que tienen como finalidad atacar a las células tumorales. Sin embargo, al mismo tiempo de realizar su función, afectan aquellas células normales que tienen una alta frecuencia de división como son las células mieloides y linfoides de medula ósea [44-45], produciéndose graves efectos secundarios como la linfopenia, inhibición de eritropoyesis y trombocitopenia [46-47].

El tratamiento con quimioterapia se ha asociado con infecciones oportunistas severas, causadas por la neutropenia y la reducción de linfocitos T CD45<sup>+</sup> [48]; provocando un aumento en el número de hospitalizaciones y un costo extra sobre el tratamiento. La supresión inmunológica tiene efectos clínicos evidentes como dolor generalizado, anorexia, adinamia y disminución en la calidad de vida [49-53].

Aunque la tasa de respuesta a los actuales tratamientos sistémicos es cercana al 50%, la resistencia se desarrolla en casi todos los pacientes. Por ello, es esencial comprender los mecanismos de resistencia como un primer paso en el desarrollo de métodos para prevenir o revertir quimiorresistencia en pacientes que reciben la terapia sistémica para el CCR metastásico [54]; así como aplicar un método diagnóstico que nos permita conocer si un individuo es susceptible o resistente a los agentes quimioterapéuticos.

### **1.12 Pruebas de sensibilidad a la quimioterapia.**

Existen métodos que permiten evaluar la sensibilidad de las células neoplásicas frente a los agentes quimioterapéuticos; así como el efecto citotóxico en el tejido normal y tumoral. Los métodos que se utilizan principalmente son aquellos que evalúan la viabilidad celular; p.ej exclusión de azul de tripán, reducción de dimetil-tiazolil-difenil-tetrazolio (MTT), reducción de Alamar Azul y cuantificación de ATP por luminiscencia.

El ATP-CRA (*Adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay*) es un método muy sensible de medición de la viabilidad, en comparación con los otros métodos que se utilizan. Este método se basa en la medición de luminiscencia de los niveles intracelulares de ATP mediante ensayos de luciferina-luciferasa [55-58]. Otra cualidad de este método frente a otros, es que requiere una pequeña cantidad de células (2,000 a 20,000), lo cual ofrece una enorme ventaja en bioensayos donde se utilizan biopsias humanas [55-57, 59-60].

El ATP-CRA se ha utilizado con éxito en pacientes con cáncer de ovario [61], pulmón [55, 62], colon y recto [60], mama [57], tracto gastrointestinal [56], cuerpo uterino [59], melanomas [63], gliomas [64] y sarcoma [65].

Los bioensayos de cáncer de pulmón con ATP-CRA fueron realizados en las células neoplásicas obtenidas a partir de biopsias de broncoscopía. Se expusieron células tumorales a diferentes agentes quimioterapéuticos por un lapso de 48h. Estas células se consideraron sensibles a los agentes ensayados cuando se observaba un 30% de disminución en el contenido de ATP intracelular, con respecto al contenido de ATP en las células neoplásicas no tratadas [55].

En otro estudio de ATP-CRA se utilizaron  $2 \times 10^4$  células por pozo (de 200  $\mu$ l de capacidad) de un cultivo primario de cáncer gástrico. Estas células se expusieron a los agentes quimioterapéuticos por 72h, incubando las preparaciones a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub>. Los cultivos que mostraron una disminución del 50% de su concentración intracelular de ATP —con respecto al control— se consideraron sensibles al fármaco probado [66]. Para el cáncer de colon se evaluaron adenocarcinomas tanto de recto como de colon, los cuales se obtuvieron de piezas quirúrgicas que pesaban un mínimo de 20mg. Los bioensayos se realizaron exponiendo las células neoplásicas a los agentes quimioterapéuticos por 48h [60].

### **1.13 Aislamiento y caracterización de células de CCR.**

Debido a que la población de células tumorales de colon es muy heterogénea en este tipo de estudios se han realizado diferentes estrategias que permiten la separación de las células epiteliales. Se ha realizado este aislamiento utilizando una columna de perlas magnéticas la cuales tienen acoplados anticuerpos monoclonales anti-CD45. De esta manera, esta columna permite separar a las células linfoides (CD45+) del resto de la población (CD45-), realizando una selección negativa de las células epiteliales del tumor [67-68]. Este procedimiento podría introducir un sesgo en el procedimiento, ya que no se están evaluando todas las estirpes celulares que se encuentran involucradas en la respuesta clínica que presenta un paciente y que conviven con las células transformadas en el tejido tumoral ya que las células linfoides podrían estar facilitando la supervivencia de las células transformadas, suministrándoles factores de crecimiento o ayudándolas a degradar a los agentes tumorales [17].

Para los ensayos de quimiosensibilidad se realiza una caracterización de las células antes del ensayo. Para ello se utilizan, en primera instancia, tinciones de

Wright-Giemsa, de Papanicolau o de inmunohistoquímica [69]. En casos más específicos, se realiza la búsqueda de genes marcadores, mediante PCR-tiempo real o marcadores celulares específicos por citometría de flujo. Sin embargo, a pesar de la importancia que implica caracterizar las células resistentes a un tratamiento dado, hasta la fecha no existen reportes sobre la caracterización post-tratamiento de las células sobrevivientes de un cultivo primario de CCR a los agentes quimioterapéuticos en estudio. Posiblemente esto se debe a que la introducción de bioensayos con propósitos predictivos sobre la eficacia de agentes quimioterapéuticos anti-CCR son relativamente nuevos.

En las tinciones inmunohistoquímicas generalmente se utilizan anticuerpos monoclonales anti-citoqueratina 18 y 20 para diagnosticar adenocarcinomas de CCR, debido a la naturaleza epitelial del tejido del CCR [8, 13, 70-71]. Se ha encontrado que la expresión de estas citoqueratinas es de un 68 a un 100% en el tejido con CCR [72-75] lográndose su detección mediante técnicas como la inmunohistoquímica, RT-PCR de punto final y tiempo real con resultados reproducibles [74]. Sin embargo se ha reportado que por Northern blot, la expresión de la citoqueratina 20 es mucho mayor en tejido normal que en tejido tumoral; ya que 13 de 28 muestras presentaron una expresión de débil a moderada [76].

Otro de los receptores es el GPA 33 que es una proteína glicosilada transmembranal que se expresa de manera específica en las células epiteliales del intestino y por ende en tejido colorrectal [77-78]. Se ha visto que GPA 33 se encuentra de manera sobreexpresada en el 95% de CCR ya sea en etapa temprana o tardía [79-80]. Se ha reportado que esta proteína es encontrada tanto en citoplasma como en la membrana celular en el 98% de las células epiteliales aisladas a partir de pacientes con adenomas [70] por lo que también se propone como un blanco terapéutico por su expresión constante [78]. Sin embargo, estos marcadores no permiten distinguir entre células epiteliales normales y tumorales.

Existen marcadores que se expresan en las células de adenocarcinoma de CCR, lo cual permitirá una diferenciación entre las células tumorales y las células normales. Entre estos marcadores se encuentra la citoqueratina 17; esta proteína normalmente se encuentra en las células basales del epitelio escamoso estratificado o epitelio ductal, y se ha visto que se encuentra expresado en el carcinoma de

células escamosas de cabeza, cuello, mama, así como de adenocarcinoma como son de páncreas, ducto-biliar y colorrectal [81-83].

Se ha visto que en el cáncer de mama que es triple negativo (que no expresan receptor de estrógenos, receptor de progesterona y HER2) la citoqueratina 17 se puede asociar con un peor pronóstico, alto grado tumoral y afección a ganglios linfáticos axilares [84-86], además se ha observado la expresión de esta proteína en células altamente tumorigénicas en carcinomas uroteliales [87]. En recientes estudios en los adenocarcinomas de cáncer colorrectal se ha identificado, mediante proteómica y microarreglos de tejidos, la expresión de la citoqueratina 17 en tejido tumoral y no en mucosa sana; observándose una mayor expresión en las etapas tardías en comparación a las etapas tempranas, por lo cual se ha considerado como un candidato de diagnóstico y pronóstico [88].

Otro de los marcadores que posee una expresión diferencial entre las células tumorales y las normales es el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Este factor se ha relacionado con vías de señalización que se encuentran involucradas con el desarrollo y progresión de varios tumores humanos incluyendo el CCR. En CCR la función de este receptor se ve afectada en algunas ocasiones debido a mutaciones (poco frecuente), aumento en el número de copias (0-50%) o sobreexpresión de la proteína (25-90%) [89].

El EGFR ha mostrado resultados muy variables en expresión cuando se correlaciona con el CCR; ya que existen reportes donde se observa una sobreexpresión del 25-85% [89-90], otros con una sobreexpresión más baja 35-49% de los casos y en otros donde solo se reporta que la expresión de este receptor es > 80% en los tumores sólidos incluyendo al CCR [91-92]. Se ha observado una correlación entre la carcinogénesis y su pronóstico [89]; ya que en el 80% de los tumores donde se encuentra la sobreexpresión de este marcador corresponden a etapas tardías (estadio III) [93-94]; sin embargo no existen reportes concluyentes sobre su asociación con el grado de invasión tumoral [95-96] y reducción de la supervivencia [96-97].

## CAPÍTULO II

### JUSTIFICACIÓN

El CCR es una enfermedad que posee una alta tasa de morbi-mortalidad en el mundo en general y en México en particular en el Noreste de México se presenta con una alta incidencia. Además, se está observando un aumento de la prevalencia de esta enfermedad en gente más joven que en años anteriores y con mayor agresividad y resistencia a la quimioterapia.

Por otro lado, se ha observado que no siempre los esquemas con agentes quimioterapéuticos de primera línea son eficaces y la expectativa de vida máxima en casos avanzados de CCR (grados III ó IV) es de poco menos de un año. Esto es debido a que se presentan células tumorales resistentes a los agentes quimioterapéuticos de primera línea. En estos casos, la quimioterapia solo produce efectos secundarios no deseados en el paciente, teniéndose una baja respuesta al tratamiento y decremento en la calidad de vida del paciente.

Por el contrario, agentes quimioterapéuticos que no son de primera elección para el tratamiento de CCR, en algunos casos han dado iguales o mejores resultados que los de medicamentos de primera línea. Por ello se deben investigar nuevos compuestos con actividad antineoplásica que pudieran servir como coadyuvantes para el tratamiento de esta enfermedad.

A pesar de disponer de líneas celulares transformadas, éstas no son las idóneas para realizar ensayos de sensibilidad a agentes quimioterapéuticos debido a que las neoplasias están compuestas por diferentes estirpes celulares. Es por ello que para realizar este tipo de estudios, es preferible utilizar cultivos primarios de células cancerosas, las cuales se obtienen directamente de tejido tumoral, recién extirpado de los pacientes; permitiendo así pronosticar, la respuesta que podría presentarse *in vivo* en el paciente tratado con esos fármacos.

Por lo cual en este trabajo se evaluaron tres diferentes agentes quimioterapéuticos utilizados en el tratamiento de cáncer no-CCR y dos fármacos que poseen reportes de actividad antineoplásica, evaluando en primer lugar con líneas celular preestablecidas (COLO 320DM y CMMH) y posteriormente con cultivos primarios de ACCR y colon sano mediante el método ATP-CRA.

### **CAPÍTULO III**

#### **HIPÓTESIS**

Algunos medicamentos antineoplásicos utilizados para el tratamiento de cáncer no-CCR o sus combinaciones, tienen valor terapéutico estadísticamente significativo *in vitro* contra una línea celular de adenocarcinoma colorrectal y en cultivos primarios de CCR mediante el método ATP-CRA.

## CAPÍTULO IV

### OBJETIVOS

#### 4.1 Objetivo general:

Determinar el potencial terapéutico *in vitro* de agentes quimioterapéuticos utilizados para tratar el cáncer no-CCR sobre la línea de adenocarcinoma de cáncer colorrectal COLO 320DM y cultivos primarios de adenocarcinoma de CCR mediante el uso del método ATP-CRA.

#### 4.2 Objetivos particulares:

- 1) Determinar el efecto máximo de la concentración alcanzada en plasma y la ID<sub>50</sub> sobre COLO 320 DM de los fármacos de interés y de sus combinaciones.
- 2) Determinar la  $\Delta$  del porcentaje de muerte de las células tratadas con los fármacos, utilizando como testigos normales células madre mesenquimales humanas (CMMH).
- 3) Determinar el efecto máximo de las concentraciones de los fármacos y sus combinaciones sobre cultivos primarios de CCR y de colon sano, y calcular la  $\Delta$  del porcentaje de muerte.
- 4) Identificar al menos un agente quimioterapéutico o combinación de éstos que muestren un potencial terapéutico más alto que los medicamentos del esquema terapéutico de primera línea utilizado.

## CAPÍTULO V

### MATERIAL Y MÉTODOS

#### 5.1 Material biológico.

##### 5.1.1 Línea celular de adenocarcinoma COLO 320DM.

En el presente estudio se utilizó la línea celular COLO 320DM (*American Type Culture Collection* [No. de catálogo CCL-220]) de adenocarcinoma colorrectal humano. Las células fueron aisladas de un tumor que estaba en estadio III (Dukes tipo C). Esta línea celular posee la característica de estar compuesta por células epiteliales adherentes y no adherentes, utilizándose ambos tipos de células, sin haber hecho ningún procedimiento de selección.

##### *5.1.1.1 Mantenimiento de COLO 320DM.*

Las células se mantuvieron por triplicado en cajas de cultivo de poliestireno de 35 cm<sup>2</sup> con fondo plano y tapón de rosca con filtro. En cada caja se inocularon 35,000 células resuspendidas en medio RPMI suplementado (anexo) y se agregó medio hasta tener un volumen final de 5 mL de medio RPMI suplementado a cada caja. Las cajas se incubaron por a 37°C en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% hasta que llegaron al 80% de confluencia se cosecharon y almacenaron a -70°C hasta su uso.

##### *5.1.1.2 Resiembras de COLO 320DM.*

Las resiembras de COLO 320DM se realizaron a partir de cajas de cultivo de 35 cm<sup>2</sup> alcanzaron un 80% de confluencia, seleccionando el cultivo con mejor densidad y aspecto de las células (tanto adherentes como no adherentes) cuando se observó en un microscopio invertido a una amplificación de 10X. De la caja seleccionada se tomo el sobrenadante con las células no adherentes y se depositó en un tubo de poliestireno de 15 mL; mientras que a la caja de cultivo con las células adherentes se les adicionó 1 mL de tripsina al 0.25% y se incubaron las células a 37°C en atmosfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 5 min y la suspensión celular resultante se mezcló con las células no adherentes. Las células se sedimentaron por centrifugación a 730× g por espacio de 10 min y se resuspendieron en 1 mL de medio RPMI suplementado. Se tomó una muestra de 4 µL y se mezcló bien con 16 µL de tripán azul al 0.4%

(anexo) y con esta preparación se determinó la concentración total y el porcentaje de viabilidad en cada cultivo con un hemacitómetro. De la suspensión celular se inocularon 35,000 células resuspendidas en medio RPMI suplementado a tres cajas y se agregó medio hasta tener un volumen final de 5 mL de medio RPMI suplementado a cada caja. Se conservaron en incubación las dos cajas no seleccionadas de la resiembra previa hasta confirmar la ausencia de contaminación en los nuevos cultivos.

### 5.1.2 Células madre mesenquimales humanas de tejido adiposo (CMMH).

#### 5.1.2.1 Aislamiento de CMMH.

Durante los procedimientos de cirugía plástica practicados a dos hombres y dos mujeres adultos, sin síntomas patológicos, se tomó aproximadamente 1 cm<sup>3</sup> de tejido adiposo de desecho del panículo subcutáneo abdominal. El tejido obtenido se depositó en un tubo de polietileno estéril de 50 mL e inmediatamente se transportó el tejido al laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular para la disgregación del tejido.

El tejido adiposo se disgregó bajo condiciones de esterilidad. Las muestras se descontaminaron con etanol al 70% (anexo) por un min; se lavaron tres veces con PBS (anexo) y se cortaron con tijeras estériles en trozos de aproximadamente 2-3 mm<sup>3</sup>, se mezclaron con 1 volumen de solución de colagenasa tipo 1 (anexo) y 2 volúmenes de medio de disgregación de tejido adiposo (anexo). La preparación se incubó a 37°C a una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por toda la noche.

Las células se sedimentaron mediante centrifugación a 730 × g por 10 min. Se retiró todo el sobrenadante y la pastilla de células se resuspendió en 2 mL de PBS con gentamicina y anfotericina B (anexo). Las células se lavaron tres veces con PBS, eliminando todo el sobrenadante quedando solamente el botón celular sedimentado en el fondo.

Las células lavadas se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo α-MEM suplementado (anexo). Se determinó la concentración total y el porcentaje de viabilidad en cada cultivo con el método de azul tripán. Se sembraron 35,000 células

en botellas de poliestireno de 35 cm<sup>2</sup> y se adicionó medio  $\alpha$ -MEM suplementado hasta alcanzar un volumen final de 5 mL.

Los cultivos se incubaron por 3 días a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en medio  $\alpha$ -MEM suplementado. Finalizado el lapso de tiempo, el sobrenadante se reincubó por 4 días más en una botella nueva de poliestireno de 35 cm<sup>2</sup> para permitir la adhesión de las células mesenquimales que se encontraban aun en el sobrenadante. En cuanto a la botella de cultivo original, se le adicionaron 5 mL de medio  $\alpha$ -MEM suplementado y a la segunda botella se le realizó el cambio de medio finalizado el período de incubación por 4 días.

#### *5.1.2.2 Resiembras de CMMH.*

Las células adheridas de cada uno de los donadores, se resembraron cuatro veces, siguiendo el mismo procedimiento que se utilizó con las células de COLO 320DM, se mezclaron las células de los cuatro donadores para realizar la caracterización inmunocitoquímica y los bioensayos de sensibilidad a fármacos.

#### *5.1.2.3 Caracterización por inmunocitoquímica.*

A partir de la mezcla de la suspensión de las células de los cuatro donadores se sembraron en una microcámara de cultivo (Chamber Slide System), colocando  $2 \times 10^4$  células por celda con 500  $\mu$ L de medio  $\alpha$ -MEM suplementado. Estas preparaciones se incubaron a 37°C en una atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> hasta que alcanzaron un 80% de confluencia. Las monocapas celulares se lavaron suavemente con PBS 1X y se fijaron por 20 min a 4°C con una mezcla de 1:1 de metanol-acetona (anexo) preenfriada a 4°C. La microcámara se colocó en un vaso Coplin con tris buffer salino + tween 20 (TBST) durante 5 min a 37°C para realizar los lavados. Enseguida se realizó el bloqueo de la peroxidasa endógena incubando la preparación con 150  $\mu$ L de peróxido de hidrogeno al 3% por 10 min a 37°C y posteriormente se realizó un lavado con TBST, enseguida se añadieron 150  $\mu$ L del anticuerpo monoclonal anti-CD105 diluido 1:10 con diluyente para anticuerpos de la marca Dako (DakoCytomation antibody Diluent with Reducing Components) incubándose en cámara húmeda por 12 h a 4°C.

Posteriormente se lavó con TBST y se agregó 150 µL del sistema de detección EnVision de Dako (anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano) incubándose por 45min a 37°C. Se lavó la preparación con TBST y la positividad se reveló agregando 150 µL de 3-3'-diaminobenzidina (DAB) durante 10 min a 37°C. Pasado este tiempo las preparaciones se lavaron tres veces con agua destilada y los núcleos se contrastan con 150 µL hematoxilina de Mayer por 1 min a 37°C.

Las preparaciones se lavaron con agua destilada por 5 min a 37°C, finalizado el tiempo se depositaron las preparaciones en una jarra de tinción con agua destilada por espacio de 5 min. Las preparaciones se deshidrataron con soluciones en orden creciente de etanol (70%, 95% y 100%) y xilol al 100%; y se montaron con medio de montaje Entellan y se colocó el cubreobjetos en ellas. Las laminillas se observaron con un microscopio Nikon Eclipse 50i y se analizaron en el sistema analizador de imágenes Software NIS-elements BR 2.30.

Como testigos positivos y negativos de la técnica de inmunocitoquímica se utilizaron cortes de hígado humano como testigo positivo y corte de yeyuno humano como testigo negativo. Previo al marcaje, los tejidos se desparafinizan con calor por 30 min seguido de xilol al 100% por 5 min, después se hidrataron con alcoholes de 100%, 96% y 70% seguido de agua destilada y TBST por 3 min cada uno. Para la exposición de los antígenos se utilizó una solución de TRS (Target retrieval solution 1X de Dako) por 1 h a 90°C. Para posteriormente realizar el marcaje con el anticuerpo anti-CD105 previamente descrito.

Posteriormente se realizó un análisis morfométrico mediante la cuantificación de las células que fueron positivas y negativas para el marcaje con el anticuerpo anti-CD105, tomando 5 campos consecutivos de las laminillas por triplicado, determinando así el porcentaje de células positivas respecto al número total de células.

### 5.1.3 Células colorrectales de tejido tumoral y tejido sano.

#### *5.1.3.1 Pacientes.*

Se utilizó tejido tumoral de pacientes con adenocarcinoma colorrectal (ACCR) en estadios III y IV siguiendo los criterios de inclusión y exclusión mostrados en la tabla 3.

**Tabla 3.** Criterios que se tomaron para la recolección de tejido de cáncer colorrectal.

Criterios de inclusión	Criterios de exclusión
* Tener diagnóstico de CCR estadios III ó IV	* Tener una enfermedad concomitante
* Requerir una extirpación quirúrgica inmediata por razones terapéuticas o para confirmar el diagnóstico mediante métodos histopatológicos	
* Buen estatus de vida (Tener un Karnofsky $\geq 60$ )	* Haber recibido un tratamiento antitumoral
* No haber iniciado quimioterapia	
* Cualquier edad y sexo	* No cumplir con alguno de los criterios de inclusión
* No tener alguna inmunodeficiencia o enfermedad autoinmune	
* Haber firmado la carta de consentimiento informado	

Para comprar los resultados se utilizó como control de nuestros experimentos un tejido sano de colon humano que se obtuvo de un procedimiento quirúrgico para reparar una perforación intestinal. Este tejido se trasladó al laboratorio de Terapia Celular después de su obtención.

#### 5.1.3.2 Cultivos primarios de ACCR y de tejido sano de colon.

Los cirujanos del Hospital Universitario y de la UMAE # 25 extirparon los tumores primarios u obtuvieron biopsias por razón necesaria y en todos los casos, en beneficio de los pacientes; siendo utilizado para este proyecto el tejido de desecho con la autorización de los pacientes. Las muestras de tejido sano y tejido tumoral se depositaron en tubos de plástico estériles de 50 mL, los cuales inmediatamente fueron transportados en frío al laboratorio de Terapia Celular del Departamento de Bioquímica y Medicina Molecular para su procesamiento.

La muestra se lavó tres veces con solución salina estéril para remover la materia fecal y se descontaminó con etanol al 70% por 1 min agitando suavemente por inversión. Se desechó todo el sobrenadante y la muestra se lavó tres veces con PBS con anfotericina B y gentamicina.

La metodología utilizada para la disgregación de las células fue igual a la utilizada para disgregar las CMMH; solo que se utilizó el medio de disgregación de tejido de colorrectal (anexo) en vez del medio de disgregación de tejido adiposo. Las células obtenidas se resuspendieron en 1 mL de medio de cultivo IMDM suplementado (anexo), se determinó el número de células y la viabilidad celular con

el método de azul tripán para realizar las pruebas de sensibilidad a los compuestos y combinaciones, así como la tinción de inmunocitoquímica para la caracterización de la células.

#### *5.1.3.3 Caracterización de las células de cultivos primarios de ACCR y tejido de colon sano por inmunocitoquímica.*

Los cultivos primarios de ACCR y tejido sano de colon se marcaron con anticuerpos monoclonales anti-citoqueratina 17 (dilución 1:200), anti-citoqueratina 20 (dilución 1:200) y anti-EFGR (dilución 1:50), siendo las diluciones hechas con diluyente de anticuerpo previamente descrito. En todos los casos se siguió la metodología empleada para el marcaje, contratinción y montaje de las CMMH.

Como testigos positivos se utilizaron cortes de glándula sublingual de humano (para la citoqueratina 17), colon de humano (para la citoqueratina 20) y piel de humano (para el EFGR). Como testigos negativos se utilizaron cortes de cerebro de humano que se incubaron junto los anticuerpos mencionados.

## **5.2 Fármacos anti-neoplásicos seleccionados.**

Se seleccionaron cinco fármacos que no se han utilizado para el tratamiento del CCR y dos fármacos que se utilizan de manera convencional para el tratamiento del CCR (*tabla 4*) y fueron evaluados de manera individual y en combinación (*tabla 6*) en la línea COLO 320DM, las CMMH, con los cultivos primarios de adenocarcinoma de ACCR y los cultivos primarios de células de tejido de colorrectal sano.

Los criterios de selección para los fármacos fueron que se encontrara un reporte previo con actividad antineoplásica o que se utilizaran para el tratamiento de otro tipo de cáncer no CCR, además que fueran de fácil acceso a la población en general.

**Tabla 4.** *Fármacos seleccionados para la evaluación.*

Agentes de primera línea para el tratamiento de CCR	5- FU
	Oxaliplatino
Agentes utilizados para cáncer no colorrectal	Carboplatino
	Doxorrubicina
	Cisplatino
Nuevo compuestos propuestos	Aspirina
	DIM

### 5.3 Determinación de curvas dosis-respuesta en COLO 320DM.

Los ensayos de citotoxicidad (letalidad) se realizaron mediante el método de ATP-CRA [55] utilizando las concentraciones 4X, 2X, 1X, 0.5X, 0.25X, 0.125X y 0.065X de los agentes quimioterapéuticos. La concentración 1X fue equivalente a la concentración máxima que cada uno de los fármacos de interés y los estándares alcanza en plasma [56, 60]. La concentración utilizada para el DIM se utilizó fue la concentración máxima reportada por Redd et al (2006). Por otro lado, dado que la aspirina tiene diferentes usos, se eligió para los bioensayos la concentración máxima que este fármaco alcanza en plasma cuando se utiliza como antiinflamatorio [98] (tabla 5).

**Tabla 5.** *Rango de concentraciones de fármacos a evaluar y concentración máxima que alcanzan en plasma.*

Compuesto		Concentración máxima en plasma ( $\mu\text{g/mL}$ )*	Rangos de concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )
Agentes de primera línea para el tratamiento de CCR	5- FU	10	0.625 a 20
	Oxaliplatino	2.9	0.181 a 11.6
Agentes no utilizados para el CCR	Carboplatino	12	0.75 a 48
	Doxorrubicina	1.5	0.093 a 6
	Cisplatino	2.5	0.156L a 10
Nuevo compuestos propuestos	Aspirina	396.34	222.5 a 900.78
	DIM	$5.9 \times 10^{-4}$	$2.4 \times 10^{-5}$ a 0.3

\*Equivalentes a 1X

Los resultados de los bioensayos se graficaron como el porcentaje de muerte celular en función de la concentración de cada uno de los cinco fármacos seleccionados de manera individual. Los resultados obtenidos con cada fármaco se linearizaron, graficando el porcentaje de muerte celular en función del Log de la dosis de cada fármaco. En cada una de estas curvas se determinaron—por

interpolación—la dosis inhibitoria media (DI<sub>50</sub>) y el efecto citotóxico alcanzado por la concentración equivalente a la máxima alcanzada en plasma por cada fármaco (*tabla 5*).

La *tabla 6* contiene las combinaciones de fármacos utilizadas en el presente trabajo. Las concentraciones de todos los fármacos de dicha *tabla* fueron equivalentes a la DL<sub>50</sub> que se determinó previamente; excepto la aspirina y el DIM, en los que utilizamos la concentración máxima que cada uno de éstos alcanza en plasma (*tabla 5*).

**Tabla 6.** *Combinaciones sometidas a los bioensayos.*

<b>Combinaciones con los fármacos de primera línea incluidos</b>
5-FU + oxaliplatino + carboplatino
5-FU + oxaliplatino + doxorubicina
5-FU + oxaliplatino + cisplatino
5-FU + oxaliplatino + carboplatino + doxorubicina
5-FU + oxaliplatino + carboplatino + cisplatino
5-FU + oxaliplatino + carboplatino + cisplatino + doxorubicina
5-FU + oxaliplatino + aspirina
5-FU + oxaliplatino + DIM
5-FU + oxaliplatino + aspirina + DIM
<b>Combinaciones sin los fármacos de primera línea</b>
Carboplatino + doxorubicina
Carboplatino + cisplatino
Carboplatino + cisplatino + doxorubicina
Aspirina + DIM
Carboplatino + doxorubicina + aspirina
Carboplatino + doxorubicina + DIM
Carboplatino + doxorubicina + aspirina + DIM
Carboplatino + doxorubicina + aspirina + DIM
Carboplatino + cisplatino + DIM
Carboplatino + cisplatino + aspirina
Carboplatino + cisplatino + DIM + aspirina
Carboplatino + cisplatino + doxorubicina + DIM
Carboplatino + cisplatino + doxorubicina + aspirina
<b>Combinaciones con fármacos de primera línea utilizadas como estándares</b>
5-FU + Oxaliplatino
5FU + oxaliplatino + leucovorina

La concentración de todos los fármacos ensayados fue equivalente a la DL<sub>50</sub>, excepto DIM y aspirina, cuya concentración fue equivalente a la máxima alcanzada en plasma.

#### **5.4 Determinación de la citotoxicidad de los fármacos y combinaciones en CMMH.**

Para los que se utilizó una mezcla de CMMH de cuatro donadores para realizar bioensayos de citotoxicidad por el método de ATP-CRA con la concentración máxima alcanzada en plasma de manera individual de los fármacos mencionados en la tabla 5 y de las combinaciones previamente descritas (*tabla 6*).

#### **5.5 Determinación de curvas dosis-respuesta de los fármacos y sus combinaciones sobre cultivos primarios de ACCR y cultivos primarios de colon.**

Para evaluar el efecto tóxico de cada fármaco por separado se utilizó la concentración máxima que cada uno de éstos alcanza en plasma para cada uno de los agentes quimioterapéuticos, aspirina y DIM (*tabla 5*) además se evaluaron las combinaciones anteriormente ya descritas (*tabla 6*).

#### **5.6 Bioensayo de ATP-CRA.**

Se determinó el porcentaje de muerte mediante la determinación de la concentración de ATP intracelular, siguiendo el métodos descrito por Park *et al* (2010) con adecuaciones menores.

Se realizaron los ensayos de citotoxicidad depositando en una placa de 96 pozos por pozo 20,000 células en 50  $\mu$ L de medio de cultivo suplementado (RPMI,  $\alpha$ -MEM ó IMDM) de acuerdo el tipo de cultivo (COLO 320DM, CMMH ó cultivos primarios de ACCR) y se añadieron 50  $\mu$ L de los diferentes tratamientos. Las células se incubaron a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% por 48 h.

Finalizado el tiempo de incubación se realizó la medición de ATP intracelular adicionando 100  $\mu$ L de la solución CellTiter-Glo® Reagent del kit CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Se mezcló por rotación manual la placa de 96 pozos por 2 min a TA para inducir la lisis celular y se incubó por 10 min a 37°C en atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5% para estabilizar la señal de luminiscencia. Se leyó la luminiscencia en cada pozo, utilizando el programa CellTiter-Glo versión 1.5.0 del equipo de luminiscencia Veritas, obteniendo como resultado la luminiscencia generada por la reacción enzimática de la luciferina-luciferasa [58].

Dependiendo de los diferentes tipos de cultivo se utilizaron distintos controles. Para todos los cultivos se utilizaron como controles 6 pozos con 100  $\mu$ L de

medio de cultivo suplementado (según el medio utilizado para cada cultivo celular) como blanco y seis pozos de células sin tratamiento como control negativo.

Solo para los cultivos primarios de ACCR y de colon sano se utilizó como controles tres pozos con 105 pg de ATP/200 µL (rango mínimo de detección), tres pozos con 208 pg de ATP (rango medio de detección); se incluyó en cada placa pozos con la concentración más baja de ATP como estándar; porque en caso de que se hubieran presentado en los controles no tratados promedios de lectura de luminiscencia más bajos que al estándar con 105 pg de ATP el experimento se hubiera descartado.

Además se incluyeron células COLO 320DM tratadas de con 5-FU como control interno positivo, la concentración de 5-FU que se usó correspondió a la concentración máxima alcanzada en plasma (1X) por este fármaco.

#### 5.6.1. Análisis de resultados de luminiscencia.

Los resultados de luminiscencia obtenida a partir de los bioensayos de ATP-CRA se convirtieron en porcentaje de muerte celular mediante la siguiente ecuación:

$$PMC = \left[ 1 - \frac{LCT}{PLCST} \right] \times 100$$

donde:

PMC es porcentaje de muerte celular.

LCT es luminiscencia del sobrenadante de las células tratadas, equivalente a la concentración de ATP intracelular.

PLCST es promedio de luminiscencia del sobrenadante de los controles no tratados, equivalente al 100% de la concentración intracelular de ATP promedio de luminiscencia de células sin tratamiento.

### **5.7 Determinación de la Δ del porcentaje de muerte de las células tratadas con los fármacos.**

Con los resultados de PMC obtenidos de los diferentes cultivos celulares se determinó la eficacia antitumoral de los fármacos experimentales y de sus

combinaciones con respecto a los estándares mediante la  $\Delta$  del PMC comparando los resultados de la siguiente manera: COLO 320DM/CMMH y cultivos primarios de ACCR con los nuevos fármacos o combinaciones/ cultivos primarios de ACCR con los fármacos de primera línea (5-FU y oxaliplatino) o combinación de primera línea (5-FU-oxaliplatino-leucovorina).

Para la comparación de COLO 320DM/CMMH la  $\Delta$  del PMC se calculó con la siguiente ecuación:

$$\Delta = \text{PMC de COLO 320DM} - \text{PMC de CMMH}$$

Para los cultivos primarios de ACCR con los nuevos fármacos o combinaciones/ cultivos primarios de ACCR con los fármacos de primera línea (5-FU y oxaliplatino) o combinación de primera línea (5-FU/oxaliplatino/leucovorina), se calculó con la siguiente ecuación:

$$\Delta = \text{PMC de cultivos primarios ACCR} - \text{PMC de cultivos primarios de colon sano}$$

### **5.8 Análisis estadístico.**

Todos los ensayos se realizaron tres veces por triplicado, en total obteniéndose nueve determinaciones para cada tratamiento. Las gráficas muestran los valores obtenidos con las barras de error estándar. Donde se indica (\*) las diferencias entre resultados se analizaron aplicando la prueba de t de Student y se consideraron estadísticamente significativas con una  $p \leq 0.05$ .

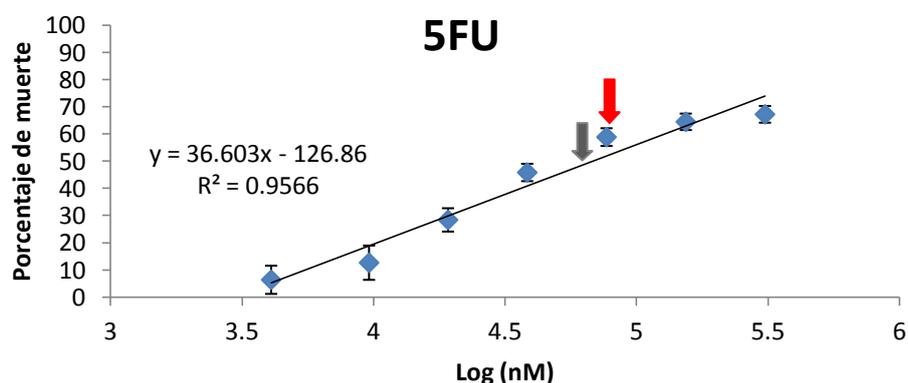
## CAPÍTULO VI

### RESULTADOS

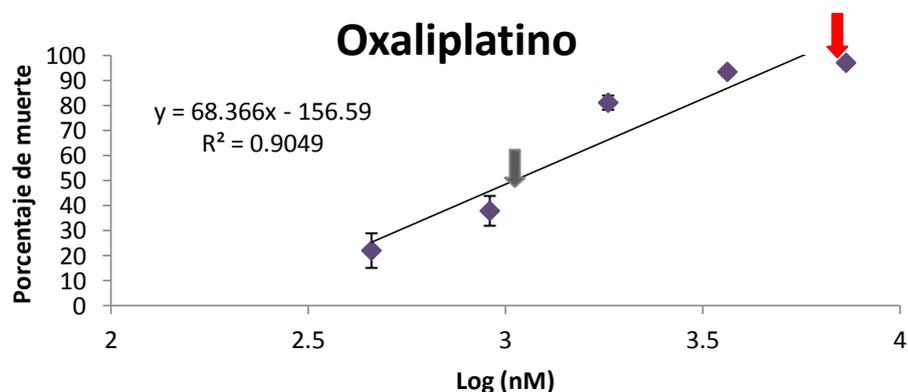
#### 6.1 Citotoxicidad sobre COLO 320DM de los fármacos con de manera individual.

##### 6.1.1 Estándares.

La concentración de 5-FU equivalente a la que este fármaco alcanza en plasma (10 µg/mL) mostró tener un 55.9±5.57% de muerte celular y la  $DI_{50}$  fue equivalente a 8.58 µg/mL (fig.3). Por otro lado, una concentración de oxaliplatino equivalente al máximo que alcanza en plasma (2.9 µg/mL) produjo un 97.12±0.81% de muerte celular y su dosis letal media fue de 0.40 µg/mL (fig.4).



**Fig. 3.** Curva dosis-respuesta de 5-FU en la línea celular COLO 320DM, mostrando el efecto máximo (EM) del fármaco a la concentración máxima que alcanza en plasma (en la flecha en rojo),  $DI_{50}$  (flecha gris) y las ecuaciones de la recta. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.

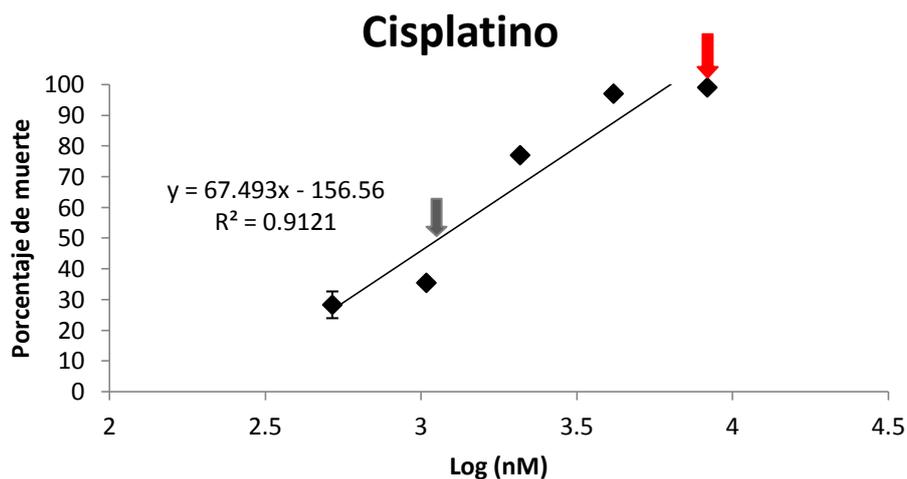


**Fig. 4.** Curva dosis-respuesta de oxaliplatino en la línea celular COLO 320DM, mostrando el efecto máximo (EM) del fármaco a la concentración máxima que alcanza en plasma (en la flecha en rojo),  $DI_{50}$  (flecha gris) y las ecuaciones de la recta. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.

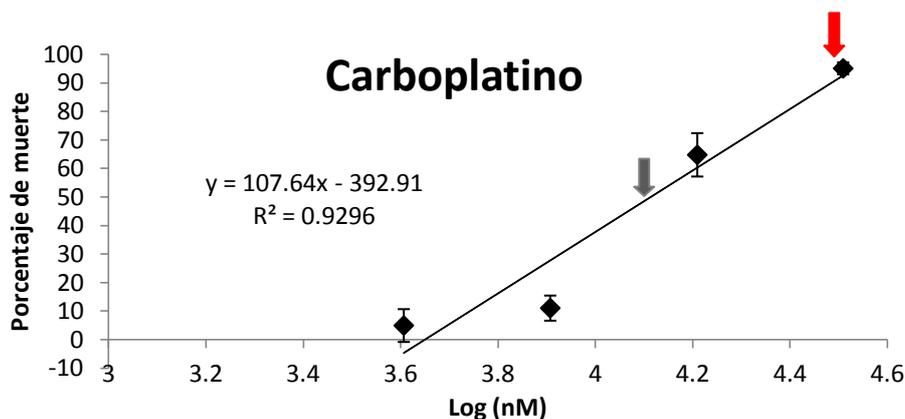
### 6.1.2 Efecto de citotoxicidad de los fármacos nuevos propuestos.

Las figuras 5 a 8 muestran que los tres agentes quimioterapéuticos utilizados para el tratamiento de cáncer no-CCR o con actividad antineoplásica fueron activos sobre COLO 320DM y la muerte celular producida por éstos tuvo una relación lineal dependiente del logaritmo de la concentración ( $r^2 = 0.90$  a  $0.98$ ); la única excepción fue el DIM que no guardó esta relación. (fig. 9).

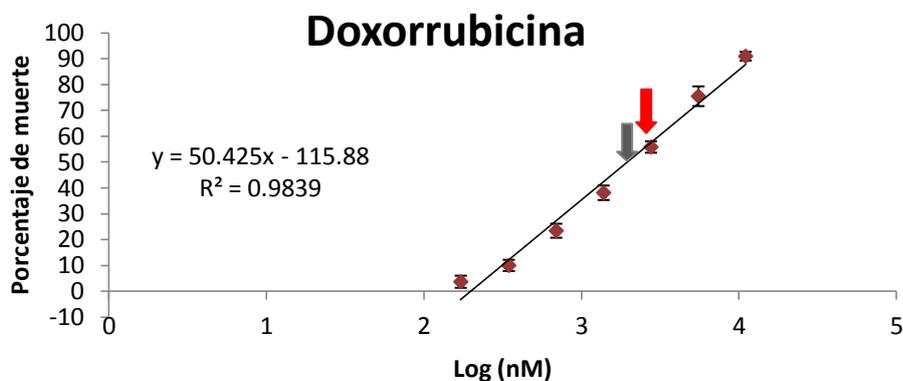
El agente más eficaz fue el cisplatino, el cual causó el  $99.29 \pm 0.14\%$  de muerte con una concentración equivalente a la máxima que alcanza en plasma ( $2.5 \mu\text{g/mL}$ ) y su  $DI_{50}$  fue de  $1.07 \mu\text{g/mL}$  (fig.5). El segundo compuesto anti-neoplásico más activo fue el carboplatino con un  $96.45 \pm 0.55\%$  de muerte celular a una concentración equivalente a la máxima que alcanza en plasma ( $12 \mu\text{g/mL}$ ) y su  $DI_{50}$  fue de  $5.47 \mu\text{g/mL}$  (fig.6) el tercer lugar en potencia fue la doxorubicina con un  $66.62 \pm 5.75\%$  y una  $DI_{50}$  de  $41.60 \mu\text{g/mL}$  (fig. 7).



**Fig. 5.** Curva dosis-respuesta de cisplatino en la línea celular de COLO 320DM, mostrando el efecto máximo (EM) del fármaco a la concentración máxima que alcanza en plasma (en la flecha en rojo),  $DI_{50}$  (flecha gris) y la ecuación de la recta. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.



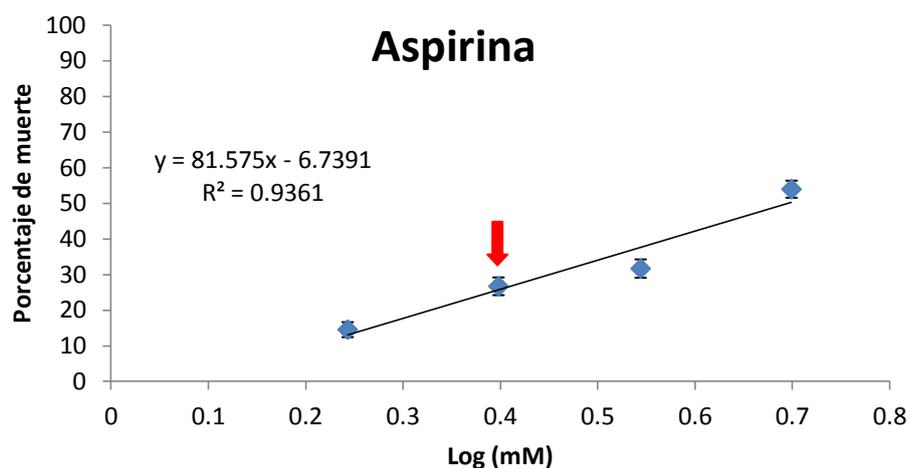
**Fig. 6.** Curva dosis-respuesta de carboplatino en la línea celular COLO 320DM, mostrando el efecto máximo (EM) del fármaco a la concentración máxima que alcanza en plasma (en la flecha en rojo),  $DI_{50}$  (flecha gris) y la ecuación de la recta. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.



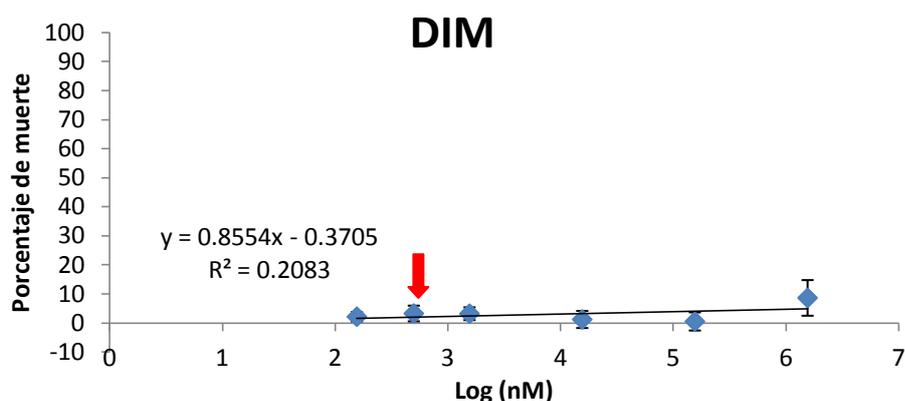
**Fig. 7.** Curva dosis-respuesta de doxorubicina en la línea celular COLO 320DM, mostrando el efecto máximo (EM) del fármaco a la concentración máxima que alcanza en plasma (en la flecha en rojo),  $DI_{50}$  (flecha gris) y la ecuación de la recta. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.

Tanto la aspirina como el DIM mostraron una baja citotoxicidad sobre COLO 320DM. La concentración de la aspirina equivalente a la que ésta alcanza en plasma—cuando este fármaco se suministra como antiinflamatorio— causó un  $26.67 \pm 2.40\%$  de muerte celular (*fig.8*) mientras que el DIM mostró tener un

4.50±2.97% de muerte en la concentración máxima alcanzada en plasma reportada por Redd *et al* (2006) (fig.9).



**Fig. 8.** Curva dosis-respuesta de aspirina en la línea celular COLO 320DM, mostrando el efecto máximo (EM) del fármaco a la concentración máxima que alcanza en plasma (en la flecha en rojo) y la ecuación de la recta. Las barras representan los promedios ± error estándar de tres experimentos por triplicado.



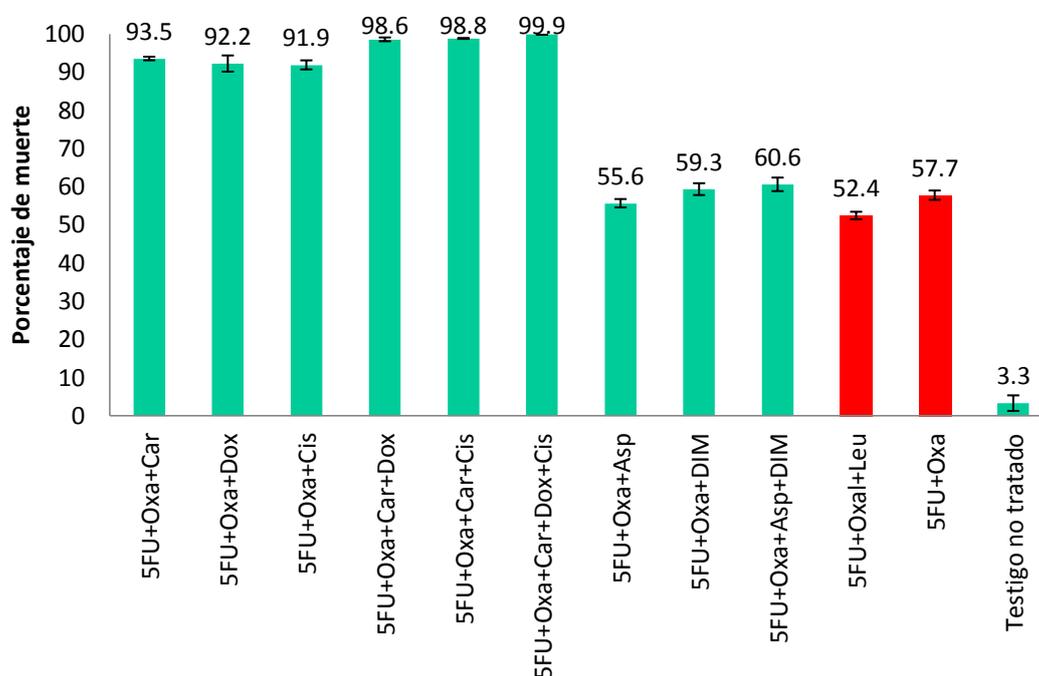
**Fig. 9.** Curva dosis-respuesta de DIM en la línea celular COLO 320DM, mostrando el efecto máximo (EM) del fármaco a la concentración máxima que alcanza en plasma (en la flecha en rojo) y la ecuación de la recta. Las barras representan los promedios ± error estándar de tres experimentos por triplicado.

## 6.2 Citotoxicidad sobre COLO 320DM fármacos evaluados en combinación.

Las combinaciones que tienen como base los agentes quimioterapéuticos de primera línea y uno o dos agentes quimioterapéuticos utilizados para el tratamiento de cáncer no-CCR poseen un porcentaje de muerte mayor (91.1% a 99.9%) en comparación con la de los estándares que corresponden a los fármacos de primera

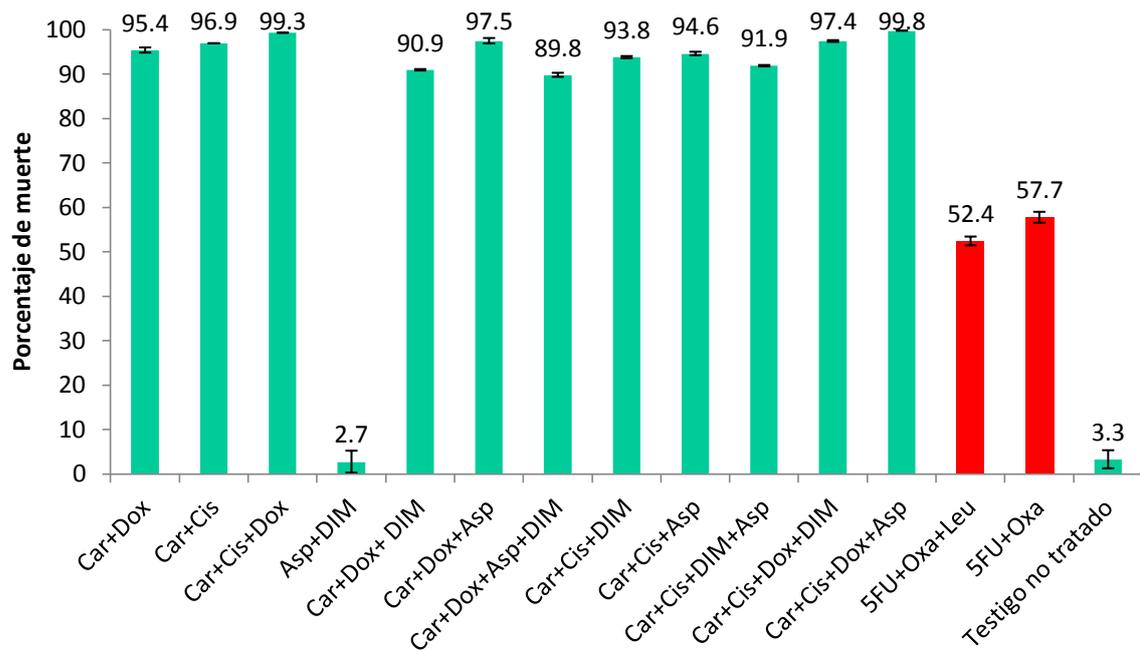
línea ( $52.4 \pm 0.99\%$  y  $57.7 \pm 1.23\%$ ); mostrando tener el doble de actividad citotóxica para las células de la línea COLO 320DM (*fig. 10*).

Las combinaciones que incluían 5-FU, oxaliplatino y DIM o aspirina o DIM y aspirina presentaron un porcentaje de muerte del 55.6% a 60.6%. (*fig. 10*).



**Fig. 10** Efecto de citotoxicidad sobre COLO 320DM de las combinaciones que tienen como base los fármacos de primera línea (5-FU y oxaliplatino). Las barras en verde se encuentran las nuevas combinaciones propuestas y las barras en rojo las combinaciones estándar. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.

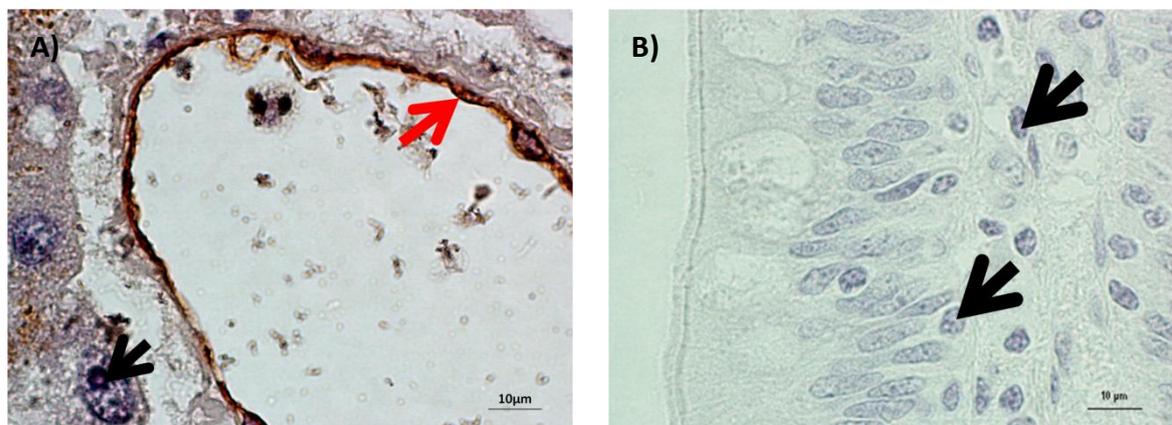
Las combinaciones de los fármacos doxorrubicina, cisplatino, carboplatino, DIM y aspirina, mostraron tener un porcentaje de muerte mayor (90.9% a 99.8%) sobre COLO 320 en comparación a los porcentajes obtenidos por los estándares ( $52.4 \pm 0.99\%$  y  $57.7 \pm 1.23\%$ ); exceptuado la combinación de aspirina/DIM, la cual presentó un  $2.7 \pm 2.48\%$  de muerte celular (*fig. 11*).



**Fig. 11** Efecto de citotoxicidad sobre COLO 320DM de las combinaciones que tienen solo los fármacos propuestos (carboplatino, cisplatino, doxorubicina, aspirina y DIM). Las barras en verde se encuentran las nuevas combinaciones propuestas y las barras en rojo las combinaciones estándar. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.

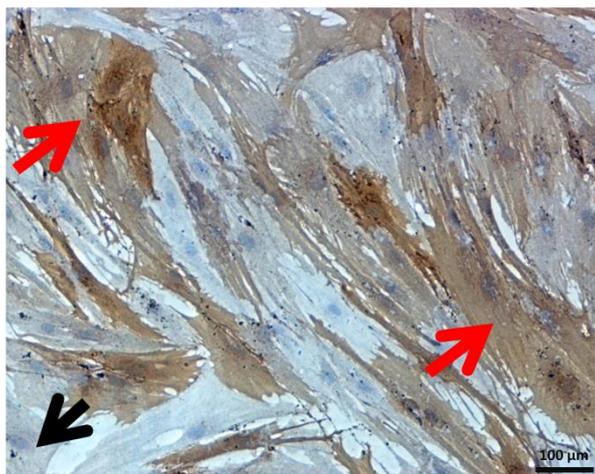
### 6.3. Caracterización de las células madre mesenquimales humanas obtenidas a partir de tejido adiposo.

La figura 12.A se muestra un corte de hígado positivo para anti-CD105. La figura 12.B muestra un corte de yeyuno, en donde se observa una reacción negativa para CD105.



**Fig.12.** Controles internos de la técnica de inmunocitoquímica con el anticuerpo anti-CD105. Reacción positiva para el marcador CD105 en el endotelio de la vena central en hígado humano (flecha roja). El recuadro B corresponde a yeyuno como testigo negativo no observándose positividad para CD105. En ambas micrografías se muestran los núcleos contrateñidos (flechas negras).

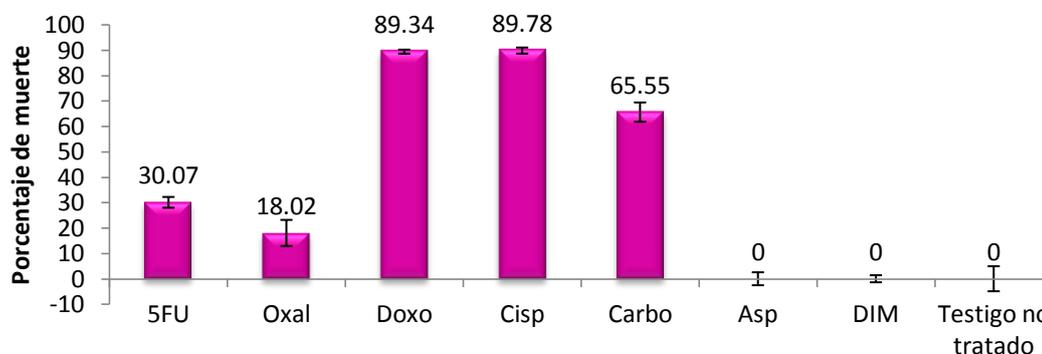
Por otra parte, en análisis morfométrico se observó que el  $55.68 \pm 8.83\%$  de las CMMH aisladas a partir de tejido adiposo fueron positivas para el marcador CD105 (*fig.13*).



**Fig.13.** Caracterización inmunocitoquímica de las CMMH. Obsérvese la positividad de color marrón en las membranas, denotando la expresión de CD105 (flechas rojas) y células negativas (flechas negras).

#### 6.4. Citotoxicidad de los fármacos de manera individual sobre CMMH.

La figura 14 muestra que todos los fármacos, excepto la aspirina y el DIM, fueron tóxicos para las CMMH en la concentración máxima alcanzada en plasma. Los estándares (5-FU y oxaliplatino) mostraron tener la menor citotoxicidad entre los fármacos analizados, siendo el oxaliplatino el agente quimioterapéutico de menor citotoxicidad; los que mostraron la mayor citotoxicidad, fueron la doxorubicina y el cisplatino.



**Fig.14.** Efecto citotóxico sobre CMMH de los fármacos evaluados en la concentración máxima alcanzada en plasma. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.

## 6.5 Citotoxicidad de los estándares y de las combinaciones de los fármacos sobre CMMH.

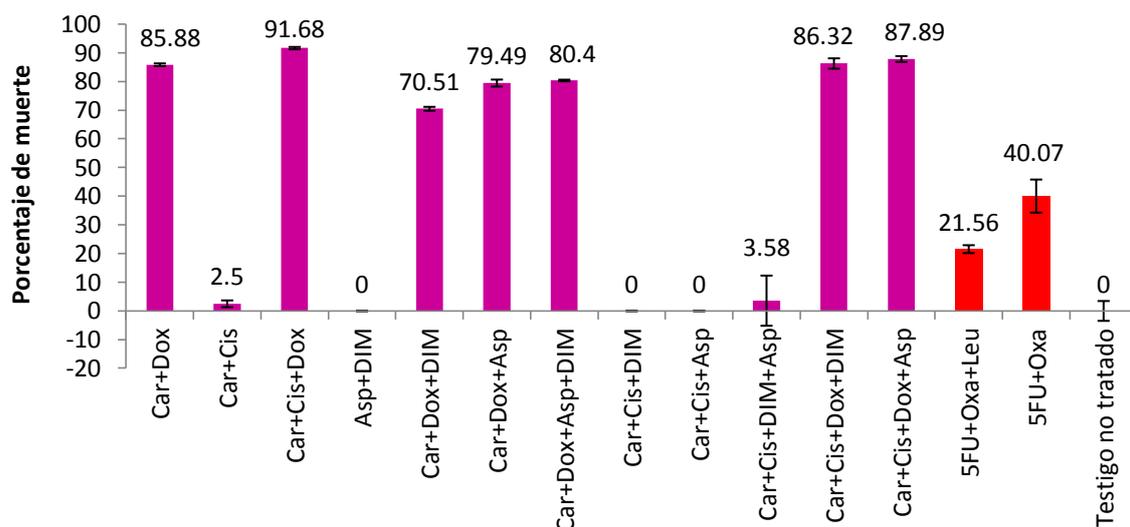
Las combinaciones que contenían 5-FU y oxaliplatino más uno o más de los nuevos fármacos propuestos, mostraron un mayor porcentaje de citotoxicidad de sobre las CMMH (45.44% a 97.49%) que la sola combinación de los estándares (21.56% y 40.07%). Entre las combinación que incluían a ambos estándares (5-FU y oxaliplatino) más uno o más fármacos experimentales, la conformada por 5-FU/oxaliplatino/cisplatino mostró la menor citotoxicidad ( $45.44 \pm 4.01\%$ ); en tanto que las combinaciones que presentaron la mayor actividad antineoplásica fueron la que estaban constituidas por 5-FU/oxaliplatino/carboplatino/doxorubicina ( $96.97 \pm 0.42\%$ ) y 5FU/oxaliplatino/carboplatino/doxorubicina/cisplatino ( $97.49 \pm 0.28\%$ ) (fig 15).



**Fig. 15** Efecto citotóxico sobre CMMH de las combinaciones compuesta por los estándares (5-FU y oxaliplatino) en combinación con uno o más de los compuestos experimentales. Las barras en magenta se encuentran las nuevas combinaciones propuestas y las barras en rojo los estándares. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.

La figura 16 muestra el efecto citotóxico de las combinaciones en donde se emplearon solamente los fármacos experimentales sobre las CMMH. Se observa que siete de las combinaciones fueron más tóxicas para las células mesenquimales (70.51% a 91.68% de muerte) en comparación los fármacos usados como estándares, que son los de primera línea (21.56% y 40.07%), dos de las combinaciones presentaron ser menos tóxicas para las CMMH (2.5% y 3.5%)

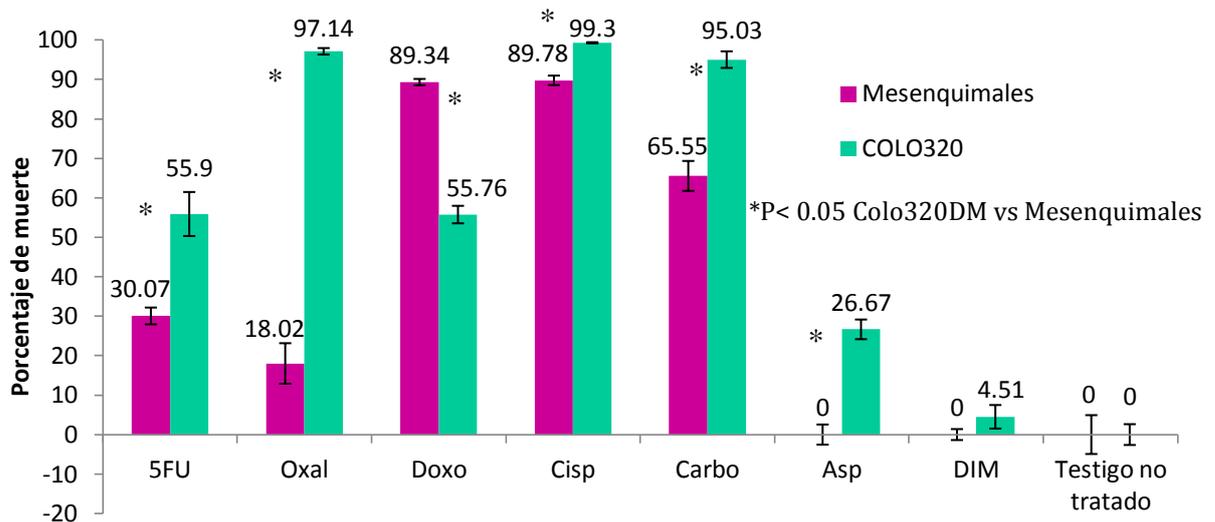
comparadas con los estándares y tres combinaciones mostraron tener una nula citotoxicidad en las CMMH.



**Fig.16.** Efecto de citotoxicidad sobre CMMH de las combinaciones que tienen solo los fármacos propuestos (carboplatino, cisplatino, doxorubicina, aspirina y DIM). Las barras en magenta se encuentran las nuevas combinaciones propuestas y las barras en rojo los estándares. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.

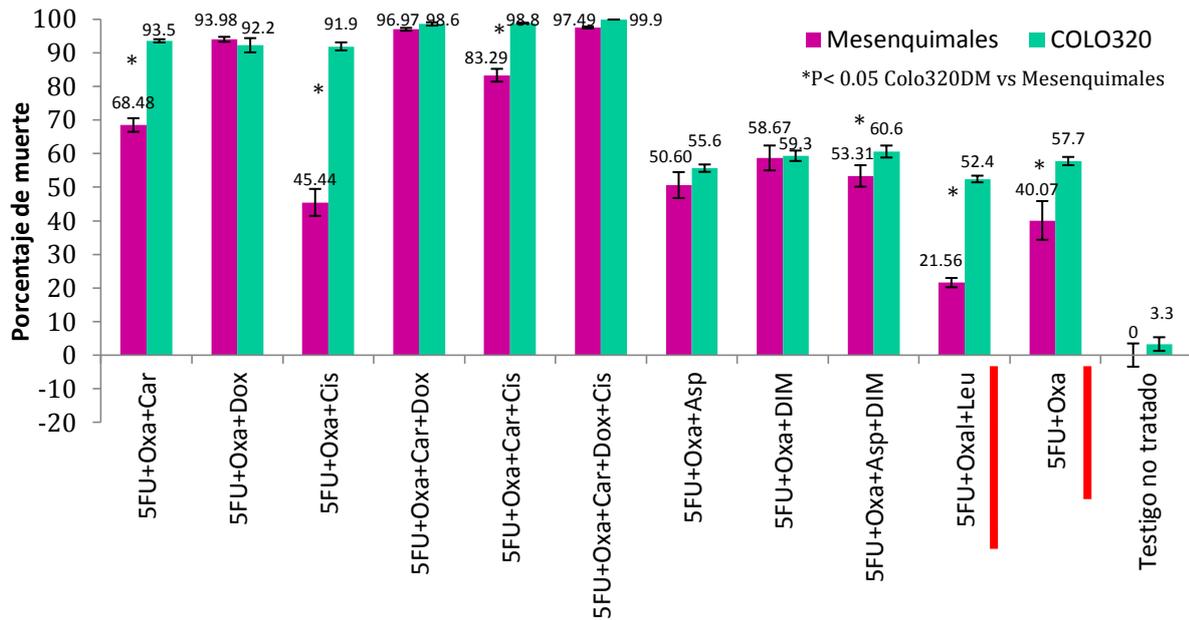
## 6.6 Comparación en la citotoxicidad de los fármacos y sus combinaciones en COLO 320DM y CMMH.

En la figura 17 se muestra la citotoxicidad de cada uno de los fármacos estándar y experimentales sobre la línea COLO 320DM y las CMMH. Puede observarse que en general COLO 320DM fue más susceptible que CMMH, exceptuando a la doxorubicina. Los estándares (5-FU y oxaliplatino) produjeron las diferencias más grandes entre la citotoxicidad sobre COLO 320DM y la citotoxicidad sobre CMMH. Sin embargo, carboplatino y cisplatino mostraron tener un efecto citotóxico mayor para la línea COLO 320 que para las CMMH. La aspirina y el DIM mostraron los menores efectos citotóxicos sobre COLO 320DM entre los siete fármacos analizados pero ninguno de estos dos compuestos mostró tener toxicidad contra las células normales (CMMH).



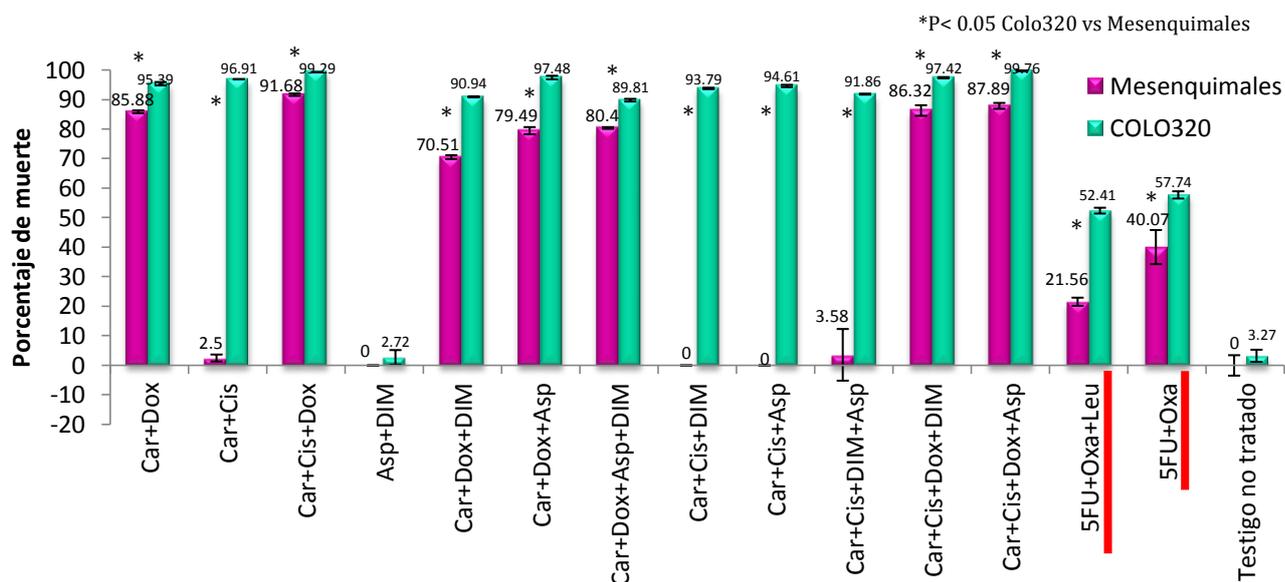
**Fig.17.** Citotoxicidad de los cinco fármacos experimentales y de los dos estándares sobre COLO 320DM (verde) y CMMH (magenta). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre la citotoxicidad de los fármacos sobre COLO 320DM y CMMH mediante un análisis de T de Student. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.

En la figura 18 se observa que seis de las combinaciones que contienen 5-FU y oxaliplatino y uno o más fármacos propuestos tienen un porcentaje de muerte similar en las células normales (CMMH) y en la línea COLO 320DM; solo la combinación 5-FU/oxaliplatino/cisplatino posee una notable diferencia entre el porcentaje de muerte de las CMMH y el efecto antineoplásico observado en la línea COLO 320DM. Esta diferencia también se pudo observar en aquellas combinaciones que se utilizan como tratamiento de primera línea para el ACCR (5-FU/oxaliplatino y 5-FU/oxaliplatino/leucovorina).



**Fig.18.** Citotoxicidad de las combinaciones que tienen como base los agentes quimioterapéuticos de primera línea y los fármacos nuevos a evaluar en las células de COLO 320DM (verde) y las CMMH (magenta). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre la citotoxicidad de los fármacos sobre COLO 320DM y CMMH mediante un análisis de T de Student. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.

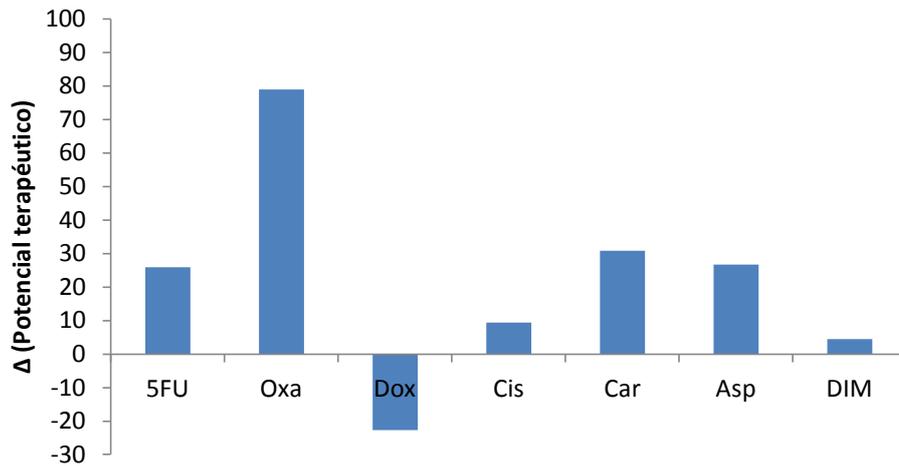
En las combinaciones conformadas únicamente por los fármacos experimentales se observaron diferencias notables entre la actividad antineoplásica y el efecto citotóxico no deseable sobre las células normales (CMMH). Las combinaciones que produjeron el efecto más notable fue carboplatino/cisplatino con un  $96.91 \pm 0.02\%$  de letalidad sobre COLO 320DM y sólo  $2.5 \pm 1.18\%$  sobre CMMH. Sin embargo cuando se incluyeron en la combinación aspirina y DIM la letalidad sobre COLO 320DM disminuyó 5% con respecto a la combinación sin aspirina o DIM y disminuyó de un 2-3% cuando la combinación tenía aspirina o DIM. Las siguientes mejores combinaciones que se observaron fueron con carboplatino/cisplatino/DIM y con carboplatino/cisplatino/aspirina, con  $93.97 \pm 0.24\%$  y  $94.61 \pm 0.39\%$  de letalidad sobre COLO 320DM y 0% de toxicidad sobre CMMH (fig.19).



**Fig.19.** Citotoxicidad de las combinaciones que solo tienen los fármacos nuevos a evaluar en las células de COLO 320DM (verde) y las CMMH (magenta). Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre la citotoxicidad de los fármacos sobre COLO 320DM y CMMH mediante un análisis de T de Student. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.

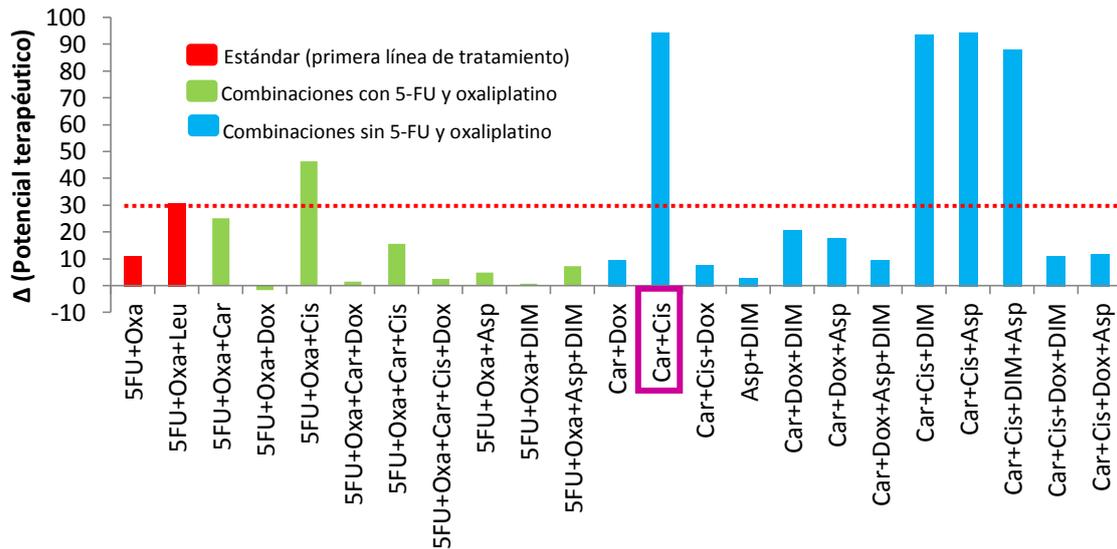
### 6.7 Determinación del potencial terapéutico de los fármacos experimentales en las líneas celulares.

La figura 20 muestra el efecto neto o potencial terapéutico deseable de los estándares y de los fármacos experimentales. Se observó que ninguno de los compuestos nuevos propuestos mostró un mayor efecto neto en comparación con los fármacos de primera línea (5-FU y oxaliplatino); incluso la doxorubicina fue más tóxica para las células normales que para las neoplásicas (razón por la que su efecto neto resultó negativo), mientras que el oxaliplatino mostró tener un efecto neto tres veces mayor que 5-FU (fig.20).



**Fig.20.** Potencial terapéutico de los fármacos estándar y de los experimentales sobre COLO 320DM y CMMH. Cada barra representa la diferencia de los promedio de tres experimentos por triplicado ( $\Delta$ ) del % de letalidad sobre COLO 320DM menos el porcentaje de letalidad sobre CMMH producidos por cada uno de los fármacos mostrados en la gráfica.

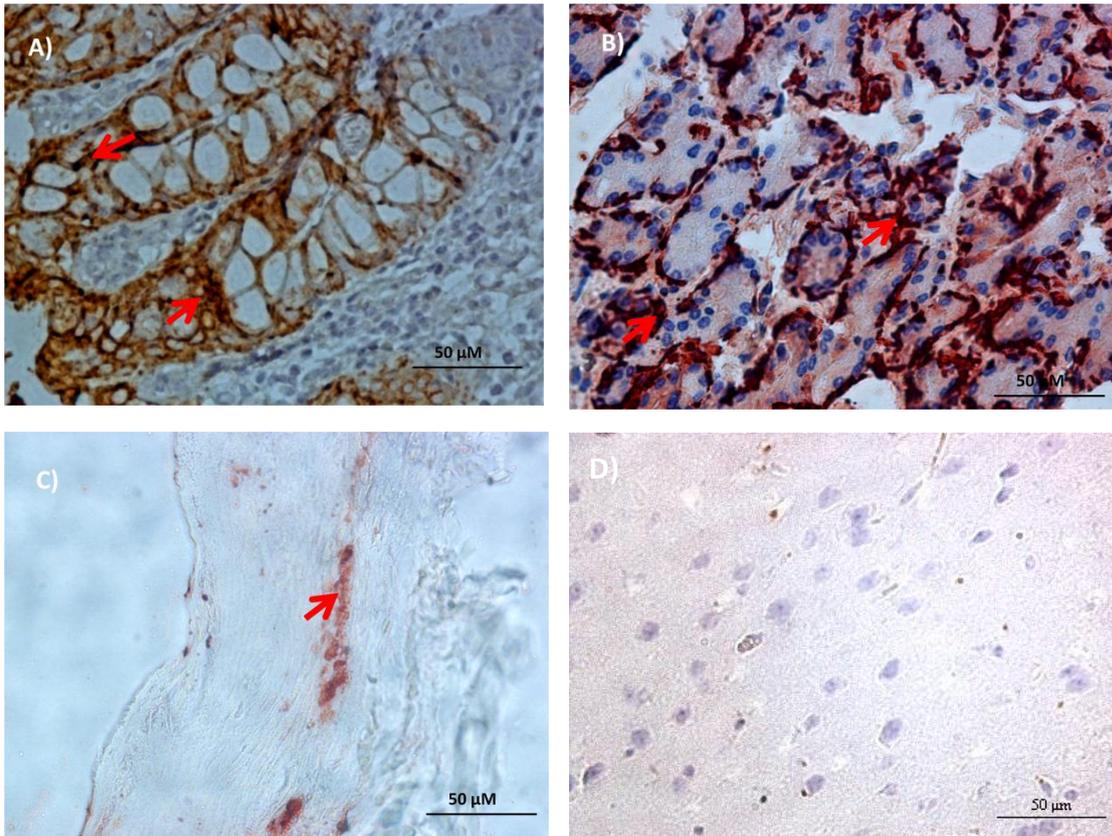
La figura 21 se muestra el efecto neto de las combinaciones conteniendo a los fármacos experimentales e incluyendo o no a los estándares. La combinación carboplatino/cisplatino fue la que mostró tener un efecto neto mayor a comparación de los estándares, siendo que en las combinaciones donde se incluyeron carboplatino/cisplatino el efecto neto deseable fue tres veces mayor que la combinación completa de estándares (5-FU/oxaliplatino/leucovorina) que es utilizada como quimioterapia estandarizada contra ACCR en el Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de la UANL. La adición de aspirina o DIM a la combinación de fármacos experimentales no incrementó el efecto deseable de carboplatino/cisplatino; adicionalmente aspirina más DIM resultó en una disminución del 10% de este efecto. Todas las demás combinaciones que incluían o no a los estándares (5FU/oxaliplatino) resultaron en un efecto neto menor que 5FU/oxaliplatino/leucovorina (*fig. 21*).



**Fig.21.** Potencial terapéutico o efecto neto de las combinaciones evaluadas en la línea de COLO 320DM y CMMH (promedios de tres experimentos por triplicado). En rojo los estándares (combinaciones utilizadas como primera línea de tratamiento para el CCR); en verde las combinaciones que tienen como base los agentes quimioterapéuticos de primera línea y los nuevos fármacos propuestos; en azul las combinaciones que solo tienen los nuevos fármacos propuestos. En el recuadro magenta la combinación que mostró un mayor potencial terapéutico para la línea COLO 320DM.

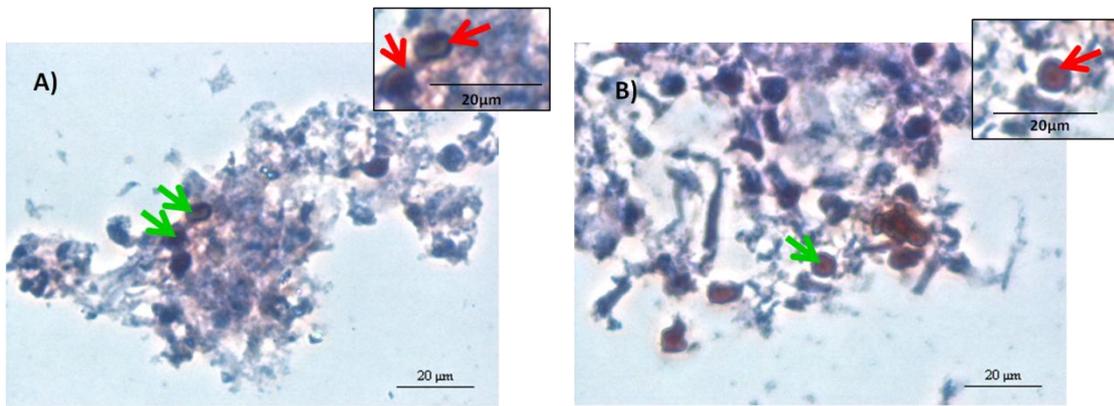
### 6.8 Caracterización inmunocitoquímica de los cultivos primarios de ACCR y colon sano.

La Figura 22 se muestran las imágenes de los testigos positivos y negativo utilizados en nuestro estudio para la caracterización inmunocitoquímica de los cultivos primarios de ACCR y de colon sano. El recuadro A muestra la positividad para citoquertina 20 en el epitelio de las criptas de Lieberkuhn del colon. El recuadro B se observa la positividad para la citoqueratina 17 en las células mioepiteliales que rodean los asinos de la glándula sublingual humana. El recuadro C muestra la positividad para el EFRGR en las células del estrato basal de la epidermis humana. El recuadro D muestra la ausencia de la positividad para CK-17, CK-20 y EFGR.



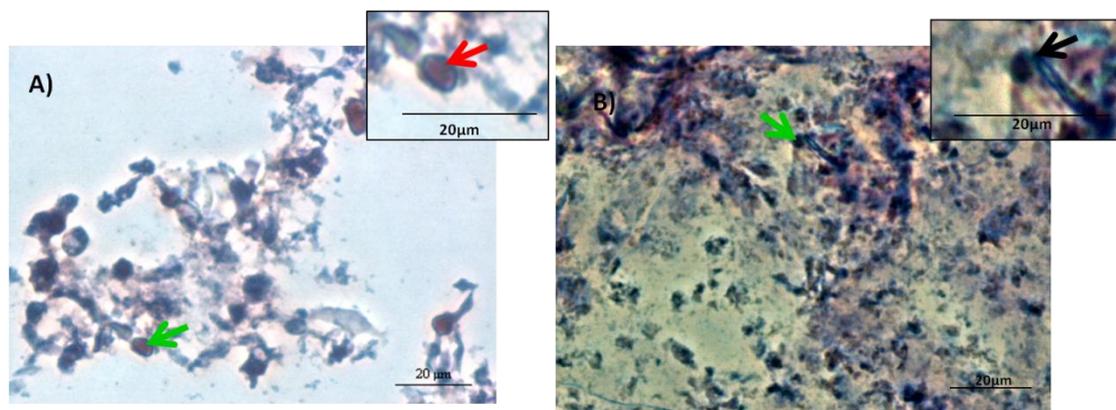
**Fig.22.** Testigos positivos y negativos para los marcadores utilizados en la caracterización de los cultivos primarios de ACCR y colon sano. (A) Reacción positiva para CK-20 en las criptas del colon humano, (B) Reacción positiva para CK-17 en las células mioepiteliales de la glándula sublingual humana, (C) Reacción positiva para EFGR en el estrato basal de la epidermis (D) ausencia de positividad para CK-20, CK-17 y EFGR en cerebro humano.

La figura 23 muestra las micrografías del aspecto de las muestras recién dispersas de los tejidos de ACCR (recuadro A) y colon sano (recuadro B). Se observan restos de tejido conectivo, detritus celulares y células intactas. Se muestra un número de células relativamente bajo debido a que nosotros no concentramos ni seleccionamos las células de ACCR. Se observan que tanto en la suspensión de los pacientes con ACCR como de la muestra de colon sano existen células positivas para la citoqueratina 20.

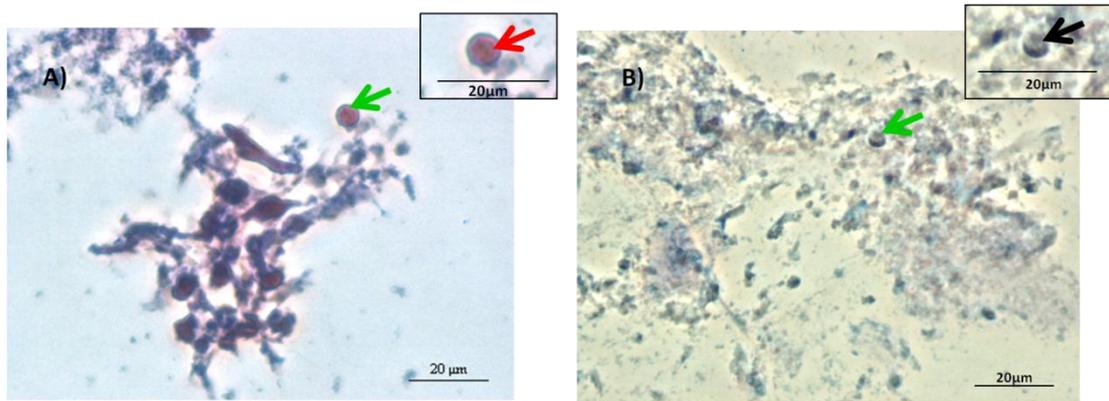


**Fig.23.** Visualización de la reacción positiva para el marcador CK-20 en las células aisladas de tejido de ACCR (A) y colon sano (B). Las flechas en verde señalan las células que fueron amplificadas en el recuadro superior derecho, las flechas rojo señalan la positividad de la reacción en célula.

Las micrografías de las figuras 24 y 25 muestran una reacción de positividad para citoqueratina 17 (*fig.24*) y EGFR (*fig.25*) en las células recién dispersadas de los tejidos de ACCR y la ausencia de la positividad en las células de colon aisladas a partir de un tejido sano.



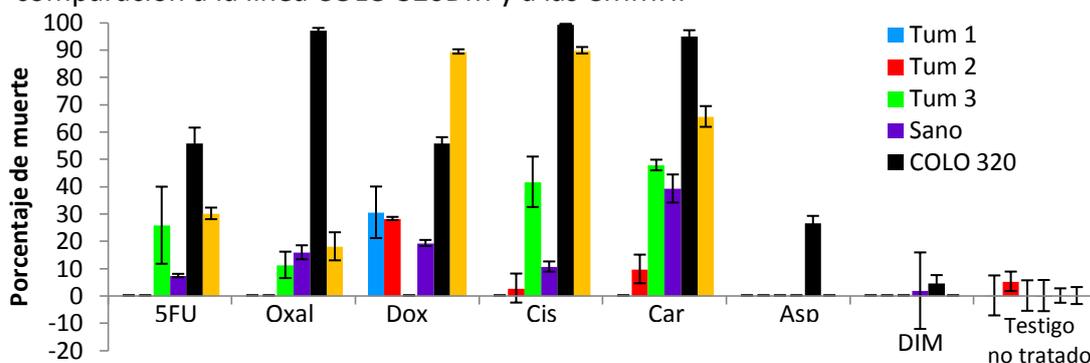
**Fig.24.** Reacción positiva (flecha rojo) para el marcador Ck-17 en las células aisladas de tejido de ACCR (A) y reacción negativa (flecha negra) para el marcador Ck-17 en colon sano (B). La flecha en verde señala la célula que fue amplificada en el recuadro superior derecho.



**Fig.25.** Reacción positiva (flecha rojo) para el marcador EFGR en las células aisladas de tejido de ACCR (A) y reacción negativa (flecha negra) para el marcador EFGR en colon sano (B). La flecha en verde señala la célula que fue ampliada en el recuadro superior derecho.

### 6.9 Citotoxicidad de los fármacos de manera individual sobre cultivos primarios de ACCR y de tejido de colon sano.

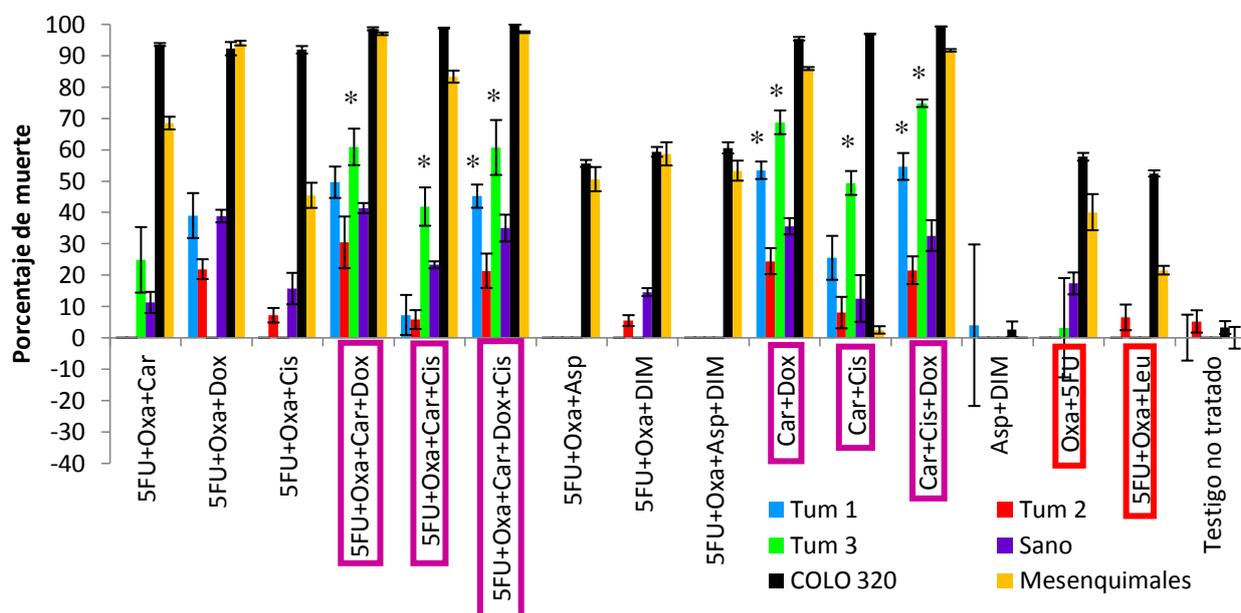
Se observó una clara heterogeneidad en la respuesta a los fármacos de los tres cultivos primarios de ACCR; se evidenció una respuesta muy pobre por parte de los cultivos primarios de ACCR a el 5-FU y oxaliplatino, desde una respuesta nula (Tumor 1 y Tumor 3) hasta un 11.22% y 25.73% de susceptibilidad (Tumor 3). El tumor 1 y 2 mostraron tener una mayor resistencia a los fármacos de manera en general teniendo la doxorubicina el mayor porcentaje de susceptibilidad (alrededor del 30% en ambos casos); mientras que el tumor 3 fue más sensible a los fármacos obteniendo una mayor susceptibilidad al efecto del cisplatino (41.63% de muerte) y carboplatino (47.77% de muerte) (fig.26). En general, fue notable la resistencia de los cultivos primarios de ACCR a los fármacos evaluados de manera individual que en comparación a la línea COLO 320DM y a las CMMH.



**Fig.26.** Efecto citotóxico con los fármacos de manera individual para las células de los cultivos primarios de CCR y tejido sano. Tumor 1(azul), Tumor 2(rojo), Tumor 3 (verde), cultivo primario de tejido sano (morado), células de la línea COLO 320DM (negro) y CMMH (amarillo). Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.

## 6.10 Citotoxicidad de las combinaciones de los fármacos sobre cultivos primarios de ACCR y de tejido de colon sano.

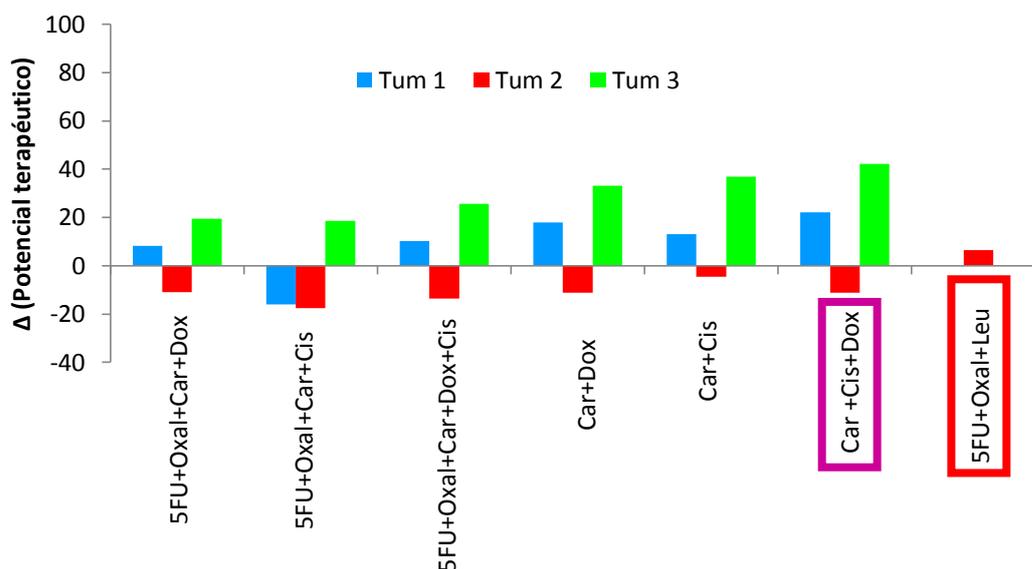
Los cultivos primarios de ACCR volvieron a mostrar una respuesta heterogénea con las combinaciones de los fármacos; siendo los cultivos primarios de ACCR resistentes a las combinaciones de fármacos que se utiliza de manera prescrita para los pacientes con ACCR (5-FU/oxaliplatino/leucovorina) en el Hospital Universitario de la Facultad de Medicina de la UANL, solo el tumor 2 mostró un 8% de muerte celular con esta combinación. Para las combinaciones nuevas propuestas que tienen los agentes quimioterapéuticos de primera línea (5-FU y oxaliplatino), se observó que todas las células tumorales de los diferentes cultivos fueron sensibles a tres de estas combinaciones y para las combinaciones que solo tienen los nuevos fármacos propuestos se observó que las células tumorales fueron sensibles a tres de estas combinaciones (*fig.27*). En general, el tumor 2 fue el más resistente a todos las combinaciones y el tumor #3 fue el más sensible.



**Fig.27.** Efecto de citotoxicidad de las combinaciones de los fármacos sobre las células de los cultivos primarios de ACCR y tejido sano. Tumor 1 (azul), Tumor 2 (rojo), Tumor 3 (verde), cultivo primario de tejido sano (morado), células de la línea COLO 320DM (negro) y CMMH (amarillo). Combinaciones a las que mostraron sensibilidad la células tumorales enmarcadas en recuadro magenta. Combinaciones utilizadas como estándares para el tratamiento de CCR enmarcadas en recuadro rojo. Los asteriscos indican diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ) entre la citotoxicidad de los fármacos sobre cultivos primarios ACCR y tejido sano mediante un análisis de T de Student. Las barras representan los promedios  $\pm$  error estándar de tres experimentos por triplicado.

### 6.11 Determinación del potencial terapéutico de los fármacos experimentales en los cultivos primarios de ACCR y colon sano.

Se observó que la combinación de carboplatino/cisplatino/doxorubicina presentó un mayor efecto neto o potencial terapéutico para los cultivos primarios de dos de los tres diferentes tumores, en comparación a las demás combinaciones que habían presentado un efecto citotóxico en las células tumorales aisladas a partir de tejidos con ACCR (fig.28).



**Fig.28.** Potencial terapéutico de las combinaciones evaluadas que presentaron tener citotoxicidad en todos los cultivos primarios de CCR. En azul, rojo y verde los cultivos primarios de CCR, en morado los cultivos primarios de colon sano. En recuadro en magenta, la combinación que mostró tener un mayor potencial terapéutico en el tratamiento del CCR y en el recuadro rojo la combinación utilizada como tratamiento de primera línea para el CCR.

## CAPÍTULO VII

### DISCUSIÓN

#### 7.1 Razonamientos sobre la estrategia empleada.

En este trabajo hemos utilizado como base para nuestro estudio al método ATP-CRA [55-56], con varias adecuaciones que consideramos fundamentales, a la luz de los conocimientos actuales sobre la biología celular y molecular del cáncer colorrectal y de la terapia celular.

El ATP-CRA es un método sensible, específico, rápido, semi-mecanizado y sobre todo, requiere muy pocas células para obtener resultados confiables. Por lo tanto, elegimos al ATP-CRA para poner a prueba nuestras ideas, que son innovadoras en el campo de la quimioterapia para el cáncer colorrectal, cuyo éxito ha sentado las bases para aplicarse en otros tipos de cáncer con alta morbi-mortalidad, como son el cáncer de mama [99] y el cérvico-uterino [61, 100]. Estas ideas son las siguientes: 1) evaluar *ex vivo* fármacos que ya han sido aprobados por las instituciones sanitarias mexicanas, estadounidenses o europeas y que están a disposición de médicos y enfermos para el tratamiento de diversos tipos de cáncer, pero que no forman parte del armamentario utilizado contra el cáncer colorrectal; 2) analizar el efecto de los fármacos experimentales en los ensayos *ex vivo*, por separado y combinados con los fármacos de primera línea (considerados aquí como estándares), porque usualmente se evalúan los fármacos por separado [56, 60] y consideramos que esto es un error, porque de esta forma se ignora las interacciones entre fármacos [101]; 3) utilizar líneas celulares transformadas, por su relativa homogeneidad fenotípica, lo cual nos permitió desarrollar y adecuar al ATP-CRA para nuestros fines; pero también cotejar los resultados obtenidos con cultivos primarios de ACCR (análisis *ex vivo*), lo cual está mucho más cerca de lo que ocurre *in vivo* y en un futuro cercano podrá extrapolarse inmediatamente al enfermo, ofreciéndole una terapia personalizada, basada en la evidencia de los resultados del laboratorio.

La hipótesis que sustenta esta última modificación se basa en que es bien conocido que las células que acompañan en el tumor a las transformadas, ayudan a las células cancerosas a desarrollarse ya defenderse de los fármacos anticancerosos

[102] y no sería de extrañar que también el estroma juegue un papel importante en el comportamiento agresivo, expansivo y defensivo del tumor. En los tejidos normales el estroma juega un rol fundamental en la biología de órganos y tejidos [103]. Por lo tanto, no se eliminó de los cultivos primarios de ACCR ni células ni el estroma, como lo hacen otros grupos [60]. 4) cotejar los resultados citotoxicidad de los fármacos y sus combinaciones que se obtuvieron con la línea de COLO 320DM y con los cultivos primarios de ACCR, evaluados con una línea de células normales y con un cultivo primario de tejido normal de colon. 5) utilizar en los bioensayos como células normales una línea de células madre mesenquimales—que se obtuvo y caracterizó específicamente para realizar este trabajo—.

Las razones que se tuvieron para utilizar CMMH fueron las siguientes: i) son virtualmente inmortales [104], lo que nos permitió utilizar múltiples resiembras, a diferencia de los cultivos primarios de monocitos que también suelen utilizarse para evaluar fármacos, 2) son normales y 3) son humanas. Las dos últimas características nos permitieron obtener resultados más fácilmente extrapolables a lo que sucede *in vivo* que cuando se utilizan líneas de células transformadas.

## **7.2 Caracterización por inmunocitoquímica de CMMH, cultivos primarios de ACCR y colon sano.**

La proteína de superficie CD-105 se expresa característicamente en la superficie de las CMMH de tejido graso [105-106] y también en las venas centrales del hígado pero no en yeyuno humano [107-109]. Nosotros, utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD-105 de ratón, observamos claramente los marcadores mencionados en hígado y en nuestra línea de CMMH, pero no en yeyuno, lo que valida plenamente los resultados de inmunocitoquímica y nos permite afirmar que nuestra línea de CMMH está formada mayoritariamente por células mesenquimales.

Por otro lado, citoqueratina 20 se expresa normalmente en células epiteliales [71, 74, 76], citoqueratina 17 lo hace normalmente en la glándula sublingual humana [110-111], y EGFR se observa normalmente en epidermis [112-113]. Los tres marcadores se expresan e incluso se sobre-expresan en células epiteliales

cancerosas de ACCR; sin embargo CK-17 y EGFR no se expresan en colon sano [71, 74, 76, 88, 93-94] y ninguno de los tres marcadores se encuentran en cerebro [107-113]. Encontrándonos lo anteriormente mencionado en nuestras preparaciones; lo cual nos permite afirmar que, efectivamente, realizamos nuestros ensayos con cultivos primarios de colon sano y de ACCR.

### **7.3 Correlaciones de nuestros hallazgos sobre resistencia y sensibilidad a los fármacos analizados y con otros reportes.**

Se han hecho múltiples estudios en donde diversas líneas de células cancerosas se exponen a diferentes fármacos para determinar la disminución del porcentaje de viabilidad celular; y así evaluar la eficacia antineoplásica de esos compuestos. Faivre et al. (1999) determinaron una  $DI_{50}$  de 4.6  $\mu\text{M}$  para el oxaliplatino y de 8.6  $\mu\text{M}$  para el cisplatino sobre COLO 320. Sin embargo, las  $DI_{50}$  en nuestro estudio fueron considerablemente menores (1.04  $\mu\text{M}$  y 1.145  $\mu\text{M}$ , respectivamente). Estas diferencias podrían deberse al tiempo de exposición de las células (48 h, en este estudio en vez de las 24 h, en el de Faivre *et al.*).

En cuanto a 5FU, la  $DI_{50}$  reportada es de 10.4  $\mu\text{M}$  para COLO 320DM, usando el método de MTT [114]; mientras que nosotros determinamos en este estudio una  $DI_{50}$  de 67.60  $\mu\text{M}$  para la misma línea celular, pero utilizando el ATP-CRA. Estas diferencias pudieron deberse a los métodos utilizados para determinar la viabilidad celular; ya que ATP-CRA es mucho más sensible que el método de reducción de MTT.

La  $DI_{50}$  de doxorrubicina sobre COLO 320 que determinamos en el presente trabajo (1.9  $\mu\text{M}$ ) fue similar a la reportada para otras líneas de ACCR (HT-29 y LoVo (1.5  $\mu\text{M}$  y 1.3  $\mu\text{M}$ , respectivamente) [115].

Se encontró que la aspirina, a una concentración de 2.5 mM produjo 20% de muerte celular sobre COLO 320DM; en tanto que la misma concentración de este medicamento indujo apoptosis a sólo el 8.92% de cultivos de la línea SW480 [116]. Entonces, el mayor efecto antineoplásico de aspirina sobre COLO 320DM pudo deberse a diferencias en el genéticas de una y otra línea celular. La heterogeneidad

genética entre líneas celulares de la misma estirpe e incluso dentro de la misma línea es bien conocida [117].

Lerner *et al.* (2012) reportaron una disminución en la viabilidad de COLO 320DM cuando las células se expusieron por 72 h a concentraciones de 10 a 100  $\mu\text{M}$  de DIM. Sin embargo, a la concentración máxima que se alcanza el DIM en plasma (2.5 nM [Reed *et al.*, 2006]), no observamos ningún efecto citotóxico a las 48 h sobre COLO 320DM. De nuevo, estas diferencias pueden explicarse a que en el estudio realizado por Lerner *et al.* en el 2012 sobrepasan la concentración real alcanzada en plasma por el DIM.

Se ha reportado que las CMMH de tejido adiposo son más sensibles al 5-FU que a la doxorrubicina [118]. Sin embargo, nuestros cultivos de CMMH de tejido adiposo fueron mucho más sensibles a la doxorrubicina que al 5-FU. Esta diferencia pudo haberse debido al método empleado para el conteo de la viabilidad (reducción de sales de tetrazolium) y a que la cantidad de células inoculadas en la placa fue menor (1,000 por pozo) en la publicación previa que la que nosotros usamos (20,000 por pozo) más alguna o algunas de las causas ya comentadas.

Por otra parte, se sabe que la aspirina inhibe el crecimiento de las células madre mesenquimales e induce apoptosis por la vía Wnt/ $\beta$ -catenina [119-120]. Sin embargo, no observamos toxicidad de la aspirina sobre nuestras CMMH; estas diferencias pudieron haberse debido al método de análisis empleado. Los autores del reporte arriba citado utilizaron el método de reducción de MTT y una menor cantidad de células por pozo (1,000); así como el origen de las células; porque estos autores usaron células madre mesenquimales de médula ósea de ratón y nosotros usamos CMM humanas de tejido graso.

#### **7.4 Eficacia antineoplásica de las combinaciones de fármacos evaluadas en este trabajo.**

Entre las combinaciones de fármacos que evaluamos sobre COLO 320DM, carboplatino/cisplatino, carboplatino/cisplatino/DIM, carboplatino/cisplatino/aspirina y carboplatino/cisplatino/aspirina/DIM presentaron 60% más eficacia

antineoplásica que los fármacos empleados como estándares (5-FU/oxaliplatino/leucovorina). Sin embargo, la presencia de DIM o de aspirina no incrementó la eficacia de la combinación de carboplatino/cisplatino; siendo esta combinación la más eficaz contra COLO 320DM.

Con respecto a los cultivos primarios de ACCR, la eficacia terapéutica se debió a la combinación carboplatino/doxorubicina/cisplatino; ya que ni el 5-FU ni el oxaliplatino contribuyeron en incremento de la eficacia antineoplásica de las combinaciones donde estos fármacos formaron parte.

En cuanto a la nula respuesta observada al tratamiento de primera línea por parte de los cultivos primarios de CCR, se ha publicado que la respuesta de los pacientes al tratamiento FOLFOX (5-FU/ácido folínico/oxaliplatino) es aproximadamente de un 20-50%. [121]. La resistencia de células de ACCR a 5FU está asociada a altos niveles de expresión de la enzima timidilato sintasa que es la enzima blanco del 5FU [121], ya activado. Es decir, convertido en 5-fluoro-2'-desoxiuridin-5'-monofosfato (FdUMP), el 5FU es una pro-droga que debe ser previamente metabolizada[122].

En un estudio realizado por Huh *et al.* (2009) se evaluó por el método de ATP-CRA la quimiosensibilidad de las células tumorales aisladas a partir de CCR, observándose que el 5-FU no obtuvo el mayor porcentaje de quimiosensibilidad; lo cual es similar a los resultados mostrados en este estudio, ya que, solo un tumor fue sensible a este agente quimioterapéutico; mientras que dos tumores mostraron tener sensibilidad a la doxorubicina (agente quimioterapéutico de manera individual). En este mismo artículo, el grupo de investigadores reportan una gran heterogeneidad en la respuesta de los tumores estudiados a los fármacos, siendo similar al comportamiento que nosotros observamos en los cultivos primarios de ACCR.

La resistencia a compuestos que contienen platino en su estructura está asociada a la expresión de ERCC1, que es una proteína de reparación de DNA por escisión [121]. Entonces, la resistencia a oxaliplatino podría deberse a una mutación en ERCC1, pero es necesario caracterizar genéticamente a las células de nuestros cultivos primarios para conocer con certeza la causa de la resistencia que

observamos en el presente trabajo; sobre todo, en las células del paciente # 2, que fueron resistentes en grado variable a todas las combinaciones probadas, incluyendo las que no contenían 5FU u oxaliplatino. Dado que, en este caso, se trata de una multiresistencia, las células del ACCR de este paciente podrían tener sobre-expresadas las bombas MDR que usualmente son responsables de este fenotipo, en las células cancerosas [123].

El tamaño de muestra de cultivos primarios que utilizamos en este trabajo aún es muy pequeño, y deberá ser aumentado. Sin embargo los resultados que hemos obtenido hasta ahora, ratifican la gran heterogeneidad que existe entre los diferentes cultivos primarios de ACCR en cuanto a sensibilidad de fármacos para el tratamiento estandarizado de ACCR, pero exhibiendo una mucho mayor resistencia que las línea celular COLO 320DM, demostrándose sin lugar a dudas, que existen buenas alternativas para el tratamiento de ACCR resistente a los medicamentos de primera línea y que no sólo vale la pena, sino que es mandatorio realizar estudios personalizados, para detectar resistencia a los medicamentos de primera línea y diseñar tratamientos eficaces, siendo posible su aplicación en el Hospital Universitario de la UANL y extenderlo al IMSS y otras instituciones, con las adecuaciones que nosotros hechas en este trabajo al ATP-CRA.

Con los datos obtenidos hasta ahora permiten proponer al Comité de Ética de la Facultad de Medicina de la UANL un estudio conmisericordioso que incluya la detección de pacientes resistentes al tratamiento quimioterapéutico estandarizado y el ensayo clínico de la combinación carboplatino/cisplatino/doxorubicina en pacientes cuyos cultivos primarios muestren sensibilidad a esta nueva combinación de fármacos anti-ACCR.

El método de evaluación *ex vivo* ATP-CRA que se ha implementado en nuestro Departamento y que se ha adecuado para un mejor uso clínico, considerando los avances en materia de biología celular y molecular del ACCR permitirá también continuar la búsqueda de nuevos medicamentos anti-neoplásicos, evaluando las combinaciones encontradas más efectivas junto con el irinotecán [60], para ver si hay sinergia en los cultivos primarios de ACCR; ya que no se ha

conseguido todavía la combinación ideal que mate selectivamente a las células tumorales, pero hemos iniciado el camino y estamos orientados en esa dirección.

## **CAPÍTULO VIII**

### **CONCLUSIONES**

Los resultados obtenidos en el presente trabajo confirman la hipótesis propuesta, ya que se identificaron agentes quimioterapéuticos que son utilizados para el tratamiento de cáncer no colorrectal, que mostraron un mayor potencial terapéutico que los fármacos de primera línea mediante el método de ATP-CRA.

La combinación cisplatino/carboplatino mostró un efecto anti-neoplásico tres veces mayor sobre COLO 320DM que el esquema terapéutico estandarizado.

Los cultivos primarios de ACCR evaluados mostraron una alta variabilidad en la respuesta a las distintas combinaciones probadas; siendo todos los cultivos primarios resistentes al tratamiento de primera línea.

La combinación carboplatino/cisplatino/doxorubicina mostró la mayor eficacia terapéutica contra cultivos primarios de ACCR que 5FU/oxaliplatino/leucovorina.

El DIM y la aspirina, por separado no poseen un efecto antineoplásico contra los cultivos primarios de ACCR y aparentemente no potencian a los otros medicamentos anti-neoplásicos.

Las células de los cultivos primarios de los tumores fueron menos sensibles a los fármacos individuales o sus combinaciones que COLO 320DM.

## **CAPÍTULO IX**

### **PERSPECTIVAS**

Utilizar la combinación carboplatino/cisplatino/doxorubicina para conducir ensayos clínicos conmisericordiosos.

Continuar la búsqueda y desarrollo de nuevos fármacos, utilizando el ATP-CRA, no sólo contra CCR, sino contra otros tipos de cáncer con alto impacto social y económico.

Realizar ensayos de terapia personalizada en la respuesta a los agentes quimioterapéuticos.

## CAPÍTULO X

### BIBLIOGRAFÍA

1. Tanaka, T., M. Tanaka, and R. Ishigamori, *Biomarkers for colorectal cancer*. Int J Mol Sci, 2010. **11**(9): p. 3209-25.
2. Vinageras-Barroso, J., *Cáncer de colon*. Cáncer de colon. Rev Gastroenterol Mex 2008. **73**(suppl 1): p. 96-99.
3. Belmontes-Montes, C. and C. Cosme-Reyes, *Tratamiento del cáncer de colon y seguimiento*. Rev Gastroenterol Mex, 2007. **72**: p. 122-125.
4. Rossi, H. and D.A. Rothenberger, *Surgical treatment of colon cancer*. Surg Oncol Clin N Am, 2006. **15**(1): p. 109-27, vii.
5. Yantiss, R.K., et al., *Clinical, pathologic, and molecular features of early-onset colorectal carcinoma*. Am J Surg Pathol, 2009. **33**(4): p. 572-82.
6. Isbister, W.H. and J. Fraser, *Large-bowel cancer in the young: a national survival study*. Dis Colon Rectum, 1990. **33**(5): p. 363-6.
7. Cappell, M.S., *The pathophysiology, clinical presentation, and diagnosis of colon cancer and adenomatous polyps*. Med Clin North Am, 2005. **89**(1): p. 1-42, vii.
8. Failli, A., et al., *The challenge of culturing human colorectal tumor cells: establishment of a cell culture model by the comparison of different methodological approaches*. Tumori, 2009. **95**(3): p. 343-7.
9. Lui, C. and J.M. Crawford, *Tracto gastrointestinal*, in *Patología estructural y funcional de Robbis y Cotran*, V. Kumar, A.K. Abbas, and N. Fausto, Editors. 2006, Elsevier: Genova, España. p. 832-874.
10. Levison, D., *El sistema gastrointestinal*, in *Patología de Muir*, D. Levison, et al., Editors. 2009, McGraw-Hill: DF. México. p. 221-259.
11. AmericanCancerSociety. (2011). "*Colorectal Cancer*." Disponible en el sitio de red: <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003096-pdf.pdf> [Revisado el 1 de agosto 2011].
12. Reid, R. and D.J. Harrison, *Cáncer y Tumores Benignos*, in *Patología de Muir*, D. Levison, et al., Editors. 2009, McGraw-Hill: DF. México. p. 77-101.
13. Chao, C., et al., *Gastrointestinal hormone receptors in primary human colorectal carcinomas*. J Surg Res, 2005. **129**(2): p. 313-21.
14. Giordano, T., *Morphologic and molecular classification of human cancer*, in *Cancer epidemiology and prevention*, D. Schottenfeld and J.F. Fraumeni, Editors. 2006, Oxford University Press: New York. p. 10-20.
15. Stewart, S.L., et al., *A population-based study of colorectal cancer histology in the United States, 1998-2001*. Cancer, 2006. **107**(5): p. 1128-1141.
16. Deans, G.T., et al., *Colorectal carcinoma: importance of clinical and pathological factors in survival*. Ann R Coll Surg Engl, 1994. **76**(1): p. 59-64.
17. Belov, L., J. Zhou, and R.I. Christopherson, *Cell surface markers in colorectal cancer prognosis*. Int J Mol Sci, 2010. **12**(1): p. 78-113.
18. Astler, V.B. and F.A. Coller, *The prognostic significance of direct extension of carcinoma of the colon and rectum*. Ann Surg, 1954. **139**(6): p. 846-52.
19. Yancik, R., et al., *Comorbidity and age as predictors of risk for early mortality of male and female colon carcinoma patients - A population-based study*. Cancer, 1998. **82**(11): p. 2123-2134.
20. AmericanCancerSociety. (2011). "*Cancer facts & figures*." Disponible en el sitio de red: <http://www.cancer.org/Research/CancerFactsFigures/CancerFactsFigures/cancer-facts-figures-2011> [Revisado el 1 de agosto 2011].
21. Habermann, J.K., et al., *From the genome to the proteome--biomarkers in colorectal cancer*. Langenbecks Arch Surg, 2008. **393**(1): p. 93-104.

22. Yang, S.Y., et al., *Inducing apoptosis of human colon cancer cells by an IGF-I D domain analogue peptide*. *Molecular Cancer*, 2008. **7**.
23. ArandaAguilar, E., *Tratamiento del cáncer de colon estadios II, III y IV*. *Oncología (Brac.)*, 2004. **27**(4): p. 258-261.
24. Boland, C.R., et al., *Colorectal cancer prevention and treatment*. *Gastroenterology*, 2000. **118**(2 Suppl 1): p. S115-28.
25. Diaz-Plasencia, J., et al., [*Colorectal cancer: its clinical picture and survival*]. *Rev Gastroenterol Peru*, 1996. **16**(1): p. 48-56.
26. Hurwitz, H., et al., *Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer*. *N Engl J Med*, 2004. **350**(23): p. 2335-42.
27. Simmonds, P.C., *Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis*. *Colorectal Cancer Collaborative Group*. *BMJ*, 2000. **321**(7260): p. 531-5.
28. Xu, R., et al., *Enhancement of paclitaxel-induced apoptosis by inhibition of mitogen-activated protein kinase pathway in colon cancer cells*. *Anticancer Res*, 2009. **29**(1): p. 261-70.
29. Fujie, Y., et al., *Oxaliplatin, a potent inhibitor of survivin, enhances paclitaxel-induced apoptosis and mitotic catastrophe in colon cancer cells*. *Jpn J Clin Oncol*, 2005. **35**(8): p. 453-63.
30. Fuchs, C., E.P. Mitchell, and P.M. Hoff, *Irinotecan in the treatment of colorectal cancer*. *Cancer Treat Rev*, 2006. **32**(7): p. 491-503.
31. O'Connell, M.J., *Oxaliplatin or irinotecan as adjuvant therapy for colon cancer: the results are in*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(19): p. 3082-4.
32. Alliot, C., *Capecitabine and mitomycin C in patients with metastatic colorectal cancer resistant to fluorouracil and irinotecan*. *Br J Cancer*, 2006. **94**(6): p. 935-6; author reply 937.
33. Vahdat, L., *Ixabepilone: a novel antineoplastic agent with low susceptibility to multiple tumor resistance mechanisms*. *Oncologist*, 2008. **13**(3): p. 214-21.
34. Shacham-Shmueli, E., et al., *Response to temozolomide in patients with metastatic colorectal cancer with loss of MGMT expression: a new approach in the era of personalized medicine?* *J Clin Oncol*, 2011. **29**(10): p. e262-5.
35. Tardito, S. and L. Marchio, *Copper compounds in anticancer strategies*. *Curr Med Chem*, 2009. **16**(11): p. 1325-48.
36. Sasaki, J., et al., *The anthelmintic drug mebendazole induces mitotic arrest and apoptosis by depolymerizing tubulin in non-small cell lung cancer cells*. *Mol Cancer Ther*, 2002. **1**(13): p. 1201-9.
37. Langley, R.E., et al., *Aspirin and cancer: has aspirin been overlooked as an adjuvant therapy?* *Br J Cancer*, 2011. **105**(8): p. 1107-13.
38. Sarkar, F.H., et al., *Cellular signaling perturbation by natural products*. *Cell Signal*, 2009. **21**(11): p. 1541-7.
39. Orido, T., et al., *Indomethacin decreases arachidonic acid uptake in HCA-7 human colon cancer cells*. *J Pharmacol Sci*, 2008. **108**(3): p. 389-92.
40. Choi, H.J., Y. Lim do, and J.H. Park, *Induction of G1 and G2/M cell cycle arrests by the dietary compound 3,3'-diindolylmethane in HT-29 human colon cancer cells*. *BMC Gastroenterol*, 2009. **9**: p. 39.
41. Kim, E.J., et al., *Activation of caspase-8 contributes to 3,3'-Diindolylmethane-induced apoptosis in colon cancer cells*. *J Nutr*, 2007. **137**(1): p. 31-6.
42. Bhatnagar, N., et al., *3,3'-diindolylmethane enhances the efficacy of butyrate in colon cancer prevention through down-regulation of survivin*. *Cancer Prev Res (Phila)*, 2009. **2**(6): p. 581-9.
43. Lerner, A., et al., *The Indolic Diet-Derivative, 3,3'-Diindolylmethane, Induced Apoptosis in Human Colon Cancer Cells through Upregulation of NDRG1*. *J Biomed Biotechnol*, 2012. **2012**: p. 256178.

44. Curtin, N.J., A.L. Harris, and G.W. Aherne, *Mechanism of cell death following thymidylate synthase inhibition: 2'-deoxyuridine-5'-triphosphate accumulation, DNA damage, and growth inhibition following exposure to CB3717 and dipyridamole*. *Cancer Res*, 1991. **51**(9): p. 2346-52.
45. Solomayer, E.F., et al., *Influence of adjuvant hormone therapy and chemotherapy on the immune system analysed in the bone marrow of patients with breast cancer*. *Clin Cancer Res*, 2003. **9**(1): p. 174-80.
46. Haynes, N.M., et al., *Immunogenic anti-cancer chemotherapy as an emerging concept*. *Curr Opin Immunol*, 2008. **20**(5): p. 545-57.
47. Lake, R.A. and R.G. van der Most, *A better way for a cancer cell to die*. *N Engl J Med*, 2006. **354**(23): p. 2503-4.
48. Masur, H., et al., *CD4 counts as predictors of opportunistic pneumonias in human immunodeficiency virus (HIV) infection*. *Ann Intern Med*, 1989. **111**(3): p. 223-31.
49. Kasper, C.E., *Sarcolemmal disruption in reloaded atrophic skeletal muscle*. *J Appl Physiol*, 1995. **79**(2): p. 607-14.
50. Cleeland, C.S., *The impact of pain on the patient with cancer*. *Cancer*, 1984. **54**(11 Suppl): p. 2635-41.
51. Berger, A.M., *Patterns of fatigue and activity and rest during adjuvant breast cancer chemotherapy*. *Oncol Nurs Forum*, 1998. **25**(1): p. 51-62.
52. Bruera, E., *ABC of palliative care. Anorexia, cachexia, and nutrition*. *BMJ*, 1997. **315**(7117): p. 1219-22.
53. Kasper, C.E. and L.P. Sarna, *Influence of adjuvant chemotherapy on skeletal muscle and fatigue in women with breast cancer*. *Biol Res Nurs*, 2000. **2**(2): p. 133-9.
54. Dallas, N.A., et al., *Chemoresistant colorectal cancer cells, the cancer stem cell phenotype, and increased sensitivity to insulin-like growth factor-I receptor inhibition*. *Cancer Res*, 2009. **69**(5): p. 1951-7.
55. Moon, Y.W., et al., *Adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay (ATP-CRA)-guided platinum-based 2-drug chemotherapy for unresectable nonsmall-cell lung cancer*. *Cancer*, 2007. **109**(9): p. 1829-35.
56. Park, S., et al., *In vitro adenosine triphosphate based chemotherapy response assay in gastric cancer*. *J Gastric Cancer*, 2010. **10**(4): p. 155-61.
57. Kim, H.A., et al., *The use of an in vitro adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay to predict chemotherapeutic response in breast cancer*. *Breast*, 2008. **17**(1): p. 19-26.
58. Sevin, B.U., et al., *Application of an ATP-bioluminescence assay in human tumor chemosensitivity testing*. *Gynecol Oncol*, 1988. **31**(1): p. 191-204.
59. Nguyen, H.N., et al., *The use of ATP bioluminescence assays in selecting a drug screen panel for chemosensitivity testing of uterine cancer cell lines*. *Gynecol Oncol*, 1992. **45**(2): p. 185-91.
60. Huh, J.W., et al., *Heterogeneity of adenosine triphosphate-based chemotherapy response assay in colorectal cancer--secondary publication*. *Yonsei Med J*, 2009. **50**(5): p. 697-703.
61. Konecny, G., et al., *Correlation of drug response with the ATP tumorchemosensitivity assay in primary FIGO stage III ovarian cancer*. *Gynecol Oncol*, 2000. **77**(2): p. 258-63.
62. Zhu, J., L. Ma, and Y. Cheng, *ATP-bioluminescence assay indicates the treatment of recurrent non-small cell lung cancer combined with malignant pleural effusion*. *The Chinese-German Journal of Clinical Oncology*, 2010. **9**(8): p. 441-443.
63. Neale, M.H., et al., *Comparison of the ex vivo chemosensitivity of uveal and cutaneous melanoma*. *Melanoma Res*, 2001. **11**(6): p. 601-9.
64. Dawson, T.P., et al., *The MTS vs. the ATP assay for in vitro chemosensitivity testing of primary glioma tumour culture*. *Neuropathol Appl Neurobiol*, 2010. **36**(6): p. 564-7.

65. Lehnhardt, M., et al., *Feasibility of chemosensitivity testing in soft tissue sarcomas*. World J Surg Oncol, 2005. **3**(1): p. 20.
66. Kawamura, H., et al., *The usefulness of the ATP assay with serum-free culture for chemosensitivity testing of gastrointestinal cancer*. Eur J Cancer, 1997. **33**(6): p. 960-6.
67. Cohen, S.J., et al., *Isolation and characterization of circulating tumor cells in patients with metastatic colorectal cancer*. Clin Colorectal Cancer, 2006. **6**(2): p. 125-32.
68. Iinuma, H., et al., *Detection of tumor cells in blood using CD45 magnetic cell separation followed by nested mutant allele-specific amplification of p53 and K-ras genes in patients with colorectal cancer*. Int J Cancer, 2000. **89**(4): p. 337-44.
69. Marrinucci, D., et al., *Circulating tumor cells from well-differentiated lung adenocarcinoma retain cytomorphic features of primary tumor type*. Arch Pathol Lab Med, 2009. **133**(9): p. 1468-71.
70. Roig, A.I., et al., *Immortalized epithelial cells derived from human colon biopsies express stem cell markers and differentiate in vitro*. Gastroenterology, 2010. **138**(3): p. 1012-21 e1-5.
71. Seidelin, J.B., T. Horn, and O.H. Nielsen, *Simple and efficient method for isolation and cultivation of endoscopically obtained human colonocytes*. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003. **285**(6): p. G1122-8.
72. Dennis, J.L., et al., *Markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin: development of a diagnostic algorithm*. Clin Cancer Res, 2005. **11**(10): p. 3766-72.
73. Kende, A.I., N.J. Carr, and L.H. Sobin, *Expression of cytokeratins 7 and 20 in carcinomas of the gastrointestinal tract*. Histopathology, 2003. **42**(2): p. 137-40.
74. Lassmann, S., et al., *Quantification of CK20 gene and protein expression in colorectal cancer by RT-PCR and immunohistochemistry reveals inter- and intratumour heterogeneity*. J Pathol, 2002. **198**(2): p. 198-206.
75. Park, S.Y., et al., *Expression of cytokeratins 7 and 20 in primary carcinomas of the stomach and colorectum and their value in the differential diagnosis of metastatic carcinomas to the ovary*. Hum Pathol, 2002. **33**(11): p. 1078-85.
76. Wildi, S., et al., *Characterization of cytokeratin 20 expression in pancreatic and colorectal cancer*. Clin Cancer Res, 1999. **5**(10): p. 2840-7.
77. Johnstone, C.N., et al., *Analysis of the regulation of the A33 antigen gene reveals intestine-specific mechanisms of gene expression*. J Biol Chem, 2002. **277**(37): p. 34531-9.
78. Ackerman, M.E., et al., *A33 antigen displays persistent surface expression*. Cancer Immunol Immunother, 2008. **57**(7): p. 1017-27.
79. Sakamoto, J., et al., *Organ-specific expression of the intestinal epithelium-related antigen A33, a cell surface target for antibody-based imaging and treatment in gastrointestinal cancer*. Cancer Chemother Pharmacol, 2000. **46 Suppl**: p. S27-32.
80. Heath, J.K., et al., *The human A33 antigen is a transmembrane glycoprotein and a novel member of the immunoglobulin superfamily*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1997. **94**(2): p. 469-474.
81. Sarbia, M., et al., *Differentiation between pancreaticobiliary and upper gastrointestinal adenocarcinomas: is analysis of cytokeratin 17 expression helpful?* Am J Clin Pathol, 2007. **128**(2): p. 255-9.
82. Solassol, J., et al., *Pemphigus vulgaris antigen mRNA quantification for the staging of sentinel lymph nodes in head and neck cancer*. Br J Cancer, 2010. **102**(1): p. 181-7.
83. Toyoshima, T., et al., *Expression of cytokeratin 17 mRNA in oral squamous cell carcinoma cells obtained by brush biopsy: preliminary results*. J Oral Pathol Med, 2009. **38**(6): p. 530-4.

84. Thike, A.A., et al., *Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer*. *Mod Pathol*, 2010. **23**(1): p. 123-33.
85. Liu, Z.B., et al., *Basal cytokeratin expression in relation to immunohistochemical and clinical characterization in breast cancer patients with triple negative phenotype*. *Tumori*, 2009. **95**(1): p. 53-62.
86. Potemski, P., et al., *Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer*. *Oncology*, 2005. **69**(6): p. 478-85.
87. He, X., et al., *Differentiation of a highly tumorigenic basal cell compartment in urothelial carcinoma*. *Stem Cells*, 2009. **27**(7): p. 1487-95.
88. Kim, C.Y., et al., *Proteomic analysis reveals overexpression of moesin and cytokeratin*. *Oncol Rep*, 2011.
89. Krasinskas, A.M., *EGFR Signaling in Colorectal Carcinoma*. *Patholog Res Int*, 2011. **2011**: p. 932932.
90. Spano, J.P., et al., *Epidermal growth factor receptor signaling in colorectal cancer: preclinical data and therapeutic perspectives*. *Ann Oncol*, 2005. **16**(2): p. 189-94.
91. Vallbohmer, D. and H.J. Lenz, *Epidermal growth factor receptor as a target for chemotherapy*. *Clin Colorectal Cancer*, 2005. **5 Suppl 1**: p. S19-27.
92. Cunningham, M.P., et al., *Coexpression, prognostic significance and predictive value of EGFR, EGFRvIII and phosphorylated EGFR in colorectal cancer*. *Int J Oncol*, 2005. **27**(2): p. 317-25.
93. Metzger, B., et al., *The human epidermal growth factor receptor (EGFR) gene in European patients with advanced colorectal cancer harbors infrequent mutations in its tyrosine kinase domain*. *BMC Med Genet*, 2011. **12**: p. 144.
94. Oh, B.Y., et al., *Epidermal growth factor receptor mutations in colorectal cancer patients*. *J Korean Soc Coloproctol*, 2011. **27**(3): p. 127-32.
95. McKay, J.A., et al., *Evaluation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in colorectal tumours and lymph node metastases*. *Eur J Cancer*, 2002. **38**(17): p. 2258-64.
96. Resnick, M.B., et al., *Epidermal growth factor receptor, c-MET, beta-catenin, and p53 expression as prognostic indicators in stage II colon cancer: a tissue microarray study*. *Clin Cancer Res*, 2004. **10**(9): p. 3069-75.
97. Goldstein, N.S. and M. Armin, *Epidermal growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV colon adenocarcinoma: implications for a standardized scoring system*. *Cancer*, 2001. **92**(5): p. 1331-46.
98. Schrör, K., *Distribution*, in *Acetylsalicylic Acid*, Wiley-Blackwell, Editor. 2009, Wiley-VCH: Federal Republic of Germany. p. 41.
99. Koo, J.S., W. Jung, and J. Jeong, *The predictive role of E-cadherin and androgen receptor on in vitro chemosensitivity in triple-negative breast Cancer*. *Jpn J Clin Oncol*, 2009. **39**(9): p. 560-8.
100. Sharma, S., et al., *Outcome of ATP-based tumor chemosensitivity assay directed chemotherapy in heavily pre-treated recurrent ovarian carcinoma*. *BMC Cancer*, 2003. **3**: p. 19.
101. Nannizzi, S., et al., *Cellular and molecular mechanisms for the synergistic cytotoxicity elicited by oxaliplatin and pemetrexed in colon cancer cell lines*. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2010. **66**(3): p. 547-58.
102. Castells, M., et al., *Implication of tumor microenvironment in chemoresistance: tumor-associated stromal cells protect tumor cells from cell death*. *Int J Mol Sci*, 2012. **13**(8): p. 9545-71.
103. Yamashita, Y.M., *Cell adhesion in regulation of asymmetric stem cell division*. *Curr Opin Cell Biol*, 2010. **22**(5): p. 605-10.

104. Burdon, T.J., et al., *Bone marrow stem cell derived paracrine factors for regenerative medicine: current perspectives and therapeutic potential*. Bone Marrow Res, 2011. **2011**: p. 207326.
105. Lindroos, B., R. Suuronen, and S. Miettinen, *The potential of adipose stem cells in regenerative medicine*. Stem Cell Rev, 2011. **7**(2): p. 269-91.
106. Musina, R.A., E.S. Bekchanova, and G.T. Sukhikh, *Comparison of mesenchymal stem cells obtained from different human tissues*. Bull Exp Biol Med, 2005. **139**(4): p. 504-9.
107. Letarte M, e.a., *CD105 (endoglin) cluster report*. In Schlossman SF, et al (eds). *Leucocyte Typing V White Cell Differentiation Antigens*. Oxford University Press (Oxford), 1995. **1756**.
108. Gougos, A. and M. Letarte, *Identification of a human endothelial cell antigen with monoclonal antibody 44G4 produced against a pre-B leukemic cell line*. J Immunol, 1988. **141**(6): p. 1925-33.
109. Bühring HJ, M.C., Letarte M, Gougos A, Saalmüller A, van Agthoven AJ, Busch FW., *Endoglin is expressed on a subpopulation of immature erythroid cells of normal human bone marrow*. Leukemia, 1991. **5**(10): p. 841-7.
110. Troyanovsky, S.M., et al., *Patterns of expression of keratin 17 in human epithelia: dependency on cell position*. J Cell Sci, 1989. **93 ( Pt 3)**: p. 419-26.
111. Smedts, F., et al., *Basal-cell keratins in cervical reserve cells and a comparison to their expression in cervical intraepithelial neoplasia*. Am J Pathol, 1992. **140**(3): p. 601-12.
112. Gusterson, B., et al., *Cellular localisation of human epidermal growth factor receptor*. Cell Biol Int Rep, 1984. **8**(8): p. 649-58.
113. Damjanov, I., B. Mildner, and B.B. Knowles, *Immunohistochemical localization of the epidermal growth factor receptor in normal human tissues*. Lab Invest, 1986. **55**(5): p. 588-92.
114. van Geelen, C.M., et al., *Differential modulation of the TRAIL receptors and the CD95 receptor in colon carcinoma cell lines*. Br J Cancer, 2003. **89**(2): p. 363-73.
115. Beaumont, P.O., et al., *Role of glutathione S-transferases in the resistance of human colon cancer cell lines to doxorubicin*. Cancer Res, 1998. **58**(5): p. 947-55.
116. Lai, M.Y., et al., *Mechanisms underlying aspirin-mediated growth inhibition and apoptosis induction of cyclooxygenase-2 negative colon cancer cell line SW480*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(26): p. 4227-33.
117. Peyton, H., *The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need?* BioTechniques, 2008. **45** (1): p. 11.
118. Qi, Z., et al., *Mesenchymal stem cells derived from different origins have unique sensitivities to different chemotherapeutic agents*. Cell Biol Int, 2012.
119. Wang, Y., et al., *Growth inhibition of mesenchymal stem cells by aspirin: involvement of the WNT/beta-catenin signal pathway*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2006. **33**(8): p. 696-701.
120. Deng, L., et al., *Aspirin induces apoptosis in mesenchymal stem cells requiring Wnt/beta-catenin pathway*. Cell Prolif, 2009. **42**(6): p. 721-30.
121. Kumamoto, K., et al., *Thymidylate synthase and thymidine phosphorylase mRNA expression in primary lesions using laser capture microdissection is useful for prediction of the efficacy of FOLFOX treatment in colorectal cancer patients with liver metastasis*. Oncol Lett, 2012. **3**(5): p. 983-989.
122. Showalter, S.L., et al., *Evaluating the drug-target relationship between thymidylate synthase expression and tumor response to 5-fluorouracil. Is it time to move forward?* Cancer Biol Ther, 2008. **7**(7): p. 986-94.
123. Sánchez -Suárez, B.-B., *Procesos Biomoleculares de la Resistencia a Drogas*. Cancerología, 2006. **1**: p. 187-199.

## CAPÍTULO XI

### ANEXOS

#### 10.1 Origen de material, reactivos y equipos utilizados.

##### 10.1.1 Material.

- Tubos de 15mL estériles con tapón de rosca. CORNING®-Corning Incorporated, Corning, NY, USA.
- Tubos de 50mL estériles con tapón de rosca. CORNING®-Corning Incorporated, Corning, NY, USA.
- Botellas de cultivo de 35cm<sup>2</sup> con tapón de rosca. CORNING®-Corning Incorporated, Corning, NY, USA.
- botellas de cultivo de 75cm<sup>2</sup> con tapón de rosca. CORNING®-Corning Incorporated, Corning, NY, USA.
- Placas de 96 pozos de ultra baja adherencia transparentes con fondo redondo. COSTAR®-Corning Incorporated, Corning, NY, USA.
- Cámaras de cultivo Chamber Slide. LAB-TEK®-Naglen Nunc International, Naperville, IL, USA.
- Placas de de 96 pozos blancas para luminiscencia con fondo plano. Thermo Scientific-ThermoFisher Scientific, Vantaa, Finland.

##### 10.1.2 Reactivos.

###### Cultivo celular

- $\alpha$ -MEM. GIBCO®/INVITROGEN™, Grand Island, NY, USA.
- Anfotericina B (Fungizone) 2.5mg/mL. GIBCO®/INVITROGEN™, Grand Island, NY, USA.
- Azul tripán. SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA.
- Colagenasa tipo I de Clostridium Histollyticum 215,000 unidades/mg. GIBCO®/INVITROGEN™, Grand Island, NY, USA.
- Etanol absolute. EMSURE™/Merk, Darmstadt, Alemania.
- Dimetilsulfóxido. SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA.
- Gentamicina 10mg/mL. GIBCO®/INVITROGEN™, Grand Island, NY, USA.
- IMDM. GIBCO®/INVITROGEN™, Grand Island, NY, USA.
- RPMI. GIBCO®/INVITROGEN™, Grand Island, NY, USA.
- Suero fetal bovino. GIBCO®/INVITROGEN™, Grand Island, NY, USA.
- Tripsina 0.25% con EDTA (1X) . GIBCO®/INVITROGEN™, Grand Island, NY, USA.

###### Inmunocitoquímicas

- Anticuerpo monoclonar de ratón [EPR1622Y] anti-citoqueratina 20. ABCAM®, Cambridge, MA, USA.

- Anticuerpo monoclonar de ratón [CK-E3] anti-citoqueratina 17 ABCAM®, Cambridge, MA, USA.
- Anticuerpo monoclonar de ratón [F4] anti- EGFR ABCAM®, Cambridge, MA, USA.
- Sistema de detección EnVision™. Dako, Carpinteria, CA, USA.

#### Fármacos evaluados

- 3-3'-diindolimetano. SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA.
- 5-FU 250mg/5mL Lote EE041A Caducidad Mayo 2013. TEVA- Lemery, S.A. de C.V.,D.F., México.
- 5-FU 250mg/5mL Lote KE079A Caducidad Noviembre 2013. TEVA- Lemery, S.A. de C.V.,D.F., México.
- aspirina . SIGMA-ALDRICH, St. Louis, MO, USA.
- carboplatino 150mg/15mL Lote 19373 Caducidad Marzo 2014. ASTROFARMA de México, D.F., México.
- cisplatino 10mg/10mL Lote CE006B Caducidad Marzo 2013. TEVA- Lemery, S.A. de C.V.,D.F., México.
- cisplatino 10mg/10mL Lote CE006C Caducidad Marzo 2013. TEVA- Lemery, S.A. de C.V.,D.F., México.
- doxorubicina 10mg/5mL Lote AE060B Caducidad Enero 2013. TEVA- Lemery, S.A. de C.V.,D.F., México.
- doxorubicina 10mg/5mL Lote IE056B Caducidad Septiembre 2013. TEVA- Lemery, S.A. de C.V.,D.F., México.
- oxaliplatino 50mg/10mL Lote 191177 Caducidad Septiembre 2013. ASTROFARMA de México, D.F., México.

#### ATP-CRA

- CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay. Promega Corporation, Madison,WI, USA.

#### 10.1.3 Equipos.

- Centrifuga Dynac™ Modelo: 420101. Becton Dickinson Primary Core Diagnostics, Sparks, MD, USA.
- Campana de flujo laminar clase II Modelo 36212-04. Labconco Corporation Kansas, Missouri, USA.
- Lector de microplaca luminómetro Veritas Modelo Veritas 9100-102. Turner BioSystems-Conquer Scientific, San Diego, CA, USA.
- Incubadora con inyector de CO<sub>2</sub> y humedad Modelo 2310. VMR International-Sheldon Manufacturing Cornelius,OR, USA.

## 10.2. Preparación de soluciones.

### -α-MEM suplementado-

- \*Gentamicina (10mg/mL).....250μL (concentración final 50μg/mL)
- \*Anfotericina B (2.5mg/mL).....100μL (concentración final 50μg/mL)
- \*SFB.....9mL
- \*Medio α-MEM.....45mL

### -Azul tripán-

- \*Azul tripán.....0.4 g
- \*PBS.....100 mL

A partir de la solución de se toman 16μL azul tripán 0.4% y se mezcla con 4μL de la suspensión celular a contar. Se depositan en la cámara de Nevower 10μL y se cuentan los 4 cuadrantes de la cámara, contabilizando las células vivas que son las refringentes (transparentes) y las células muertas son las oscuras (azules) para determinar el porcentaje de viabilidad y la cuenta de células vivas por mL aplicando la siguiente formula.

$$\left[ \begin{array}{c} \text{Promedio de las células} \\ \text{vivas de cuadrantes} \end{array} \right] \left[ \begin{array}{c} \text{Factor de dilución de la} \\ \text{suspensión celular} \end{array} \right] \left[ 5 \right] = \quad \times 10^4 \text{ células/mL}$$

### -Colagenasa tipo 1-

- \*Colagenasa tipo I.....40 mg
- \*PBS (sin antibióticos y antimicótico).....20 mL

Mezclar la colagenasa con el PBS y agitarla hasta disolver todos los grumos para posteriormente esterilizarla mediante filtración y adicionar antibiótico y antimicótico.

- \*Gentamicina (10mg/mL).....100μL (concentración final 50μg/mL)
- \*Anfotericina B (2.5mg/mL).....20μL (concentración final 2.5μg/mL)

### -Etanol al 70%-

- \*Etanol absoluto grado molecular.....70 mL
- \*Agua Mili Q.....aforar a 100 mL

Mezclar ambas soluciones por inversión para asegurar la homogenización de la muestra.

-IMDM suplementado-

- \*Gentamicina (10mg/mL).....250µL (concentración final 50µg/mL)
- \*Anfotericina B (2.5mg/mL).....50µL (concentración final 2.5µg/mL)
- \*SFB.....4.5mL
- \*Medio IMDM.....45mL

-Medio de disgregación de tejido adiposo-

- \*α-Mem.....20 mL
- \*Albumina sérica bovina.....0.6 gr

Mezclar por agitación hasta disolver todos los grumos el medio de cultivo y albumina sérica bovina, para posteriormente esterilizarla mediante filtración y adicionar antibiótico y antimicótico.

- \*Gentamicina (10mg/mL).....100µL (concentración final 50µg/mL)
- \*Anfotericina B (2.5mg/mL).....20µL (concentración final 2.5µg/mL)

IMPORTANTE A ESTE MEDIO DE CULTIVO NO SE LE DEBE SUPLEMENTAR CON SUERO FETAL BOVINO.

-Medio de disgregación de tejido colorrectal-

- \*RPMI.....20 mL
- \*Gentamicina (10mg/mL).....100µL (concentración final 50µg/mL)
- \*Anfotericina B (2.5mg/mL).....20µL (concentración final 2.5µg/mL)

IMPORTANTE A ESTE MEDIO DE CULTIVO NO SE LE DEBE SUPLEMENTAR CON SUERO FETAL BOVINO.

-Metanol-Acetona fijador-

Se realiza una mezcla 1:1 de metanol y acetona absolutos. Se preserva en refrigeración para evitar evaporación.

-PBS 1X-

\*Cloruro de Potasio.....0.106 gr

\*Fosfato de Potasio.....0.102 gr

\*Cloruro de Sodio.....4.09 gr

\*Fosfato de Sodio.....0.798 gr

Ajustar el pH a 7.4 y aforar a 500mL con agua MiliQ para esterilizar por autoclave.

-PBS 1X con antibiótico y antimicótico-

\*Gentamicina (10mg/mL).....250µL (concentración final 50µg/mL)

\*Anfotericina B (2.5mg/mL)..... 50µL (concentración final 2.5µg/mL)

\*PBS 1X.....50mL

-RPMI suplementado-

\*Gentamicina (10mg/mL).....250µL (concentración final 50µg/mL)

\*Anfotericina B (2.5mg/mL).....50µL (concentración final 2.5µg/mL)

\*SFB.....4.5mL

\*Medio RPMI.....45mL

## **Martha S. Rodríguez González**

### **LUGAR DE NACIMIENTO:**

- Monterrey, Nuevo León

### **ESTUDIOS REALIZADOS**

- Licenciatura en Químico Bacteriólogo Parasitólogo, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León.

### **PREMIOS Y DISTINCIONES**

- Participación en “VII Verano de la Investigación Científica y Tecnológica de la UNAL”, período del 27 de Junio al 29 de Julio del 2005.
- Participación en el Programa de Búsqueda y Desarrollo de Talentos a Nivel Superior de la Universidad Autónoma de Nuevo León, Noviembre del 2003.
- Participación en “V Verano de la Investigación Científica y Tecnológica de la UANL”, período del 30 de Junio al 1 de Agosto del 2003.

### **TESIS DESARROLLADAS**

- “Estandarización y Validación de Protocolos para la Extracción y Manipulación de Ácidos Nucleicos para el Establecimiento de un Banco de Tumores”. Unidad de Virología y Cáncer del Departamento de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Enero 2006 a Febrero 2008. (Tesis Licenciatura).

### **EXPERIENCIA PROFESIONAL**

- Análisis Microbiológico en el Laboratorio de Servicios a la Industria. Facultad de Ingeniería y Arquitectura, Universidad Regiomontana. Noviembre 2007 a Junio 2010.
- Programa de Desarrollos de Procesos Biotecnológicos en Microbiología Industrial del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Agosto del 2004 a Marzo del 2005. (Servicio Social).