

**UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA  
FACULTAD DE VETERINARIA**

**Evaluación de un fármaco con actividad antitumoral, utilizando el modelo de  
melanoma murino**

**Por**

**SANTANA FERNANDEZ Alvaro**



**TESIS DE GRADO** presentada como  
uno de los requisitos para obtener el  
título de Doctor en Ciencias  
Veterinarias.  
(Orientación Producción Animal)

**MODALIDAD Ensayo Experimental**

TG 154  
Evaluación



**MONTEVIDEO  
URUGUAY  
2009**

Hoja de aprobaciones

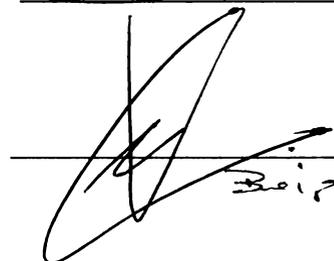
Presidente de mesa: Dr. José Pedro Pacheco.

Firma:



Segundo miembro (Tutor): Dr. Martin Breijo

Firma:



Tercer miembro: Dr. Uruguaysito Benavidez

Firma:

\_\_\_\_\_

Co- Tutor:

Dr. Rodrigo Puentes

Firma:

\_\_\_\_\_

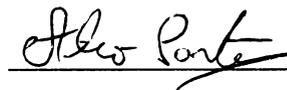
Fecha:

22, 12, 2009

Autor:

Br. Alvaro Santana

Firma:



FACULTAD DE VETERINARIA,

Aprobado con 12 (doce) ~~10~~

Agradecimientos.

A mi familia: por su apoyo incondicional y su cariño irrestricto, motor de esta tesis y motivo de mi existencia.

A mi tutor y co-tutor: Por sus enseñanzas, paciencia y comprensión.

A la Asociación de Estudiantes de Veterinaria: por ser parte fundamental de esta etapa de mi vida y fuente de entrañables compañeros.

Al equipo de Bovinos y Nutrición: por ayudarme a recorrer el tramo final de este camino y ser mis compañeros de ruta en viaje venidero.

Al personal de Unidad para Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE) y el laboratorio de Inmunología Facultad de Veterinaria: sin los cuales no se hubiera podido desarrollar este trabajo.

Tabla de contenido	
INDICE DE FIGURAS .....	3
INDICE DE TABLAS.....	3
1) RESUMEN.....	4
SUMMARY .....	5
2) INTRODUCCIÓN. ....	6
3) REVISIÓN BIBLIOGRAFICA. ....	8
3.1) Impacto del cáncer en la salud humana y animal.....	8
3.2) Bases patológicas del proceso neoplásicos y su clasificación.....	9
3.3) Diagnostico y herramientas terapéuticas del cáncer.....	11
3.3.1) Quimioterapia. ....	13
3.3.2) Terapia radiante. ....	18
3.3.3) Modificadores de la respuesta biológica .....	21
3.3.4) Terapias complementarias y alternativas. ....	21
3.3.4.1) Homeopatía.....	22
3.3.4.2) Fitoterapia.....	22
3.3.5) Homeopático Activador Natural del Sistema Inmune (HANSI).....	23
3.4) Modulación de la respuesta inmune contra tumores. ....	24
3.5) Los modelos murinos en el desarrollo de anti cancerígenos.....	27
4) OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.....	29
4.1) Objetivo General.....	29
4.2) Objetivos Específicos. ....	29
5) MATERIALES Y METODOS.....	29
5.1) Modelo de melanoma murino subcutáneo. ....	29
5.2) Reactivos .....	29
5.3) Animales e instalaciones. ....	29
5.4) Diseño experimental.....	30
5.5) Determinaciones.....	30
5.6) Análisis estadísticos. ....	31
6) RESULTADOS .....	32
6.1) Evolución del peso corporal.....	32
6.2) Evolución tumoral.....	32
6.2.1) Tiempo libre de tumor.....	32

6.2.2) Volumen tumoral.....	33
6.3) Tiempo de sobrevida de los animales. ....	35
7) DISCUSIÓN .....	36
7.1) Comportamiento del modelo de melanoma murino. ....	36
7.2) Evaluación de la terapia HANSI sobre el desarrollo de melanomas murinos. ....	37
7.2.1) Evolución tumoral .....	37
7.2.2) Tiempo de sobrevida de los animales.....	39
8) CNCLUSIONES.....	40
9) BIBLIOGRAFIA.....	41
10) ANEXOS.....	45
Anexo 1 Estadificación clínica de tumores de la cavidad bucal.....	45
Anexo 2 Tablas de conversión de Kg a superficie corporal en m <sup>2</sup> .....	46
Anexo 3 Tablas de toxicidades asociadas a algunas drogas antineoplásicas. ....	47
Anexo 4 Tabla de sustancias empleadas como modificadores de la respuesta biológica.	49
Anexo 5: Tabla antígenos de rechazo tumoral. ....	50
Anexo 6: Cronograma de actividades.....	50
Anexo 7: Sistema de identificación de animales. ....	51
Anexo 8. Planilla de evolución Tumoral. ....	51
Anexo 9: Protocolo de necropsia.....	52
Anexo 10. Análisis estadístico de la frecuencia de aparición de los tumores. ....	53
Anexo 11. Análisis estadístico de la evolución de la masa tumoral.....	54
Anexo 12. Comparación estadística de la sobrevida de los animales. ....	55
Anexo 13. Resumen del protocolo de expansión celular y preparado del inóculo celular. .....	56

## INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Peso para cada tratamiento. Media y su error estándar por tratamiento.....	32
Figura 2. Porcentaje de animales libres de tumor para cada día de observación .....	33
Figura 3 Sumatoria de los volúmenes tumorales individuales por tratamiento para cada observación, asumiendo para aquellos animales fallecidos un volumen igual al ultimo registrado. ....	34
Figura 4. Volumen tumoral medio, desvío estandar por tratamiento y diferencia porcentual tomada como el porcentaje que representa la diferencia entre ambos grupos en el valor del grupo control ( $((GC - GT) * 100) / GC$ ), para cada observación. ....	34
Figura 5. Estimación por grupo de la sobrevivencia en el modelo de Kaplan – Meier, (grupo = 0 es grupo control “GC” y el grupo = 1 es grupo tratado “GT”). ....	35

## INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Distribución temporal de las muertes por eutanasia según el grupo.....	35
Tabla 2. Parámetros reportados y obtenidos para grupos controles sin tratamiento. ....	36
Tabla 3 Tiempo medio de vida (Tomada de Laboratorio IFFA CREDO). ....	39

## 1) RESUMEN y SUMMARY

El cáncer es en la actualidad uno de los principales problemas de salud pública en el mundo y se estima que en los próximos 10 años morirán unos 84 millones de personas, si no se mejoran las estrategias terapéuticas existentes. Para la búsqueda de nuevas terapias antitumorales es necesario el uso de metodologías que permitan una evaluación primaria de la potencialidad de las mismas. El modelo de melanoma murino, basado en la inoculación subcutánea de células tumorales B16F1 a ratones de la cepa C57BL/6J, ha sido utilizado para estudios en inmunología básica y en la evaluación de vacunas anti – tumorales en fase experimental. En el presente trabajo se estudió el efecto de un producto descrito como Homeopático Activador Natural del Sistema Inmunitario [HANSI] sobre el desarrollo de melanomas murinos. Para ello dos grupos de 25 ratones cada uno fueron inoculados con células B16F1 y recibieron un tratamiento con HANSI (grupo tratado = GT) y con su excipiente (grupo control =GC) respectivamente. Se evaluaron la evolución de peso corporal, tiempo de aparición de los tumores post inoculación, el volumen tumoral y el tiempo de sobrevida para ambos grupos. Entre los días 11 y 17 post inoculación, el 100% de los animales de ambos grupos desarrollaron tumores. Al día 11 el 60% de los ratones del grupo control y el 40% del grupo tratado presentaban tumores palpables. Los tiempos medios de aparición de los tumores en ambos grupos fueron de  $12,08 \pm 1,68$  para el GC y  $12,88 \pm 2,10$  d para el grupo GT ( $p= 0.194$ ). La media de las masas tumorales de ambos grupos comparadas a los días 18, 26 y 31 post inoculación tumoral no mostraron diferencias significativas ( $p=0,92$   $p=0,16$  y  $p=0,29$  respectivamente). La sobrevida media de los individuos de cada grupo, fue de  $29,76 \pm 6,95$  d para el GC y  $31,08 \pm 8,14$  d para el grupo GT ( $p=0,57$ ), perteneciendo las últimas 3 muertes a individuos del grupo tratado. En el presente trabajo se discute el desempeño del modelo de melanoma murino como herramienta de evaluación primaria de productos anti tumorales y los resultados obtenidos con la aplicación de la terapia HANSI.

## SUMMARY

Cancer is currently a major public health problems in the world and it is estimated that within the next 10 years will die some 84 million people, if not improve existing therapeutic strategies. To search for new anticancer therapies require the use of methodologies for primary evaluation of the potential of them. The murine melanoma model, based on subcutaneous inoculation of B16F1 tumor cells into mice of the C57BL/6J strain has been used for studies in basic immunology and vaccine evaluation in anti - tumor in the experimental stage. In this paper we studied the effect of a product described as Natural Homeopathic Immune System Activator [Hansi] on the development of murine melanomas. To this end two groups of 25 mice each were inoculated with B16F1 cells and were treated with Hansi (treated group = GT) and its vehicle (control group = CG) respectively. We assessed changes in body weight, time of appearance of tumors post inoculation, tumor volume and survival time for both groups. Between 11 and 17 post inoculation, 100% of animals developed tumors in both groups. At day 11 to 60% of the mice in the control group and 40% of the treated group had palpable tumors. The median time to onset of tumors in both groups were  $12.08 \pm 1.68$  for CG and  $12.88 \pm 2.10$  d for the GT group ( $p = 0.194$ ). The average tumor masses in both groups compared to days 18, 26 and 31 post tumor inoculation showed no significant difference ( $p = 0.92$   $p = 0.16$  and  $p = 0.29$  respectively). Median survival of individuals in each group was  $29.76 \pm 6.95$  d for GC and  $31.08 \pm 8.14$  d for the GT group ( $p = 0.57$ ), belonging to the last 3 deaths individuals in the treated group. This paper discusses the performance of murine melanoma model as a primary assessment tool of anti tumor and the results obtained with the application of therapy Hansi.

## 2) INTRODUCCIÓN.

El cáncer es uno de los mayores problemas de salud pública que enfrenta la humanidad. Existe una correlación positiva entre el nivel de desarrollo de una sociedad y el aumento porcentual de las muertes por esta enfermedad, por lo que es esperable que este problema se incremente en el futuro (OMS, 2008).

En función de los cálculos de la incidencia y la tasa de mortalidad observada en la población de Estados Unidos, la American Cancer Society prevé que para el 2009 existan un total de 1.479.350 nuevos casos y 562.340 muertes por cáncer solo en ese país. Estos datos se enmarcan en un contexto de reducción de las tasas de incidencia de cáncer en la población en general gracias a trabajos de prevención y nuevos tratamientos. En los últimos diez años la incidencia de cáncer se redujo en hombres 1,8% por año y en mujeres 0,6% por año (Cancer Statistics, 2009). Debido a la disminución en los tres principales sitios de cáncer en los hombres pulmón, próstata, y colon - recto y en dos sitios principales de cáncer en las mujeres mama y colon - recto.

El objetivo en la terapia anti cancerosa es la eliminación de todas las células tumorales. Para esto existe una amplia gama de herramientas terapéuticas diferentes y en general complementarias. La elección de la terapéutica adecuada dependerá de la localización y tipo histológico del tumor, estatificación del paciente, presencia o no de enfermedades concurrentes y síndromes para neoplásicos, así como la infraestructura disponible para la aplicación de los diferentes tratamientos (Ogilvie y col, 2008).

Cada herramienta terapéutica posee sus limitantes, el ejemplo más claro quizás es la imposibilidad de extirpación de masas tumorales ligadas íntimamente a componentes vitales del organismo. Otro factor que debe considerarse es que una terapia no será igualmente efectiva en todas las situaciones donde pueda ser aplicada. La quimioterapia constituye un buen ejemplo de esto siendo mas efectiva cuanto mayor sea la tasa de división celular del tumor. Cánceres de colon o de mama que presentan tasas de división celular media- baja responden en menor medida a la quimioterapia que los linfomas o mielomas de altas tasas de división (Kumar y col, 2006).

El sistema inmune posee un rol determinante en cuanto al desarrollo o no de una neoplasia. Numerosos autores han documentado que algunas respuestas inmunes pueden destruir células tumorales Lopez, 1991. Estas células presentan alteraciones o ausencia de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) lo que puede ser reconocido y atacado por el sistema inmune. Dentro de los mecanismos de defensa las células NK (asesinas naturales) participan en la destrucción de células normales alteradas, algunos microorganismos y fundamentalmente células tumorales (Tizard y col, 2007).

La actividad de las células NK está regulada por la exposición a algunas citoquinas IL-2, IL-4, IL-12 e IFN- $\gamma$ . Los mecanismos efectores están dado por

perforinas y un proteasa denominada fragmentina que induce la fragmentación del ácido de desoxirribonucleico (ADN) y la apoptosis de las células blanco. Poseen además un ligando CD95L (ligando fas) que puede inducir la apoptosis por la unión a su receptor CD95 en la célula blanco. Mediante estos mecanismos las células NK son capaces de destruir células tumorales cultivadas, células de leucemia, mieloma y algunos sarcomas humanos. Estas células activadas por medio de IFN -  $\gamma$  son capaces de infiltrar tumores murinos de tipo primario (Tizard y col, 2007).

El terapéutico a utilizar HANSI (5% de alcohol y concentraciones micro molares de Cactus Grandiflora, Aloe Socotrina, Abies Nigra, Arnica, Lachesis, Carbonato de Calcio y Lycopodium) a sido postulado como un activador de células NK *in vitro*, por lo que parece válido estudiar su potencial rol antitumoral en ensayos *in vivo*. Por otra parte ha demostrado baja toxicidad *in vivo*, lo que permitiría utilizarlo solo o en forma complementaria a una terapia convencional (See y col, 1998).

Este tipo de terapias co-adyuvante se enmarcan en una perspectiva holística (completa y abarcativa) del tratamiento antitumoral donde son relevantes tanto la eliminación de las células neoplásicas como el tratamiento sintomático de los efectos secundarios y la contención sicosocial del paciente y su entorno. A fin de maximizar las opciones de cura con la mejor calidad de vida posible. Este concepto es relativamente nuevo en medicina (Rosenthal y Jeglum, 1996).

En la búsqueda de nuevos productos con efecto antitumoral es importante contar con herramientas metodológicas que permitan una evaluación de la potencialidad de los mismos. Una de estas herramientas es la modelización, existiendo un espectro de modelos muy amplio. Los modelos murinos para el estudio experimental del cáncer abarcan: cepas consanguíneas de ratones, líneas de ratones con mutaciones espontáneas, ratones transgénicos y con inhibición génica (KO). Las ventajas más importantes que ofrecen estos modelos, en contraposición a las líneas celulares tumorales (humanas), son (i) la posibilidad de estudiar el efecto de las mutaciones que predisponen al cáncer en un fondo genético uniforme y (ii) la posibilidad de llevar a cabo todo tipo de estudios básicos y ensayos terapéuticos *in vivo* (Venavidez y Guenet, 2000).

En este trabajo se utiliza el modelo de melanoma murino, basado en la inoculación subcutánea de células tumorales B16F1 a ratones de la cepa C57BL6, el cual ha sido utilizado para estudios en Inmunología básica y en el desarrollo de vacunas anti – tumorales experimentales (Lopez, 1991; Agorio y col, 2005; Agorio y col, 2007).

### 3) REVISIÓN BIBLIOGRAFICA.

#### 3.1) Impacto del cáncer en la salud humana y animal.

Según la Organización Mundial de la Salud (OMS) en su comunicado de prensa N° 016/06 del 2006 el cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial. Se estima que en 2005 murieron de cáncer 7,6 millones de personas, y en los próximos 10 años morirán otros 84 millones si no se mejoran las estrategias existentes. La OMS ha propuesto el objetivo mundial de reducir las tasas de mortalidad por enfermedades crónicas en un 2% anual entre 2006 y 2015. El logro de ese objetivo evitaría más de 8 millones de los 84 millones de muertes previstas por cáncer a lo largo de la próxima década (Ministerio de Salud Pública (MSP), 2006).

En la República Oriental Uruguay (ROU) el cáncer es la segunda causa de muerte, siendo responsable del 24,8 % del total de defunciones del año 2006 (MSP, 2006) y el 22,7 % del total de defunciones del año 2007 (MSP, 2009). Es de resaltar que si el total de defunciones se desagrega por franjas etareas, el cáncer es la primer causa de muerte entre los 40 y los 60 años de edad (MSP, 2006).

En la medicina veterinaria el cáncer ha sido descrito en todas las especies de animales domésticos, ya sean estos de interés productivo y/o animales de compañía. La importancia relativa de esta patología no es igual para todas las especies. Las especies productivas presentan un tiempo de vida acotado a su ciclo de producción y una lógica clínica basada en el costo beneficio estrictamente económico. Elementos que conducen a una menor casuística y prácticamente nula terapéutica en comparación con las especies de compañía.

En la medida que las especies de compañía aumentan su papel afectivo en nuestra sociedad, los dueños son consientes y se preocupan mas por sus animales. Esto redundo en un incremento de los controles médico veterinarios lo que trae aparejado a una disminución de la prevalencia de enfermedades infecciosas, una mejora de la nutrición y cuidado del animal, permitiendo un incremento en la expectativa de vida de las mascotas. Sin embargo, estas medidas estarían favoreciendo la incidencia relativa de las neoplasias en este tipo de animales. Esto aunado a una mayor exposición a contaminantes ambientales y carcinogénicos químicos, determina que sea de esperar que los índices de presentación de esta enfermedad sean mayores en un futuro (Davis, 1987).

La información sobre la incidencia de esta patología en animales de compañía en el Uruguay es escasa. Realizando un análisis de los registros suministrados por el hospital escuela de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República encontramos que entre los años 1992 y 2005 se atendieron 39.333 casos, siendo las neoplasias un total de 2703 casos, representando el 6,9 % del total de consultas.

### 3.2) Bases patológicas del proceso neoplásicos y su clasificación.

A modo de definiciones, en este trabajo se utilizará la palabra **neoplasia** con la acepción que le diera el oncólogo Willis, 1952 *“Una neoplasia es una masa anormal de tejido cuyo crecimiento excede al de los tejidos normales y no está coordinado con estos mismos; persistiendo en la misma manera excesiva después de cesar el estímulo que desencadenó el cambio”*. A esta definición añade Kumar, 2006 *“es el resultado de alteraciones genéticas hereditarias que se transmiten a la progenie de las células tumorales. Estos cambios permiten una proliferación no regulada que se hace autónoma (independiente del estímulo fisiológico de crecimiento)”*.

La génesis del proceso neoplásico mas allá del agente causal (genético, químico, infeccioso), es la pérdida del control en el ciclo celular que da lugar a la división incontrolada de una célula generando una clona de células en crecimiento. Con el tiempo estas generaran un neoplasia (Tizard y col, 2007).

El cáncer es una enfermedad genética. Las alteraciones genómicas que se asocian al cáncer van desde la sustitución de un único nucleótido hasta grandes reorganizaciones cromosómicas, amplificaciones y deleciones. A diferencia de otras enfermedades genéticas el cáncer es causado por mutaciones que se producen predominantemente en células somáticas y solo un 1 % se asocia a células germinales. Otra diferencia importante con otras enfermedades genéticas es que el cáncer no suele surgir como consecuencia de una única mutación, sino de la acumulación de muchas mutaciones, hasta 6 a 10 mutaciones. Las mutaciones que conducen al cáncer afectan múltiples funciones celulares, que incluyen la reparación de los daños del ADN, la división celular , la apoptosis, la diferenciación celular y los contactos célula – célula (Klug y col, 2006).

El término **tumor** es más inespecífico y denota uno de los signos cardinales de la inflamación que es la tumefacción. Incluye por lo tanto procesos producidos por hemorragias o edemas además de los neoplásicos; los cuales a su vez pueden existir sin producir tumefacción. La historia ha equiparado estos términos (neoplasia y tumor) a tal punto que el resto de los significados de la palabra tumor son poco usados. De echo la **oncología** (del griego onco = tumor) es el estudio de los tumores, o mas precisamente de las neoplasias (Kumar y col, 2006), utilizándose indistintamente de aquí en más.

El termino **cáncer** es el *“nombre común para todos las neoplasias malignas”*. Mientras que los calificativos maligno y benigno tienen connotaciones clínicas. En general los *tumores benignos* se designan añadiendo el sufijo *“oma”* a la célula original. Esto no es así para los tumores derivados del tejido epitelial, donde se clasifican variadamente basándose a veces en la célula de origen, en la arquitectura microscópica o su estructura macroscópica. Desde el punto de vista clínico por lo general la lesión no amenaza la vida (excepto excepciones por su ubicación o función), es de crecimiento comparativamente lento, no se diseminará

por el cuerpo (no dará metástasis) y es susceptible de extirpación con cura del paciente (Kumar y col, 2006).

Por otra parte los *tumores malignos* surgen de dos fuentes: del tejido mesenquimal en cuyo caso se los denomina sarcomas (del griego sar = carnosos), o derivadas del tejido epitelial en cualquiera de sus capas denominándose carcinomas. Desde el punto de vista clínico, los tumores malignos tienen como características el crecimiento rápido, la invasión, la destrucción de tejidos adyacentes, la diseminación por todo el cuerpo y en general causan la muerte (Kumar y col, 2006).

En los procesos tumorales malignos las células sufren cambios que se pueden definir según su grado de diferenciación. La diferenciación se refiere al grado en que las células neoplásicas se asemejan a las células normales equivalentes, tanto morfológica, como funcionalmente. La falta de diferenciación se denomina anaplasia. Si bien existen excepciones en general cuanto menos diferenciado el tumor, mayor malignidad.

La falta de diferenciación está marcada por una serie de características: (i) Polimorfismo variación en el tamaño y la forma. (ii) Morfología nuclear anormal. Núcleos excesivamente grandes con relaciones núcleo / citoplasma cerca de 1 a 1 en comparación con la normal que varía de 1 a 4 a 1 a 6. (iii) Alto números de mitosis y figuras mitóticas atípicas con usos tripolares, cuádrupolares o multipolares. (iv) y pérdida de la polaridad. Las células anaplásicas pierden la polaridad creciendo en grandes masas anárquicas y desorganizadas. (v) Células gigantes, con núcleos hiper cromáticos. Mas allá de estas características los tumores malignos pueden abarcar todo el espectro de diferenciación desde tumores anaplásicos hasta bien diferenciados (Kumar y col, 2006; Spangler y Kass, 2006).

Otra característica relevante es la velocidad de crecimiento de un tumor estando ésta determinada por tres factores fundamentales: (i) El tiempo de duplicación de las células tumorales. (ii) La fracción de las células tumorales que integran la masa replicante (fracción de crecimiento). (iii) La velocidad a la que estas células se desprenden y pierden de la masa en crecimiento. A medida que el tumor se desarrolla la cantidad de células que se pierden es mayor ya sea por desprendimiento, la falta de nutrientes, la apoptosis; por diferenciación y por reversión a  $G_0$ .

En resumen el crecimiento tumoral está determinado por la diferencia entre la capacidad de generación de células y el ritmo de pérdida de las mismas (Kumar y col, 2006).

Es así que tumores de crecimiento rápido tienen en general una tasa de recambio celular alta, como es el caso de algunos linfomas, leucemias, carcinomas de células pequeñas de pulmón. Otros por el contrario presentan un desarrollo más lento como es el caso de cáncer de colon o mama, debido a su baja fracción de

células en crecimiento. Esto determina características de respuesta terapéutica sobre todo a la quimioterapia marcadamente diferentes.

La angiogénesis es un requisito del tumor en crecimiento, ya que sin un adecuado suministro de oxígeno y de los nutrientes una masa tumoral, no puede expandirse, este concepto se aplica tanto para el desarrollo del tumor primario y como secundario (Lunt y col, 2009).

El microambiente tumoral es complejo e implica cambios fisiopatológicos característicos tales como la hipoxia, pH bajo, y aumento de la presión del líquido intersticial debido a un suministro vascular mal estructurado. Otra interesante característica de la fisiopatología del microambiente tumorales es la elevada presión del líquido intersticial, con valores que van desde 10 hasta 100 mm Hg; existiendo múltiples factores que actúan conjuntamente para esto (Lunt y col, 2009).

Una característica determinante en la malignidad de un tumor es su capacidad de generar otras masas tumorales a distancia, las que se denominan metástasis. El proceso metastásico implica una serie de eventos complejos y coordinados. Debe producirse la liberación de células del tumor primario, el pasaje al torrente sanguíneo o linfático, la adición en un nuevo punto al endotelio vascular, su migración al parénquima y multiplicación. Resultando así en su instalación en uno o múltiples puntos a distancia.

En este proceso se han identificado diferentes factores a nivel molecular que perturban y modifican las interacciones tumor - matriz extracelular (ECM). Estos incluyen la señalización a través de moléculas de adhesión celular (CAM), como integrinas y cadherinas; la remodelación tisular a través de la acción de proteasas, como la plasmina o metaloproteinasas (MMP), las quimiocinas, factores de crecimiento y moléculas de señalización, todos los cuales actúan en el control de procesos como la proliferación, supervivencia y la apoptosis, la migración y la invasión (Lunt y col, 2009).

### 3.3) Diagnóstico y herramientas terapéuticas del cáncer.

*El diagnóstico* de una neoplasia debe incluir un minucioso chequeo clínico (con los análisis para clínicos necesarios) para determinar cuan extendida esta la enfermedad en el organismo, los trastornos orgánicos causados por el cáncer y la existencia o no de síndromes para neoplásicos. Es necesario explorar la presencia de enfermedades concurrentes y realizar la evaluación histopatológica (citología y/o histología) del tumor a fin de aproximarse al comportamiento biológico esperable para el mismo.

La sistematización de este proceso diagnóstico se resume en la *estadificación*. Esta constituye una antesala esencial al diseño de una estrategia eficaz de tratamiento. Posee tres componentes: A) Diagnóstico tisular: cada tumor es único y debe identificarse con una biopsia. B) ubicación y alcance del tumor: es el

proceso de evaluar el tumor localmente y en sitios distantes a través de procesos metastásicos. C) condición del paciente: determinar la presencia de patologías concurrentes o síndromes para neoplásicos (Ogilvie y col, 2008).

Si bien existen diferentes sistemas de estadificación la Organización Mundial de la Salud y otros organismos por convención utilizan el sistema TNM donde T refiere la tumor primario, N a la infiltración de ganglios regionales y M a la presencia de metástasis. Estos ítems a su vez son sub clasificados con números arábigos, el tumor primario "T" en función de su tamaño; los ganglios regionales "N" en función del número que se encuentren afectados, de su movilidad y histología; y la metástasis "M" en función de su existencia. La combinación de de los tres puntos determina el estadio o condición del paciente que va del 1 al 4, siendo 1 el mas leve y 4 el mas grave, (Anexo 1: Esquema de estadificación clínica de tumores de la cavidad bucal) (Balch, 2001).

*La biopsia* es uno de los procedimientos más importantes realizados cuando se evalúa un paciente oncológico. Cada biopsia debe ser realizada asumiendo que la lesión es maligna. Esta tiene valor si se realiza de forma adecuada y es interpretada por un patólogo capacitado. Los resultados deberán ser considerados en concierto con la información de otros métodos complementarios como laboratorio de rutina, radiología, ultrasonografía, tomografía computarizada, resonancia magnética nuclear y otros métodos imagenológicos. La biopsia proporciona al equipo profesional y al propietario el primer fragmento vital de información en un plan de acción. Esta es la primera fase de reversión del sentido de pérdida del poder asociado con el diagnóstico del cáncer (Ogilvie y col, 2008).

Una vez realizado el diagnóstico se dispone de un abanico de terapéuticas, de diversa naturaleza y características; muchas complementarias o por lo menos no excluyentes. Según (Rosenthal & Jeglum, 1996) son al menos 5 los *factores que deben tenerse en cuenta para orientar las elecciones y acciones terapéuticas*. (1) El conocimiento del comportamiento biológico de la enfermedad. (2) Estadificación clínica del caso a tratar. (3) Existencia de patologías concurrentes u procesos mórbidos que comprometan la tolerancia del paciente a la terapéutica a instituir. (4) La capacidad y voluntad del propietario del animal a tratar. (5) La disponibilidad y capacidad técnica para aplicar las modalidades terapéuticas indicadas.

La idea de que *el paciente oncológico debe ser considerado mas allá de su patología específica (cáncer)*, atendiendo su estado general, entorno sico-social y todos los aspectos que contribuyan a una mejora en la calidad de vida de ese animal, es relativamente nueva en medicina y es conocido como un enfoque holístico (amplio y abarcativo) del tratamiento oncológico. En este marco, tanto la combinación de herramientas terapéuticas a fin de maximizar sus beneficios y/o disminuir los efectos secundarios (indeseados); como la prevención o atención de los efectos nocivos de las terapias instauradas y la información (capacitación) del propietario son determinantes en el logro del objetivo terapéutico (Rosenthal y col, 1996).

Dentro de las *opciones terapéuticas* en medicina veterinaria deben considerarse la cirugía, la quimioterapia, la terapia radiante (radioterapia), modificadores de la respuesta biológica (agentes biológicos, derivados del BCG, cimetidina, antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), bisfosfatos, tetraciclinas, anticuerpos monoclonales), terapias complementarias o alternativas (acupuntura, homeopatía, fitoterapia, quiropraxia, terapia nutricional), terapias antineoplásicas emergentes (terapia génica, vacunas antitumorales, anticuerpos monoclonales y conjugados inmunológicos, terapias de orientación molecular), hipertermia, crioterapia, terapia fotodinámica y los tratamientos de soporte nutricional, transfusional, analgésico y paliativo de efectos secundarios (vómitos, diarreas, trastornos hematológicos).

Algunas terapias son de enfoque sistémico como la quimioterapia y los modificadores de la respuesta biológica los que pueden considerarse útiles para combatir la enfermedad micrometastásica. Mientras que otras son de enfoque local. La terapia radiante es útil para esterilizar la enfermedad local o regional y la cirugía para eliminar el tumor macroscópico. Las terapias antineoplásicas emergentes y las alternativas o complementarias se emplean generalmente como terapias co-adyuvantes (Rosenthal y col, 1996).

### 3.3.1) Quimioterapia.

La quimioterapia se refiere a una clase terapéutica heterogénea que incluye numerosos productos fabricados a partir de moléculas diversas. Las *principales familias* agrupadas según su modo de acción y su objetivo a nivel celular son: (i) agentes alquilantes, (ii) venenos de huso, L- asparginasa y (iii) AINEs; en particular aquellos selectivos de la cox (ciclo oxigenasa) (Lanore y Delprat, 2004). La cura inducida por quimioterapia es posible con tratamientos combinados pero casi nunca cuando se utilizan agentes quimioterápicos únicos (Oglivie y col, 2008).

Para los *agentes alquilantes* el objetivo es la cadena de ADN, fijándose en sus bases nitrogenadas. La alquilación es la sustitución de un átomo de hidrógeno por un grupo alquilo de un agente alquilante. La unión obtenida es generalmente un doble enlace covalente, los puentes intra e inter moleculares así creados sobre el genoma bloquean la replicación de ADN y la transcripción del ARN. Este obstáculo lleva a la muerte celular. El lugar preferente de alquilación es en el séptimo átomo de la guanina. De este grupo se utilizan en medicina veterinaria la doxorubicina la bleomicina, la mitoxantrona y la actinomicina D.

La *doxorubicina* puede ser considerada como un inhibidor de la enzima topoisomerasa II. Recordemos que la topoisomerasa II permite la escisión-reparación temporal de la doble cadena de ADN. Este despliegue de la doble hélice es un fenómeno esencial en la replicación. Para llevarlo a cabo la topoisomerasa II forma con los fragmentos de ADN un complejo temporal y por tanto modificable. La doxorubicina actúa a este nivel estabilizando el complejo topoisomerasa II/ ADN y haciendo que la replicación sea imposible. Finalmente la doxorubicina es capaz de inducir la formación de radicales libres muy tóxicos (en particular para las membranas celulares). Este elemento parece contribuir poco a

su capacidad antitumoral y es responsable sobre todo de su toxicidad cardíaca (Lanore y Delprat, 2004).

Los otros fármacos (mitoxantrona, actinomicina D) parecen actuar sobre todo por intercalación. La bleomicina esta considerada como un agente de escisión capaz de provocar lesiones en le ADN, (Lanore, 2004).

Los *venenos de huso* son agentes mitostáticos, o sea que actúan como su nombre indica, durante la mitosis deteniéndola. Son de alguna manera, los únicos antimitóticos en un sentido estricto. Actúan pues, como agentes dependientes de la fase M del ciclo celular. Se distinguen dos grupos: los alcaloides de la vinca y los taxanos.

Los *alcaloides de la vinca* (*Vinca rosea*) son unos dímeros asimétricos que se conjugan de manera mas o menos reversible con la tubulina, inhibiendo así la polimerización de los micro túbulos. La formación del huso acromático es entonces imposible; en el mejor de los casos el huso esta desorganizado. Esto conduce a un bloqueo de la mitosis con interrupción del ciclo en metafase. Se utilizan de este grupo esencialmente la *vincristina* y la *vinblastina* en medicina veterinaria. Esta desorganización de los micro túbulos puede originar otros defectos celulares: inhibición de la fagocitosis, defecto del transporte axonal (responsable de la neurotoxicidad) y modificación del transporte de proteínas (Lanore y Delprat, 2004).

Los *taxanos* (*doxetaxel* y *placitaxel*) son derivados de una variedad del Tejo. Modifican la relación tubulina soluble/tubulina polimerizada a favor de una polimerización excesiva. Esto cursa con una anormal estabilidad de los microtubulos y la mitosis no puede terminarse en forma correcta (Lanore y Delprat, 2004).

La *aspargina* es un aminoácido no esencial. Su síntesis se produce en el conjunto de las células sanas por acción de la asparginasa sintetasa, que la produce por transaminación del ácido aspártico. La aspargina es sin embargo necesaria para la síntesis proteica. La producción exógena no es suficiente para el crecimiento rápido de las células malignas (linfoides en particular). Además estas son amenudo deficientes en asparginasa- sintetasa dando como consecuencia una capacidad de síntesis endógena limitada (Lanore y Delprat, 2004).

La *L-asparginasa* es una enzima proteolítica que hidroliza la aspargina en ácido aspártico y amonio. Produce así una disminución de la concentración plasmática de aspargina exógena (caída de la tasa plasmática) y en consecuencia, una disminución de la síntesis proteica, en particular las células linfoides malignas. Ello implica pues la muerte celular por apoptosis. Este mecanismo de acción tan particular a menudo se utiliza en el tratamiento de recaídas o casos de quimioresistencia. Es de interés por la ausencia de resistencia cruzada con otros antineoplásicos (Lanore y Delprat, 2004).

Algunos *AINES* poseen actividad antitumoral. Se ha descrito en concreto la eficacia del piroxicam en el tratamiento paliativo de carcinoma de células de transición (CCT) de la vejiga. El modo de acción de los aines como antitumorales es poco conocido. Algunos autores plantean que el piroxicam puede favorecer la apoptosis y modificar el ciclo celular. Se ha demostrado la inhibición de receptores cox.- 2 por parte de los aines, lo cual podría ser un mecanismo de acción (Lanore y Delprat, 2004).

### 3.3.1.1) Efectos tóxicos y resistencia a la quimioterapia.

La quimioterapia utiliza fármacos con efectos secundarios marcados y de un índice terapéutico débil, es decir, que la relación entre la concentración tóxica y la concentración mínima eficaz es cercana a uno. En algunos casos como con el paclitaxel y etoposido, el vehículo utilizado para mantener la droga en solución es más tóxico que el producto per se. La dosis de quimioterápicos no se administra en función del peso sino de la tasa metabólica, lo que se relaciona con el área de superficie corporal (ASC) en m<sup>2</sup>, (Anexo 2 Tablas de conversión de Kg a superficie corporal en m<sup>2</sup>). Todas las drogas quimioterapéuticas parecen metabolizarse y excretarse en forma compleja (Oglivie y col, 2008).

Es de resaltar que la toxicidad de la quimioterapia es mucho menos importante en los carnívoros domésticos que en el hombre (5-40 % frente a 75-100 % de efectos secundarios) (Lanore y Delprat, 2004).

A diferencia de la mayoría de las células tumorales las células normales poseen mecanismos capaces de reparar el daño celular. En consecuencia los agentes citotóxicos se deben administrar a intervalos adecuados para permitir que las células tumorales mueran, en tanto que las normales se recuperan (Oglivie y col, 2008).

Pueden inducirse dos tipos de toxicidad, una no específica que está directamente ligada al efecto citotóxico del fármaco sobre los tejidos sanos del organismo que presentan tasas de recambio celular alta. Y un segundo tipo de toxicidad, llamada específica, ligada al fármaco independientemente de su acción sobre el ciclo celular (Lanore y Delprat, 2004). (Anexo 3 Tablas de toxicidades asociadas a algunas drogas antineoplásicas).

Las reacciones toxicológicas varían en función de la naturaleza química, dosis y frecuencia de aplicación del fármaco; y la susceptibilidad del paciente dada por la tolerancia individual, capacidad de metabolización y excreción de la droga. Los efectos tóxicos de mayor importancia clínica comprenden: toxicidad hematológica y gastrointestinal, (Sociedad Uruguaya de Veterinarios Especialistas en Pequeños Animales, 2005)

La médula ósea es sensible a la mayoría de los fármacos anti cancerosos porque presenta un índice mitótico y fracción proliferativa muy elevada (del orden del 40 – 60 %). La mayoría de los fármacos son mielotóxicos a excepción hecha de la L-

asparginasa y la bleomicina. La mielo toxicidad se controla mediante hemogramas de rutina los que debieran realizarse uno antes de cada sección. No efectuándose la misma con recuentos leucocitarios inferiores a  $4000/\text{mm}^3$  o granulocitos neutrófilos inferiores a  $2500/\text{mm}^3$ . El segundo hemograma debería realizarse en el momento del NADIR (punto de menor concentración de leucocitos en una curva de evolución leucocitaria post tratamiento) el cual varía con cada quimioterápico, con el objetivo de evaluar el riesgo de neutropenia séptica (Lanore y Delprat, 2004).

La toxicidad hematológica es un factor limitante en la quimioterapia. Se trata de la toxicidad más habitual y más grave por dos motivos. El primero es que puede comprometer el éxito de un tratamiento debido a la necesaria reducción de dosis ante las evidencias de toxicidad. La segunda razón es el riesgo potencial mortal para el animal por neutropenia séptica. Esta corresponde a una septicemia secundaria y asociada a la neutropenia quimioinducida. El orden cronológico en que se afectan las distintas líneas celulares sanguíneas está relacionado con su vida media en sangre. El tiempo de vida de los granulocitos neutrófilos es de 6 a 12 hs, el de las plaquetas de 5 a 7 días y el de los eritrocitos de 120 días en el perro y solo 70 días en el gato. Es por ello que la neutropenia es la primera y más frecuente en aparecer, seguida de la trombocitopenia (Lanore y Delprat, 2004).

La trombocitopenia iatrogénica es más rara que la neutropenia, pero es otra manifestación posible. Se manifiesta por lo expuesto más tardíamente y los fármacos más riesgosos en este sentido son los nitrosoureicos (carmustina, lomustina) y los alquilantes (sobre todo el melalfan). La vincristina y los corticoides, en cambio, se utilizan en el tratamiento de algunas trombocitopenias. Los accidentes hemorrágicos son raros y se producen cuando el recuento plaquetario es extremadamente bajo (inferior a  $20.000$  plaquetas/ $\text{mm}^3$ ). La anemia quimioinducida es extremadamente rara y siempre tardía, (al menos 3-4 meses después del inicio de la quimioterapia). Afortunadamente la mayoría de estos efectos son reversibles mediante la suspensión del tratamiento, debido a la reserva que constituyen las células pluripotenciales en fase  $G_0$ , las que entran en ciclo regenerando la población celular (Lanore y Delprat, 2004).

Los *trastornos digestivos* forman parte de los problemas que se observan con mayor frecuencia. En términos de repercusión clínica, la toxicidad digestiva es, no obstante, menos grave que la toxicidad hematológica. Los principales problemas observados son anorexia, disorexia, náuseas, vómitos, diarrea o constipación. Entre los fármacos utilizados regularmente en oncología veterinaria, el cisplatino, la doxorubicina y la ciclofosfamida son los más susceptibles de generar toxicidad digestiva. El cisplatino es particularmente fuerte en la inducción de vómitos, junto con la dacarbacina. Los alcaloides de la vinca se han asociado con constipación (Lanore y Delprat, 2004).

La *toxicidad renal* está ligada al uso del cisplatino en el caso del perro y de la adriablastina en el caso del gato. Es de destacar que el cisplatino no debiera administrarse a los gatos debido a su toxicidad pulmonar. La frecuencia de

aparición de la insuficiencia renal iatrogénica varía del 6 al 16 % según los estudios y los protocolos de diuresis utilizados. Entre las modificaciones biológicas asociadas a la nefrotoxicidad del cisplatino son claramente identificables la disminución de la tasa de filtración glomerular y disfunción tubular proximal. Contrariamente a lo que sucede con su mecanismo, que aun no es bien conocido. El resultado final del mecanismo es la necrosis del epitelio tubular. Los efectos clínicos van desde una elevación de la urea y la creatinina a una insuficiencia renal crónica irreversible. La muerte por insuficiencia renal aguda ha sido descrita. Si bien no está claramente dilucidado y existe una importante variabilidad individual en cuanto al volumen de perfusión óptimo que disminuya los riesgos de nefrotoxicidad y no implique un gasto económico y temporal innecesario. Parecería que volúmenes entre 80 y 120 ml/kg repartido en un período de 4 a 6 hs de fluido terapia antes y después de la quimioterapia es suficiente para prevenir las complicaciones renales (Lanore y Delprat, 2004).

La doxorubicina provoca en el caso del gato una toxicidad renal mucho más preocupante que la toxicidad cardíaca. Se trata de una toxicidad por dosis acumulativa lo que hace que no se pueda realizar más de 8 sesiones en el gato. Hay que prestar atención al efecto hipotensor de la anestesia general que debe realizarse en esta especie para administrar el fármaco I/V (Lanore y Delprat, 2004).

En las vías urinarias puede constatarse también *toxicidad vesical*. Se trata básicamente de la cistitis hemorrágica estéril, que es debida sobre todo al uso de ciclofosfamida. Sus manifestaciones clínicas son hematuria (macro o microscópica), estranguria y disuria. Su aparición es menos frecuente de lo esperado debido a la asociación con corticoesteroides en la mayoría de los protocolos quimioterápicos que utilizan ciclofosfamida (protocolo de Cotter). La acción irritante de los metabolitos (como la acreolina) derivados de la ciclofosfamida, está en relación al tiempo de retención urinaria. De hecho la presencia sostenida de estos metabolitos pueden generar fibrosis quística vesical. Es por esto que se prefieren tratamientos espaciados con dosis altas que dosis bajas prolongadas en el tiempo (Lanore y Delprat, 2004).

La *toxicidad cardíaca* es un factor limitante en la utilización de la doxorubicina. La administración de esta droga provoca cuadros de intoxicación aguda 48 hs post tratamiento, o intoxicación crónica por acumulación. La intoxicación aguda está producida principalmente por un metabolito post oxidación hepática el doxorubinol, el cual provoca la liberación de histamina con consecuencias de hipersensibilidad de tipo I (eritema cutáneo) y sensibilidad cardíaca. Manifestada fundamentalmente por bloqueos atrio ventriculares, extrasístoles, taquicardias supra ventriculares. En general estos problemas son temporarios y reversibles sin mayor consecuencia clínica, aunque en algunos casos pueden ameritar tratamiento para su reversión. La toxicidad crónica aparece luego de los 180 mg/m<sup>2</sup> y casi sistemáticamente luego de los 240 mg/m<sup>2</sup>, lo que determina un máximo de sesiones posibles. El fármaco provoca una disminución contráctil del miocardio, generando con el tiempo una cardiomiopatía dilatada, provocando la

muerte. Es de particular importancia en razas predispuestas a este tipo de patologías cardíacas (Bóxer, Doberman, Dogo) (Lanore y Delprat, 2004).

La *resistencia a la quimioterapia* es variable según los tumores, y en consecuencia constituye un límite a su eficacia. Esta resistencia puede estar ligada a factores intrínsecos y menos habitualmente a factores extrínsecos. Los *factores intrínsecos* afectan a los mecanismos biológicos encargados de reparar o impedir las lesiones quimioinducidas. La resistencia intrínseca se denomina primaria si se presenta súbitamente en la célula antes de la quimioterapia; es decir, de novó desde su transformación cancerosa. Por el contrario se habla de resistencia intrínseca adquirida o secundaria si aparece después que el tumor haya sido expuesto al agente citotóxico, y en particular cuando se presenta una recidiva. Dos mecanismos son posibles: la célula puede modificar su genotipo/fenotipo o se selecciona una sub población reciente. La resistencia adquirida explica las recaídas en el caso de los linfomas sean más difíciles de tratar. Los *factores extrínsecos* agrupan el conjunto de mecanismos farmacocinéticos o anatómicos que impiden a la molécula anticancerosa alcanzar su objetivo (Lanore y Delprat, 2004).

### 3.3.2) Terapia radiante.

Por terapia radiante se entiende un conjunto de procedimientos que utilizan la radiación como agente curativo. Esta se puede realizar con fines paliativos o curativos. Es considerada un tratamiento local o regional, de ataque a la enfermedad micro metastásica o células tumorales residuales. Logrando sus mejores resultados cuando se utiliza en combinación con otras terapias (cirugía, quimioterapia) (Ogilvie y col, 2008).

La radiación ionizante puede ser electromagnética o particulada. La radiación electromagnética es una onda o paquete de energía (fotón). Existen dos tipos de radiación electromagnética: los rayos roentgen generados por máquinas eléctricas (ortovoltaje, acelerador lineal) y radiación gama producida intranuclearmente, por lo general mediante la desintegración espontánea de isótopos radiactivos, como el cobalto-60 ( $\text{Co}^{60}$ ) o cesio-137 ( $\text{Cs}^{137}$ ) (Nesmeianov, 1956).

La radiación ionizante puede matar células en forma directa, básicamente por sus efectos sobre el ADN y en menor medida sobre las membranas. Como alternativa la radiación puede interactuar con el agua de las células y matriz intracelular formando radicales libres. Las células lesionadas por la radiación pueden morir directamente mediante apoptosis; pueden repararse e intentar la mitosis y luego morir; o dividirse en forma aberrante. Algunas células son funcionales pero no se dividen, otras pueden tener daños menores reparables. Estas constituyen la base para la recurrencia tumoral (Ogilvie y col, 2008).

La destrucción celular radiactiva es una proporción constante (más que un número constante) de la masa tumoral existente, parte del daño radiactivo inicial es sub

letal y reparable, existiendo una dosis umbral que debe superarse para lograr la muerte celular (Ogilvie y col, 2008).

Las células en fase M o G<sub>2</sub> son mas sensibles a la radioterapia, mientras que aquellas en fase S y G<sub>0</sub> son las mas resistentes y las que se encuentran en fase G<sub>1</sub> están en una situación intermedia. Dependiendo de la cantidad de células en cada fase puede haber alteración de la dosis umbral y tasa de matanza exponencial. El oxígeno es un factor determinante en el éxito de radioterapia ya que este reacciona con las lesiones del ADN volviéndolas permanentes. Si hay menor disponibilidad de oxígeno existe mayor probabilidad de reparación antes de que este se vuelva permanente (Ogilvie y col, 2008).

La dosis de radiación absorbida es el factor biológico que influye en mayor medida en el control tumoral y la toxicidad. La unidad de medición de la radiación absorbida es el Gray (Gy). Un curso (tratamiento) de radioterapia se describe en función de dosis total, número de sesiones (fracciones de la dosis total) y el tiempo durante el cual se administrará el tratamiento (Ej: 60 Gy, administrado en fracciones de 3 Gy, 5 días por semana, durante 4 semanas). La mayoría de los tumores en medicina veterinaria reciben una dosis de entre 40 a 60 Grey, suministradas en 9 a 30 sesiones en 3 a 6 semanas (Ogilvie y col, 2008).

El suministro de radioterapia desde una máquina externa se denomina *teleterapia* o *radioterapia de rayo*. En medicina veterinaria esta se aplica comúnmente mediante aceleradores lineales o máquinas de ortovoltaje. Puesto que la fuente de radiación es externa, el animal no requiere aislamiento. Dependiendo del mecanismo de absorción radiactiva implicado, fotoeléctrica o absorción Compton y/o el tipo de partícula desplazada (electrón o protón) encontramos varias modalidades. A saber terapia de *ortovoltaje* (utiliza la absorción fotoeléctrica desplazando electrones de alta energía), *megavoltaje* (utiliza la absorción Compton desplazando electrones con baja energía), terapia de *haz eléctrico* (desplaza electrones con diferentes niveles de energía), terapia de *haz protónico* los protones tienen mas masa que los electrones viajan con mayor lentitud y tienden a depositar toda su energía en un volumen tisular estrecho (Ogilvie y col, 2008).

Cuando el suministro de la radiación se realiza mediante un implante (semilla o pajuelas) en el tumor o su alrededor se denomina *braquiterapia*. La cantidad de tejido lesionado es directamente proporcional a la energía de la radiación implantada, así como el tiempo que el implante permanece en el lugar. Dependiendo del tejido implantado los materiales utilizados varían el estroncio-90 (Sr<sup>90</sup>) y el iridio se utilizan generalmente para implantes superficiales, mientras que en cavidades es mas común utilizar radio o cesio. En este tipo de terapia el animal requiere un periodo variable de aislamiento debido a este se vuelve radiactivo (Ogilvie y col, 2008).

Cuando la radioterapia es orientada a un blanco tisular específico mediante el uso de radionúclidos con afinidad especial por las células tumorales, como pueden ser

el yodo-131 ( $I^{131}$ ) para el tratamiento del carcinoma tiroideo o el samario-153 ( $Sm^{153}$ ) para tumores esqueléticos caninos. Al igual que cuando se combina radionúclidos con anticuerpos monoclonales (radioinmunoterapia), hablamos de *terapia sistémica*. Esta requiere aislamiento del paciente mientras éste sea radiactivo (Ogilvie y col, 2008).

La *terapia radiante de intensidad modulada o radiación conforme*, es una modalidad avanzada de alta precisión. La técnica utiliza aceleradores lineales bajo control computarizado, para administrar dosis radiactivas exactas a un tumor. Esta técnica presenta una precisión variable en 4mm. Mas exacta aun es la *radiocirugía* la cual presenta un margen de irradiación de 0,33 a 1mm. Esta permite la oferta exacta de radiación en altas dosis (10 -15 Gy) en una única dosis. Este tipo de terapias es casi exclusiva aun de uso humano, fundamentalmente para tumores de cabeza y cuello (Ogilvie y col, 2008).

La dosis radiactiva posible de suministrar está en estrecha relación con la resistencia radiactiva de los tejidos normales que rodean el tumor. La resistencia de los tejidos normales es función no solo del tipo celular sino fundamentalmente de de los requerimientos proliferativos del tejido normal. Es así que la piel, la mucosa gastrointestinal, la medula ósea, glándulas y tejidos reproductores, se consideran radiosensibles. Mientras que el hueso y el hígado en condiciones estables (sin lesión) son relativamente radioresistentes (Ogilvie y col, 2008).

Los *efectos agudos* de la radio terapia son comunes, siendo causa del efecto de la misma sobre los tejidos radiosensibles. Estos en general (a excepción de las células madres de la medula ósea), presentan una dosis umbral alta. Por lo que el fraccionamiento de la dosis en varias sesiones permite el reclutamiento y reparación de células normales, no así las células tumorales. Estos efectos abarcan mucosistis, inflamación epidérmica húmeda y queratitis. Aparecen comúnmente entre las tres semanas posteriores a la sesión de radioterapia (Ogilvie y col, 2008).

Los *efectos tardíos* se deben fundamentalmente a la lesión de células estromales y del endotelio vascular de tejidos, causando necrosis, fibrosis, ulceración que no cura y daño del sistema nervioso central. La sintomatología dependerá del órgano afectado. La radiación puede dañar en forma directa las membranas celulares, interrumpiendo así el transporte transmembrana con el consecuente edema; efecto que cobra importancia en el sistema nervioso central. Estos efectos aparecen generalmente meses o incluso años después del tratamiento (Ogilvie y col, 2008).

Con la mayor disponibilidad de planeamiento computarizado y determinación del alcance de la enfermedad con el uso de tomografía computada (TC) y resonancia magnética nuclear, los efectos benéficos de la teleterapia radiante están en camino de incrementarse en forma sustancial, reduciendo los daños colaterales mediante la sustitución de máquinas de ortovoltaje por aceleradores lineales y

unidades de megavoltaje (Ogilvie y col, 2008). Igualmente esta realidad parece distante aun en la medicina veterinaria de estas latitudes.

### 3.3.3) Modificadores de la respuesta biológica

Los modificadores de la respuesta biológica (MBR) o terapia biológica se están transformando con rapidez en un componente clave en el tratamiento del cáncer. Este grupo abarca una amplia variedad de sustancias, productos biológicos, agentes químicos, linfocinas, citocinas, factores de crecimiento hematopoyéticos, anticuerpos, terapia génica y vacunas; que tienen por objetivo reconstituir o potenciar el sistema inmune. Para prevenir, reducir o eliminar el crecimiento y presencia del cáncer, empleando procesos biológicos endógenos (Ogilvie y col, 2008). (Anexo 4 tabla de sustancias empleadas como modificadores de la respuesta biológica).

Los *agentes biológicos* como (*Serratia mercensens*, *Streptococcus pyogenes*, *Corynebacterium parvum* [también conocido como *Propionibacterim acnés*], bacilo de Calmette- Guérin [BCG]), L-MTP-PE (muramil tripeptido-fosfatidiletanolamina encapsulado en liposomas), e inmuno potenciadores químicos (acemananos, levamisol, cimetidina) son categorizados como inmunoterapicos inespecificos activos. Estos agentes estimulan en forma activa al sistema inmune para defender al organismo de diversas sustancias patógenas y el cáncer (Ogilvie y col, 2008).

De los modificadores mas utilizados; las Interleucinas son glicoproteínas biológicamente activos derivados principalmente de los linfocitos activados y macrófagos. Mayor conocimiento de las propiedades bioquímicas y biológicas de las interleucinas se ha adquirido con los avances en la tecnología de ADN recombinante, la purificación de proteínas, células y las técnicas de cultivo. Las propiedades biológicas de las interleucinas incluyen inducción de la activación de linfocitos T y la proliferación, el aumento de neutrófilos, macrófagos y linfocitos T citotóxicos, la promoción de los linfocitos B y multilinaje madre de la médula ósea, precursores de crecimiento y diferenciación celular (Elmslie y col, 1991).

### 3.3.4) Terapias complementarias y alternativas.

Bajo esta denominación de medicina complementaria y alternativa (CAM) se encuentran sistemas diversos de cuidados médicos y de salud, de prácticas y productos que no se consideran por ahora que forman parte de la medicina tradicional occidental (National Cancer Institiut, 2009).

Si bien muchos occidentales son escépticos respecto a estas terapias, es de utilidad tener presente que aproximadamente el 80% de la población mundial utiliza al menos una forma de medicina alternativa, y muchas personas desean para su mascota este tipo de atención cuando se enferman (Eisenberg, 1993).

Aunque están agrupadas, la medicina complementaria y la alternativa son diferentes una de otra. La medicina *complementaria* se usa junto con la medicina

convencional. Un ejemplo de terapia complementaria es el uso de aromaterapia para ayudar a reducir las molestias del paciente después de una cirugía. La medicina *alternativa* se usa en vez de la medicina convencional. Un ejemplo de una terapia alternativa es el uso de una dieta especial para tratar el cáncer en vez de someterse a cirugía, a radiación o a quimioterapia recomendadas por un practicante de cuidados médicos convencionales, (National Cancer Institiut, 2009).

El Centro Nacional para la Medicina Complementaria y Alternativa (NCCAM) de los Estados Unidos de América ha clasificado estas terapias en cinco grupos o campos: (i) sistemas médicos alternativos (por ejemplo, la medicina homeopática y la medicina tradicional China); (ii) intervenciones corporales y mentales (por ejemplo, visualización y relajación); (iii) métodos de manipulación y que tienen el cuerpo como base (por ejemplo, la quiropráctica y el masaje); (iv) terapias basadas en la biología (por ejemplo, las vitaminas y productos herbarios); y (v) terapias de energía (por ejemplo, el qi gong y el toque terapéutico).

Un número reducido de terapias que originalmente se consideraban puramente métodos alternativos están encontrando su lugar en el tratamiento para el cáncer. No para su curación, sino como terapias complementarias que pueden ayudar a los pacientes a sentirse mejor y a recuperarse más pronto. Un ejemplo es la acupuntura. Esta es efectiva para el manejo de náuseas y vómitos relacionados con la quimioterapia y para controlar el dolor relacionado con la cirugía. Por el contrario, algunos métodos, como el uso de "laetrile", han sido estudiados y se ha encontrado que no son efectivos o que son potencialmente dañinos, (National Cancer Institiut, 2009).

#### 3.3.4.1) Homeopatía

La medicina homeopática emplea diluciones extremas para tratar enfermedades o disturbios. Estos remedios están confeccionados con diluciones de hasta 1 en 20.000 de sustancias naturales de origen animal, vegetal o mineral. Quienes promulgan esta terapia evocan mecanismos de la física cuántica, postulando que la energía electromagnética del remedio homeopático puede interactuar con el cuerpo para fines biológicos - curativos. Un fenómeno conocido como memoria del agua, el cual consistente en que la estructura de una solución de agua y alcohol es alterada durante el proceso de creación de los remedios, de manera que la estructura de la molécula es retenida incluso después que nada queda de la sustancia real. Estos conceptos constituyen el principio de acción de los remedios homeopáticos (Ogilvie y col, 2008).

#### 3.3.4.2) Fitoterapia.

La fitoterapia es la ciencia que estudia la utilización de los productos de origen vegetal con finalidad terapéutica, ya sea para prevenir, para atenuar o para curar un estado patológico. La base de los medicamentos fitoterápicos son las drogas vegetales y los diferentes tipos de productos que de ellas se obtienen. Los

principios activos son las sustancias responsables de la acción farmacológica (ej: planta medicinal-Valeriana officinalis, droga vegetal- raíz de valeriana, principio activo- valepotriatos y el ácido valerénico) (Cañigueral y Vila, 1998).

El mecanismo de acción depende del ingrediente activo de la hierba en cuestión. Los agentes empleados comprenden entre otros sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, quinonas, podofilotoxinas, taxol y alcaloides. Muchos de estos tales como el paclitaxel, vincristina, etopócido, han sido adaptados para la terapia antineoplásica clásica occidental (Ogilvie y col, 2008).

### 3.3.5) Homeopático Activador Natural del Sistema Inmune (HANSI)

Este producto desarrollado por el Dr. Hirschmann, J, es utilizado a nivel mundial para el tratamiento de diversas patologías relacionadas con el desempeño del sistema inmune por ejemplo el Síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), poliartritis reumatoide (PAR), anafilaxias de tipo I (alergias) y diversos trastornos autoinmunitarios. En Uruguay este producto está autorizado por el Ministerio de Salud Pública (MSP) para su comercialización, y cuenta con una importante casuística acumulada.

Se lo puede definir como una fórmula magistral, ya que es una mezcla de diferentes sustancias activas: minerales (Carbonato de Calcio), animales (veneno de Lachesis) y vegetales (Cactus Grandiflora, Aloe Socotrina, Abies Nigra, Arnica y Lycopodium). Se suministra a concentraciones homeopáticas, con una base de agua destilada y alcohol al 5 %.

El medicamento ha sido fabricado de acuerdo con los métodos y especificaciones de la Farmacopea Homeopática de los Estados Unidos. En concreto, cada extracto fue diluido en serie de 5% de etanol y agua estéril a una concentración final de 1:106 y en combinación con los otros componentes. La mezcla final fue potenciada por agitación repetida. El análisis por espectrofotometría de la mezcla final sólo revela etanol y agua. Esto está en conformidad con la práctica homeopática estándar de dilución de los componentes iniciales hasta el punto en que no pueden ser detectadas por medio estándar (HANSI Uruguay, 2009).

Dentro de los trabajos que han estudiado directamente este producto (See y col, 1998) comunicó un incremento en la actividad de las células NK *in vitro* de pacientes con síndrome de fatiga crónica (SFC) o síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida (SIDA), sometidos a un tratamiento con este producto. Paralelamente observó una reducción en la afección del páncreas de ratas expuestas a una línea diabetogénica de virus cocksackie B4 (CVB4) cepa E2. Con estos datos el autor sugiere que el producto posee un potencial antiviral a través de la estimulación del sistema inmune.

Por otra parte también se probó este producto como terapia con potencial anti tumoral. En un modelo de carcinomas mamarios en ratas basados en la administración de N-metilnitroso- urea (NMU) como inductor químico de la

carcinogénesis, se evaluó el desarrollo tumoral solo o complementado con agentes quimioterápicos. Este grupo encontró diferencias en el crecimiento tumoral cuando se utilizó HANSI como coadyuvante de la terapia con 5 fluoruracilo, Adriamacina, Ciclofosfamida (Aguirre y col, 2002).

### 3.4) Modulación de la respuesta inmune contra tumores.

La noción de sensibilización del sistema inmune contra patógenos infecciosos introducida por Edward Jenner, quien descubrió en 1796 que la viruela vacuna proporcionaba protección contra la viruela humana, dio lugar al desarrollo de la inmunología moderna sustentada en la biología molecular, la bioquímica, la genética y la microbiología (Janeway y col, 2003).

El sistema inmunitario tal cual lo comprendemos hoy, es un conjunto de órganos, células y factores solubles, que actúan en forma coordinada y sincrónica, con un fin específico: preservar la integridad del organismo. Desde un punto de vista didáctico dividimos esta compleja red de constituyentes en la inmunidad innata y la inmunidad adquirida.

La *inmunidad innata* está constituida por 1) las barreras físicas y químicas, como los epitelios y las sustancias antimicrobianas formadas en su superficie, 2) células fagocíticas (neutrófilos y macrófagos) y linfocitos citolíticos naturales (NK); 3) proteínas sanguíneas como los factores del sistema de complemento y otros mediadores de la inflamación; y 4) unas proteínas denominadas citocinas que regulan y coordinan muchas de las actividades de las células de la inmunidad innata. Estos componentes son comunes en la defensa ante toda agresión, se encuentran presentes desde el nacimiento y no se especializan o perfeccionan mayormente durante el transcurso de la vida (Abbas y col, 2008).

En contra partida la *inmunidad adaptativa* presenta una alta especificidad molecular contra el elemento reaccionante, aumentando su especificidad e intensidad con exposiciones repetidas. Existen dos tipos de respuesta adaptativa. La *inmunidad humoral*, constituida por las Inmunoglobulinas, moléculas presentes en la sangre y secreciones, producidas por los linfocitos B capaces de reconocer secuencias aminoácidas específicas (epítipo) y unirse a él, señalizando la presencia de un riesgo (opsonización) para el organismo. Por otro lado la *inmunidad celular* es llevada a cabo por los linfocitos T los cuales poseen mecanismos de destrucción celular y a su vez pueden coordinar y orientar la proliferación de los linfocitos B (Abbas y col, 2008).

En lo que respecta a la inmunidad anti tumoral Mc Farlane Burnet esbozo en los años 50, el concepto *vigilancia inmunitaria*. Es función del sistema inmune la eliminación de aquellas células que presentan alguna anomalía (mutación) evitando su proliferación. Aunque a priori podría parecer ineficiente en su función, debido a la alta incidencia del cáncer en la población (cualquiera sea humana o animal). Si tomamos en cuenta la inmensa cantidad de células que se generan en el transcurso de la vida, es pequeña la cantidad que expresan alteraciones y de

éstas mínima las que escapan al control del sistema inmunitario y logran generar un tumor (Roitt y col, 2003).

Los estudios en animales han demostrado que algunos tumores provocan respuestas inmunitarias específicas que suprimen su crecimiento. Los antígenos expresados por tumores murinos inducidos experimentalmente, a menudo denominados antígenos de trasplante o antígenos de rechazo al tumor, son por lo general específicos de un tumor individual. Existiendo al menos seis categorías de de antígenos de rechazo tumoral, (Anexo 5: Tabla antígenos de rechazo tumoral) (Janeway y col, 2003)

La primer categoría está constituida por los antígenos estrictamente específicos del tumor. Que se generan como parte del proceso oncogénico. Los trabajos de Prhen y Main, junto con los que dirigiera Boon y col. demostraron en primer lugar la existencia de moléculas de membrana (MHC de clase I) que están presentes en todas las células nucleadas del cuerpo y en algunas células tumorales no se expresan o lo hacen en forma mínima, lo cual da lugar al reconocimiento como anormal por células T CD8 y/o células NK.

Por otra parte estas moléculas son las encargadas de mostrar al sistema inmune los péptidos que son sintetizados en el espacio intracelular. Cuando el metabolismo celular se ve alterado puede reflejarse en la síntesis de péptidos atípicos, los cuales son reconocidos por los linfocitos T citotóxicos, montando estos una respuesta que culmina con la eliminación de las células alteradas (Tizard y col, 2007).

Una segunda categoría de antígenos son aquellos que son detectados en tumores inducidos por agentes infecciosos (virus de hepatitis [HBV], virus de hepatitis C [HCV], virus de papiloma humano [HPV] y la bacteria *Helicobacter pilori*). Estos patógenos representan cerca del 90% de los tumores atribuibles a agentes infecciosos (Itoh y col, 2009).

Una tercera y cuarta categoría esta constituida por antígenos que solo se expresan en algún tejido específico o como parte de un proceso de diferenciación. Estos genes que en condiciones normales no se expresan (silenciosos), pero dentro de los cambios que llevan a la pérdida del control en la división celular se vuelven codificantes. Este es el caso de los antígenos oncofetales (antígeno carcinoembrionario [CEA],  $\alpha$ -feto proteínas del carcinoma hepático), o el gen codificador de un antígeno de melanoma MAGE-1 (Roitt y col, 2003).

La quinta categoría describe la sobre expresión de ciertos antígenos por parte de células tumorales; como por ejemplo HER-2/neu (conocido también como c-Erb-2) un receptor de tirocinasa homólogo al receptor de crecimiento epidérmico que se sobre expresa en muchos adenocarcinomas de mama y ovario entre otros.

Las moléculas antigénicas que presentan modificaciones post transduccionales anormales constituyen una sexta categoría. Existen cambios en la estructura de

los hidratos de carbono, como sucede en cánceres gastrointestinales que expresan el antígeno de Lewis (Le), otros compuestos como las glicoproteínas 95 KDa F19 encontrada en los fibroblastos reactivos del estroma del 90 % en los carcinomas de colon, mama, pulmón y páncreas; o la glicoproteína endocialina (FB5) que se encuentra en la vasculatura recién generada de una proporción significativa de tumores malignos (Roitt y col, 2003).

Como ya se mencionó el sistema inmune es capaz de eliminar células cancerosas, y numerosos autores han documentado respuestas inmunes capaces de destruir células tumorales (Lopez, 1991).

En las respuestas inmunes anti tumorales participan, como queda en evidencia mediante estudios histopatológicos, células mononucleares (linfocitos T, linfocitos citolíticos naturales o asesinas naturales (NK) y macrófagos). Existen además células activadas (linfocitos y macrófagos) en los ganglios linfáticos que drenan localizaciones tumorales (Abbas y col, 2008). Estos componentes celulares necesitan reconocer antígenos específicos que le permitan montar una respuesta (Roitt y col, 2003).

Dentro de los mecanismos con que cuenta el organismo para la eliminación de las células tumorales, se ha comprobado que los macrófagos activados por TNF- $\alpha$  desempeñan un rol importante. Estos son capaces de infiltrarse en las masas tumorales y generar destrucción a través de la producción de intermediarios reactivos de oxígeno (IRO) y factor de necrosis tumoral. Además son capaces de activar otras poblaciones celulares (T CD4 y células NK) mediante la secreción de citoquinas (IL -1) (Tizard y col, 2007).

Las células NK desempeñan un papel central en la inmunidad antitumoral. Incluso en modelos con células B16 resistentes a la acción NK, desarrollan un rol importante en el control de metástasis (Ehrlich y col, 1984).

Estas representan aproximadamente el 15 % de los linfocitos presentes en la sangre periférica. Estas células a diferencia de los linfocitos T no maduran en el timo, no recirculan, debido a que son células residentes en los tejidos. No expresan el complejo CD3, ni CD4, BCR o TCR, en cambio expresan un antígeno mayor de superficie característico llamado CD56 en el ser humano, así como CD2, CD16 y CD95L (ligando de fas) (Tizard y col, 2007).

Estas células reconocen tumores y células anormales por una gran cantidad de mecanismos. Por ejemplo como ya fue expresado, matan de manera selectiva aquellas células que no expresan MHC de clase I. Otros comprenden el reconocimiento por parte de estas células de las moléculas MICA (presente solo en superficie de células anormales) o mediante citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC); donde células opsonizadas con anticuerpos se unen a receptores CD16 (receptor Fc [Fc $\gamma$ RIII]) que expresan las células NK (Janeway y col, 2003)

Los mecanismos de destrucción celular utilizado por las células NK, está dado por medio de perforinas y citocinas (TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ ), así como a través de CD95L. Las perforinas y granzimas se expresan de forma constitutiva en las células NK, y aumenta con la exposición a IL-2 e IL-12. Las perforinas ocasionan lesiones pequeñas (5 a 7 nm) en la superficie de la célula blanco. Esto interfiere con el equilibrio osmótico y sirve de entrada a la inyección de granzimas. Secretan además una proteasa denominada fragmentina, capaz de inducir la fragmentación de ADN y la apoptosis de la célula blanco (Janeway y col, 2003).

### 3.5) Los modelos murinos en el desarrollo de anti cancerígenos.

Los modelos animales por definición, son una aproximación de la realidad, y su uso en el desarrollo de drogas contra el cáncer es controvertido. Si bien existen entusiastas y detractores sobre la utilización de modelos tumorales, la evaluación clínica de correlaciones útiles proporcionadas por los modelos animales y su utilización racional es necesaria (Talmadge y col, 2007).

La aplicabilidad de los tumores trasplantables en la enfermedad humana tiene sus limitaciones; primero ellos fueron establecidos hace muchos años atrás y pueden ser parcialmente histoincompatibles con los ratones singénicos actuales, también algunos de ellos han incorporado virus endógenos no expresados por sus huésped murinos por lo que pueden ser mucho más inmunogénicos que los tumores humanos que surgen de modo natural (Rosenberg, 2004).

Estos tumores generalmente son inoculados de forma subcutánea o intravenosa por lo que no crecen en el sitio anatómico apropiado por lo tanto no son mimica de la fisiología órgano específica característica del tumor. De esta forma el sistema inmune no se expone al tumor de forma lenta como ocurre en el humano (Rosenberg, 2004).

Los tumores trasplantables generalmente progresan de forma rápida después de su implantación, mientras que en el humano este desarrollo es lento y sucede atravesando una serie de cambios celulares graduales que van desde los estadios pre-malignos hasta los malignos por lo que el sistema inmune se aclimata de forma lenta. Estas variaciones cinéticas pueden conducir a diferentes consecuencias inmunológicas tales como tolerancia o activación del Sistema Inmune (Rosenberg, 2004)

Muchos modelos de tumores sólidos de uso común están sesgados hacia los resultados falsos positivos debido a que son seleccionados en base a la facilidad de uso, la sensibilidad de a la terapéutica, un rápido crecimiento y otros atributos que faciliten los estudios, pero no las correlaciones clínicas (Talmadge y col, 2007).

Por otro lado se conoce que hay muchas respuestas en las investigaciones oncológicas que solo pueden ser respondidas en estudio de tumores creciendo *in vivo* y que es necesario tratar de minimizar la angustia y el dolor en los animales

portadores de estos tumores, por lo que seguimos las recomendaciones de la "Guía para el bienestar Animal en las Neoplasias Experimentales", (UK Coordinating Committee on Cancer Research, 1997), sobre todo para predecir y reconocer los efectos adversos y establecer el punto final de los experimentos con animales portadores de tumor, sacrificándolos en forma humanitaria (Beausoleil y Delgado, 2008 )

Aunque es difícil extraer conclusiones generales acerca de la importancia de las diferencias entre el ratón y la inmunología humana, vale la pena considerar la posibilidad de que cualquier respuesta dada en un ratón no se puede producir de forma idéntica en los seres humanos (Mestas y Hughe, 2004).

Para la medicina experimental, el ratón es un organismo modelo que ofrece muchas ventajas con respecto a otros modelos genéticos como la mosca *Drosophila melanogaster*, el nematodo *Caenorhabditis elegans* (ambos tienen sus genomas secuenciados en forma completa) e inclusive la rata. Estas ventajas son: al tratarse de un mamífero, una gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al hombre, aunque no hay que perder de vista que no se trata de un humano en miniatura. Tienen un tiempo generacional muy corto, son muy prolíficos y se adaptan fácilmente a la vida en los bioterios, lo que permite controlar las variables ambientales en las experimentaciones (Benavides y Guenet, 2000).

Comparte con el hombre el privilegio de ser las especies de mamífero mejor estudiadas desde el punto de vista genético. El primer borrador de ambos genomas está completo (Benavides y Guenet, 2000).

Existe una cantidad enorme de líneas genéticamente definidas, como las consanguíneas y congénicas, además de miles de mutaciones y un gran número de rearrreglos cromosómicos disponibles. Es el único animal que posee sistemas eficientes de cultivo de células embrionarias pluripotenciales ("ES cells") para generar quimeras, lo que permite la realización de mutaciones dirigidas (por ej.: los ratones KO) o condicionales (por ej.: el sistema Cre/loxP) (Benavides y Guenet, 2000).

Finalmente, el trabajo acumulado durante un siglo de investigaciones ha resultado en una inmensa cantidad de documentación sobre los fenotipos mutantes, las características de las cepas y los mapas genéticos (Benavides y Guenet, 2000).

Si bien es necesario tener precaución en la interpretación de los datos obtenidos en ratones, está claramente justificado su uso. Los modelos murinos serán absolutamente esencial para la continuación de los avances en nuestra comprensión de la función del sistema inmune en la salud y la enfermedad, (Mestas y Hughe, 2004).

## **4) OBJETIVOS GENERALES Y ESPECÍFICOS.**

### **4.1) Objetivo General.**

Estudiar el efecto de un preparado terapéutico (HANSI), sobre el desarrollo de tumores inducidos en el modelo de melanoma murino.

### **4.2) Objetivos Específicos.**

- 4.2.1) Propagar la línea B16F1 *in vitro* como fuente de implante de células tumorales.
- 4.2.2) Estudiar la evolución tumoral en el ratón a partir de la inoculación subcutánea de las células tumorales.
- 4.2.3) Evaluar la influencia del tratamiento HANSI sobre el desarrollo tumoral y la sobrevida de los animales.

## **5) MATERIALES Y METODOS.**

### **5.1) Modelo de melanoma murino subcutáneo.**

Este modelo se basa en la inoculación sub cutánea de células tumorales B16F1. Este es un tumor originariamente espontáneo, que es trasplantado en su portador singénico, ratón C57BL/6J. Con cantidades de células tumorales inoculadas de entre  $5 \times 10^4$  y  $2 \times 10^6$ , los ratones desarrollan tumores a nivel dorso – lumbar en un tiempo promedio de 7 – 18 días y una sobrevida luego de la aparición del tumor de 30 – 45 días (Lopez, 1991; Agorio y col, 2005; Agorio y col, 2007).

### **5.2) Reactivos**

Los principios activos y los excipientes fueron provistos por HANSI Uruguay.

Las células B16F1 (American Type Cultured Collection, N° de línea CRL-6323) fueron donadas gentilmente por el Laboratorio de Vacunas Recombinantes del Instituto de Higiene, Facultad de Medicina. Las células fueron descongeladas y expandidas en Minimum Essential Medium con sales de Eagle (E-MEM) con 10% de Suero fetal bovino (Nutricell ®), siguiendo procedimientos estándares (Kunz y Mueller, 2000). Estas se inocularon a razón de  $1.5 \times 10^5$  células por ratón. (Anexo 13. Resumen del protocolo de expansión celular y preparado del inóculo celular).

### **5.3) Animales e instalaciones.**

Se utilizaron ratones C57BL/6J, hembras de 6 semanas de edad provistos por la Dirección de Laboratorios Veterinarios, MGAP. Los mismos fueron mantenidos en la Unidad de Reactivos para Biomodelos de Experimentación (URBE), Facultad de

Medicina, con ciclos de 12 horas luz – oscuridad, con agua, ración *ad libitum* y temperatura controlada.

La expansión y mantención de la línea celular, al igual que la operación de inoculación sub cutánea con las células tumorales se realizaron en el Departamento de Ciencias Microbiológicas, Área de Inmunología de Facultad de Veterinaria.

#### 5.4) Diseño experimental.

Se trabajó con 50 ratonas C57BL/6J. Las mismas se dividieron en dos grupos, uno de los cuales recibió el tratamiento con HANSI (grupo tratado “GT”; n=25) y el otro solo el excipiente del producto (grupo control “GC”; n=25).

El tratamiento se inició el día – 93 administrando en forma subcutánea 0.2 ml de HANSI, tres veces por semana hasta el día 0 y todos los días pos inoculación hasta finalizar el experimento. El grupo control recibió el excipiente en igual volumen y frecuencia.

El día 0 todos los animales fueron anestesiados con 0,3 ml de una solución que contiene 5 mg/ml de ketamina y 0,2 mg/ml de xilacina (Institute for Laboratory Animal Research, 1993) inoculados vía subcutánea en zona dorso lumbar derecha con 250 µl de una suspensión de  $1.5 \times 10^5$  células tumorales B16F1 en medio de cultivo E-MEM.

El experimento finalizó cuando los animales murieron espontáneamente o cuando la evolución de la enfermedad impuso la aplicación del criterio de punto final establecido en el protocolo experimental presentado a la Comisión Honoraria de Experimentación Animal (CHEA). Brevemente, como criterio de punto final, se estableció que aquellos animales que no fuesen capaces de desplazarse por sus propios medios, no accedieran al alimento y/o manifestasen síntomas de deshidratación severa, se sacrifican por dislocación cervical, (Protocolo de experimentación aprobado por la CHEA N° 7106 – 06). (Anexo 6: Cronograma de actividades).

Las variables estudiadas de respuesta al tratamiento fueron la evolución del peso corporal, la evolución tumoral (tiempo libre de tumor y volumen tumoral) y el tiempo de supervivencia en forma individual, para ambos grupos. (Anexo 7: Sistema de identificación de animales).

#### 5.5) Determinaciones.

##### 5.5.1) Evolución del peso corporal.

El pesaje se realizó en forma quincenal pre inoculación de las células tumorales y semanalmente post inoculación. Se utilizó una balanza de precisión con una graduación de 0,1g.

#### 5.5.2) El tiempo libre de tumor.

Se entiende como el tiempo durante el cual no se constata la aparición de los tumores post inoculación de las células tumorales. Se registró la aparición de los tumores diariamente. Como criterio aquellos tumores en que una de sus dimensiones era menor a 4mm no fueron medibles, registrándose los como "palpable".

#### 5.5.3) Volumen tumoral.

El registro del volumen tumoral se realizó, utilizando un calibre con graduación 1mm, registrándose largo (L), ancho (A) y altura (Al). El volumen tumoral (VT) se determinó mediante la siguiente ecuación:

$$VT = L * A * Al * 0,5236$$

Donde 0.5236 es una constante para el cálculo de volumen de una esfera que representa  $\pi/6$ , (Anexo 8: Planilla de evolución tumoral) (Agorio y col, 2007; Qi-Hong y col, 2009).

#### 5.5.4) Tiempo de sobrevida.

Este parámetro se entiende como el tiempo transcurrido entre la inoculación de las células tumorales (día 0) y la muerte de los animales.

Los decesos se registraron, identificando el animal y la fecha. A efectos de recabar el mayor volumen de información posible, se realizó un protocolo de necropsia a todos los individuos registrando datos del animal y del tumor, conservando los órganos, tumores o recesiones de interés en formol al 5% para su posterior análisis (Anexo 9: Protocolo de necropsia).

#### 5.6) Análisis estadísticos.

El estudio estadístico se realizó mediante la comparación de la evolución tumoral entre los grupos utilizando test de t y ensayos de sobrevida, (STATA software, USA), (Pagano y col, 2001).

## 6) RESULTADOS

### 6.1) Evolución del peso corporal.

La evolución de peso fue similar para ambos grupos. Se debe considerar que luego del día 0 los pesos totales incluyen el peso de la masa tumoral. No se observaron diferencias en las ganancias de peso entre los grupos de animales.

En la figura 1 se muestra el peso promedio de los ratones en cada tratamiento, para cada observación y su desvío estándar. La media de los promedios de peso entre los días - 81 y 18 es de 22.6 g para ambos grupos, mientras que el de los días 21 a 32 es de 29 g para el grupo tratado y 28 g para el grupo control. Este aumento (6,4 g GT y 5,4g GC) es atribuible al crecimiento tumoral.

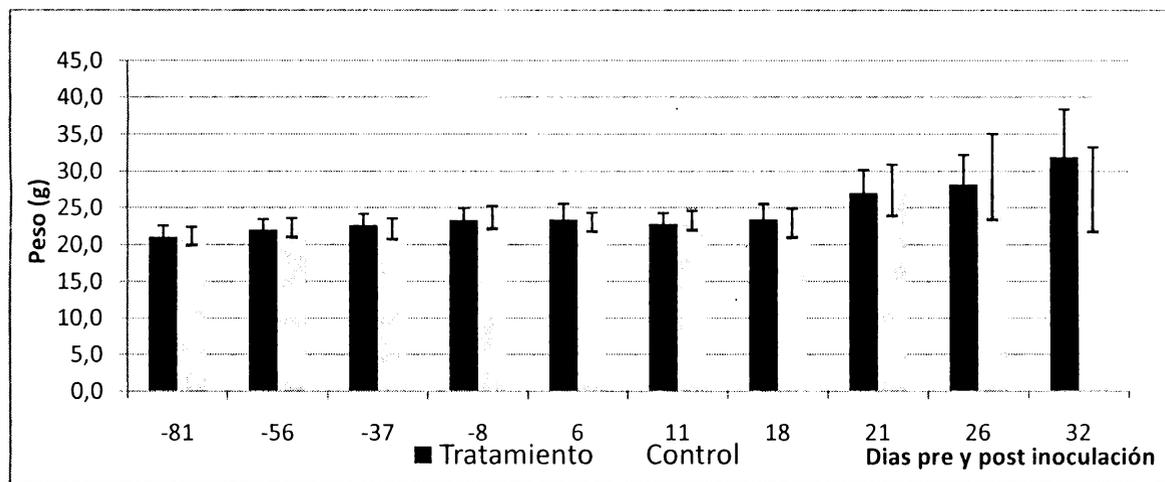


Figura 1. Peso para cada tratamiento. Media y su error estándar por tratamiento.

### 6.2) Evolución tumoral.

Para el estudio de la evolución tumoral se realizaron las determinaciones de: (A) tiempo libre de tumor y (B) volumen tumoral.

#### 6.2.1) Tiempo libre de tumor.

En el ensayo, entre los días 11 y 17 post inoculación el 100% de los animales desarrollaron tumores. El promedio de aparición de tumores fue  $12,08 \pm 1.68$  días post inoculación para el grupo control "GC" y  $12,88 \pm 2.10$  días post inoculación para el grupo tratado "GT". En la figura 2 se muestra el % de animales libres de tumor para cada día de observación. Para el análisis estadístico se realizó una regresión de cox, las diferencias no fueron estadísticamente significativas ( $p=0.19$ ). (Anexo 10. Análisis estadístico de la frecuencia de aparición de los tumores en los grupos tratado y control).

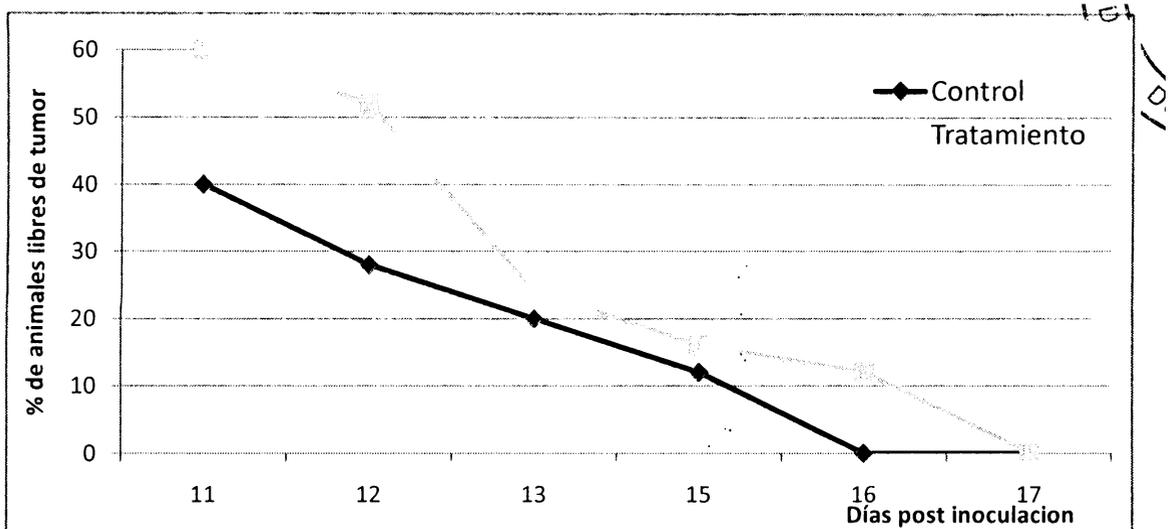


Figura 2. Porcentaje de animales libres de tumor para cada día de observación

### 6.2.2) Volumen tumoral.

Las mediciones de la masa tumoral se efectuaron los días 11, 13, 18, 21, 26 y 31 post inoculación, de la forma descrita en materiales y métodos (literal 5.5.3), expresándose el volumen tumoral en  $\text{mm}^3$ .

Para el análisis estadístico, se analizó el crecimiento tumoral de los animales vivos de cada grupo, a los 18, 26 y 31 días de la inoculación de las células tumorales, mediante un test de t. No encontrándose diferencias significativas en el crecimiento tumoral entre ambos grupos para los días analizados,  $p=0,92$   $p=0,16$  y  $p=0,29$  respectivamente para cada día. (Anexo 11 Análisis estadístico de la evolución de la masa tumoral luego de 18, 26 y 31 días de inoculado el tumor en el grupo tratado y control).

En relación al volumen tumoral, los resultados indicaron que estadísticamente la comparación de las medias del volumen tumoral en ambos grupos fue similar para todas las observaciones. El día 18 la media para el grupo control (GC) fue de  $1363.4 \pm 212.6 \text{ mm}^3$  y para el grupo tratado (GT) fue de  $1330.2 \pm 274.3 \text{ mm}^3$  ( $p=0.92$ ), el día 26 la media para el GC fue de  $6772.0 \pm 1335.9 \text{ mm}^3$  y para el GT fue de  $4482.6 \pm 873.9 \text{ mm}^3$  ( $p=0.16$ ) y para el día 31 la media para el GC fue de  $8302.5 \pm 1714.7 \text{ mm}^3$  y para el GT  $11543.8 \pm 2167.9 \text{ mm}^3$  ( $p=0.29$ ).

La figura 3 representa la sumatoria de los volúmenes tumorales de todos los individuos para cada tratamiento en cada observación, contabilizando a los individuos fallecidos con el último dato medido. En promedio para todas las observaciones el GT presenta el 45 % del volumen tumoral del GC. En la medición del día 11 post inoculación el GT es el 32% del GC y el día 31 el valor del GT es el 66 % del GC siendo este el máximo valor absoluto y porcentual alcanzado.

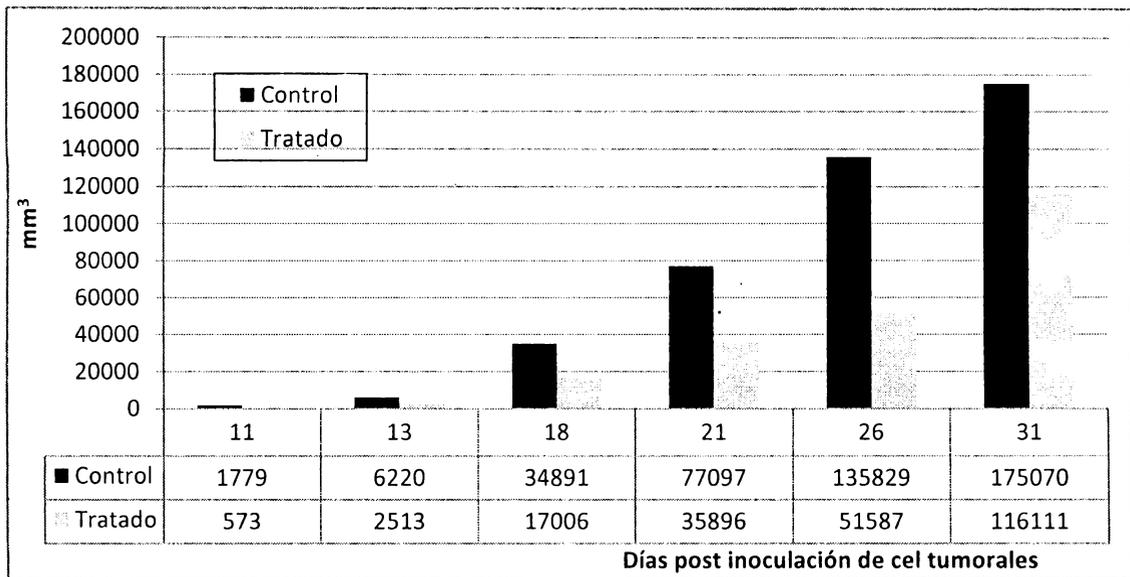


Figura 3 Sumatoria de los volúmenes tumorales individuales por tratamiento para cada observación, asumiendo para aquellos animales fallecidos un volumen igual al ultimo registrado.

El volumen medio de los tumores fue pro medialmente 17% menor en el grupo tratado durante todo el ensayo, siendo únicamente en la última medición (día 31) donde el promedio del volumen tumoral del GC es menor al del GT, Figura 5. Esta figura presenta la media del volumen tumoral en mm<sup>3</sup> de cada grupo para cada observación. Además se calculo de la diferencia % entre ambos grupos, tomada como el porcentaje que representa la diferencia entre ambos grupos (GC - GT) en el valor del grupo control.

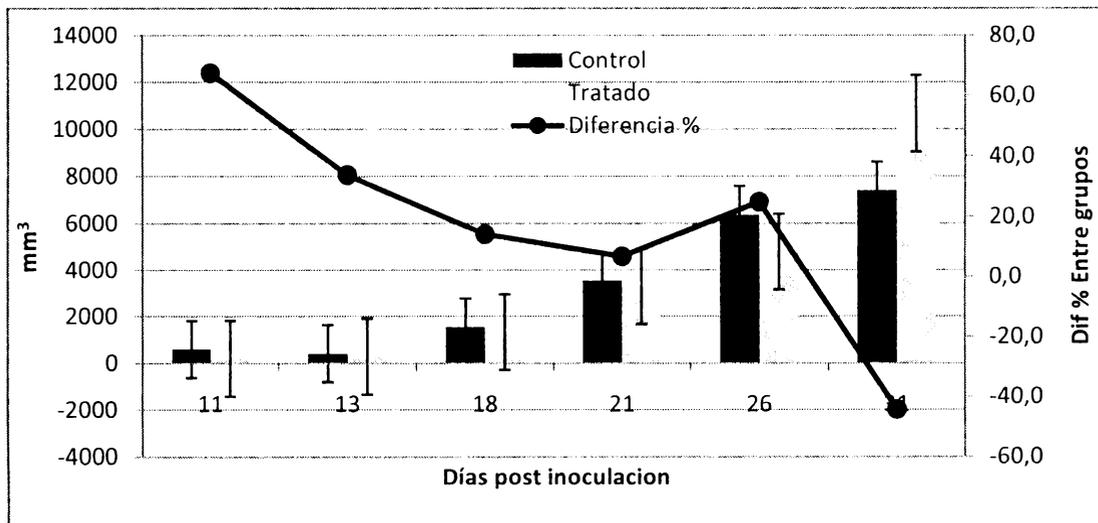


Figura 4. Volumen tumoral medio, desvio estandar por tratamiento y diferencia porcentual tomada como el porcentaje que representa la diferencia entre ambos grupos en el valor del grupo control ( $((GC - GT) * 100) / GC$ ), para cada observación.

### 6.3) Tiempo de sobrevida de los animales.

Las primeras muertes de animales se observaron al día 17 y la última muerte se observó al día 45 post inoculación de las células tumorales. La media de sobrevida, fue de  $29,76 \pm 6,95$  días para el "GC" y  $31,08 \pm 8,14$  días para el "GT".

Para el análisis estadístico de estos datos se realizó una regresión de cox, determinándose que estas diferencias no son estadísticamente significativas ( $p=0,57$ ). (Anexo 12 Comparación estadística de la sobrevida de los animales del grupo tratado y control).

La figura 6 es la representación gráfica de las curvas de sobrevida, donde el grupo = 0 es grupo control "GC" y el grupo = 1 es grupo tratado "GT".

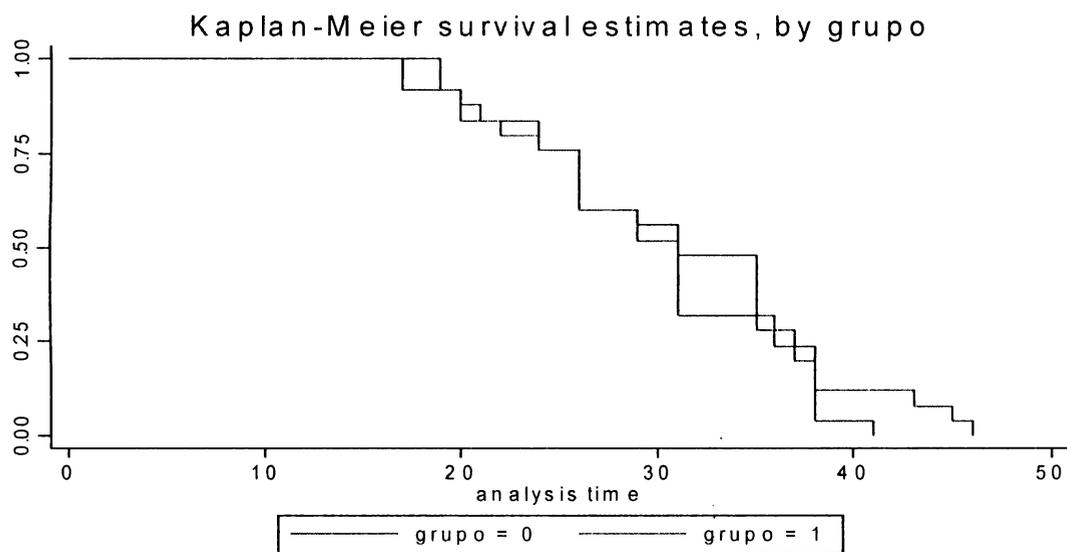


Figura 5. Estimación por grupo de la sobrevida en el modelo de Kaplan – Meier, (grupo = 0 es grupo control "GC" y el grupo = 1 es grupo tratado "GT").

Con respecto a la aplicación de eutanasias, estas se realizaron en 9 individuos. Cuatro de los cuales correspondieron al grupo control y cinco al grupo tratado, distribuidos como se indica en la Tabla 2.

Tabla 1. Distribución temporal de las muertes por eutanasia según el grupo.

Día	Grupo control	Grupo tratamiento
31	1	
38	3	3
44		1
45		1

## 7) DISCUSIÓN

La discusión de los resultados se realizara en dos grandes capítulos. En primer lugar se abordará el modelo tumoral utilizado (objetivo 4.2); y luego se discutirán los resultados de la terapia instaurada sobre el desarrollo de los melanomas inducidos (objetivo 4.3).

### 7.1) Comportamiento del modelo de melanoma murino.

Del objetivo 4.1 “propagar la línea B16F1 *in vitro* como fuente de implante de células tumorales”. Se logro la expansión de la clona celular, obteniéndose un cultivo estable. El resultado más elocuente en este sentido es la incidencia del 100% de aparición de tumores en los animales inoculados.

En cuanto a las variables de respuesta: incidencia de tumores lograda, tiempo libre de tumor promedio, volumen tumoral desarrollado ( $\text{mm}^3$ ) y tiempo de sobrevivida, el modelo se comportó dentro de los parámetros establecidos por otros autores (Lopez, 1991; Agorio y col, 2005; Agorio y col, 2007). En la Tabla 3 se presenta una comparación para algunos parámetros entre diferentes autores y este ensayo. Si bien existen variaciones, el modelo posee una alta repetitividad, lo que es deseable.

**Tabla 2. Parámetros reportados y obtenidos para grupos controles sin tratamiento.**

Autor	Parámetro		
	Tiempo libre de tumor <sup>1</sup>	Vol tumoral <sup>2</sup>	Última muerte
Agorio y col, 2005	10 a 18 d	3500	41
Lopez, 1991 <sup>3</sup>	7 a 18 d	3050	35
Ensayo	11 a 16 d	3530	41

<sup>1</sup> mínimo y máximo en días

<sup>2</sup> medio a los 21 días  $\text{mm}^3$

<sup>3</sup> concentración de células viables  $2 \times 10^6$

En este ensayo el 100% de los animales del grupo control presentaban tumor palpable al día 17 post inoculación de las células tumorales (intervalo 6 días). El volumen tumoral promedio al día 21 post inoculación de las células fue de  $3530 \pm 2558 \text{ mm}^3$ . Los decesos se produjeron todos entre los días 17 y 41 (intervalo de 24 días).

A su vez Lopez, (1991) estableció 7 a 18 días (intervalo 11 días) como período libre de tumor post inoculación con diversas concentraciones de células viables inoculadas ( $2 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^4$ ,  $10 \times 10^4$ ,  $50 \times 10^4$ ) en animales sin tratamiento. El tiempo medio de sobrevivida varió ligeramente de unos lotes a otros, siendo mayor cuanto menor fue el número de células tumorales viables inoculadas. En ningún caso fue superior a los 35 días o menor a 7 días (intervalo de 28 días).

Con concentraciones de células de  $2 \times 10^6$  reporta un volumen tumoral promedio de  $3050 \text{ mm}^3$  a los 21 días y establece además un tiempo medio de supervivencia de  $26 \pm 2$  y  $30 \pm 3$  días.

Agorio y col, (2007) reporta que el 100 % de los animales control presenta masa tumorales palpables entre los días 12 a 18 (intervalo 6 días). El volumen tumoral promedio fue de  $3500 \text{ mm}^3$ , estableciendo  $4000 \text{ mm}^3$  como máximo desarrollo tolerable en los ensayos realizados por este grupo. En relación al tiempo de supervivencia informa un mínimo de 20 días y máximo de 41 días (intervalos de 21 días).

Si bien en términos generales se comparte lo expresado por Lopez, (1991), "el modelo de melanoma es un modelo experimental idóneo, ya que se trata de un tumor animal autóctono primario"..., "Este tipo de tumores son considerados buenos modelos del cáncer humano. Es un tumor fácilmente trasplantable, mediante la inyección subcutánea de células tumorales viables LI y col, (1984); Kanclertz y col, (1986)".

Es necesario tener en cuenta que los tumores trasplantables progresan de forma rápida después de su implantación, mientras que en el humano este desarrollo es lento y sucede atravesando una serie de cambios celulares graduales que van desde los estadios pre-malignos hasta los malignos por lo que el sistema inmune se aclimata de forma lenta. Estas variaciones cinéticas pueden conducir a diferentes consecuencias inmunológicas tales como tolerancia, o activación, Rosenberg, (2004). En este modelo la velocidad de desarrollo de los tumores es muy alta, llevando a la muerte de los animales en pocos días. Esta característica lo transforma en un modelo muy exigente a la hora de hacer una evaluación de terapias antitumorales. Pudiendo actuar como limitante en cuanto a la sensibilidad del modelo para detectar productos potencialmente útiles.

Esto puede deberse al alto grado de malignidad de las células utilizadas; así como al número relativamente alto ( $1 \times 10^5$ ) de células tumorales viables implantadas en relación a la evolución natural de un proceso oncológico. Por lo tanto la adecuación del modelo mediante la atenuación de su malignidad; o extirpación de la masa tumoral primaria u otras técnicas podrían ser exploradas.

7.2) Evaluación de la terapia HANSI sobre el desarrollo de melanomas murinos.

7.2.1) Evolución tumoral

El grupo tratado recibió medicación durante 93 días previo a la inoculación de las células tumorales, el primer día (día 11) de control de la aparición de tumores el 60% (15 animales) de los ratones del grupo control presentaban tumores palpables, mientras que del grupo tratado lo hacían el 40% (10 animales).

El grupo tratado presentó un retraso de un día (en un intervalo de 6 días) en la aparición de tumores, cuando el grupo control presentaba un 100% de incidencia habían 3 animales (12%) del grupo tratado que aun no habían desarrollado tumor Figura 2. Agorio y col, (2007) reportan períodos libres de entre 20 y 26 días para animales tratados. Utilizando siempre concentraciones de células tumorales viables de  $1,5 \times 10^5$ , en animales tratados con vacuna viva atenuada en base a *Salmonella* como vector para la terapia génica de citocinas por vía oral contra melanoma.

Son varios los factores reportados que podrían estar influyendo en la falta de respuesta costatada en este ensayo. Algunos de ellos pueden ser la edad de los animales, la presencia del tumor primario y la interacciones celulares intrínsecas de la respuesta inmune.

Si bien la falta de respuesta al tratamiento puede estar relacionada como se comento antes con las características propias del modelo, es relevante igualmente considerar que HANSI presenta como antecedente de acción un incremento de la actividad de células NK. Los datos generados por Erlich y col, (1984) documentan una disminución de la actividad NK en los ratones durante los primeros 6 meses de edad, lo cual contribuye al crecimiento de determinados tumores trasplantados en ratones. No contamos con datos de fórmula leucocitaria o parámetros que permitan una evaluación del nivel de activación de la inmunidad innata (evaluación del brote respiratorio, capacidad fagocítica *in vitro* de macrófagos, activación de linfocitos *in vitro*, etc.), y unan aproximación en este aspecto.

No debe perderse de vista el hecho reportado por numerosos autores de la inmunosupresión ejercida por el tumor primario. Este hecho ha llevado a la generación de modelos de melanoma con extirpación del tumor primario (Danna y col, 2004) y evaluación sobre el control de metástasis. En el presente experimento los tumores primarios adquirieron volúmenes máximos de  $15614 \text{ mm}^3$  y promedio para el día 31 en 12 animales del grupo tratado de  $10656 \pm 7510$ , valores estos realmente importantes. Agorio y col, (2007) establece un máximo de  $4000 \text{ mm}^3$  como máximo de desarrollo tolerable aplicando la eutanasia en los animales que superan este valor.

Las interacciones celulares han sido reportadas por Llarregui y col, (2007) como células reguladoras contribuyen al escape y progresión tumoral a través de diferentes mecanismos inmunosupresores. Este amplio abanico incluye células dendríticas (DCs) inmaduras (iDCs), CDs maduras tolerogénicas, células supresoras de origen mieloide (MDSC), células dendríticas plasmocitoides (pDCs), macrófagos asociados a tumores con un fenotipo M2 (TAM), células T reguladoras naturales  $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FoxP3}^+$  (Tregs), células reguladoras inducibles productoras de IL-10 (Tr1) y células  $\text{CD4}^+$  NKT productoras de IL-13 y TGF- $\beta$ . La comprensión de los mecanismos a través de los cuales actúan estas células provocando inmunosupresión, es crítica para el diseño de nuevas estrategias de inmunoterapia.

## 7.2.2) Tiempo de sobrevida de los animales

Deber

Aunque por definición no se encuentra incluido dentro de este parámetro es interesante resaltar que durante el tiempo pre - inoculación de las células tumorales, no se registraron muertes.

En condiciones saludables el tiempo medio de vida de estos animales es de 790 días, para las hembras, y de 840 días para los machos promedio, en la Tabla 4 se comparan datos de distintas fuentes.

Tabla 3 Tiempo medio de vida (Tomada de Laboratorio IFFA CREDO).

	<b>Machos</b>	<b>Hembras</b>
Goodrick.	827d. $\pm$ 34	818d. $\pm$ 21
Kunstyr et Leuenberger, 1975.	878d. $\pm$ 10	794d. $\pm$ 6
Curtis, 1971.	Vida media: 600 días	

El tiempo de sobrevida en este ensayo fue de entre 19 y 46 (intervalo de 27 días) días para el grupo tratado "GT", este es mayor al reportado Lopez (1991) y menor al reportado por Agorio y col (2007), quien informa sobrevidas de entre 26 y 55 (intervalo de 29 días) días para animales tratados.

Aunque la diferencias entre los tratamientos no alcanzan a ser estadísticamente significativas, presentan una diferencia a favor del grupo tratado "GT"  $31,08 \pm 8,14$  y  $29,76 \pm 6,95$ , para el grupo control "GC" (Figura 3). Debe observarse además que los últimos dos individuos pertenecientes al GT fueron sacrificados en aplicación de los criterios de punto final del experimento (Tabla 2).

Son reiteradas las pequeñas diferencias en los parámetros evaluados a favor del grupo tratado. En temáticas como terapias antitumorales pequeñas mejoras o incluso mejoras parciales pueden llegar a ser de interés para maximizar las posibilidades de sobrevivencia digna de un individuo. Esto sumado a la falta de datos histopatológicos para los cuales se cuenta con muestras aun no procesadas. Es que se plantea que sería interesante estudiar el tratamiento HANSI como co adyuvante de una protocolo quimioterápico tradicional.

## **8) CNCLUSIONES.**

El modelo de melanoma murino, reafirma ser una herramienta valida para la búsqueda de productos potencialmente anticancerígenos.

Los resultados del ensayo demuestran que en este modelo experimental, la terapia HANSI no modificó ninguno de los parámetros evaluados: tiempo libre de tumor, volumen tumoral, tiempo de sobrevida y peso vivo cuando se lo comparó con el control.

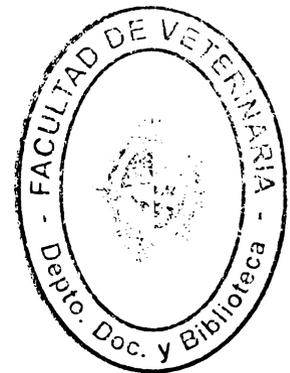
## 9) BIBLIOGRAFIA

1. Abbas, A., Lichtman, A., Pillai, S. (2008). Inmunidad antitumoral. En . Abbas, A. Lichtman, S. Pillai, *Inmunologia celular y molecular 6ª ed.* Valencia: Elsevier, p. 397-419
2. Agorio, C. (2005). Monografía: Vacunas en Melanoma; Facultad de Medicina, Escuela de Postgraduados, Catedra de Dermatología. *Monografía: Vacunas en Melanoma* . Montevideo, Montevideo, Uruguay.
3. Agorio, C., Schreiber, F., Sheppard, M., Mastroen, P., Fernandez, M., Martinez, M., y otros. (2007). Live attenuated Salmonella as a vector for oral cytokine gene therapy in melanoma. *The Journal of Gene Medicine*, 9: 416–423.
4. Aguirre, G., Costa, J., Fernandez, M. (2002). HANSI: ESTUDIOS “IN VIVO” SOBRE CARCINOMAS EXPERIMENTALES. 8º Congreso Brasileiro de Ciencia em Animáis de Laboratorio y 4º congreso mundial de ciencia en animáis de laboratorio. Brasil.
5. Balch, C. M. (2001). Final Version of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Cutaneous Melanoma. *Journal of Clinical Oncology*, 19: 3635-3648.
6. Beausoleil y Delgado, I. A.-M.-M.-C. (2008). Alcance, limitaciones y perspectivas éticas de los sistemas experimentales murinos en la evaluación de estrategias inmunoterapeuticas del cancer. *REDVET. Revista electrónica de Veterinaria*, 9: 12 -16.
7. Benavides, F. y Guenet, J. (2000). Modelos murinos de enfermedades humanas. *MEDICINA (Buenos Aires)*; 61: p 215-231.
8. Cañigüeral, S. y Vila, R. (1998). Fitoterapia: conceptos y limites. Fuentes de informacion. En A. Arteche, B. Vanaclocha, I. Guenechea, R. Martinez, *Fitoterapia*, 3ª ed. *Vademecun de prescripcion. Plantas medicinales*. Barcelona: Masson p 23-31.
9. Danna, E., Sinha, V., Gilbert, M., Clements, V., Pulaski, B., & Ostrand-Rosenberg, S. (2004). Surgical Removal of Primary Tumor Reverses Tumor-Induced Immunosuppression Despite the Presence of Metastatic Disease. *Cancer Reserch* , 2205-2211.
10. Davis, L. E. (1987). *Manual de terapeutica de los pequeños animales*. Barcelona: SALVAT.
11. Ehrlich, R., Smorodinsky, N., Efrati, M., Yaakubowicz, M., & Witz, I. (1984). B16 melanoma development, NK activity cytostasis and natural antibodies in 3 and 12 month old mice. *British Journal of Cancer*. 49(6): 769–777.
12. Eisenberg DM, K. R. (1993). Unconventional medicine in the United States. Prevalence, costs, and patterns of use. *The New England Journal of Medicine*. 4: 246-52.
13. Elmslie RE, D. S. (1991 ). Interleukins: biological properties and therapeutic potential. *Journal of Internal Veterinarian Medicine*;5(5), 283-293.
14. Llarregui, J., Croci, D., Toscano, M., & Bianco, G. (2007). Integrandó el universo de células regulatorias en el cancer un obstáculo crítico para el éxito de estrategias de inmunoterapia. *Medicina (Buenos Aires)* , p 25-31.

15. Institute for Laboratory Animal Research (ILAR). (1993). *Care and handling of laboratory animals*, Copyright 1991 by Current Protocols.
16. Itoh, K., Yamada, A., Mine, T. y Noguch, M. (2009). Recent Advances in Cancer Vaccines: An Overview. *Japanese Journal of Clinical Oncology*; 39(2), 73–80.
17. Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. y Sholomochik, M. J. (2003). Manipulación de la respuesta inmunitaria. En J. Charles A Janeway, P. Travers, M. Walport, y M. J. Sholomochik, *Inmunobiología. El sistema inmunitario en condiciones de salud y enfermedad. 2ª ED.* Barcelona: Masson. 553-576.
18. Jemal, A., Siegel, R., Ward, E., Hao, Y. y Xu, J. (2009). Cancer Statistics, 2009. *Cancer Journal of Clinical*. 59., 225-249.
19. Klug, W., Cummings, M. y Spencer, C. (2006). Regulación del ciclo celular y cáncer. En W. Klug, M. Cummings y C. Spencer, *Conceptos de Genética.* (Barcelona): Pearson Educacion, p. 501-527
20. Kumar, B; Abbas, A; Fausto, N; *Robbins y Cotran* (2006). *Patología estructural y funcional 7ª ed.* Madrid: Elsevier. p. 273-346.
21. Kunz-Schughart, L. y Mueller-Klieser, W. (2000). Three dimensional culture. En J. R. Masters, *Animal Cell Culture 3ª ed.* New York: Oxford University, p 123-149.
22. Lanore, D., y Delprat, C. (2004). Efectos secundarios de la quimioterapia. En Lanore, D y Delprat, C. *Quimioterapia anticancerosa.* Barcelona: Masson, p. 47-65.
23. Lopez, E. (1991). Estudio del melanoma B 16 trasplantado en su portador singenoco el raton C57BL/EJ inmuno terapia especifica. *Tesis Doctoral. Universidad complutense, Departamento de medicina II Dermatología facultad de Medicina .* Madrid. p 1-263.
24. Lunt, S. J., Chaudary, N., y Hill, R. P. (2009). The tumor microenvironment and metastatic disease. *Clinical Exp Metastasis*; N° 26 , p 19–34.
25. Mestas, J., y Hughe, C. (2004). Review: Of Mice and Not Men: Differences between mouse and men. *The Journal of Immunology* , 2731-2738.
26. Ministerio de salud publica (MSP), e. (2006). *Comisión honoraria de lucha contra el cancer.* Disponible en: [http://www.urucan.org.uy/uilayer/ve/inc\\_mor\\_2002\\_2005/Torta%202006.pdf](http://www.urucan.org.uy/uilayer/ve/inc_mor_2002_2005/Torta%202006.pdf). Fecha de consulta: 19/9/2009.
27. MSP, M. d. (2006). *Ministerio de Salud Publica Republica Oriental de Uruguay.* Disponible en: [www.msp.gub.uy/andocasociado.aspx?312,15900](http://www.msp.gub.uy/andocasociado.aspx?312,15900). Fecha de consulta: 31/7/2009.
28. MSP, M. d. *Ministerio de Salud Publica.* Disponible en: [http://www.msp.gub.uy/uc\\_2618\\_1.html](http://www.msp.gub.uy/uc_2618_1.html). 19/8/2009.
29. National Cancer Institiut (2009). *El cancer:* Hojas informativas, La medicina complementaria y alternativa en el tratamiento del cáncer: Disponible en: <http://www.cancernet.gov/espanol/cancer/hojas-informativas/medicina-complementaria-alternativa-respuestas>. Fecha de consulta:6/9/2009
30. Nesmeianov, A. (1956). Utilizacion de los elementos radiactivos como emisores de radiacion. En A. Nesmeianov, *Elementos radiactivos y sus aplicaciones.* Moscu. p 132-145.

31. Ogilvie, G. K., y Moore, A. S. (2008). Abordaje del paciente oncológico: estadificación. En G. K. Ogilvie, y A. S. Moore, *Manejo del paciente canino oncológico. Guía práctica para la atención compasiva*. Buenos Aires: Inter - medical p 17-21.
32. Ogilvie, G., Moore, A. (2008). ¡Biopsia, biopsia, biopsia!, teoría y práctica. En G. Ogilvie, y A. Moore, *Manejo del paciente canino oncológico. Guía práctica para la atención compasiva*. Buenos Aires: Intermedica, p 71-76.
33. Ogilvie, G., y Moore, A. (2008). Medicina veterinaria complementaria y alternativa: propiedades, usos y manejo del paciente. En G. Ogilvie, y A. Moore, *Manejo del paciente canino oncológico. Guía para la atención compasiva*. Buenos Aires: Intermedica, p. 225-237.
34. Ogilvie, G., y Moore, A. (2008). Terapia radiante: propiedades, usos y manejo del paciente. En G. Ogilvie, y A. Moore, *Manejo del paciente canino oncológico. Guía práctica para la atención compasiva*. Buenos Aires :Intermedica, p 186-210.
35. Ogilvie, G., y Moore, A. (2008). Quimioterapia: propiedades, usos y manejo del paciente. En G. Ogilvie, y A. Moore, *Manejo del paciente canino oncológico. Guía práctica para la atención compasiva*. Buenos Aires: Intermedica, p 157-183.
36. OMS, O. m. (2008). *Informe sobre la salud en el mundo 2008. La atención primaria de salud: Más necesaria que nunca*. Suiza: OMS.
37. Pagano, M., y Gauvreau, K. (2001). Análisis de la supervivencia. En M. Pagano, y K. Gauvreau, *Bioestadística*. DF Mexico: Math. Learning. p. 488-513.
38. Qi-Hong, Z., Ying, Z., y Liu, Y. (2009). Anticancer effect of realgar nanoparticles on mouse melanoma skin cancer in vivo via transdermal drug delivery. *Medical Oncology* .
39. Roitt, I., y Delves, P. (2003). Inmunología tumoral. En I. Roitt, y P. Delves, *Inmunología. Fundamentos 10ª Ed.* Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, p 427-453.
40. Rosenberg, S. O. (2004). Review: Animal models of tumor immunity, immunotherapy and cancer vaccines. *Current Opinion in Immunology*, 16 : 143–150.
41. Rosenthal, R. C. y Jeglum, K. A. (1996). Tratamiento multidisciplinario: uso conjunto y fundado de los mejores tratamientos disponibles. En R. C. Rosenthal, *Clinicas Veterinarias de Norteamérica, Controversias en oncología clínica. Volumen 1/1996*. Mexico: Mc Graw - Hill Interamericana. p. 1 - 9
42. See, D. M., Tiles, J. G., y Bertacchini, C. (1998). Inmunomodulatory effects of a homeopathic agent. *American Journal of Natural Medicine*, 5 : 6.
43. Sociedad Uruguaya de Veterinarios Especialistas en Pequeños Animales. World Small Animal Veterinary Association. (2005). Oncología, conferencistas Josep Pastor, Pedro Martino . *Curso de Educación Continua para América del Sur. Montevideo, UY. 10 dic. 2005.,.* Montevideo (Uruguay). p. 1-9.

44. Spangler, W. L., y Kass, P. (2006). The histologic and epidemiologic bases for prognostic considerations in canine melanocytic neoplasia. *Veterinary Pathology* 43:136–149.
45. Talmadge, J. E., Singh, R. K., Fidler, I. J., y A., R. (2007). Review: Murine Models to Evaluate Novel and Conventional Therapeutic Strategies for Cancer. *The American Journal of Pathology*, 170 (3): 793-804.
46. Tizard, I. R. (2007). Resistencia a tumores. En I. R. Tizard, *Inmunologia Veterinaria*. Mexico: Mc Graw - Hill Interamericana, p 319 - 332.
47. UK Co-ordinating Committee on Cancer Research. (1997). *UKCCCR Guidelines for the Welfare of Animals in Experimental Neoplasia*, 2<sup>a</sup> Ed. Londres.
48. Uruguay, H. (2009). *HANSI Uruguay*. Disponible en: <http://hansi.4d2.net/>. Fecha de consulta: 26/10/2009
49. Venavidez, F., y Guenet, J. L. (2000). Modelos murinos en enfermedades humanas. *Medicina (Buenos Aires)* 2000; 61: 215-231.



## 10) ANEXOS.

### Anexo 1 Estadificación clínica de tumores de la cavidad bucal.

Estadio	T	N	M
I	T1	N0, N1a o N2a	M0
II	T2	N0, N1a o N2a	M0
III	T3	N0, N1a o N2a	M0
IV	Cualquier T		
	Cualquier T	N 2b o N3	M0
	Cualquier T	Cualquier N	M1

T: tumor primario

T0= Sin signos de tumor

T1= tumor con diámetro máximo <2cm

T1a= Sin invasión ósea

T1b =Con invasión ósea

T2 =Tumor con diámetro entre 2 y 4 cm.

T2a= Sin invasión ósea

T2b =Con invasión ósea

T3=Tumor con diámetro > 4 cm.

T3a= Sin invasión ósea

T3b=Con invasión ósea

N: Ganglio linfático regionales (GLR)

N0=sin signos que estén afectados los GLR

N1=Ganglios ipsilaterales móviles

N1a= Ganglios histológicamente negativos

N1b= Ganglios histológicamente positivos

N2=ganglios móviles contra laterales o bilaterales

N2a= Ganglios histológicamente negativos

N2b= Ganglios histológicamente positivos

N3=Ganglios fijos

M: Metástasis a distancia

M0=Sin signos de metástasis a distancia.

M=con metástasis a distancia.

Anexo 2 Tablas de conversión de Kg a superficie corporal en m<sup>2</sup>.

Perros

Peso kg	m <sup>2</sup>	Peso kg	m <sup>2</sup>	Peso kg	m <sup>2</sup>
1	0,10	21	0,75	41	1,17
2	0,16	22	0,78	42	1,19
3	0,21	23	0,80	43	1,21
4	0,25	24	0,82	44	1,23
5	0,29	25	0,85	45	1,25
6	0,33	26	0,87	46	1,26
7	0,36	27	0,89	47	1,28
8	0,40	28	0,91	48	1,30
9	0,43	29	0,93	49	1,32
10	0,46	30	0,95	50	1,34
11	0,49	31	0,97	51	1,35
12	0,52	32	0,99	52	1,37
13	0,55	33	1,02	53	1,39
14	0,58	34	1,04	54	1,41
15	0,60	35	1,06	55	1,42
16	0,63	36	1,08	56	1,44
17	0,66	37	1,09	57	1,46
18	0,68	38	1,11	58	1,47
19	0,71	39	1,13	59	1,49
20	0,73	40	1,15	60	1,51

Gatos

Peso kg	m <sup>2</sup>	Peso kg	m <sup>2</sup>
2,0	0,16	4,80	0,28
2,2	0,17	4,60	0,27
2,4	0,18	4,80	0,28
2,6	0,19	5,00	0,29
2,8	0,20	5,20	0,30
3,0	0,21	5,40	0,30
3,2	0,22	5,60	0,31
3,4	0,22	5,80	0,32
3,6	0,23	6,00	0,33
3,8	0,24	6,20	0,33
4,0	0,25	6,40	0,34
4,2	0,26	6,60	0,35
4,4	0,27	6,80	0,35
4,6	0,27	7,00	0,36

## Anexo 3 Tablas de toxicidades asociadas a algunas drogas antineoplásicas.

**Tabla 21-1 Toxicidades asociadas con algunas drogas antineoplásicas y hormonas disponibles en el comercio**

<b>Droga</b>	<b>Toxicidad aguda</b>	<b>Toxicidad retardada</b>
L-asparaginasa	Anafilaxis o hipersensibilidad (menos probable por ruta IM), náusea y vómito, fiebre, escalofríos, dolor abdominal e hiperglucemia que lleva al comapático	Depresión o hiperexcitabilidad del SNC, pancreatitis hemorrágica aguda, defectos hemostáticos, trombosis, daños renal y he- (no comunicado en perros pero registrado en otras especies)
Bleomicina	Náusea y vómito, fiebre, anafilaxis y otras reacciones alérgicas	Neumonitis y fibrosis pulmonar, salpullido, alopecia
Busulfan	Náusea y vómito, rara vez, diarrea	Supresión de médula ósea, infiltrados y fibrosis pulmonares, hiperpigmentación, alopecia, leucemia
Carmustina	Náusea y vómito, y flebitis local	Leucopenia y trombocitopenia (pueden ser prolongadas), fibrosis pulmonar (puede ser irreversible), daño renal, daño hepático reversible
Clorambucilo	Supresión de médula ósea, infiltrados y fibrosis pulmonares, leucemia, toxicidad hepática y alucinaciones	Ninguna
Cisplatino	Nefrotoxicidad aguda, náusea, vómito	Neutropenia, trombocitopenia, alopecia, náusea retardada, diarrea, neuropatía, sordera
Ciclofosfamida	Náusea y vómito e hipersensibilidad del tipo I (anafilactoide)	Supresión de médula ósea, cistitis hemorrágica, fibrosis y cáncer vesical, esterilidad (puede ser temporal), infiltrados y fibrosis pulmonares, hiponatremia, leucemia
Citosina arabinósido	Náusea y vómito, diarrea y anafilaxis	Supresión de médula ósea, ulceración oral, daño hepático, fiebre (no comunicada en perros pero observada en otras especies)
Dacarbacina	Náusea y vómito, diarrea, anafilaxis y dolor en la administración	Supresión de médula ósea, deterioro renal, necrosis hepática, fotosensibilidad, alopecia
Dactinomicina	Náusea y vómito, diarrea, reacción local y flebitis, reacción anafilactoide	Estomatitis, ulceración oral, supresión de médula ósea, alopecia, foliculitis, dermatitis en áreas previamente irradiadas
Daunorrubicina	Náusea y vómito, diarrea, daño tisular local marcado y necrosis con extravasación, cambios ECG transitorios, y reacción anafilactoide	Supresión de médula ósea, cardiotoxicidad (puede ser irreversible), alopecia, anorexia, diarrea, fiebre y escalofríos
Doxorrubicina	Náusea y vómito, daño tisular local marcado y necrosis con extravasación, diarrea y colitis, cambios ECG transitorios, arritmias ventriculares, reacción anafilactoide, y urticaria y prurito luego de una inyección	Supresión de médula ósea, daño renal, cardiotoxicidad, estomatitis, anorexia, diarrea, fiebre, alopecia

<b>Droga</b>	<b>Toxicidad aguda</b>	<b>Toxicidad retardada</b>
Etopósido (VP16)*	Náusea y vómito, hipotensión marcada, anafilaxis, reacciones cutáneas, diarrea y fiebre	Supresión de médula ósea, neuropatía periférica, reacciones alérgicas, daño hepático, alopecia
5-fluorouracilo**	Convulsiones y otras neurotoxicidades	Supresión de médula ósea, alopecia, náuseas
Hidroxiurea***	Náusea y vómito	Supresión de médula ósea, estomatitis, disuria, alopecia
Lomustina (CCNU)	Náusea y vómito	Leucopenia y trombocitopenia retardadas (pueden ser prolongadas), aumento transitorio de actividad aminotransferasa, reacciones neurológicas, fibrosis pulmonar
Mecloretamina	Náusea y vómito, reacción local y flebitis	Supresión de médula ósea, diarrea, úlceras orales, infiltrados y fibrosis pulmonares, leucemia, alopecia
Melfalan	Náusea leve y reacciones de hipersensibilidad	Supresión de médula ósea (especialmente plaquetas), infiltrados y fibrosis pulmonares, leucemia
Mercaptopurina	Náusea y vómito, diarrea	Supresión de médula ósea y colestasis, necrosis hepática (rara), ulceraciones orales e intestinales, pancreatitis
Metotrexato	Náusea y vómito, diarrea, fiebre y anafilaxis	Ulceraciones orales y gastrointestinales, supresión de médula ósea, toxicidad hepática (incluyendo cirrosis)
Mitotano	Náusea y vómito, diarrea	Insuficiencia adrenal, depresión del SNC, salpullido, albuminuria, hipertensión
Mitoxantrona	Náusea y vómito	Supresión de médula ósea
Tiotepa	Náusea y vómito, dolor local y esfacelo perivascular con extravasación	Supresión de médula ósea, infiltrados y fibrosis pulmonares, leucemia
Vinblastina	Náusea y vómito, reacción local y flebitis con extravasación	Supresión de médula ósea, estomatitis, pérdida de reflejos tendinosos profundos, dolor de quijada, mialgia, íleo paralítico, secreción de HAD inapropiada, alopecia
Vincristina	Esfacelo con extravasación	Neuropatía periférica, supresión de médula ósea leve, constipación, íleo paralítico, secreción de HAD inapropiada, daño hepático, dolor de quijada, convulsiones, alopecia

No comunicada en perros.

\*No recomendada en perros.

\*\*Todavía investigacional en perros.

AD = hormona antidiurética; SNC = sistema nervioso central; ECG = electrocardiograma.

daptado de Ogilvie GK: Principles of oncology, in Morgan RV (ed): *Handbook of Small Animal Internal Medicine*. Philadelphia, Churchill Livingstone, 1992, pp 799-812; con autorización.

Tomado de (Ogilvie & Moore, 2008)

Anexo 4 Tabla de sustancias empleadas como modificadores de la respuesta biológica.

<b>Inmunomodulantes inespecíficos</b>	
Bacilo de Calmette- Guérin	C.parvum
Staphage lysate	L-MTP-PE
Levamisol	Cimetidina
Peroxicam	Acemanano
Regressin-V	Retinoides
Vitamina-C	Acido foloico
Cinc	Selenio
Vitamina-E	
<b>Linfocinas/monocinas</b>	
Interleuquina-1	Interleuquina-2
Interferón	Factor de necrosis tumoral
<b>Terapia celular adoptiva</b>	
Células asesinas activadas por linfocinas	
Linfocitos infiltrativos de tumor	
<b>Inmunoterapia</b>	
Anticuerpos anti células de linfoma	
<b>Factores de crecimiento</b>	
Factor estimulante de colonias de granulocitos (filgrastim)	
Factor estimulante de colonias de granulocitos - macrófagos (sargramostin)	
Factor estimulante de colonia macrófago	

## Anexo 5: Tabla antígenos de rechazo tumoral.

Clase de antígeno	Antígeno	Naturaleza del antígeno	Tipo de tumor
Oncogén mutado op supresor de tumor específico de tumor	Cinasa 4 dependiente de ciclina	Regulador del ciclo celular	Melanoma
	Beta- catenina	Relevo en la vía de traducción de señales	Melanoma
	Caspasa-8	Regulador de apoptosis	Carcinoma de células escamosas
Célula germinal	MAGE-1 , MAGE-3	Proteínas testiculares normales	Melanoma, mama, glioma
Diferenciación	Tirosinasa	Enzima en la vía de síntesis de melanina	Melanoma
	Ig de superficie	Anticuerpo específico después del re-ordenamiento génico en una clona de células	Linfoma
Expresión génica anormal	HER-2/neu	Receptor tirocinasa	Mama, Ovarios
Modificación post transicional anormal	MUC-1	Mucina sub glucosilada	Mama, Páncreas
Proteína oncovirica	Proteínas del HPV de tipo 16 E6 y E7	Productos génicos de transformación vírica	Carcinoma cervical

## Anexo 6: Cronograma de actividades.

Objetivo esp./ Mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1												
2												
3												

 1. Poner a punto el cultivo de las células tumorales *in vitro* como fuente de implante de células tumorales.

 2. Estudiar la evolución tumoral en el ratón a partir de la inoculación subcutánea de las células tumorales.

 3. Evaluar la influencia del tratamiento HANSI sobre el desarrollo tumoral y la supervivencia de los animales.

#### Anexo 7: Sistema de identificación de animales.

La codificación se establece mediante el grupo al que pertenece, control "P" y tratamiento "T". La caja en que se encuentra el ratón, habiendo 4 cajas por tratamiento y cada caja posee un máximo de siete ratones. Y la señalización mediante marca permanente en el pabellón auricular, pudiendo ser esta una perforación al centro del pabellón "B" o una incisión en forma de "V" en los márgenes del mismo, en oreja izquierda "l", derecha "d" o ambas.

Ej: la codificación, P4 B1, establece que el animal es del grupo control "P", de la caja "4", con perforación central "B", en oreja izquierda "l".

#### Anexo 8. Planilla de evolución Tumoral.

Fecha	Animal N°	Peso (g)	Tumor		Observaciones
			Dimensiones (mm)	Ulceracion	