

**UNIVERSIDAD ABIERTA INTERAMERICANA
FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD**



**ACTIVIDAD ANTITUMORAL DE LOS BISFOSFONATOS. PERSPECTIVA DE
INVESTIGACIÓN FARMACOLÓGICA.**

Por:

Lilian Andrea Granada Herrera

Tutora:

Dra. Alicia G Fuchs

Título a obtener:

Magíster En Investigación Clínica Farmacológica

**EI TRABAJO SE REALIZÓ EN EL CAECIHS (Centro de Altos Estudios en Ciencias
Humanas y de la Salud) PERTENECIENTE A LA UNIVERSIDAD ABIERTA
INTERAMERICANA. www.uai.edu.ar**

Diciembre 2021

Agradecimientos

Lic. Mariana Ferrulli

Dra. Andrea F Maglioco

Lic. Melisa S. Barbery Venturi

Dr. Emilio Roldán

Agradecimientos

Recuerdo el día que decidí realizar mi tesis en el CAECIHS, recuerdo la mezcla de sentimientos. Llevaba unos meses viviendo en Argentina y como extrajera mis ojos se maravillaban al ver todas las oportunidades que se me estaban presentando. Desde el primer momento que conocí a la Dra. Alicia Fuchs, mi tutora de tesina, pude ver su pasión por la investigación y su buena disposición para que emprendiéramos juntas este nuevo desafío. La Dra. Alicia siempre estuvo guiándome y siempre estaré agradecida, ya que en cada asesoría me brindaba las enseñanzas que solo puede dar alguien tras muchos años de experiencia y conocimientos en este hermoso rubro. Por mi parte fui feliz de empezar con este gran reto. No fue fácil, ello conllevó un gran sacrificio y dedicación, pero me dejó un mar de conocimientos, y una gran satisfacción.

Agradezco de igual forma al grupo entero del CAECIHS, fue muy lindo poder conocerlos y compartir cada día. Gracias a Mariana Ferrulli, con quien tuve la fortuna de trabajar, y de quien aprendí mucho. Gracias por enseñarme el manejo del laboratorio y por ser más que una compañera de trabajo, una amiga. Al Dr. Emilio Roldán y por su intermedio a Gador SA. Por haber provisto sin cargo los bisfosfonatos utilizados en este estudio. A la Fundación Iberoamericana de Estudios Superiores por haber provisto los materiales que se han utilizado en este trabajo.

A mis padres les agradezco de forma infinita todo su amor y apoyo incondicional, siempre recuerdo sus palabras, la manera en que me impulsaron aun estando en la distancia. Estoy segura que la realización de mis proyectos son motivo de felicidad para ellos. A mi esposo gracias por mostrar interés en los temas que son tan importante para mí, por tu compañía y por la paciencia en este proceso de largas jornadas de lectura y estudio, y por ayudarme a cumplir mis propósitos. A mi suegra Nora, gracias por cada impulso, estuviste siempre ahí con tus sabios consejos.

1 CONTENIDO

2	ABREVIATURAS.....	7
3	RESUMEN	9
3.1	Hipótesis	10
3.2	Objetivo primario	10
3.3	Experimento 1.....	10
3.3.1	Metodología.....	10
3.3.2	Resultados	12
3.4	Experimento 2.....	13
3.4.1	Metodología.....	13
3.4.2	Resultados	14
3.5	Conclusión.....	14
4	INTRODUCCIÓN	16
4.1	Bisfosfonatos.....	16
4.1.1	Antecedentes	16
4.1.2	Generalidades	16
4.1.3	Uso terapéutico	17
4.1.4	Mecanismo de acción	18
4.1.5	Farmacocinética	21
4.1.6	Efectos adversos	22
4.2	Cáncer colorrectal	23
4.2.1	Epidemiología	23
4.2.2	Causas del cáncer colorrectal.....	24
4.2.3	Fisiopatología.....	25
4.2.4	Pruebas de detección.....	27
4.2.5	Tratamiento	28
4.3	Aspectos generales en la investigación farmacológica	28
4.3.1	Etapas preclínica.....	29

4.3.2	Etapa clínica	31
4.4	Cultivos celulares	33
4.5	Bisfosfonatos en la oncología. Despertando una perspectiva de futuro	35
5	HIPÓTESIS.....	37
6	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN	38
6.1	Objetivo primario	38
6.2	Objetivos secundarios	38
7	MATERIALES Y MÉTODOS	39
7.1	Materiales	39
7.1.1	Cultivo celular	39
7.1.2	Reactivos.....	39
7.1.3	Plásticos y otros	40
7.1.4	Equipos	40
7.2	Métodos.....	41
7.2.1	Células utilizadas en este estudio.....	41
7.2.2	Bisfosfonatos (Laboratorios Gador SRL)	41
7.2.3	Preparación de medios	41
7.2.4	Mantenimiento de células y repiques	42
7.2.5	Descongelamiento y congelamiento	42
7.2.6	Tripsinización	43
7.2.7	Recuento celular	43
7.2.8	Siembra de células en las microplacas	43
7.2.9	Medición de proteínas método Bradford	44
8	EXPERIMENTOS EN ESPECTROFLUORÓMETRO	45
8.1	Preparación de Fluo 4 AM y mecanismo de acción	45
8.2	Preparación de los Bisfosfonatos	45
8.3	Soluciones de sales.....	46
8.4	Marcación celular con Fluo 4AM	46
8.5	Medición de fluorescencia en equipo GloMax: desafío con BFS... ..	46
9	ESTADÍSTICA.....	48

10	RESULTADOS	49
10.1	Evaluación de los efectos antiproliferativos de los BF en las células HT29 y VERO.....	49
10.1.1	Efecto de los bisfosfonatos sobre el crecimiento de las células HT29 y VERO.....	49
10.1.2	Proteínas totales en células HT29 y VERO expuestas al ibandronato y etindronato	51
10.1.3	Concentración final de proteínas por célula en las células HT29 y VERO	52
10.2	Efecto de los BF en la entrada de Ca^{2+} en células HT29 y VERO.	54
10.2.1	Fluorescencia obtenida en células HT29 y VERO luego de la adición de BF, Cl_2Ca , $Gluc_2Ca$	54
10.2.2	Concentraciones (μM) de Ca^{2+} en las células HT29 y VERO	57
10.3	Escalamiento de los resultados experimentales a la investigación clínica farmacológica	59
11	DISCUSIÓN.....	62
12	BIBLIOGRAFÍA.....	66

2 ABREVIATURAS

APC: *Adenomatous Poliposis Coli*

A₄₈₀: Absorbancia a 480 nanómetros

BF: Bisfosfonatos

BAPTA: 1,2-bis(o-aminofenoxi) etano -N,N,N',N'-ácido tetraacético

BSA: Albúmina Sérica Bovina

CLO: Clodronato

CCR: Cáncer colorrectal

DCC: *Deleted in Colorectal Cancer*

DMSO: Dimetil Sulfóxido

DMEM-F12: Dulbecco's Modified Eagle's Medium/Nutrient F-12

EHDP: Etidronato

EGTA: Etilen glicol bis- N,N,N, N ácido tetraacético

FPP: Farnesilpirofosfato

FPPS: Farnesilpirofosfato sintasa

GGPP: Geranilgeranilpirofosfato

GTP: Trifosfato de guanosina

hrs.: horas

HT29: Línea celular provenientes de adenocarcinoma de colon humano

IB: Ibandronato

K-RAS: *Kirsten rat sarcoma viral oncogene*

LI: Lidandronato

mM: Milimolar

M: Molar

mg: Miligramo

NBF: Bisfosfonatos nitrogenados

nNBF: Bisfosfonatos no nitrogenados

nM: Nanomolar

OLP: Olpandronato

PAM: Pamidronato

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute*

SFB: Suero Fetal Bovino

μ M: Micromolar

μ g: Microgramo

μ m: Micrómetro

VERO: Línea celular provenientes de riñón de mono verde

ZOL: Ácido Zoledrónico

3 RESUMEN

El cáncer colorrectal (CCR) es un cáncer con gran prevalencia entre la población, es una enfermedad muy heterogénea, causada por la asociación entre factores genéticos y ambientales. Los tratamientos convencionales suelen ser exitosos, pero en aquellos casos donde el carcinoma resiste al tratamiento, reanuda su crecimiento con mayor patogenicidad. El tratamiento del CCR consiste en cirugía durante las etapas iniciales de la enfermedad, en conjunto con quimioterapia y radioterapia a partir del estadio III. Para estos tratamientos adyuvantes se utilizan fármacos con fuertes efectos secundarios y con la respuesta no muy eficaz. Por tal motivo la investigación farmacológica continúa con el estudio y desarrollo de nuevas moléculas con el objetivo de desarrollar fármacos con mayor eficacia y menos efectos adversos, logrando aumento de la supervivencia y mejor calidad de vida para los pacientes. La investigación está orientada a diseñar combinaciones de fármacos y tratamientos como: terapias hormonales, inhibidores de transducción de señales, moduladores de la expresión de genes, inductores e inhibidores de apoptosis, inhibidores de la angiogénesis, inmunoterapias y toxoides con transportadores dirigidos hacia el tejido tumoral. Diversos estudios preclínicos efectuados en varios tipos de tumores sugieren que los bisfosfonatos (BF) pueden reducir la metástasis ósea y visceral a través de la inhibición de la angiogénesis, de la disminución de la adhesión de células tumorales en el hueso y la inducción de la apoptosis de células tumorales (1)(2). Estos resultados son dependientes del tipo de BF utilizado, siendo algunos de ellos más efectivos que otros, en función de sus diferentes radicales químicos.

La heterogeneidad de la potencia de cada BF depende de su estructura química y del metabolismo de la célula diana, por lo cual se evaluó el efecto de dos BF, ibandronato (IB) (aminobifosfonato-NBF) y etidronato (EHDP) (no-aminobifosfonato-nNBF) sobre dos líneas celulares. El estudio del efecto biológico de los BF sobre el crecimiento celular se realizó sobre la línea celular HT29, provenientes de un carcinoma de colon humano y una línea celular normal, las células VERO, provenientes de riñón de mono verde. El estudio de su mecanismo de acción se realizó midiendo el influjo de calcio intracelular, porque este es uno de los mecanismos de acción postulados para estos compuestos.

3.1 Hipótesis

Los BF son selectivamente citotóxicos sobre las células tumorales y su utilización en la terapia de CCR, podría resultar rápidamente utilizables porque la mayoría de los BF se encuentran aprobados para otros usos terapéuticos.

3.2 Objetivo primario

Determinar la actividad citotóxica selectiva del IB y EHDP sobre un modelo de células tumorales humanas, la línea celular HT29, proveniente de un adenocarcinoma colónico humano y utilizando como control las células VERO, línea celular establecida a partir de riñón de mono verde, son células transformadas no tumorales. Ambas líneas celulares son bien conocidas y establecidas, de tipo epiteliales con capacidad absortiva-secretora. La experimentación se realizó en cultivo de células utilizando dosis *in vitro* escalables para el tratamiento humano.

3.3 Experimento 1

3.3.1 Metodología

El diseño del estudio fue experimental, se manipuló de manera intencional la variable independiente tratamiento con BF (Lab. Gador SA) observando y midiendo sus efectos en la variable dependiente (Células HT29 y VERO). El primer estudio se basó en evaluar el crecimiento celular *in vitro* mediante el conteo de células viables y la concentración de proteínas celulares. Las células HT29 y VERO se sembraron en una placa de 96 pocillos y se desafiaron a las 24 horas de sembradas con BF: IB o EHDP en dos concentraciones: 1 y 10, μM . Se utilizaron estas concentraciones porque resultan escalables para el tratamiento en humanos. En el pocillo del control se sembraron células (HT29 o VERO) con medio de cultivo con solución fisiológica. La cantidad de células iniciales se estandarizó teniendo en cuenta las características del crecimiento celular. En cada pozo se sembraron 2000 células VERO o 3000 células HT29. EL tamaño de muestra por cada experimento corresponde a 54 pozos (4 experimentos x 3 repeticiones). Se midió la viabilidad celular luego de la adición de los BF y

se contaron al microscopio las células viables, por el método de *trypan blue*, que tiñe las células muertas. La técnica de concentración proteica fue la reacción de Bradford.

El segundo estudio evaluó el efecto del EHDP y el IB sobre la concentración de Ca^{2+} intracelular en la línea celular HT29 y VERO. La dinámica del calcio se estudió por método fluorescente utilizando el Fluo-4AM en un espectrofluorómetro en presencia de dos sales de calcio, gluconato (Gluc_2Ca) y cloruro (Cl_2Ca). El Gluc^- es un anión impermeable a la membrana celular y el Cl^- es permeable, permitiendo el estudio de la dinámica del Ca^{2+} en dos situaciones diferentes, cuando se acompaña de la dinámica del anión Cl^- y en situación de movilización del catión Ca^{2+} únicamente. Un tercer capítulo consiste en una evaluación teórica del escalamiento de los BF conocidos hacia este nuevo uso terapéutico.

Esquema de placa de 96 pocillos. El experimento 1 se realizó en Células HT29 y células VERO

Muestra sembrada por triplicado

Día cero: Se utilizaron células del stock congelado en N_2 líquido, dentro de 5 pasajes consecutivos. (VERO obtenidas de ABAC y HT29 del Instituto Leloir). Luego de descongeladas se sembraron en una botella y a la semana se tripsinizaron y se diluyeron a 20.000 y 30.000 células por ml de medio de cultivo correspondiente para ser sembradas en las placas de 96 pocillos. Medio de cultivo: VERO RPMI y HT29 DMEM/F12; 10 %. Suero fetal bovino y antibióticos.

Día 1: Adición de BF. Stock diluido en buffer fosfato (pH 7-7,2) a concentración final de 1 y 10 μM . Proporción (BF: Medio de cultivo) v/v; 10: 100 μl . El BF se agregó luego de 24 hrs. del cultivo celular.

Día 3: Primer recuento luego de la tripsinización celular a las 48 hrs. luego del agregado de los BF

Día 5: Segundo recuento luego de transcurrido 96 hrs. con BF

Día 7: Tercer recuento luego de transcurrido 144 hrs. con BF

Día 9: Cuarto recuento luego de transcurrido 192 hrs. con BF

Experimento		Recuento 1			Recuento 2			Recuento 3			Recuento 4					
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	1	2	3
Control	A															
Ibandronato 10 μM	B															
Ibandronato 1 μM	C															
Etidronato 10 μM	D															
Etidronato 1 μM	D															

Casillas Grises: Pocillos vacíos. El control, son células sin adición de BF y adición de solución fisiológica en su lugar.

3.3.2 Resultados

Los resultados del experimento muestran que las células HT29 no tienen diferencias significativas ($p > 0,05$) en el crecimiento celular, concentración de proteínas totales y por célula respecto al control (sin BF). En cambio, en las células VERO si se detectaron diferencias significativas ($p < 0,05$). En el crecimiento celular, se observó aumento de la proliferación, con diferencias significativas que se encontraron cuando las células se expusieron a las menores concentraciones de los BF (IB 1 μM , EHDP 1 μM). En el análisis de la concentración de proteínas totales las diferencias significativas se encontraron en todas las concentraciones de los BF. Para las concentraciones de proteínas por célula, las diferencias significativas se encontraron en las mayores concentraciones de los BF (IB 10 μM , EHDP 10 μM) en células VERO.

En la siguiente tabla se representan estos resultados, donde A, indica un aumento, NS indica que no se observaron cambios significativos en el crecimiento celular y concentración de proteínas totales y por célula. $*p < 0,05$ respecto a la misma línea celular sin tratamiento con BF.

	Célula	IB 1 μ M	IB 10 μ M	EHDP 1 μ M	EHDP 10 μ M
Crecimiento celular	HT29	NS	NS	NS	NS
	VERO	A *	NS	A *	NS
Proteínas totales	HT29	NS	NS	NS	NS
	VERO	A *	A *	A *	A *
Proteína por célula	HT29	NS	NS	NS	NS
	VERO	NS	A *	NS	A *

3.4 Experimento 2

3.4.1 Metodología

Para la realización de este estudio se utilizaron las células HT29 y VERO que son mantenidas en forma rutinaria en el laboratorio. Las mediciones de la movilización de Ca^{2+} se realizaron con el espectrofluorómetro GloMax multifunción (Promega), con la sonda fluorescente Fluo-4AM y los BF fueron cedidos gentilmente por Laboratorios Gador SA.

Para el inicio del experimento se realizó el recuento celular para posteriormente ser repartidas en los pocillos en placa de 96 pozos, se sembraron 3-4 pocillos/experimento con un volumen final de 90 μ l, conteniendo en ellos $1E+05$ células HT29 o VERO. Se realizó 7-8 experimentos por condición. El número (n) total de la muestra representa el número total de mediciones por cada condición, número de pocillos medidos. Se utilizó la concentración de BF (30 μ M), esta es una dosis mayor que la utilizada en la curva de crecimiento porque se trata de un experimento *in situ* agudo, sin incubación previa de las células y el agregado de los compuestos en el momento de la medición.

Las células fueron marcadas e incubadas con la sonda de Ca^{2+} fluorescente, Fluo-4 AM, 6 μ M, se realizó la medición de emisión de fluorescencia inicial (Fli) en el equipo GloMax que se obtuvo luego de agregarse el EHDP o IB c/ 1- 2 min, dependiendo de la estabilidad de la señal. Luego se agregaron 10 μ l de las sales $Gluc_2Ca/Cl_2Ca$ a una concentración de 1,5 mM de Ca^{2+} , realizando su respectiva lectura de la fluorescencia 3 veces antes de agregar la ionomicina. Como último paso del procedimiento se agregó 10 μ l de ionomicina (90 μ M) para obtener la capacidad máxima de entrada de Ca^{2+} indicada por el máximo de fluorescencia: $F_{max} = 100\%$. Emitida por el Fluo 4AM intracelular y la capacidad total de entrada de Ca^{2+} midiendo la

fluorescencia unas 3 veces más. Se realizaron 2 grupos control, uno con Ca^{2+} sin BF y otro sin Ca^{2+} con BF.

3.4.2 Resultados

Los resultados muestran que en las células HT29 y en las células VERO la influencia de los BF para la entrada de Ca^{2+} intracelular es diferente. En las HT29 se observaron diferencias significativas ($p < 0,05$) de las medias muestrales de la concentración de Ca^{2+} cuando se utilizó Gluc_2Ca con IB, comparado con el Gluc_2Ca solo (control). Cuando las células se desafiaron con Cl_2Ca ambos BF produjeron el aumento de Ca^{2+} intracelular significativo. Las células VERO no modificaron su Ca^{2+} en presencia de cualquiera de los BF ensayados. Lo mencionado anteriormente se ve reflejado de manera resumida en la siguiente tabla donde A, indica un aumento, NS indica que no se observaron cambios significativos en el ingreso de Ca^{2+} .

EFFECTOS DE LOS BF EN LA ENTRADA DE Ca^{2+} EN LAS CELULAS HT29 y VERO				
Condiciones del experimento	Gluc₂Ca		Cl₂Ca	
	EHDP	IB	EHDP	IB
Células VERO	NS	NS	NS	NS
Células HT29	NS	A *	A *	A *

Se compara en cada condición del experimento los BF (EHDP ó IB) contra el control (Gluc_2Ca ó Cl_2Ca) utilizando el “test t de student” * $p < 0,05$ respecto a la incubación de cada línea celular con su propio control, en las mismas condiciones sin BF. A: aumento de incorporación de Ca^{2+} ; NS: no significativo.

3.5 Conclusión

En las pruebas de crecimiento celular no se observó ninguna acción antiproliferativa del uso de BF, IB y EHDP, en las células HT29 en ninguna de las concentraciones evaluadas, sin embargo, esto puede deberse a un sesgo cometido en el experimento, dado a la amplia dispersión de los datos obtenidos en el recuento celular y en la medición de proteínas. Por el contrario, en las células VERO la dispersión de los datos fue menor. En estas se pudo observar una mayor proliferación celular en las concentraciones de BF, IB y EHDP 1 μM , efecto que no se observó en concentraciones mayores

de BF IB y EHDP (10 μ M). En cuanto a la concentración de proteínas / célula, esta línea celular presento un aumento en la acumulación de proteínas intracelular posiblemente debido a la disminución de la prenilación de proteínas causada por la acción de los BF.

Los BF en presencia de las sales de calcio, Cl_2Ca y Gluc_2Ca , permitieron en las células HT29 un mayor ingreso de Ca^{2+} intracelular. Este aumento fue mayor cuando se utilizó el NBF IB, lo que puede indicar que estos son más efectivos que los nNBF (EHDP) en la movilización del Ca^{2+} al interior de la célula tumoral. Por el contrario, no se detectó ninguna diferencia en la entrada de Ca^{2+} en las células VERO cuando fueron expuestas a las sales de calcio con los BF.

Los resultados obtenidos en los experimentos realizados no presentan correlación entre la inhibición del crecimiento celular y la concentración de Ca^{2+} cuantificado por espectrofluorometría en ninguna de las dos líneas celulares estudiadas. El efecto antiproliferativo o citotóxico sobre las células tumorales HT29 no se ha podido demostrar. Por otro lado, la acumulación de proteínas intracelulares en las células VERO podría ser índice de toxicidad. Por estos motivos, se requiere de la realización de más estudios que concluyan sobre el beneficio de implementar este tratamiento. En conclusión, no es posible el escalamiento de estos resultados experimentales a una fase de investigación clínica.

El experimento de los efectos de los BF sobre la entrada de Ca^{2+} fue realizado en conjunto con otras investigaciones del CAECIHS, por lo que un subgrupo de datos obtenidos de las HT29 **fue parcialmente publicado** en: Ferrulli M, Pérez Rojo FG, Granada Herrera LA, Maglioco A, Roldán EAJ, Fuchs AG. *Effect of Etidronate and Ibandronate on Cytosolic Ca^{2+} in HT29 and Parasite Cell Line from Echinococcus Granulosus sensu lato. (2019) The Open Parasitology Journal DOI: 10.2174/1874421401907010019, 2019, 7, 19-25. Content list available at: <https://openparasitologyjournal.com>*

Palabras Claves: cáncer colorrectal, bisfosfonato, células HT29, células VERO, ibandronato, etindronato.

4 INTRODUCCIÓN

4.1 Bisfosfonatos

4.1.1 Antecedentes

Los BF fueron sintetizados en el siglo XX por químicos alemanes, quienes buscaban prevenir el depósito industrial de CaCO_3 en sus chimeneas. A principios del siglo XX la industria química usó los BF como agentes anticorrosivos y antisarro por su capacidad de inhibir la formación de depósitos de calcio en varias superficies. A partir de 1966 se empezaron a realizar nuevos estudios con enfoque clínico que permitieron por medio de sus resultados exitosos, marcar una era del uso de los BF en el área médico, despertando así el interés de muchos investigadores sobre el estudio de la molécula. Posteriormente se empezaron a realizar distintos estudios experimentales en animales de laboratorio y en investigación clínica. En 1969 se publicó la primera preinscripción médica del EHDP en humanos, se realizó en un niño con fibrodisplasia osificante progresiva, teniendo éxito para inhibir la calcificación extraósea (3). Desde hace aproximadamente 30 años se realiza una gran variedad de estudios experimentales *in vitro* e *in vivo* sobre los BF, permitiendo el avance en el campo medicinal y demostrando la versatilidad en su mecanismo de acción a nivel celular y molecular (4).

4.1.2 Generalidades

Los BF son derivados del ácido bisfosfónico, que es un análogo de ácido pirofosfórico inorgánico (Fig. 1), en los cuales el oxígeno que une los grupos fosfato es reemplazado por un átomo de carbono resistente a la hidrólisis química y enzimática, se unen fuertemente a los cristales de hidroxiapatita e inhiben su formación y disolución (2). Sin embargo, otros mecanismos de acción han sido descritos que involucran su acción en tejidos no óseos. Estos efectos se deben a las modificaciones químicas que se han efectuado en la molécula de estos químicos de síntesis. La estructura de P-C-P le permite un gran número de posibles variaciones, principalmente por el cambio de las dos cadenas laterales en el carbono, se pueden formar dos enlaces covalentes adicionales al átomo de carbono de los BF con átomos de carbono, oxígeno, halógeno, azufre o nitrógeno, dando lugar a una

enorme variedad de estructuras posibles. Los dos grupos unidos covalentemente (cadenas laterales) al carbono se denominan habitualmente R 1 y R 2 (5). Estos pequeños cambios en la estructura del BF pueden conducir a grandes alteraciones en su fisicoquímica y acciones biológicas, terapéuticas y toxicológicas. Cuando en la cadena de carbono alifático se encuentra contenida el grupo amino, la actividad del compuesto se incrementa dramáticamente marcando diferencias significativas (6)(7)(8).

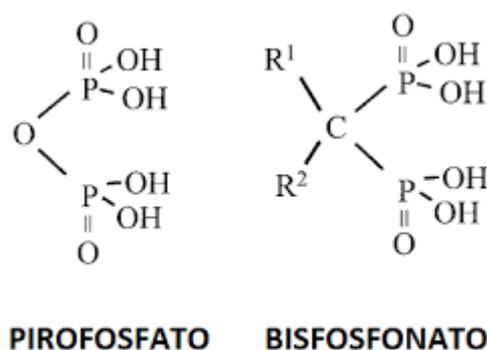


Figura1. La estructura del pirofosfato en comparación con la estructura química primaria de los bisfosfonatos.

4.1.3 Uso terapéutico

Los bisfosfonatos han sido utilizados en diversas patologías relacionadas con el hueso, como la enfermedad de Paget óseo, también se han usado en el tratamiento y prevención de la osteoporosis, prevención de la enfermedad ósea tras el trasplante de órganos, osteogénesis imperfecta, enfermedad de McCune-Albright, entre otras. En el área de la oncología los BF se emplean en el tratamiento de la hipercalcemia tumoral, en la prevención y tratamiento de los eventos óseos asociados a las metástasis óseas secundarias en una amplia gama de tumores sólidos, como el cáncer de próstata, el cáncer de pulmón y entre otros, las lesiones óseas de mieloma múltiple; en la prevención de la osteoporosis asociada al cáncer de mama, en el tratamiento combinado con radioterapia de las metástasis óseas que ocasionan también resorción ósea entre otros (4)(9)(10). El estudio de los BF ha sido continuo y la amplitud de su potencialidad se ha incrementado constantemente. Estudios preclínicos han demostrado que los NBF, que tienen en su estructura nitrógeno, son al menos 100 veces más potentes que los nNBF que no lo contienen, esto respecto a su capacidad para inhibir la resorción ósea (*in vitro*). En estudios actuales se intenta

demostrar acciones antitumorales, inmunomoduladoras, antiparasitarias y el estudio de los mecanismos que involucran sus efectos adversos (4).

El estudio de la actividad anticancerígena de los BF se ha ido ampliando en varios tipos de cáncer sólidos, entre ellos el CCR. Diversos estudios observacionales y metaanálisis relacionan el posible efecto protector del uso de BF orales en el CCR (11)(12)(13)(14)(15). Estudiar los BF desde un ámbito preclínico nos brinda la posibilidad de comprender el comportamiento de la molécula a nivel celular, evaluando su farmacodinamia. El IB, por ejemplo, en un ensayo preclínico en ratones, a los que se les indujo colitis ulcerosa, enfermedad pretumoral, el IB ejerció acción protectora (16). Los BF alendronato sódico (ABP) y zolendronato (ZOL), en sinergia con metformina, inhibieron la incidencia y el crecimiento del adenocarcinoma en un modelo de cáncer en ratas F344 (17). En otros estudios, *in vitro*, se observó la acción del ZOL, usado en distintas dosis, podría regular la autofagia y apoptosis de las células de CCR, células CT26, disminuyendo así su crecimiento (18). En cultivos tridimensionales (3D) se estudió la estimulación de reacción inmune antitumoral, y el ZOL activó las células T eliminando y fragmentando los esferoides tumorales del CCR (19). La evidencia experimental en CCR, y otros tumores, sugiere que los BF pueden tener acciones quimiopreventivo, sin embargo, la evidencia no es suficiente, porque no todas las líneas celulares de CCR fueron utilizadas para estos estudios y no todos los BF del mercado fueron ensayados, además las respuestas obtenidas no fueron totalmente concluyentes.

4.1.4 Mecanismo de acción

Muchos años de estudios han permitido demostrar el mecanismo de acción de los BF inactivando los osteoclastos. El BF entra a la célula por pinocitosis y/o fagocitosis y se localiza fundamentalmente en vacuolas intracelulares, pero también se lo puede encontrar en otros organelas, como en el citoplasma soluble, mitocondrias y núcleo. La actividad biológica y su potencia dependen de su estructura química. El pamidronato (PAM) y el ABP tienen una potencia de 10 a 100 veces mayor que la del EHDP y la actividad sobre distintas células y órganos presentando diferentes mecanismos de acción (20).

Distintos autores han expuesto desde la base de sus estudios cuál sería el mecanismo de acción de estos fármacos a nivel celular y molecular, algunos encontraron relación a partir de su estructura y la concentración que se

logre en el microambiente celular. Los BF se pueden dividir en 2 clases farmacológicas distintas, NBF, nitrogenados (BF que contienen nitrógeno, llamados de última generación) y no nitrogenados, nNBF, (Llamados de primera generación). Ver figura 2, tabla 1. Ambas clases inducen la apoptosis, pero por mecanismos diferentes.

4.1.4.1 Bisfosfonatos nitrogenados

Los NBF son más potentes e interrumpen la formación de osteoclastos, la supervivencia y la dinámica citoesquelética inhibiendo enzimas importantes de la ruta biosintética del mevalonato/colesterol, inhibe la Farnesil Pirofosfato Sintetasa (FPPS) y la Solanesil difosfato sintasa entre otras enzimas como consecuencia de la inhibición de la prenilación de proteínas (21)(22)(23).

La inhibición de FPPS previene y bloquea la biosíntesis de compuestos isoprenoides (farnesol y geranilgeraniol), compuestos formados por residuos de isopreno que tienen un papel clave en la regulación de numerosos e importantes procesos biológicos, como la regulación de la expresión génica, transporte de electrones (hemo A y ubiquinona), estabilizadores de la membrana celular, precursores de ácidos biliares, biosíntesis de glicoproteínas y en la formación de colesterol, entre otros. La prenilación de proteínas consiste en añadir grupos isoprenoides derivados del FPP o GGPP en residuos específicos de cisteína localizados cerca del extremo C-terminal de diferentes proteínas, de tal forma estas cambian su conformación y por ende su funcionalidad, esto conlleva la desregulación de diversas vías metabólicas y procesos fisiológico (24)(25). Por consiguiente, la inhibición de la prenilación postraducciona de pequeñas proteínas de unión a GTP impiden la señalización intracelular del Ras, Rho y Rac, moléculas de señalización implicadas en la regulación de la proliferación celular, la supervivencia celular y la organización citoesquelética (26), el efecto se debe a deslocalización de las pequeñas proteínas en su lugar de funcionalidad.

Por consiguiente, la inhibición de la prenilación de proteínas y la señalización de Ras dentro de los osteoclastos conduce a defectos en el transporte de vesículas intracelulares, como resultado, los osteoclastos no pueden formar una zona de sellado hermético o bordes ondulados, que son necesarios para la reabsorción ósea, conllevando a una pérdida de la función de los osteoclastos y, en consecuencia, a la muerte celular

apoptótica indirecta (27). Otros estudios describen que los BF actúan por competición, uniéndose al sitio de unión al sustrato natural de la enzima (28).

Los NBF no se metabolizan a análogos de ATP, pero investigaciones han proporcionado otro mecanismo de acción donde los BF pueden inducir la formación de un nuevo análogo de ATP, el Apppl (éster 3- (3-metilbut-3-enil) del 1-adenosin-5'-ilo del ácido trifosfórico) como consecuencia de la inhibición de la vía del mevalonato en las células, permitiendo así que la Apppl inhibiera la translocasa de ADP/ATP mitocondrial provocando apoptosis en los osteoclastos (27).

Fisher J y colaboradores demostraron *in vitro* que los NBF causan la apoptosis de los macrófagos al inhibir las enzimas en la ruta biosintética que conduce del mevalonato al colesterol. Sugiriendo la probabilidad que, en los osteoclastos, el difosfato de geranylgeranilo, (el sustrato para la prenilación de la mayoría de las proteínas de unión a GTP) sea el intermedio crucial afectado por estos BF (29).

Se postula que el mecanismo de acción de los BF sobre el tejido óseo sea diferente dependiendo de la célula, mientras que en los osteoclastos los BF generan apoptosis, en los osteocitos y osteoblastos supervivencia celular (30)(4). Otros estudios sugieren que el mecanismo de acción de los BF sobre los osteoclastos implique también la inhibición de la activación o reclutamiento de los osteoclastos mediado por PTH, PTHrp, calcitriol, prostaglandinas y citocinas (IL-1, TNF) (9).

4.1.4.2 Bisfosfonatos no nitrogenados

Los nNBF son menos potentes (llamados de primera generación), no inhiben la vía del mevalonato ni la isoprenilación de proteínas, pero inician la apoptosis de los osteoclastos al inhibir la translocasa de nucleótido de adenina mitocondrial, pueden incorporarse metabólicamente como análogos no hidrolizables de ATP tipo AppCp (análogos citotóxicos), que interfieren con las vías intracelulares dependientes de ATP (31).

4.1.4.3 Clasificación de los bisfosfonatos

Figura 2. Estructura molecular de los bisfosfonatos

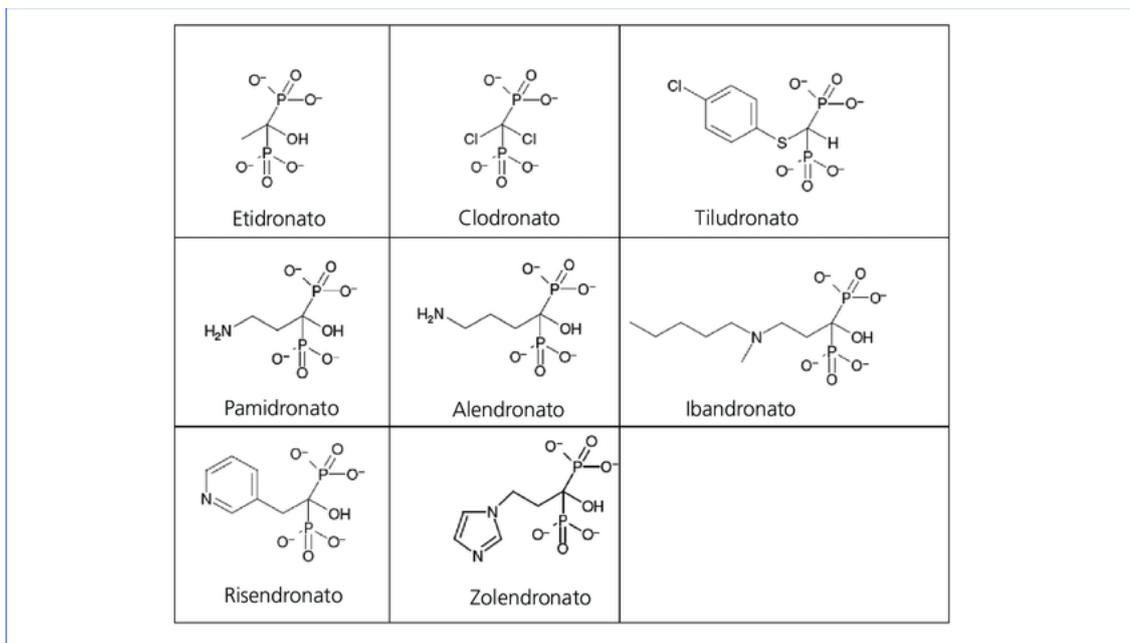


Tabla 1. Clasificación de algunos de los BF aprobados por el ANMAT según a la presencia del residuo nitrogenado en su estructura, abreviatura y su vía de administración (IV: Intravenoso) (VO: Vía oral)

No nitrogenados	Nitrogenados
Etidronato (EHDP) (VO)	Pamidronato (PAM) (IV)
Clodronato (CLO) (IV- VO)	Alendronato (ABP) (VO)
Tiludronato (VO)	Ibandronato (IB) (VO)
	Risedronato (RIS) (VO)
	Zolendronato (ZOL) (IV)
	Olpandronato (OLP) (IV- VO)

4.1.5 Farmacocinética

Los BF orales son absorbidos en cantidad reducida en el intestino delgado, por lo que la presencia intraluminal de alimentos dificulta aún más la absorción. Se recomienda su ingestión por la mañana, en ayunas, 30 minutos antes de ingerir alimentos y con un volumen suficiente de agua

para favorecer su dispersión en el estómago. La absorción oral del BF es entre 1-10%, por vía sanguínea entra al hueso donde es retenido en forma prolongada. La mayor capacidad de retención se observa en pacientes que presentan una tasa de recambio óseo aumentado. Los BF administrados por vía intravenosa son absorbidos de manera inmediata al hueso (30-70%), el resto sin ser metabolizado se elimina por vía renal (filtración glomerular) con una tasa de eliminación proporcional a la depuración de creatinina en un lapso de 24 horas. Esta eliminación urinaria depende de la función renal del paciente. En algunos casos la toxicidad renal podría generarse por las variaciones y diferencias en la capacidad de los BF de unirse a proteínas sanguíneas, de su vida media en el tejido renal, y en la capacidad de producir toxicidad renal acumulada. Sin embargo, en su mayoría la toxicidad se debe a una administración rápida y dosis excesivas del fármaco (23).

La vida media de los BF en el torrente sanguíneo es muy corta y oscila entre los 30 a 120 min, pero una vez absorbidos por el tejido óseo y blando pueden persistir de 3 a más de 10 años. La vida media de eliminación de estos fármacos por lo general no coincide con la duración de sus efectos debido a su retención en el tejido óseo, que puede extenderse, dependiendo de procesos de remodelado y la resorción. Una vez que se culmina la administración del fármaco, la cantidad retenida en el hueso pasará a la circulación para ser eliminada, pero también puede ser reciclada y recaptada por el tejido antes de ser eliminada (3).

4.1.6 Efectos adversos

Los BF se han considerado fármacos seguros y efectivos cuando se utilizan adecuadamente para el tratamiento de ciertas patologías óseas, en especial la osteoporosis. Se tiene conocimiento que su administración puede generar síntomas o diversos efectos secundarios en el aparato digestivo superior pudiendo producir úlceras gástricas, esofagitis, y estenosis esofágicas, las molestias gastrointestinales son frecuentes, aunque raramente constituyen una causa de suspensión del tratamiento. Las medidas preventivas para reducir el riesgo de estas complicaciones, entre ellas, tomar el fármaco con un vaso de 180-240 ml de agua en posición erguida evitando acostarse hasta que hayan transcurrido 30 min y se haya ingerido el desayuno. La administración por vía intravenosa puede generar síntomas pseudogripales, fiebre y alteraciones renales. Para aquellos

pacientes que tienen patologías con mayor predisposición a fracturas, los beneficios del tratamiento con BF pueden llegar a estar por encima de estos eventos adversos. La FDA recomienda utilizarlos con precaución en pacientes con aclaramiento de creatinina inferior a 30 ml/min (8).

Respecto a la forma de administrar los BF hay divergencias en los aspectos de la duración óptima del tratamiento a la aplicabilidad del descanso. A mayor potencia del fármaco, la dosis y su frecuencia de administración deben ser menores, para disminuir la toxicidad y la aparición de un evento secundario, teniendo en cuenta que los BF son absorbidos y retenidos por el hueso por tiempo prologando (8)(23).

Se evaluó la eficacia y la seguridad de los BF en tratamientos prolongados, en relación a la presencia de sus probables efectos adversos graves como osteonecrosis de los maxilares, fracturas atípicas, dolor músculo-esquelético, fibrilación auricular, y en ocasiones trastornos inflamatorios oculares: conjuntivitis, episcleritis y uveitis que se asociaron al tratamiento crónico con BF (32). Los dos efectos adversos más controvertidos en la actualidad son la osteonecrosis de los maxilares y las fracturas atípicas de la diáfisis femoral. Aunque no se conoce la patogenia de estos procesos, es necesario tomar precauciones en ambos casos sobre todo en pacientes de alto riesgo. Asimismo, se deberá valorar cuidadosamente la indicación del BF, evitando su administración si el riesgo de fractura no es elevado y valorando su retirada o suspensión temporal tras 5 años de tratamiento (8). Existen datos científicos contradictorios sobre los riesgos del tratamiento con BF, implementándose el uso de algunas pautas preventivas en los pacientes durante o previo a su tratamiento con BF (8)(33)(34).

4.2 Cáncer colorrectal

4.2.1 Epidemiología

El colon y el recto comprenden la porción final del tracto digestivo humano, comenzando en la válvula ileocecal que marca el final del intestino delgado, terminando en el ano, midiendo aproximadamente un metro de largo. A nivel mundial, el CCR es la tercera forma más común y la cuarta causa de muerte por cáncer, después del cáncer de pulmón y de mama. En los países desarrollados la incidencia de CCR es mayor y representa una proporción mayor de muertes por cáncer (35). Las últimas actualizaciones sobre la

carga mundial del cáncer, GLOBOCAN 2020 estiman una incidencia y mortalidad por cáncer mundial en 2020 de 19,3 millones de nuevos casos de cáncer (18,1 millones excluyendo el cáncer de piel no melanoma) y casi 10,0 millones de muertes por cáncer (9,9 millones excluyendo el cáncer de piel no melanoma). El cáncer de mama femenino ha superado al cáncer de pulmón como el cáncer más comúnmente diagnosticado, se estima que hay 2,3 millones de casos nuevos (11,7 %), seguidos de los cánceres de pulmón (11,4 %), CCR (10,0 %), de próstata (7,3 %) y de estómago (5,6%). El cáncer de pulmón siguió siendo la principal causa de muerte por cáncer, con un estimado de 1,8 millones de muertes (18 %), seguido de los cánceres colorrectales (9,4 %), de hígado (8,3 %), de estómago (7,7 %) y de mama femenino (6,9 %)(36).

4.2.2 Causas del cáncer colorrectal

Las causas precisas del CCR son desconocidas, aparentemente los factores medioambientales son los más determinantes en su activación y se atribuyen dentro de los principales al estilo de vida, caracterizado por el aumento de una dieta rica en proteínas, carnes rojas, bajo contenido en fibra, el uso de preservantes en los alimentos, obesidad, tabaquismo y sedentarismo (37). Últimamente se está teniendo en cuenta la composición de la biomasa intestinal, sobre todo la presencia de las bacterias fusiformes estaría asociadas a la transformación maligna epitelial, estas bacterias son encontradas usualmente en boca y faringe, pero no en colon, de tal forma que la presencia de estas bacterias en el colon se asocia con una alteración de la microbiota intestinal. Algunos resultados de estudios de investigación mencionan que las fusobacterias podrían contribuir en el crecimiento del tumor primario y en la aparición de metástasis en otros órganos (38). Pero la teoría más reciente es que se produce la activación de un oncogén (K-RAS) y la pérdida de otros genes supresores del crecimiento tumoral (DCC, APC, SMAD4, TP53) (39)(40)(41).

Aunque son numerosos los factores de riesgo, aproximadamente el 75% de todos los nuevos casos de CCR afectan a personas que no presentan factores predisponentes. Otro grupo importante de factores de riesgo son los antecedentes de cólicos intestinales o de enfermedad intestinal inflamatoria (Ejemplo, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn). Hay grupos de población con una incidencia superior de CCR, estos grupos de riesgo incluyen a pacientes con condiciones hereditarias como la poliposis

adenomatosa familiar (PAF), síndrome de Lynch, conocido como el cáncer colónico hereditario sin poliposis (CCHNP), que representan el 5 % de los CCR. La genética de estas dos condiciones ha sido bien descrita y su patogénesis es muy diferente, PAF presenta miles de pólipos, algunos de los cuales progresan a cáncer, mientras que en el CCHNP la mayoría de los pólipos individuales progresan a cáncer. El síndrome de poliposis hiperplásica (SPH) es una enfermedad rara caracterizada por múltiples pólipos hiperplásicos en el intestino y se asocia con un mayor riesgo de CCR. Entre otros factores de riesgos se encuentra los antecedentes personales de adenomas o CCR en la historia familiar de primer grado, o una historia personal de cáncer de mama, ovario o endometrio, la presencia de familiares que hayan padecido CCR antes de los 60 años, o si más de un familiar con otra edad también posee la enfermedad (40)(41).

Los síntomas más frecuentes del CCR son la hemorragia rectal, cambio del hábito intestinal, dolor abdominal, obstrucción intestinal, cambio en el apetito, pérdida de peso y debilidad.

4.2.3 Fisiopatología

La microarquitectura del colon se caracteriza por criptas que tienen una profundidad de alrededor de 50 células. En el intestino delgado las criptas y vellosidades confieren suficiente superficie para la absorción de nutrientes. En el colon no es necesaria esta gran área ya que la absorción se restringe al agua. En el epitelio sano del colon hay una renovación casi constante y normal del epitelio superficial aproximadamente cada seis días mediante proliferación celular y diferenciación de las células de la cripta. La proliferación de los colonocitos se lleva a cabo en la porción inferior de la cripta y se caracteriza por sufrir mitosis y las células del colon migran hacia la parte superior de la cripta alejándose de las células madre. La diferenciación y la maduración de las células se llevan a cabo a medida que estas migran hacia la luz intestinal. Las células maduras pierden su capacidad de dividirse, mueren por apoptosis y exfolian a la luz intestinal.

En el adenoma esta secuencia está alterada. Ocurre mitosis continua y las células no sufren la diferenciación, de manera que el compartimiento de proliferación puede llegar a ocupar la cripta completa. El adenoma es una neoplasia benigna y aunque se acepta generalmente que los cánceres de colon surgen a partir de los adenomas del colon, se sabe que la mayoría de los adenomas no se desarrollan para formar carcinomas. La frecuencia

exacta de progresión de un adenoma a cáncer no se conoce, el tiempo de transformación neoplásica se considera aproximadamente de 10 a 15 años, lo que representa el tiempo disponible para detectar y extirpar estos adenomas antes de su progresión a carcinoma invasivo (42).

El CCR es altamente heterogéneo en su fenotipo y genotipo, lo que está en relación con las diferentes vías de carcinogénesis. Las vías de carcinogénesis son una secuencia de alteraciones moleculares que llevan al desarrollo de un tumor, actualmente se consideran tres vías principales de carcinogénesis para CCR: la supresora, la mutadora y la aserrada.

La vía supresora: Implica que la acumulación de mutaciones conduce a la activación del oncogén (KRAS) y la inactivación del gen supresor (DCC, APC, SMAD4, TP53). La acumulación de estas alteraciones moleculares, independientemente del orden en que se adquieran, es responsable de la transformación neoplásica. El 85% de los tumores CCR esporádicos, al igual que la PAF, surgen como consecuencia de la acumulación de alteraciones genéticas en las células de la mucosa cólica, afectando principalmente genes clave del ciclo celular (entre ellos APC, K-RAS y TP53).

La vía mutadora: Es la acumulación de errores durante la replicación del ADN debido a la presencia de mutaciones en genes responsables de su reparación (MSH2, MLH1, MSH6, PMS2, MLH3, MSH3, PMS1 y Exo1). Estos errores se acumulan predominantemente en fragmentos repetitivos de ADN (microsatélites) esparcidos por todo el genoma, lo que resulta en mutaciones en varios genes diana. Esta vía de mutación o inestabilidad de microsatélites está implicada en el síndrome de Lynch y en el 15-20% de los CCR esporádicos. Los tumores de esta vía comparten los mecanismos moleculares del cáncer colorrectal hereditario no asociado a poliposis (HNPCC).

La vía aserrada: Consiste en la hipermetilación aberrante del ADN, un mecanismo para silenciar la función de los genes. La metilación de dinucleótidos en la región promotora de muchos genes se ha denominado fenotipo metilador de islas CpG (CIMP). El CIMP es responsable del 15% - 20% del CCR esporádico. Un tumor se considera positivo para CIMP si presenta metilación de al menos 3 de los siguientes marcadores: CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3 y SOCS1 (39)(43)(44).

4.2.4 Pruebas de detección

La mayoría de los cánceres colorrectales podrían prevenirse mediante la detección y extirpación de adenomas de colon premalignos y se prevé un beneficio importante mediante la detección de CCR en etapas tempranas, cuando la enfermedad es apta de curación mediante escisión quirúrgica. Estas consideraciones han llevado a recomendaciones para la detección masiva a partir de los 50 años para la población adulta de riesgo promedio, y antes de esa edad para las personas con mayor riesgo, debido a antecedentes familiares u otros factores predisponentes (45).

La detección temprana del CCR se realiza teniendo en cuenta los factores predisponentes de cada paciente y eventualmente, la presencia en el laboratorio de análisis complementarios que confirman la sospecha y el diagnóstico como la prueba de detección de sangre oculta en heces, sigmoidoscopia o colonoscopia con endoscopio flexible, enema con doble contraste de bario, pruebas genéticas, colonografía con tomografía computarizada. Si se concluye que la persona tiene un CCR se efectúan análisis que permiten estadificar el grado de enfermedad como la radiografía torácica, la tomografía computarizada, la resonancia magnética y las pruebas analíticas, determinación del valor de CEA, el perfil bioquímico completo y las pruebas de función hepática.

El cáncer colorrectal se presenta y se clasifica en varios estadios:

Estadio 0: Carcinoma *in situ*: Las células cancerosas se encuentran en la capa interna (mucosa) de la pared del colon o del recto, la mayoría de los casos en este estadio pueden extirparse durante una colonoscopia.

Estadio I: El tumor ha crecido y ha traspasado a otra capa (submucosa), pero no se ha producido la diseminación.

Estadio II: El tumor se ha extendido más profundamente, en la parte interna de la pared del colon o del recto, y afecta a las capas más externas de la pared del intestino. Es posible que haya afectado a los tejidos próximos, pero no se ha producido diseminación a los ganglios linfáticos.

Estadio III: El tumor se ha diseminado a los ganglios linfáticos cercanos, pero no a otras partes del cuerpo.

Estadio IV: El tumor se ha diseminado a otras partes del cuerpo, como el hígado, los pulmones, el peritoneo (la membrana que cubre la cavidad abdominal) o los ovarios.

Cáncer recurrente o recidivado: Se produce cuando, pasado un tiempo después de haber tenido el cáncer colorrectal, éste vuelve a aparecer, ya sea en el colon, el recto o en otra parte del cuerpo (40)(46).

4.2.5 Tratamiento

Los CCR identificados en los primeros estadíos son altamente tratables y a menudo, responden bien a terapias estándar. Las opciones de tratamiento dependen de la localización del tumor y del grado de extensión (estadificación), así como del estado de salud específico de cada persona. Se contemplan diversos tratamientos que pueden aplicarse individualmente o en combinación, como la cirugía, la quimioterapia, los tratamientos biológicos o la radioterapia.

La resección quirúrgica del colon afectado es el tratamiento inicial para el colon y muchos cánceres de recto. La probabilidad de recurrencia está relacionada con el grado de penetración del tumor a través de la pared intestinal y la presencia o ausencia de afectación ganglionar (45). La recurrencia de la enfermedad, tanto a nivel local como a distancia, después de la cirugía de resección radical, constituye el problema más grave, siendo en la mayoría de los pacientes la causa de muerte. La mayoría de los pacientes con estadíos I y II de CCR se tratan y curan con cirugía. Para pacientes con estadío III de cáncer de colon el tratamiento estándar es cirugía seguido de quimioterapia adyuvante. En cáncer de colon metastásico la quimioterapia sola o en combinación con tratamientos biológicos es la elección, aunque cada vez se recomienda más el abordaje multidisciplinar para elegir la mejor opción terapéutica adaptada al perfil del paciente, especialmente ante la valoración de la resección de metástasis (44)(47).

4.3 Aspectos generales en la investigación farmacológica

El objetivo de la investigación farmacéutica es desarrollar terapias lo más específicas posibles frente a los órganos diana, generando la menor cantidad de efectos adversos. La fase preclínica sin lugar a duda es la etapa en la cual este objetivo se puede empezar a diseñar y materializar. El estudio del fármaco va de la mano con el conocimiento de la enfermedad, poder indagar, identificar y comprender todos sus aspectos y detalles es la mejor manera para acercarse al estudio de la molécula indicada.

La aprobación de un fármaco para ser utilizado en salud humana requiere primero su propio desarrollo y por consiguiente un arduo estudio con su respectivo diseño previo, teniendo en cuenta factores como, tipo de compuesto, mecanismo de acción e indicaciones clínicas, conocer el ámbito regulatorio y guías que aplican. Es importante definir un diseño de ensayo clínico en donde se tenga en cuenta principalmente la duración del tratamiento, la vía y pauta de administración y el tipo de población sujeta al estudio.

El desarrollo de un nuevo fármaco es un proceso complejo, largo y costoso. Para que una molécula con alto potencial farmacológico pase a una fase clínica, existen diversas actividades que se enfocan en poder demostrar seguridad, eficacia y relación coste/eficacia óptima. Lo que conlleva un elevado aporte intelectual y económico. El desarrollo de un fármaco consta de varias etapas y fases con directrices precisas para cada una de las etapas. Las fases son: descubrimiento, preclínica, clínica (en humanos), fase de registro y autorización. Se debe contar con un sistema de gestión de calidad, donde se haya demostrado, por medio de evidencia científica, la actividad biológica, seguridad y eficacia del mismo. El medicamento será evaluado y aprobado por entes regulatorios nacionales e internacionales. Una vez descubierta o diseñada una molécula (Etapa básica), que puede ser eficaz para el tratamiento en una enfermedad, o para aliviar o prevenir, se procede a analizar los efectos del compuesto y a realizar una serie de estudios de eficacia y seguridad en distintos sistemas biológicos de aplicación en laboratorio (líneas celulares, cultivos primarios, animales de laboratorio, sistemas bacterianos, pruebas bioquímicas y físicas y métodos bioinformáticos) (Etapa preclínica). Tomando una serie de decisiones que incluyen que hacer, cuando hacerlo, cómo y con quien (48)(49)(50)(51) (52).

4.3.1 Etapa preclínica

Antes de que el fármaco pase a ser aprobado en seres humanos, fase clínica (Fase I), debe ser probado primero en la fase preclínica. Se efectúan tamizajes de diferentes propuestas de compuestos o modificaciones de los mismos en distintos diseños o modelos experimentales: células o tejidos (*in vitro*), modelos computacionales (*in silico*), pruebas físico-químicas y / o en organismos vivos (*in vivo*) con la finalidad de conocer la actividad farmacológica y la toxicología del fármaco seleccionado y la vía de administración, aportando información sobre el riesgo de los ensayos de

fase temprana. Estos diseños preclínicos permiten que se realicen técnicas que no son éticamente aceptables en el hombre, los ensayos en animales de experimentación son claves para la búsqueda de las posibles dianas terapéuticas dirigidas a la prevención y tratamiento de enfermedades y sus mecanismos de acción. Son modelos que se complementan y no son excluyentes. Cada uno de ellos cumplirá un papel clave en la explicación de un fenómeno natural. Los resultados combinados de los estudios *in vitro* e *in vivo* ayudan a extrapolar los hallazgos a humanos. Los ensayos que estudian la seguridad del medicamento a nivel preclínico deberán realizarse cumpliendo las normas de BPL (Buena Práctica de Laboratorio) y los procedimientos bioéticos aprobados para el uso de animales de laboratorio (CICUAL) (48)(49)(50)(51)(52).

La seguridad en investigación preclínica está garantizada por el cumplimiento de una serie de normas y guías, entre ellas BBP (Guías y Normas de Buenas Prácticas preclínicas) e ICH (*Guidelines on Safety of Animals*), que orientan el correcto procedimiento con todo lo relacionado en esta etapa de la investigación. Es primordial la capacitación al personal involucrado en el estudio sobre el ámbito regulatorio (48)(49)(50)(51)(52).

4.3.1.1 Modelos *In vivo*

Son diseños útiles para construir prototipos predecibles que simulen la condición humana y la patología propuesta para el uso del compuesto tratamiento. Aunque es un limitante la extrapolación de resultados porque son sistemas biológicos que poseen características de especie específica, en estos modelos se puede determinar la dosis efectiva (DE) 50 y 90 y las vías de administración del compuesto.

4.3.1.2 Modelos *in vitro*

Las pruebas *in vitro* tienen relación con el estudio de las características físico- químicas de laboratorio como es la formulación de los compuestos y su disolución, la resistencia a las temperaturas y a los diferentes grados de acidez, que tiene que cumplir los parámetros de la farmacopea.

La investigación en los modelos *in vitro* referido a células u órganos pueden ser de desarrollo *ex vivo* como en el caso de micro-órganos o explantos, pueden realizarse sobre cultivo primario celular o sobre líneas celulares establecidas. En el caso de explantos o cultivos primarios, si son de origen

humano su obtención depende de la aprobación de un comité de ética en investigación y de la persona o el familiar, también en el caso del material cadavérico. Si son de origen animal de laboratorio el CICUAL tiene que aprobarlo y si son de origen de animales domésticos o de cría corresponde al CICUAL y la firma del consentimiento por el dueño del animal. Los estudios en cultivo bacteriano, de líneas de bacterias modificadas o con características enzimáticas diferentes proveen un modelo de toxicidad o estudio de la degradación de compuesto y en el caso de los antibióticos su efectividad, en estos casos es muy importante las buenas prácticas de laboratorio y contar con los servicios de bioseguridad y descarte de material biológico para impedir su disseminación en el ambiente.

En estos sistemas se puede estudiar la Dosis letal (DL) 50 y DE 50 y 90 en modelos celulares y los mecanismos de acción y toxicidad a nivel molecular.

Las pruebas *in vitro* e *in silico*, están contribuyendo a disminuir el uso de animales debido a que permite conocer el grado de toxicidad de una sustancia antes de realizar ensayos en animales. Las líneas celulares *in vitro* derivadas de células de mamíferos pueden ser utilizadas para predecir aspectos de la actividad *in vivo* y evaluar cuantitativamente la sensibilidad relativa de varias especies (incluidos humanos) al fármaco, estudiando bajo condiciones controladas la respuesta de las células a distintos estímulos. Estos estudios pueden diseñarse para determinar el mecanismo de acción, por ejemplo, ocupación del receptor, afinidad del receptor y / o efectos farmacológicos, y para ayudar en la selección de una especie animal apropiada para estudios adicionales de farmacología y toxicología *in vivo*. El uso de líneas celulares y / o cultivos de células primarias puede ser útil para examinar los efectos directos sobre el fenotipo y genotipo celular y los efectos biológicos como proliferación, muerte, migración, invasión y adhesión celular, entre otros. En el ámbito de la oncología el uso de los cultivos celulares genera gran expectativa para evaluar la actividad anticancerosa de nuevos compuestos o terapia (48)(49)(50)(51)(52).

4.3.2 Etapa clínica

La etapa clínica se realizará posterior a la obtención de la aprobación por parte de las autoridades regulatorias competentes, FDA (*Food and Drug Administration*), EMA (*European Medicines Agency*), ANMAT (Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnologías, Argentina) y otros respectivos reguladores. Estos organismos autorizan la

continuidad del estudio y el diseño de ensayo clínico. Los estudios clínicos se llevan a cabo en una serie de etapas, cada una con un propósito distinto, pero relacionadas de tal manera que los resultados y las conclusiones de las fases iniciales sean usadas para construir las fases posteriores.

El paso del estudio de la fase preclínica a la fase clínica se realizará una vez que la fase preclínica finalice, y que los resultados tanto como todos los soportes del estudio garanticen una generación y gestión de datos de investigación admisibles para continuar con la etapa clínica. Las características del compuesto en estudio deben poseer actividad biológica deseada, solubilidad adecuada, capacidad para atravesar barreras críticas, estabilidad metabólica y seguridad en la administración en el hombre.

El paso a la fase clínica servirá para establecer la utilidad del compuesto en la patología humana. Entre los estudios que se realizarán están la farmacodinamia o farmacocinética que estudian la distribución del compuesto en el organismo; las reacciones adversas y establecer la seguridad y la eficacia del medicamento.

Las fases de investigación clínica son:

Fase I: Dura entre 6 meses y un año, se realizan los primeros estudios en seres humanos, con la intención de demostrar la seguridad del compuesto y para guiar hacia la pauta de administración óptima en estudios que se realicen más adelante. Suelen participar entre 20 y 100 sujetos voluntarios sanos y/o pacientes.

Fase II: El objetivo en esta fase es la búsqueda de dosis adecuadas y obtener los primeros datos sobre la eficacia del medicamento. En ellos participan entre 100 y 300 pacientes y son estudios terapéuticos exploratorios.

Fase III: Se realizan desde centenares a mil pacientes y duran aproximadamente entre tres y seis años, se evalúa la eficacia y seguridad del tratamiento experimental en condiciones de uso habituales y en comparación con los tratamientos ya disponibles para esa indicación concreta. Se trata de estudios terapéuticos de confirmación.

Fase de Aprobación y Registro: En esta fase se presenta la solicitud de autorización a las agencias reguladoras competentes, para la aprobación de comercialización del fármaco. El informe ha de contener toda la información recopilada a lo largo de todo el proceso de investigación y

desarrollo del medicamento y debe demostrar que el nuevo fármaco tendrá el efecto deseado.

Fase de la farmacovigilancia: Es la fase en la que se hace seguimiento de la seguridad de los medicamentos que han sido aprobados por los entes reguladores y se encuentran en comercialización. La detección y seguimiento de efectos adversos en medicamentos post-comercialización es importante ya que es posible que algunos de ellos no fueran identificados o no se hayan presentado durante el desarrollo del estudio clínico. Por lo que se procede a un seguimiento detallado de las incidencias que el producto pueda generar, para modificar la información relativa a las recomendaciones de uso o, incluso, para retirar el fármaco del mercado en el caso de que sea necesario. La duración de esta fase suele ser de varios años (52) (53) (54) (55) (56).

4.4 Cultivos celulares

Los cultivos celulares, es una técnica en el cual se cultivan células (procariotas, eucariotas o vegetales) en condiciones controladas, provenientes de un órgano o un tejido, normal o tumoral. Las células tienen que mantener sus funciones metabólicas, fisiológicas, bioquímicas, y genéticas, de igual forma a las que tenían en el huésped, permitiendo así su supervivencia y multiplicación. Los cultivos se establecen a partir de una disgregación celular, que se obtiene ya sea por medios enzimáticos, químicos o mecánicos, se mantienen solo aquellas que sobreviven a este proceso.

Uno de los métodos utilizados para su obtención es la disgregación enzimática con tripsina que digiere las proteínas responsables de la adhesión celular al sustrato, así las células adheridas al sustrato pasan a estar en suspensión.

Hay varios tipos de cultivos celulares, los cultivos primarios que se mantiene durante pocos pasajes en cultivo, en general menos de 10 y que mantiene con mayor fidelidad las funciones primarias de las células y luego de determinado número de divisiones, las células entran en un proceso de senescencia, lo cual implica que estas dejen de dividirse, manteniendo generalmente la viabilidad. Y las líneas celulares que se trata de células transformadas y adaptadas a proliferar en condiciones de cultivo que

adquieren características propias diferentes y mantienen algunas características originarias. Los cultivos celulares pueden ser en suspensión porque se trata de células que no adhieren como los linfocitos, por transformación celular con la pérdida de las interacciones intercelulares y con la matriz extracelular u otras células que siguen manteniendo su capacidad de adhesión y de sintetizar los elementos necesarios para la formación de la matriz extracelular y establecer las uniones intercelulares.

Las líneas celulares establecidas han sufrido un cambio genético que permite la inmortalización celular, y se multiplican *in vitro* durante periodos prolongados.

Los cultivos celulares son utilizados como un instrumento analítico o como modelo para mecanismos celulares. Actualmente pueden cultivarse células procedentes de una amplia gama de tejidos y organismos diferentes, permitiendo el estudio de las propias células, su metabolismo, el control del ciclo celular, la modulación de la expresión génica, el cultivo de virus, la clonación y el estudio de numerosos aspectos relacionados con el cáncer y su diagnóstico entre otros.

En los últimos años la técnica en cultivos celulares ha ido en aumento, siendo un adelanto que genera expectativa para distintos ámbitos, logrando importantes avances científicos, tanto en la industria de la tecnología, como en distintas disciplinas dentro de la investigación biomédica, constituyendo una herramienta básica de aplicación fundamental en el diagnóstico viral, en el campo médico, veterinario, en la investigación y en la industria farmacéutica donde por ejemplo, se utilizan estas técnicas en los estudios para el desarrollo de nuevos fármacos (57).

Para este estudio se utilizó la línea celular VERO, células epiteliales provenientes de riñón de mono verde, línea celular muy estudiada, cuyas características metabólicas de absorción-secreción son útiles para comprender diversos mecanismos y procesos, entre ellos la citotoxicidad farmacológica. Las células VERO son utilizadas en la investigación debido a que presentan un comportamiento estable, representativo de las células normales, no tumorales, y una alta velocidad de reproducción. Además, la similitud del metabolismo con el de las HT29, que también son células epiteliales, permitió utilizarlas como control.

4.5 Bisfosfonatos en la oncología. Despertando una perspectiva de futuro

Actualmente existen tratamientos para la mayoría de las enfermedades agudas, y tras ello continua la búsqueda de drogas innovadoras que contribuyan la mejora de calidad de vida y sobrevida de patologías crónicas, entre ellas el cáncer.

Los tratamientos hoy por hoy poseen limitantes, lo cual genera la necesidad de continuar con la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para la prevención, diagnóstico y tratamiento. Para ello los estudios preclínicos cumplen un rol crucial permitiendo estudiar y determinar el comportamiento de una molécula *in vitro* estimando la citotoxicidad y evaluando su eficacia experimental en sistema aislado, que permite estudiar su mecanismo de acción molecular; el uso de metodologías y técnicas distintas puede fortalecer el conocimiento existente sobre la molécula y aportar un nuevo enfoque en su mecanismo de acción.

La evaluación experimental de los BF en modelos animales e *in vitro* ha sido relevante a la hora de generar evidencias que sustenten el uso terapéutico de los mismos en distintas situaciones clínicas, con distintas vías o regímenes de administración y para el conocimiento de su mecanismo de acción. Los BF tienen una buena selectividad de acción para muchas patologías óseas, entre ellas las neoplasias malignas. Los BF hoy continúan siendo objetivo de estudio sobre todo para conocer con certeza su mecanismo de acción molecular y sobre una amplia gama de enfermedades, sobre todo, entre las enfermedades extraesqueléticas, permitiendo así agrupar la mayor parte de evidencia experimental y clínica, para otras formas comunes de administración, u otras combinaciones y usos.

En distintos estudios se han establecido modelos *in vitro* permitiendo obtener datos de efectos tóxicos. Se han expuesto distintas líneas celulares tumorales a los BF, entre ellas se encuentran, líneas celulares de mama, próstata, mieloma múltiple, en donde, de forma aislada o mediante un efecto sinérgico con otras terapias antineoplásicas se inhibe la proliferación o inducen apoptosis (58).

Se ha demostrado que el ZOL inhibe directa e indirectamente el crecimiento de células cancerosas *in vitro* y el crecimiento y tumorigénesis en sistemas de modelos animales. La inhibición *in vitro* de la actividad de la FPPS (el objetivo intracelular de los N-BP) proporciono datos preclínicos que indican que ZOL puede inhibir la proliferación, adhesión, invasión y angiogénesis tumoral. Además, puede activar respuestas inmunitarias innatas y adaptativas contra las células cancerosas, promover la apoptosis

y producir efectos anticancerígenos sinérgicos con otras drogas utilizadas en oncología. Estos hallazgos preclínicos proporcionan más información sobre los mecanismos de acción de los BF, también proporcionan la justificación para evaluar su actividad antitumoral en la clínica (59)(60)(61).

Entre los BF que están siendo sometidos a prueba de investigación clínica en EEUU y / o Europa son el CLO, PAM, IB, ZOL que dieron respuestas promisorias permitiendo el avance de su utilización en el tratamiento de la metástasis ósea y su posible utilidad en los distintos tipos de cáncer. En cáncer de mama (CLO, IB, ZOL), en cáncer de próstata (CLO, ZOL), cáncer de Pulmón (ZOL), cáncer renal (ZOL). Tiroides y vejiga (ZOL), CCR (IB), mieloma múltiple (CLO, ZOL) contribuyendo su uso también como apoyo de tratamiento para algunos tipos de cánceres gracias a su sinergismo con terapias antineoplásicas utilizadas. Se asocian con la quimioterapia (CLO, ZOL, IB), la hormonoterapia (CLO, ZOL), la terapia con radionúclidos (ZOL), la radioterapia (PAM, ZOL, IB), aumentando la apoptosis de células cancerígenas contribuyendo al control del tumor. Del uso complementario de BF con radioterapia se pueden obtener beneficios clínicos en la mejora de la densidad ósea, permitiendo aumento de la recalcificación en la zona afectada, disminución del manejo de opioides controlando los niveles de dolor, también reduce la osteopenia asociada a los cánceres de mama y próstata y se utilizan para tratar la hipercalcemia asociada a ciertas neoplasias (62)(63).

En este estudio se expusieron las líneas celulares HT-29 y VERO a BF con concentraciones diferentes, con el objetivo de determinar su efecto sobre el crecimiento y la viabilidad celular, efecto tóxico versus efecto terapéutico probables, con la intención de que los resultados obtenidos sean escalados a la investigación clínica farmacológica contribuyendo con el avance terapéutico.

Los BF y su utilización en terapia oncológica en humanos pueden resultar rápidamente utilizables, porque la mayoría de los BF se encuentran aprobados para usos terapéuticos. En ciertas situaciones es más rentable y confiable trabajar con moléculas que están en el mercado o con moléculas que sean estructural y farmacológicamente comparables. Trabajar con moléculas que cuentan con antecedentes en la práctica médica, puede favorecer y reducir las extensas pruebas de toxicidad, ampliando la posibilidad de continuar investigando sobre él en distintas patologías.

5 HIPÓTESIS

Los BF son selectivamente citotóxicos sobre las células tumorales y su utilización en la terapia del CCR, podría resultar rápidamente utilizables porque la mayoría de los BF se encuentran aprobados para otros usos terapéuticos.

6 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACIÓN

6.1 Objetivo primario

Determinar la actividad citotóxica selectiva del IB y EHDP sobre un modelo de células tumorales humanas, la línea celular HT29, proveniente de un adenocarcinoma colónico humano y utilizando como control las células VERO, línea celular establecida a partir de riñón de mono verde, son células transformadas no tumorales. Ambas líneas celulares son bien conocidas y establecidas, de tipo epiteliales con capacidad absortiva-secretora. La experimentación se realizó en cultivo de células utilizando dosis *in vitro* escalables para el tratamiento humano.

6.2 Objetivos secundarios

- Medición de la viabilidad y el crecimiento celular por concentración de proteínas y conteo de células viables
- Evaluar el mecanismo de acción de BF sobre el calcio iónico intracelular
- Escalar los resultados experimentales a la investigación clínica farmacológica

7 MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Materiales

7.1.1 Cultivo celular

- HT29 en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Sigma-Aldrich lote RNBD0340, D6046)
- VERO en RPMI-1640 (Sigma-Aldrich lote RNBB7794)

7.1.2 Reactivos

- Antibióticos Penicilina/Streptomycin (Sigma-Aldrich lote 065M4794V). Stock de 5000 unidades de penicilina y 5 mg de estreptomycin
- Suero fetal bovino 10% (FBS), Lote 1659859 GIBCO
- DMEM Dulbecco's Modified Eagle's Medium Sigma-Aldrich lote RNBD0340, D6046)
- RPMI -1640 Medium 10X, Ref R1145, Lote RNBB7794, SIGMA-ALDRICH.
- Trypsin 1X, 0.25 %, Ref 15050-057, Lote 1665788 gibco.
- DMSO (Sigma, lote 472301)
- Tripán Blue (Sigma, Cód. T6146-5G)
- Reactivo de Bradford (Bio Rad lote L9700067)
- Glutamina (200 mM Sigma-Aldrich, lote RNBC8866)
- PBS (buffer) (HyClone lote AVA57593B)
- Bicarbonato de sodio sobresaturado (Anedra lote Nro. 12128-2)
- HEPES 10 mM (MP Biomedicals lote 7847H)
- Agua (H₂O) para soluciones: desionizada estéril
- Bisfosfonatos Ibandronato y Etidronato (Laboratorios Gador Ltd.). Dilución stock en agua bidestilada deionizada a 10 mM. Las diluciones sucesivas se realizaron en PBS y se ajustó el pH de la solución a 7.2.

7.1.2.1 Buffers:

- HBSS (sódico): PIPES 10 mM (Sigma, lote SLBK5937V), NaCl 124 mM (Anedra Lote 2095-1), KCl 1 mM (Anedra lote 13089-1), MgCl₂ 1,3

mM (Sigma, life science lote 078K5430), glucosa 10 mM (Cicarelli, lote 56801), NaHCO₃ 25 mM (Anedra lote Nro. 12128-2), KH₂PO₄ 1,22 mM (Carlo Erba código 47168)

- Fluo-4AM 4 μM (Life technologies lote Nro. 1204207)
- Cl₂Ca (Anedra lote Nro. 21659-3) 15 mM solución en agua deionizada
- Gluc₂Ca (Sigma Aldrich lote Nro. 099H0088) 15 mM solución en agua deionizada

7.1.3 Plásticos y otros

- Microplaca de 96 pocillos
- Placa de fluorescencia negra de 96 pocillos (Corning)
- Tubos Eppendorf de 1,5 ml (BD)
- Tubos Falcon de 15 ml (BD)
- Micropipetas p10, p100 y p1000 (Eppendorf research)
- Frasco de 25 ml cultivo (BD)
- Cámara de Neubauer
- Crioviales (BD)
- Filtros de poro de 22 micras de diámetro (BD) estériles
- Cubetas de medición de absorbancia
- Tips azules (100-1000 microlitros) ExtraGene, RefTip-1100-B
- Tips amarillas (Biologix)
- Alcohol 70%
- Recipiente para descarte de material, con agua e hipoclorito de sodio 5 ppm.

7.1.4 Equipos

- Flujo laminar (LABTEC, modelo SW-JC-1FD)
- pHímetro (Adwa)
- Centrífuga (Rolco Modelo 2036 y Ecys para tubos Falcon y Eppendorf, respectivamente)
- Espectrofotómetro (WPA)
- Espectrofluorómetro GloMax-Multidetecion system (Promega)
- Microscopio Óptico invertido (Arcano)
- Microscopio de fluorescencia (Arcano, modelo: xsz-107e)
- Baño térmico (Vicking)
- Estufa de cultivo húmeda/ gaseada (Sanyo)

- Balanza digital (Ohaus, d=0,1mg)
- Vortex

7.2 Métodos

7.2.1 Células utilizadas en este estudio

- **HT29** en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium Sigma-Aldrich lote RNBD0340, D6046). Provenientes de adenocarcinoma de colon humano, línea establecida que se diferencia en enterocitos embrionarios con modificación de la composición del medio de cultivo y se polarizan en presencia de una matriz extracelular, obtenida por gentileza del Dr. Eduardo Cafferata, del Instituto Leloir, pero se ha modificado su cultivo agregándole glucosa al medio para obtener una reproducción y sobrevivencia más eficiente.
- **VERO** en RPMI-1640 (Sigma-Aldrich lote RNBB7794). Línea celular de células epiteliales de túbulos renales normales provenientes de Mono Verde, Línea celular establecida, obtenida de ABAC (Banco de Células Argentino)

Los cultivos celulares se mantuvieron en estufa a 37 °C con una mezcla 95 % aire y 5 % CO₂.

7.2.2 Bisfosfonatos (Laboratorios Gador SRL)

Ibandronato (IB) e Etidronato (EHDP), ambos en polvo de uso clínico.

7.2.3 Preparación de medios

7.2.3.1 DMEM-F-12 para células HT29

A 40 ml de medio 1X se agregó 200µl de antibiótico penicilina/estreptomicina. Y 10% (v/v) de SFB. Se agregó glutamina luego de los 10 días de preparado el medio, (stock de 200 mM), 200 µl por tubo.

7.2.3.2 RPMI 1640 para células VERO

Para 200 ml finales: Se tomaron 20 ml del stock de medio RPMI 10X al que se le agregó 2 ml de glutamina (stock de 200 mM), 2 ml de HEPES (stock 37%; p/v; estéril), 2 ml de penicilina/estreptomicina y H₂O deionizada hasta 200 ml. Se llevó a pH con NaHCO₃ sobresaturado.

7.2.4 Mantenimiento de células y repiques

Se utilizaron células HT29 y VERO de diversos *batches*, congeladas desde 2009 al 2015. Las células HT29 fueron sembradas en 2 frascos con medio DMEM-F12 y las células VERO en RPMI, ambos suplementados con 10% de SFB, respectivamente. Luego de una semana de cultivo se repicaron y diluyeron 1/3. Cada 4 semanas se congelaba una muestra. Las células se mantuvieron en cultivo y fueron repicadas en forma subsiguiente dependiendo de su ritmo de crecimiento, cuando la monocapa alcanzaba el 95% del cubrimiento de la superficie del frasco con cambios de medio cada 3 días.

7.2.5 Descongelamiento y congelamiento

7.2.5.1 Descongelamiento

Teniendo todos los materiales y condiciones de asepsia se retiró el vial del nitrógeno colocándolo en el baño María hasta que descongeló. Se tomó 1 ml del vial y se suspendió en un Falcon agregando 2 ml del medio que correspondió RPMI o DMEM a 37°C. Se centrifugó, se descartó el sobrenadante, se resuspendió el botón celular en 1 ml de medio (Esto con la finalidad de eliminar residuos del DMSO). Finalmente, las células fueron colocadas en la botella con 5 ml finales de medio. Se llevó a estufa para que las células comenzaran a proliferar.

7.2.5.2 Congelamiento

Las células HT29 y VERO se congelaron cuando el monocapa celular llegó al 70% de la superficie, se hizo el proceso de tripsinización, se centrifugó (2500 rpm), se lavó la tripsina, y se las colocó en viales conteniendo 90% de SFB y 10% de DMSO (Vol. final de 1,5 ml aproximadamente por criovial). Luego de 2 horas a -20°C se colocaron en un vial en nitrógeno líquido.

7.2.6 Tripsinización

Se descartó el medio que contenía previamente las células tanto HT29 como VERO, se agregó PBS estéril (aproximadamente 500 μ l) para eliminar residuos de medio, luego se descartó y se adicionó 1 ml de tripsina (con EDTA-NaOH), se colocó en la estufa por aproximadamente 5 min. Luego de este tiempo se observó si las células se habían levantado, se les dio ligeros golpes para terminar de desprenderlas totalmente. Se adicionó 1 ml de medio o PBS estéril, para inactivar la tripsina, se colocó todo el contenido en un tubo Falcon y se procedió a centrifugar por 5 minutos a 2500 rpm. Luego de ello se eliminó el sobrenadante, y se resuspendió el botón celular en 1 ml de medio. Luego se procedió con el paso que correspondía según si era para congelamiento o para recuento celular.

7.2.7 Recuento celular

Previo al proceso de tripsinización, se tomó 10 μ l de la suspensión celular anterior y se colocó en un microtubo Eppendorf que contiene 90 μ l de PBS, o medio. Se resuspendió bien y luego se tomó 20 μ l de esta suspensión y se mezcló con 20 μ l de *trypan blue*, se homogeneizó bien, se colocaron 10 μ l en la cámara de Newbauer, se observó al microscopio óptico y se procedió al conteo en 40x.

7.2.8 Siembra de células en las microplacas

Se sembró entre 2500 o 3000 células VERO/HT29 en cada uno de los wells seleccionados y se llevó a un volumen final de 150 μ l de medio completo DMEM, se incubó por 24 horas. Al día siguiente se atemperó aproximadamente a 45°C cada uno de los BF, IB y EHDP, quienes estaban preparados en las distintas concentraciones (1 μ M, 10 μ M en PBS). Se descartó el medio de cada pocillo de la placa en el recipiente que contiene hipoclorito y se colocó en cada uno de ellos según correspondía, medio RPMI con SFB 10%+ PBS, BF, medio RPMI con SFB 10% tal como se muestra en el esquema antes visto y luego se procedió con la correspondiente lectura y recuento cada 48 hs. Se midieron por triplicado.

7.2.9 Medición de proteínas método Bradford

La preparación de las muestras celulares se realizó posteriormente al conteo celular en los experimentos con los BF, del pellet original fueron tomados dos alícuotas de 20 μ l, rotuladas por fecha de experimento y guardadas a -20 $^{\circ}$ C. Una de estas alícuotas se descongeló y 10 μ l se colocaron en otro tubo al que se le agregó 10 μ l de solución de NaOH 2M para que la concentración de NaOH final fuese de 1M y así romper la membrana celular y que las proteínas quedaran libres para ser cuantificadas con el colorante Bradford. La curva de calibración se realizó con BSA con el agregado 10 μ l de NaOH 1 M, para descartar interferencias. Se vortexeó cada muestra varias veces y luego se incubó en baño térmico por 30 minutos. Luego de este tiempo el tubo nuevamente se vortexeó varias veces (3 o 4) y 10 μ l fueron utilizados para medir proteínas. A esos 10 μ l se les agregó 1ml de reactivo de Bradford (diluido 1/5) y la solución nueva fue colocada en una cubeta y llevada al espectrofotómetro para medir absorbancia (a 450 nm). Se midieron por duplicado.

8 EXPERIMENTOS EN ESPECTROFLUORÓMETRO

8.1 Preparación de Fluo 4 AM y mecanismo de acción

Se partió de un stock de Fluo 4AM 1mM en PBS guardado a -20°C. En el flujo laminar se tomaron 10 µl del stock y se llevó a un volumen final de 1000 µl con H₂O deionizada, de tal manera de obtener un stock de Fluo 10 µM, el cual fue utilizado durante el/ los experimentos.

El indicador fluorescente verde de calcio se utiliza comúnmente como el éster acetoximetílico no fluorescente (Fluo-4 AM) que se escinde dentro de la célula para dar el Fluo-4 libre que se une al Ca²⁺ después ingresar a la célula y cuando lo hace emite luz verde; sus espectros de extinción son de 495 nm y de emisión de 516 nm. Para calcular la concentración de Ca²⁺ intracelular se utiliza la siguiente fórmula (Gee KR, 2000):

$$[Ca^{2+}]_i = Kd * (FI - F_{min}) / (F_{max} - FI)$$

El Kd es un valor constante de disociación del calcio del fluorescente, FI es la fluorescencia de cada punto, F_{min} es la fluorescencia mínima obtenida y la F_{max} la correspondiente a la máxima luego de agregado de ionomicina.

8.2 Preparación de los Bisfosfonatos

Para la preparación de los BF se procedió a autoclavar en una botella una solución de PBS. Luego se pesaron en un tubo Falcon estéril cada uno de los BF. En flujo laminar se agregaron 5 ml de PBS estéril en un tubo Falcon y se colocó el BF previamente pesado para que la concentración final de cada uno fuera de 10 mM. Se midió el pH de la solución preparada en pHímetro y el pH fue de 7,5, con lo cual no fue necesario añadir ni NaOH ni HCl para llevar a correcto pH. Luego se procedió al filtrado de la solución formada y se alícuotó el volumen obtenido en varios tubos Eppendorf estériles. El agregado de H₂O deionizada a la solución se utilizó para obtener soluciones de BF: 10, 100, 1000 µM.

8.3 Soluciones de sales

Las sales de Gluc_2Ca y de Cl_2Ca se prepararon a una concentración de 15 mM en 20 ml de volumen final con H_2O deionizada en tubo Falcon de 50 ml. Este stock concentrado se lo filtró con filtros de 0,22 μM y se lo guarda a 4°C.

8.4 Marcación celular con Fluo 4AM

Las células fueron retiradas con micropipeta del recipiente que las contenía y pasadas a un tubo Falcon de 15 ml. Para las células VERO y HT29 se utilizaban 1 o 2 frascos (dependiendo de la confluencia alcanzada). Luego se procedía a su centrifugación y posteriores lavados con buffer sódico (3 veces para eliminar células muertas). Luego de los lavados se realizaba el conteo celular. Se sembraban por pocillo: $1\text{E}+05$ células (VERO o HT-29). Luego se le agregaba una concentración final de Fluo 4AM de 6 μM . Se incubaban las células por 45- 50 min. en estufa a 37°C y después 15 min. a temperatura ambiente (en oscuridad). Luego se realizaban 3/4 lavados a cada tipo celular en el mismo buffer HBSS y finalmente se diluían con buffer acorde a la cantidad de células y se añadían 0,1 μM de concentración final EGTA (1 mM stock).

8.5 Medición de fluorescencia en equipo GloMax: desafío con BFS

Antes de comenzar a trabajar se debía asegurar que el cuarto del equipo estuviera a $\sim 25^\circ\text{C}$, condicionado con un Split y a oscuras.

Se realizó el agregado de 0,1 mM de EGTA al medio de incubación para eliminar el efecto del Ca^{2+} libre sobre la medición del experimento, de esa manera se pudo ajustar los valores al Ca^{2+} agregado en forma experimental.

Luego del lavado las células se resuspendieron para ser repartidas en los pocillos con un volumen final de 90 μl , conteniendo la cantidad de células reportadas con anterioridad.

Se sembraron 3- 4 pocillos / experimento por cada condición y tipo celular y se realizaron 7-8 experimentos por condición. El número (n) total de la muestra representa el número total de mediciones por cada condición, número de pocillos medidos.

Al ingresar la placa en el equipo, se comenzó midiendo la fluorescencia cada 1-2 minutos repitiéndose unas 3 o 4 veces, hasta que se detectaran valores estables. Todas las mediciones con previa agitación de la placa por unos 10 segundos aproximadamente (opción de shaker en el equipo GloMax). Cuando se finalizaba con la detección de 4 valores estables se comenzaba con el tratamiento: agregado de BF (EHDP ó IB), se agregó a cada pocillo 10 μ l de EHDP / IB (provenientes de un stock 300 μ M en PBS) y se midió la señal unas 3 veces, luego se agregaba 10 μ l de cloruro o gluconato de calcio/ vez, midiendo la fluorescencia 3 veces. Las sales se agregaron a una concentración de 1,5 mM. Una vez finalizado el agregado de calcio, se agregó a cada pocillo 10 μ l de ionomicina a una concentración de 90 μ M para obtener el 100% de fluorescencia emitida por el Fluo 4AM intracelular y la capacidad total de entrada de Ca^{2+} . Se midió la fluorescencia unas 3 veces más.

9 ESTADÍSTICA

La unidad experimental es el pocillo, la comparación entre las líneas celulares HT29 y VERO. El primer experimento fue desarrollado a partir del crecimiento celular y de los μg de proteínas obtenidas en cada experimento por célula. Para el segundo experimento se utilizó la media de los datos de concentración μM Ca^{2+} intracelular. Para el análisis de resultado se utilizó análisis de la varianza para diferenciar grupos de tratamiento y la “test t de student” para comparar las medias en ambos experimentos donde se expusieron las células a los BF y a las sales de calcio.

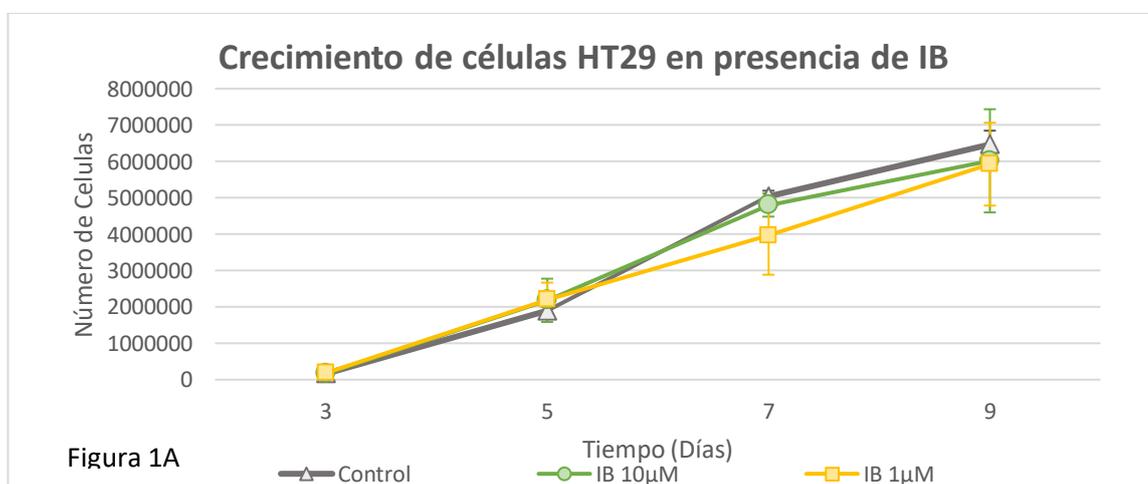
10 RESULTADOS

10.1 Evaluación de los efectos antiproliferativos de los BF en las células HT29 y VERO

10.1.1 Efecto de los bisfosfonatos sobre el crecimiento de las células HT29 y VERO

Se observó que en el día 9 los BF, IB y EDHP, en las dos concentraciones utilizadas, 10 μM y 1 μM , no afectaron el crecimiento de las células HT29 de manera significativa ($p > 0,05$) con respecto al control sin tratamiento, analizado con el “test t de student”. En contraste, utilizando la misma prueba paramétrica, se evidencio diferencias significativas ($p < 0,05$) en el crecimiento celular de las células VERO expuestas a concentraciones de IB 1 μM y EHDP 1 μM . No se encontraron diferencias significativas ($p > 0,05$) en la concentración de IB 10 μM ni EHDP 10 μM en comparación con su control (sin BF). Ampliando el análisis de las células VERO para el día 7 del experimento, se encontró diferencia significativa ($p < 0.05$) solo en la concentración de EHDP 1 μM .

A continuación, se resume en las figuras 1A, 1B, 1C, 1D, los resultados obtenidos y mencionados anteriormente. En ellas cada uno de los puntos representa una media y el desvío estándar (DS) de los pocillos analizados, que se hicieron por triplicado en cuatro experimentos independientes. Estos se analizaron por un periodo de 9 días cada 48 hrs. El tiempo cero es el momento que se siembran las células. Los BF fueron agregados 24 hrs. después de la siembra y la primera lectura se efectuó 48 hrs. después de comenzado el tratamiento. El tamaño de la muestra por cada condición fue de 12 pocillos.



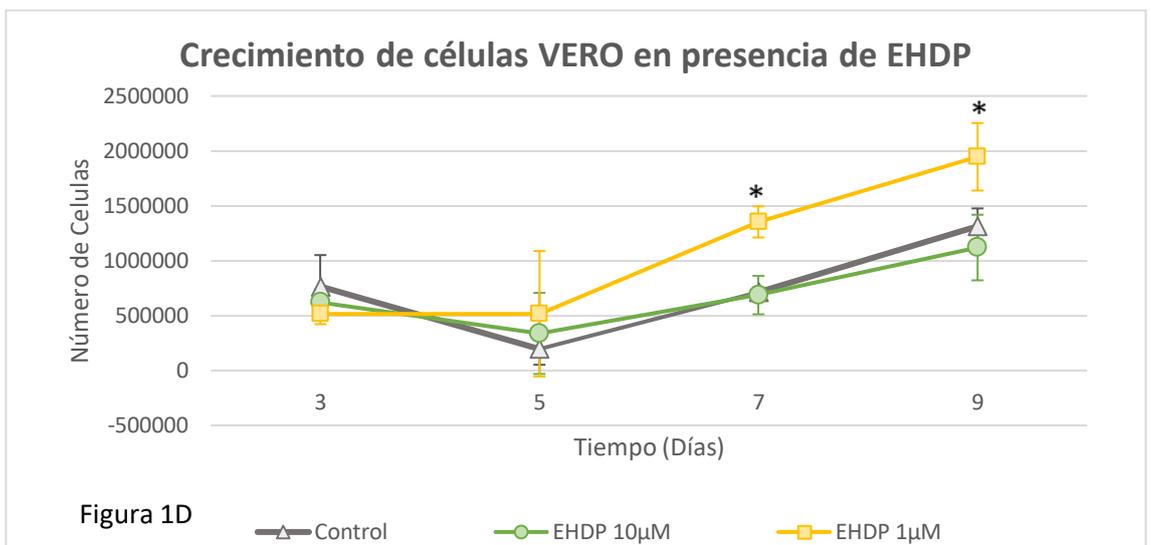
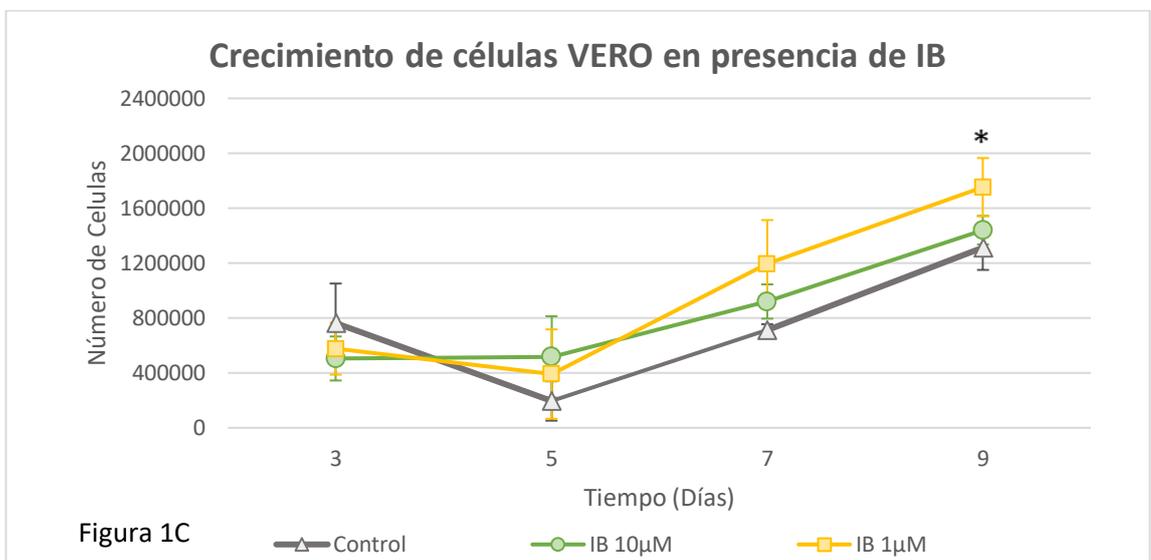
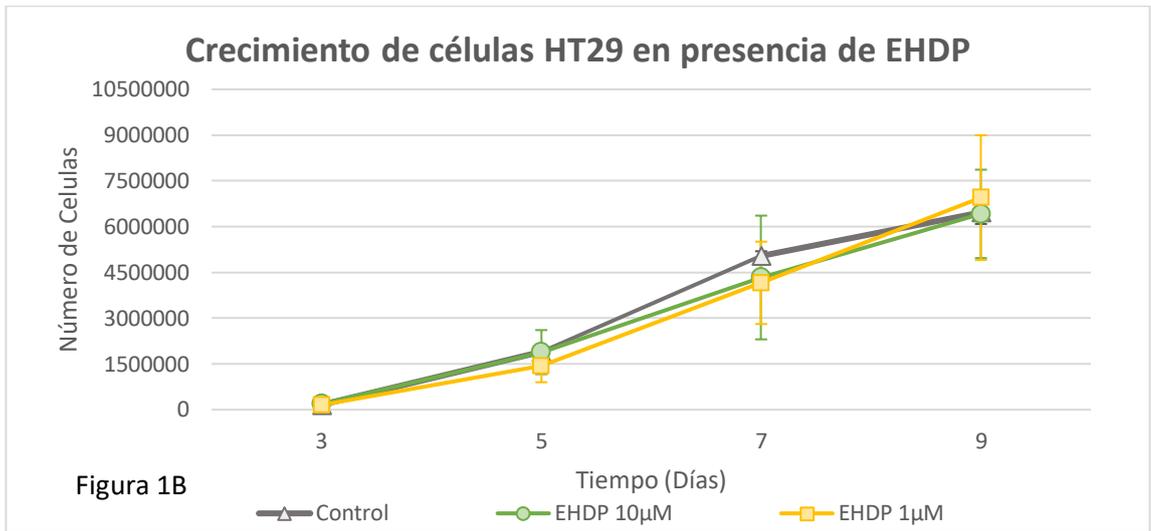


Figura. 1. Muestra el efecto de los BF a distintas concentraciones sobre el crecimiento celular. Células HT29: (1A) ibandronato y (1B) etindronato (EHDP) y células VERO 1C ibandronato (IB) y 1D etindronato (EHDP). * $p < 0,05$

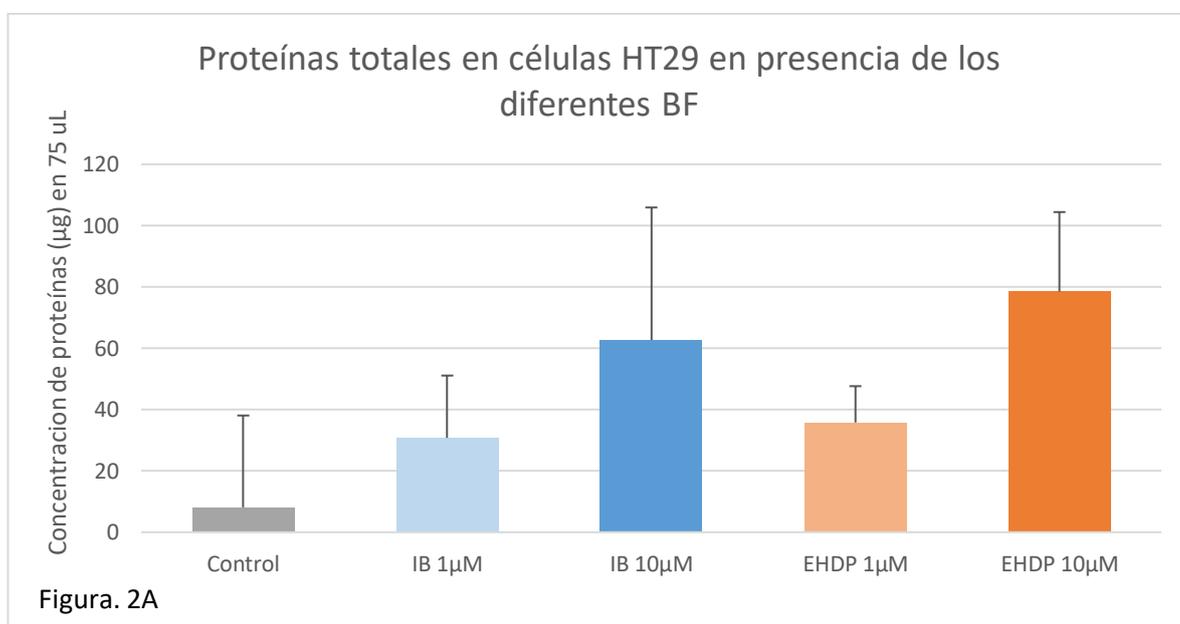
10.1.2 Proteínas totales en células HT29 y VERO expuestas al ibandronato y etindronato

Las muestras se procesaron luego de cada experimento. Los datos obtenidos fueron utilizados para hallar la concentración total de las proteínas celulares utilizando el método de Bradford.

Analizando las concentraciones de proteínas obtenidas en las células HT29 (figura 2A) expuestas a los diferentes BF, no se encuentran diferencias significativas ($p > 0,05$) con el “test t de student” en comparación con el control (sin BF). Las células HT29 expuestas a la concentración de EHDP 10 μM presentó una tendencia progresiva al aumento de proteínas intracelulares, pero no llega a ningún punto de diferencia significativa utilizando la misma prueba paramétrica, presentando un DS alto.

En las células VERO (figura 2B) se observó diferencias significativas ($p < 0,05$) en la concentración de proteínas celulares, tanto en las expuestas a IB (1 μM , 10 μM) como en las expuestas a EHDP (1 μM , 10 μM) esto con respecto al control (sin BF).

En las siguientes figuras se analizan los datos finales tomados del último día del experimento (Día 9), en esta se grafica la media y el DS de los 3 pocillos por cada condición.



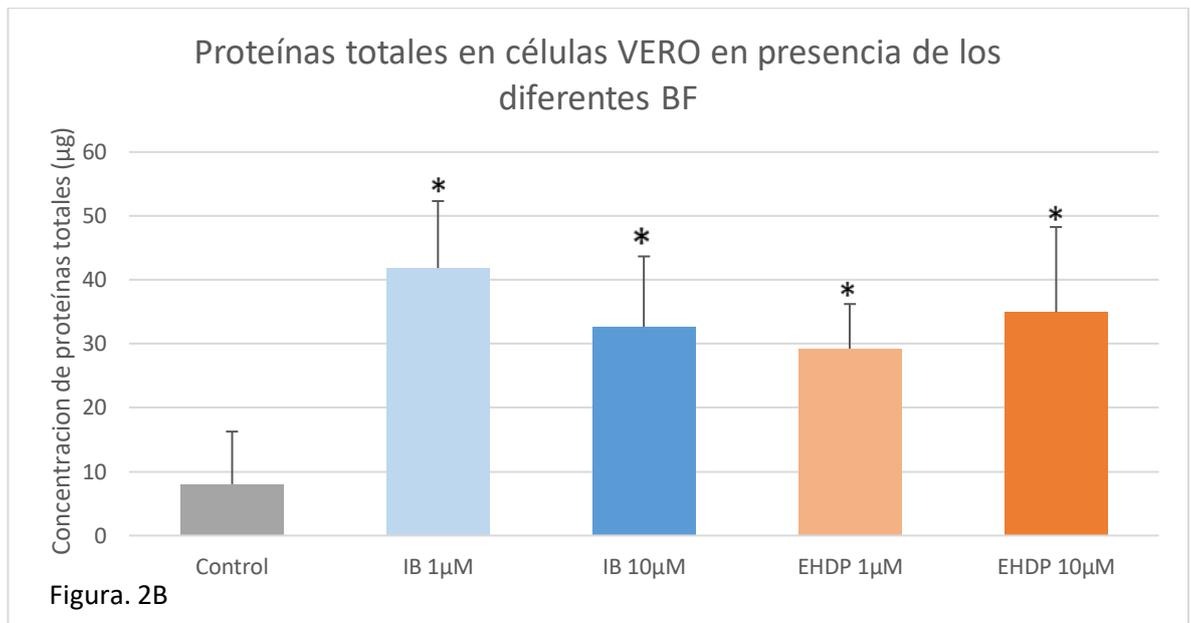


Figura 2. Concentración de proteínas celular al final del tratamiento con distintas concentraciones de BF: ibandronato (IB) y etindronato (EHDP). (2A) en células HT29 y (2B) en las células VERO. * $p < 0,05$, evaluado por el “test t de student” respecto a las células control sin tratamiento.

10.1.3 Concentración final de proteínas por célula en las células HT29 y VERO

Se utilizaron los conteos celulares finales de la curva de crecimiento celular y las cantidades de proteínas finales obtenidas para hallar la concentración final de proteínas/célula.

Se analizaron los datos obtenidos de la concentración final de proteínas por célula en las células HT29 y VERO con el “test t de student”. En las células HT29 expuestas a IB Y EHDP (1 µM, 10 µM) (figura 3A) no se observaron diferencias significativas ($p > 0,05$). En las células VERO solamente se encontraron diferencias significativas ($p < 0,05$) en las células expuestas a IB (10 µM) y EHDP (10 µM) (figura 3B). Comparando las muestras tratadas con el control (sin BF).

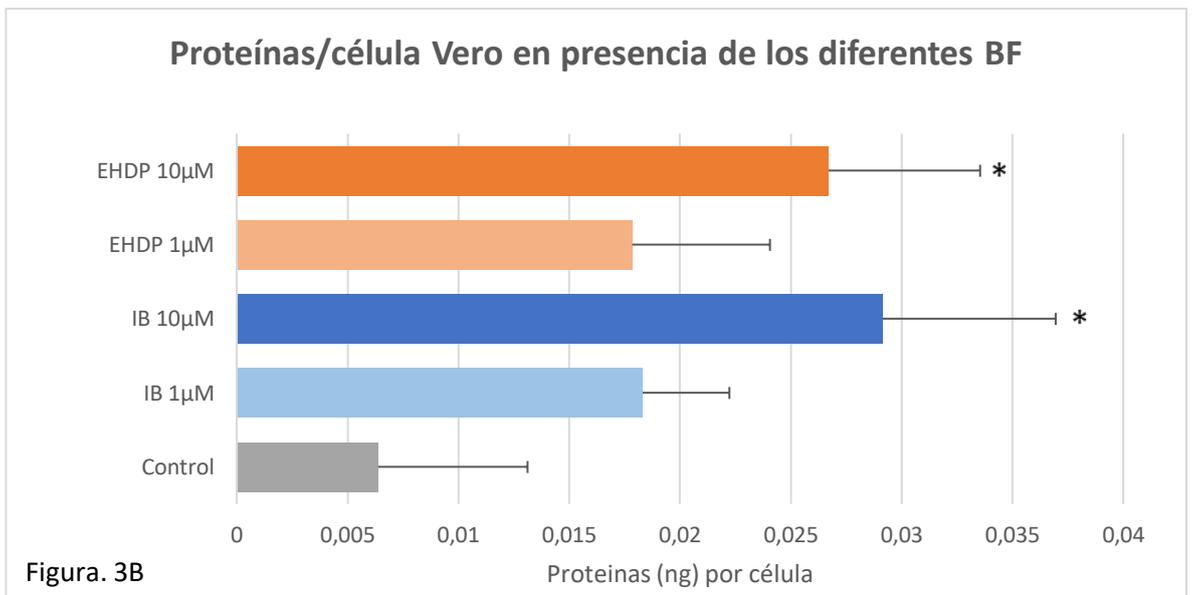
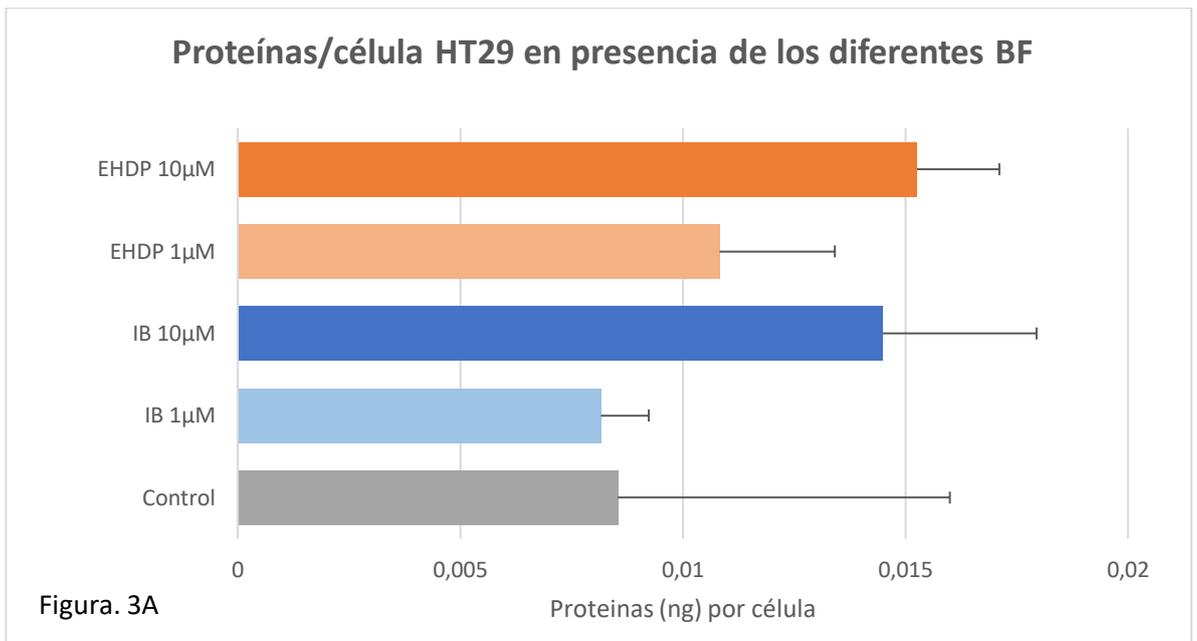


Figura 3. Concentración de proteínas por células evaluada al final del tratamiento (9 días) de incubación con los BF ibandronato (IB) y etindronato (EHDP) en distintas concentraciones. Figura 3A células HT29 y 3B células Vero. * $p < 0,05$

10.2 Efecto de los BF en la entrada de Ca^{2+} en células HT29 y VERO

10.2.1 Fluorescencia obtenida en células HT29 y VERO luego de la adición de BF, Cl_2Ca , Gluc_2Ca

Los valores de la fluorescencia nos brindan información sobre el comportamiento y transporte de la entrada de Ca^{2+} intracelular en las HT29 y VERO al ser expuestas a diferentes de condiciones experimentales. En el primer paso se corroboró que en la adición de BF, no se generaban ningún tipo de modificación en la entrada de Ca^{2+} . El agregado de las sales de calcio produjo un aumento de la fluorescencia, lo que indica el aumento en el ingreso del Ca^{2+} intracelular, por último, el agregado de la ionomicina refleja el máximo de la entrada de Ca^{2+} en la célula, porque la ionomicina es un intercambiador. Este último dato es importante para hallar la concentración en μM de Ca^{2+} intracelular y verificar el mantenimiento de la viabilidad celular durante el experimento.

Fig. 4 (A, B, C) se muestran los resultados obtenidos con las células HT29 y en la Fig. 5 (A, B, C) los resultados obtenidos con las células Vero. Se observa las diferencias de fluorescencias obtenidas en células HT29 y VERO después de la adición de los BF, sales y la ionomicina; las adiciones de estos componentes están indicados en los gráficos por las flechas. Cada punto refleja el promedio obtenido de 4 pocillos durante 3 mediciones independientes.

10.2.1.1 Fluorescencias en células HT29

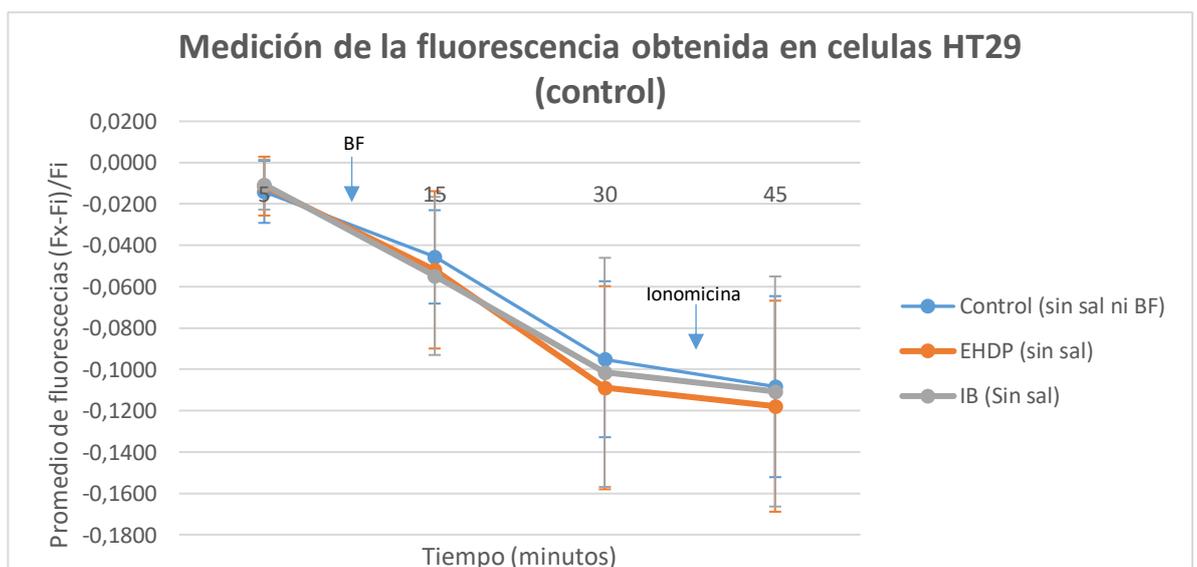


Figura 4 A. Se observa la fluorescencia sin presencia de sales de calcio

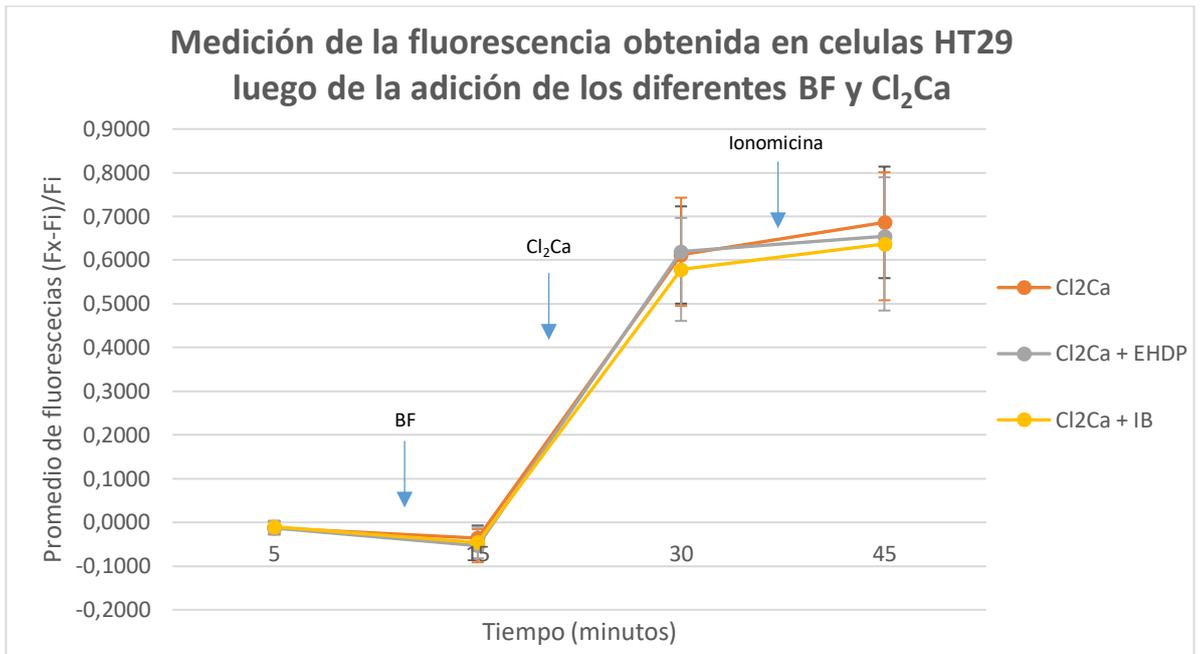


Figura 4 B. Se observa la fluorescencia en presencia de Cl₂Ca

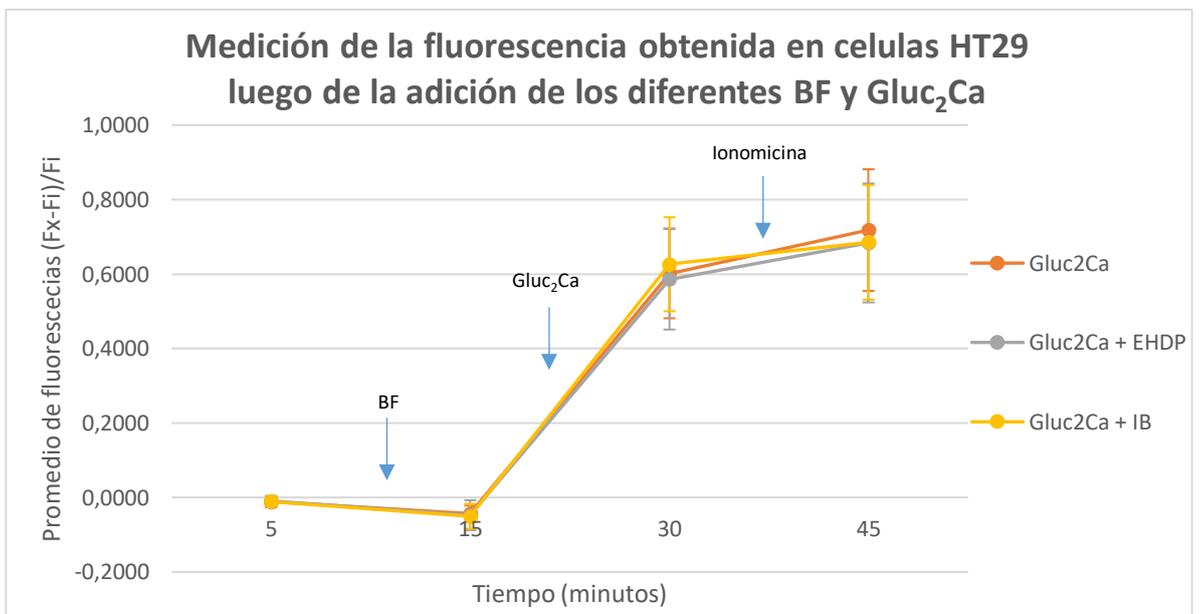


Figura 4 C. Se observa la fluorescencia en presencia de Gluc₂Ca.

10.2.1.2 Fluorescencias en células VERO

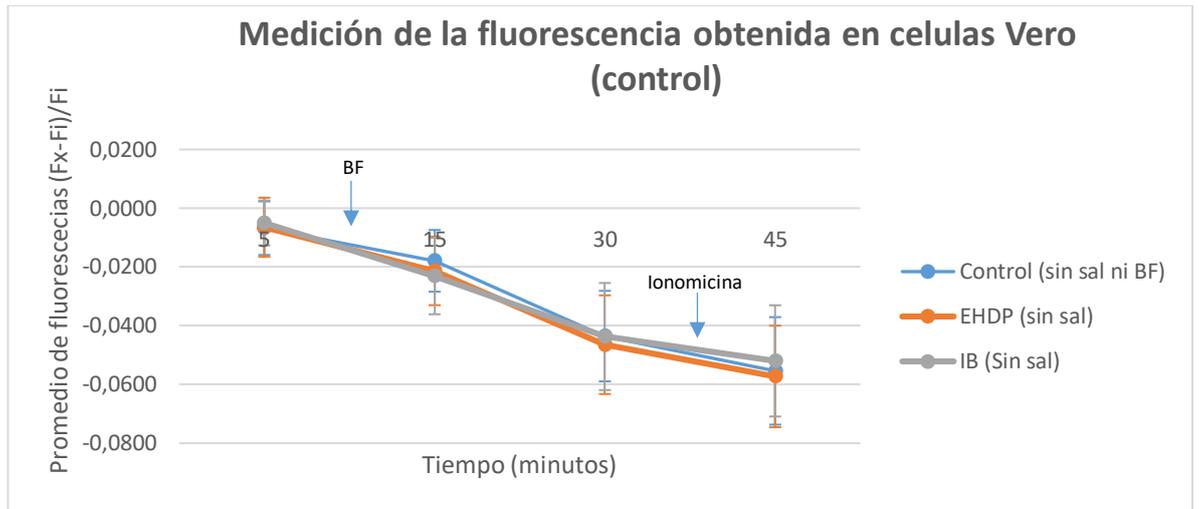


Figura 5 A. Se observa la fluorescencia sin presencia de sales de calcio

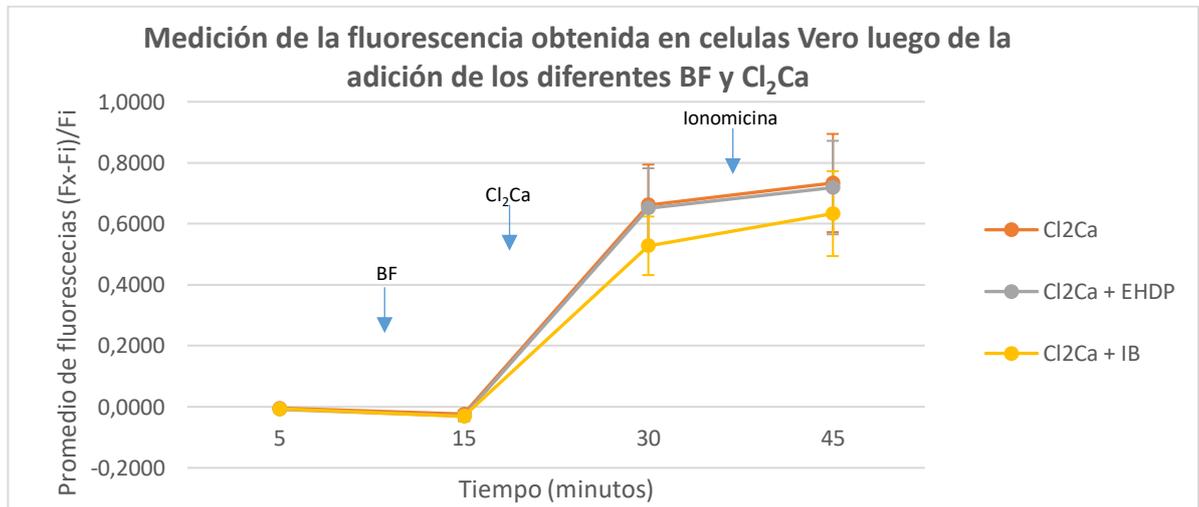


Figura 5 B. Se observa la fluorescencia en presencia de Cl₂Ca

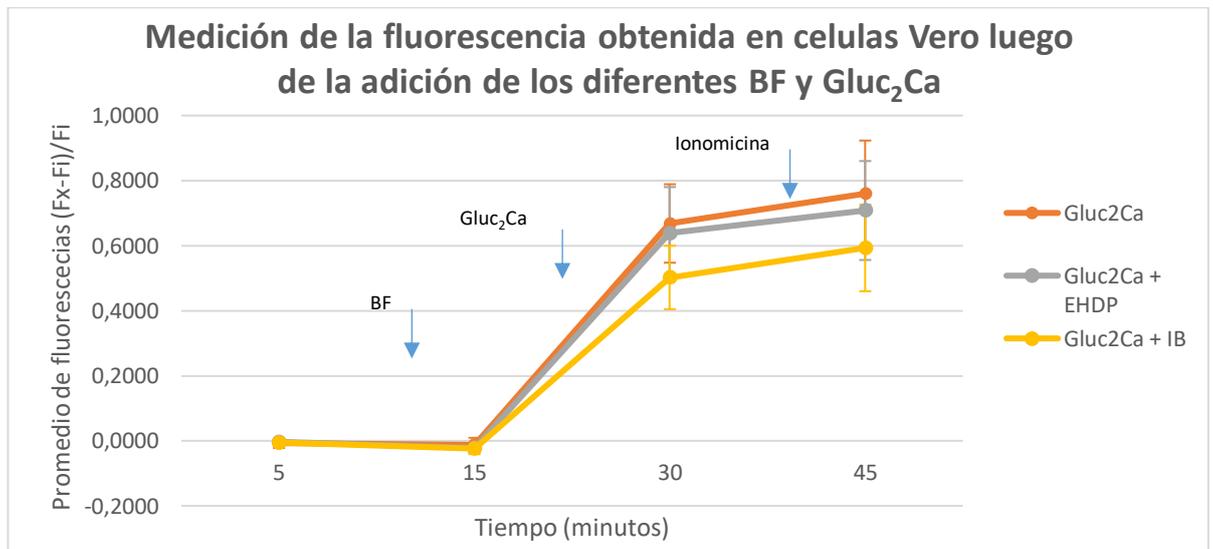


Figura 5 C. Se observa la fluorescencia en presencia de Gluc₂Ca.

10.2.2 Concentraciones (μM) de Ca^{2+} en las células HT29 y VERO

A partir de los datos de fluorescencias obtenidos en el paso anterior, se procedió a calcular la concentración de Ca^{2+} intracelular en las células HT29 y VERO con y sin BF (IB y EHDP) en presencia de Cl_2Ca o Gluc_2Ca . Las células incubadas sin BF constituyen el control para analizar el impacto de los BF en la entrada de Ca^{2+} intracelular.

El momento representativo del ingreso de Ca^{2+} en las células es luego del agregado de las sales al medio y antes del agregado de la ionomicina.

Utilizando el “test t de student” se determina que hay diferencias significativas ($p < 0,05$) al exponer las células HT29 con IB en presencia de Gluc_2Ca ($p = 0,0064$) o Cl_2Ca ($p = 0,0002$) y con EHDP en células incubadas sólo con Cl_2Ca ($p = 0,0010$) (Fig. 6A). Las HT29 incubadas con EHDP en presencia de Gluc_2Ca no presenta diferencias significativas ($p > 0,05$). El Cl_2Ca con IB fue el que presentó mayor aumento de Ca^{2+} intracelular respecto al control.

Analizando las células Vero (Figura 6B) con el “test t de student” no se observan diferencias significativas de las medias de concentración de Ca^{2+} intracelular luego de la exposición a las sales de calcio con y sin BF. Con un ($P > 0,05$).

Las figuras 6A (HT29) y 6B (VERO) muestran los resultados obtenidos en los distintos esquemas de incubación experimentales. Se grafican las medias y los SD, de triplicados de 4 experimentos independientes, total 13 pocillos por cada esquema experimental.

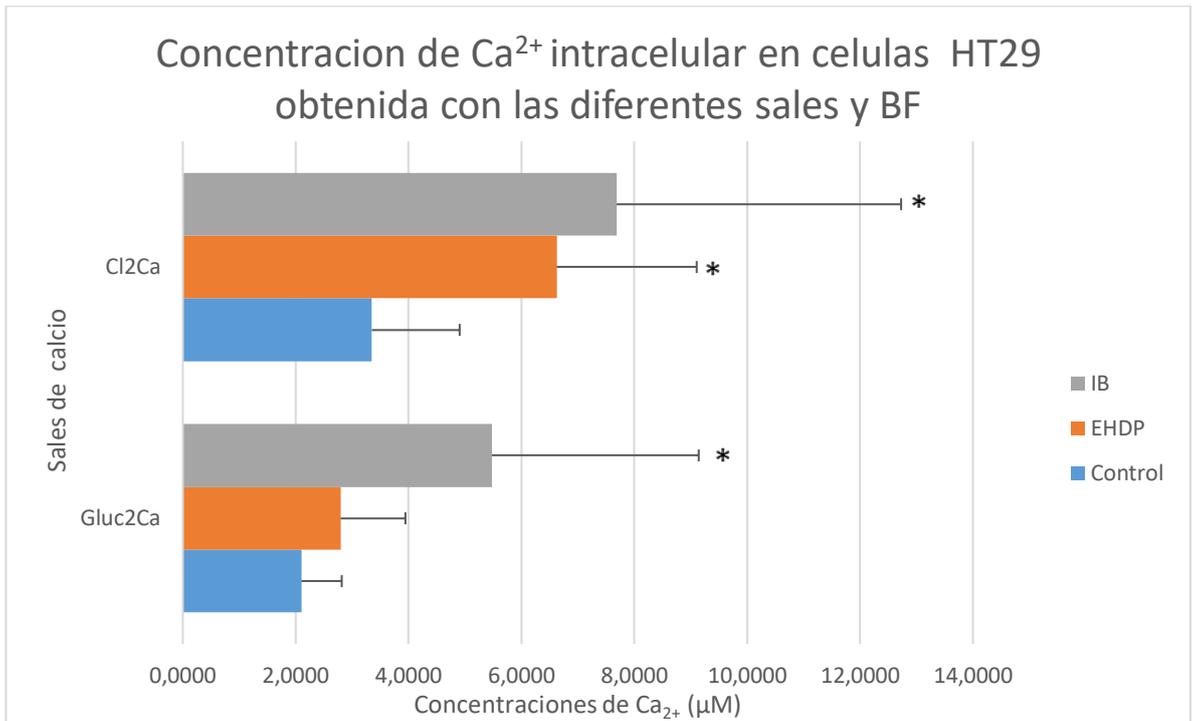


Figura 6 A. Se observa la concentración de Ca^{2+} intracelular, la media y SD, obtenida al final del experimento en las células HT29 expuestas a los BF ibandronato (IB) y etindronato (EHDP) y las respectivas sales Cl_2Ca y Gluc_2Ca . * $p < 0,05$.

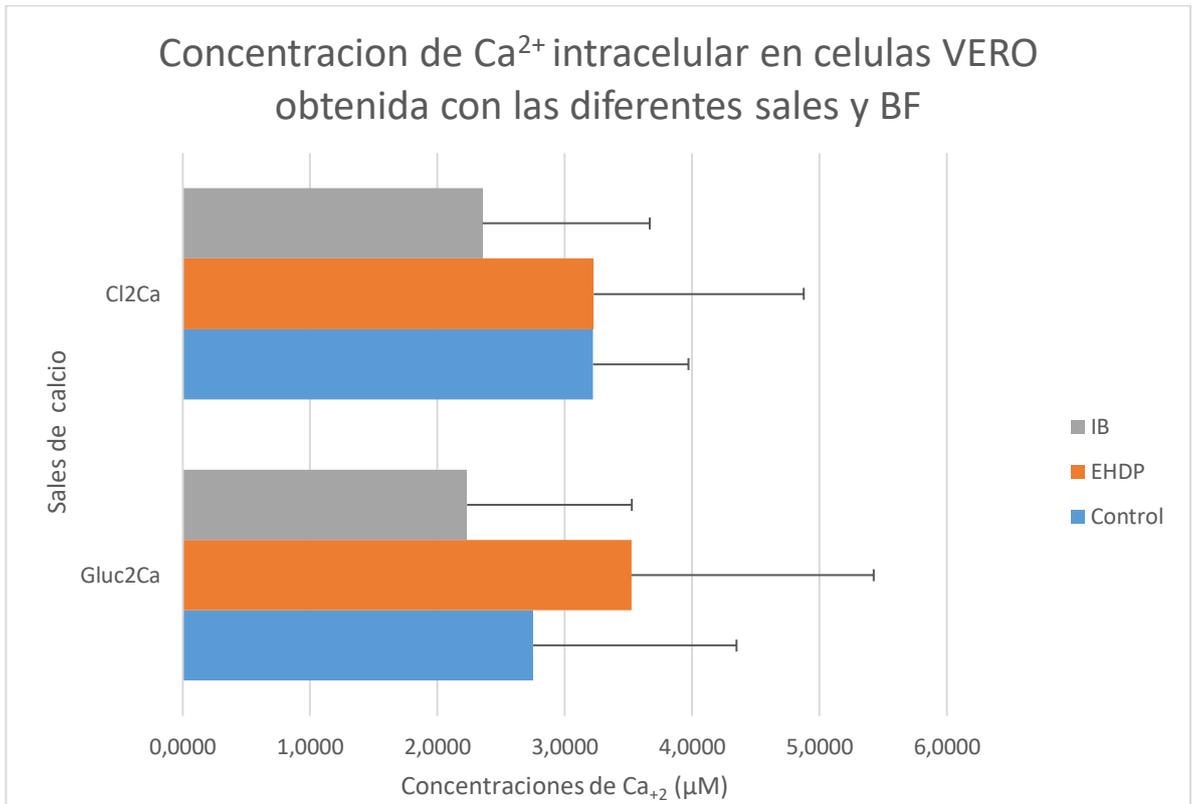


Figura 6 B. Se observa la media y el SD de la concentración de Ca^{2+} intracelular, obtenida al final del experimento, en las células VERO expuestas a los BF ibandronato (IB) y etindronato (EHDP) y las respectivas sales Cl_2Ca y Gluc_2Ca .

10.3 Escalamiento de los resultados experimentales a la investigación clínica farmacológica

El estudio del tratamiento del cáncer en el ser humano ha sido una tarea compleja para la investigación farmacológica, y el desarrollo de estudios preclínicos (*in vitro/in vivo*) es crucial para poder avanzar a estudios clínicos (humanos). Si el resultado del estudio *in vitro*, donde se estudió la acción antiproliferativa de los BF en las células tumorales HT29 hubiera sido promisorio, demostrándose su actividad biológica y su mecanismo de acción, llevaríamos el estudio del BF a una siguiente etapa en la investigación preclínica *in vivo*, donde el objetivo sería evaluar la eficacia terapéutica del BF en animales de experimentación y evaluar la acción de mismo en el órgano diana. En este caso nuestro órgano diana en estudio es el tumor de colon, por lo cual se inmunosuprime el animal o se usa un modelo inmunosuprimido como los ratones *nude*, creando las condiciones para que la implantación de un tumor humano pueda crecer. Si en esta etapa los resultados fueran favorables, o sea disminución del crecimiento del tumor sin toxicidad demostrable, se podría hablar de el escalonamiento de resultados experimentales a una fase de investigación clínica. Para ello se realizaría un protocolo de investigación de fase III, aleatorizado, controlado, doble ciego, multicéntrico. Evaluando la eficacia y seguridad del BF. El protocolo del estudio tiene que ser aprobado por un comité de bioética y en la Argentina por el ANMAT previa a su implantación. Las buenas prácticas clínicas (BPC) y la verificación de que el estudio se esté realizando bajo las directrices del protocolo y el cumplimiento de los requerimientos regulatorios, son supervisadas por un monitor (persona nombrada por el patrocinador o por la CRO) de ensayos clínicos a modo de garantizar que los derechos y el bienestar de los pacientes estén protegidos. Los datos del estudio se verifican en los documentos fuente, entre ellos se incluyen, el consentimiento informado, historia clínica (HC), registro de eventos adversos tanto en CRF, como en HC del paciente, graficas clínicas y administrativas, informes de laboratorio, diarios de los pacientes, planilla de visitas, asignación de medicamentos, formulario de control de temperaturas entre otras (64).

Se incluirían aproximadamente 700 personas con cáncer de colon en estadio III de ambos sexos para lograr un índice de confianza del 95%, con un error α : 0,05% y error β : 0,05% (65). Los participantes deberán haber comprendido y firmado el consentimiento informado para estar en el

estudio, se realizará una detallada lista de criterios de inclusión, por ejemplo, edad: mayor de 60 años, estadio III de la enfermedad. Y criterios de exclusión, por ejemplo, poseer alguna patología de base, como diabetes o enfermedades cardíacas y falta de adherencia a tratamientos. Que definirá qué población podrá ser incorporada al estudio.

Se utilizará la asignación aleatoria simple, generada por ordenador. Se adjudicará un número de asignación a los pacientes reclutados. Una vez que se haya adjudicado un número de asignación a cada participante, todo documento del estudio deberá ir identificado con ese número de asignación específico. Dicho número de asignación no se podrá adjudicar a ningún otro participante. Luego se dividen los participantes del estudio en dos grupos en una relación 1:1 hacia las ramas de tratamiento (tratamiento convencional-BF más tratamiento convencional). Los participantes de la rama 1 tendrán acceso al tratamiento convencional (grupo control) y los participantes de la otra rama recibirá tratamiento convencional más BF (grupo en estudio). Será un estudio doble ciego (donde ni el investigador ni el participante saben el tratamiento otorgado).

El objetivo principal del estudio es determinar si la adición de BF al tratamiento convencional luego de la resección quirúrgica del tumor primario de CCR estadio III reduce la probabilidad de recidiva del tumor. Como primer objetivo secundario tenemos comparar la Razón de Supervivencia Libre de Enfermedad (SLE) y Supervivencia Global (SG) desde la fecha de la asignación del tratamiento hasta la fecha de la primera observación de la recurrencia de la enfermedad o de la muerte entre los pacientes pertenecientes a la rama 1 y 2, evaluándolos a los 2, 3 y 5 años. La SG se resume mediante el método de Kaplan-Meier. Otro objetivo secundario es comparar el perfil de seguridad del tratamiento con BF evaluando los posibles efectos adversos del mismo.

Se realizaría un cronograma de visitas y procedimientos donde se especifique detalladamente la asistencia y donde se registrará todos los análisis de laboratorios, toma de signos vitales, tomografías, resonancias magnéticas, y todas las pruebas adicionales que sean importantes para evaluar la evolución del estudio, mantener la seguridad del paciente y detectar a tiempo posibles efectos adversos, de ser eventos serios se puede desvincular al paciente de estudio o directamente discontinuar el ensayo.

Finalmente, si el resultado del estudio demuestra que la adicción del BF al tratamiento convencional es más eficaz y lo suficientemente seguros para

los pacientes, se continuara con toda la parte reglamentaria. Presentando los resultados de la investigación al organismo correspondiente de la región para que autorice los BF en este tipo de tratamiento. Si se autoriza se pondrá en marcha la etapa de farmacovigilancia donde se asientan los efectos adversos a largo plazo de la medicación, de estos estudios dependerá su permanencia en el mercado.

11 DISCUSIÓN

Los BF poseen afinidad con el Ca^{2+} , actualmente son utilizados solos o de manera sinérgica con otros fármacos para el tratamiento de tumores y enfermedades esqueléticas (61). Se han realizado estudios *in vitro* con la intención de ampliar los conocimientos existentes sobre el modo de acción de estos fármacos y encontrar un resultado positivo para su aplicabilidad en el tratamiento de tumores sólidos. Se ha estado trabajando en distintas líneas celulares tumorales entre ellas líneas celulares de cáncer de colon, mama, pulmón, próstata entre otras (58)(66).

Entre los BF que son utilizados como terapia en las enfermedades esqueléticas y en las enfermedades óseas metastásicas como producto del cáncer avanzado, se encuentra el ZOL, PAM, CLO e IB, este último BF que se utilizó en este trabajo, fue motivo de interés también por otros autores y se realizó un estudio clínico evaluando la eficacia y seguridad del IB en sus dos presentaciones de administración, vía oral y vía venosa en pacientes con distintos tipos de cáncer avanzado, y se encontraron algunas diferencias que no quedan claras del todo (posiblemente por el bajo número de pacientes incluidos en el estudio); las diferencias se encontraron en la mortalidad, el motivo de retiro de los pacientes del estudio, y la alteración de algunos parámetros bioquímicos (67).

Este trabajo estuvo dirigido al estudio de los BF (IB y EHDP) sobre la proliferación celular y citotóxicos, sobre las células tumorales HT29 y células VERO. Los resultados fueron evaluados por la curva de crecimiento celular y su respectiva medición de concentración de proteínas. Se evaluó el mecanismo de acción de los BF sobre la entrada Ca^{2+} intracelular y si este era comparable entre las dos líneas celulares HT29 y VERO. Los valores de las fluorescencias obtenidas permitieron conocer el efecto de los BF sobre el Ca^{2+} intracelular en estas líneas celulares mostrando las diferencias existentes entre ambas.

El ion Ca^{2+} es un elemento esencial que se encuentra involucrado en diversos procesos biológicos, entre ellos la contracción muscular, división celular, la actividad enzimática, motilidad celular, formación de huesos, la estructura de la membrana celular, coagulación sanguínea y actuando como segundo mensajero en la regulación metabólica importante para la respuesta celular a estímulos de excitación. El Ca^{2+} tiene un rol mensajero intracelular que interviene en la activación de muchos procesos celulares

como la diferenciación, la proliferación, la apoptosis, el estrés oxidativo, así como en la síntesis, procesamiento y plegamiento de proteínas. En el crecimiento celular actúa como intermediario en la acción de los factores de crecimiento (68).

Para conservar un equilibrio intra y extracelular en la concentración de Ca^{2+} , la célula cuenta con una amplia gama de medios de transporte que auto regula los distintos compartimentos en la membrana plasmática y en los depósitos intracelulares. La desregulación de la homeostasis del Ca^{2+} o variaciones de concentración en los compartimentos, en especial en el citosol, pueden llevar a la activación o desactivación de determinados procesos y vías de señalización. La principal organela que regula la concentración del calcio intracelular, es el retículo endoplasmático y en momentos de exceso de Ca^{2+} intracelular, las mitocondrias tienen capacidad de acumular Ca^{2+} entre 10 a 100 veces más de la concentración del citosol, un exceso del ion en esta organela puede causar desequilibrio en la función respiratoria de la célula (69)(70).

El IB es un NBF Y el EHDP es un nNBF que han sido utilizados en el campo de la investigación y clínico. El uso de las sales Cl_2Ca y Gluc_2Ca en el estudio ha sido interesante por su diferencia en el mecanismo de acción para generar el ingreso del calcio iónico a las células. Lo cual nos permite estudiar dos comportamientos, uno más relacionado con el proceso de estrés osmótico y el otro con la relación Cl^- - Ca^{2+} . El objetivo con el agregado de sales fue acercarnos al conocimiento de cuál sería el mecanismo más involucrado en el aumento de la concentración de Ca^{2+} intracelular y el efecto de los BF en la modificación de la movilización del Ca^{2+} (influjo). En una célula no tumoral, una alta concentración Ca^{2+} intracelular puede ser tóxica. Por otro lado, en las células tumorales, HT29, un aumento de la concentración intracelular de Ca^{2+} podría permitir a la célula una mayor posibilidad de proliferación y supervivencia. Otros autores demostraron que las células HT29 tienen mayor tolerancia a concentraciones Ca^{2+} que su contraparte normal la línea celular NCM460, a pesar de que los mecanismos moleculares son similares (70).

A partir de los resultados obtenidos encontramos que en las células tumorales HT29 la presencia de IB con Cl_2Ca y Gluc_2Ca ; y de EHDP con Cl_2Ca generan un mayor ingreso de Ca^{2+} . Por el contrario, en las células VERO los BF no ocasionaron ninguna modificación de la concentración de calcio

iónico intracelular. Los NBF, como el IB, podrían ser más efectivos que los nNBF para el ingreso de calcio a la célula tumoral.

Los resultados obtenidos en este trabajo respecto al efecto de los BF sobre el crecimiento celular no apoyan hipótesis sostenida por otros autores del efecto del Ca^{2+} intracelular favoreciendo o inhibiendo su crecimiento. Otros autores han demostrado *in vitro* en células de cáncer de mama que las concentraciones de Cl_2Ca (2,0 mM) asociadas al IB causan inhibición de crecimiento celular y apoptosis inducida. El mecanismo de acción propuesto es que altas concentraciones de sal forman un complejo Ca^{2+} -IB facilitando el ingreso a la vez del complejo Ca^{2+} y BF. Permitiendo que este aumento de BF intracelular pueda tener una acción en la inhibición de la prenilación y efectos inhibidores de crecimiento celular y apoptosis (71).

Nuestros resultados no correlacionan la inhibición del crecimiento celular con la concentración de Ca^{2+} intracelular en ninguna de las dos líneas celulares estudiadas. Esto puede deberse a un sesgo cometido en el estudio del crecimiento celular, donde se observa una dispersión importante de los resultados obtenidos con las células HT29, tanto en el conteo como en la cuantificación de proteínas. Esto es debido a que estas células en estado más indiferenciado crecen formando colonias agrupadas y hay mucha apoptosis celular, además estas células tienen mucho *shedding*, secretando muchas proteínas y glicoproteínas, que pudieron ser lavadas y pérdidas durante las centrifugaciones preparatorias para el conteo y medición.

La tendencia al aumento de proteínas totales y el aumento de la concentración de proteínas por célula, podría estar indicando un efecto de los BF sobre la prenilación proteica y acumulación de proteína intracelularmente, porque las proteínas que forman el citoesqueleto son proteínas preniladas y la desorganización de este puede tener consecuencias sobre el transporte intracelular de proteínas, mecanismo involucrado tanto en la secreción celular como en la degradación de las proteínas. En las células VERO los resultados fueron menos dispersos, esto se debe a las características intrínsecas de las líneas celulares, como se ha mencionado anteriormente. No se observa efecto sobre el crecimiento celular a concentración de 10 μM , pero 1 μM de IB y EHDP ocasionan un aumento significativo de la proliferación. Este aumento puede deberse al efecto de los BF sobre la concentración de Ca^{2+} , comprobado por espectrofluorimetría, aunque no hay correlación clara entre dosis-respuesta en la proliferación celular (1-10 μM). Los resultados obtenidos en

la relación proteínas/célula, en esta línea celular, VERO, se observa que las proteínas se acumulan intracelularmente, posiblemente debido a la alteración del citoesqueleto debido a la disminución de la prenilación de proteínas por el efecto de los BF.

Respecto a la posibilidad de escalamiento del uso de los BF como tratamiento coadyuvante del CCR estadio III, otros estudios experimentales serían necesarios y también la prueba de mayor variedad de BF, ya que como se mencionó en la introducción, su potencia y sus blancos terapéuticos son variable. Los resultados obtenidos hasta el momento no concluyen sobre el beneficio de implementar este tratamiento. Entre los esquemas de estudios preclínicos que serían necesarios se incluye la realización de un protocolo dosis-respuesta en cultivo celular ampliando las dosis hasta los 100 μ M. El estudio de la combinación de los BF con otras drogas antineoplásicas utilizadas en el tratamiento del CCR como 5-fluorouracilo (5-FU), capecitabina, irinotecán entre otros(72). La comprobación por métodos bioquímicos que han inhibido las enzimas que intervienen en la prenilación. Estudios de microscopía electrónica para comprobar la afectación del citoesqueleto con el uso de BF. El estudio de marcadores de apoptosis celular, entre ellos, pérdida de asimetría de membrana detectado con Anexina V, liberación del citocromo c, condensación y fragmentación del ADN, activación de caspasas, disminución del potencial transmembrana mitocondrial, entre otros. La experimentación en animales *nude* trasplantados con tumores CCR humanos y el efecto de los BF solos y en combinación con los otros quimioterapéuticos y el testeo de la toxicidad sobre todo en riñón, hígado, médula ósea y sistema nervioso central. En todos estos estudios se tendrían que hacer controles con los tratamientos convencionales, los BF solos y la evolución natural de la enfermedad en los animales de experimentación. La dosis para ajustar en animales de experimentación está en relación de 100 a 1000 respecto a la dosis DE90 en cultivo celular o la combinación de estas utilizando la DL50 de ambas drogas a combinar y su escalamiento de dosis en forma proporcional. El escalamiento a las fases clínicas requiere de la seguridad experimental que los tratamientos son efectivos. Si se logra efectividad terapéutica experimental en especies animales se podría pasar a una fase 3 en humanos, siempre que el BF esté aprobado por el ANMAT, en la Argentina y la misma institución apruebe la investigación clínica propuesta junto con la aprobación de un Comité de Ética en Investigación.

12 BIBLIOGRAFÍA

1. Zago PMW, Fontes VC, Castelo Branco SJDS, Lima De Farias RR, Hass V, Ruiz ALTG, et al. Antiproliferative Effect of Zoledronate on Tumor Cell Lines. *Rev bras cancerol*. 2018;64(1):93–8.
2. Fleisch H. Bisphosphonates: Mechanisms of Action. *Endocrine Reviews*. 1998;19(1):80–100.
3. Ibieta ZBR, Mohar BA, Lara MFU, Rueda AAC, Reynoso NN. Los bisfosfonatos a través de la historia. *J Cancerol*. 2018;5:49–57.
4. Santini D, Schiavon G, Angeletti S, Vincenzi B, Gasparro S, Grilli C, et al. Last Generation of Amino-Bisphosphonates (N-BPs) and Cancer Angiogenesis: A New Role for These Drugs?. *Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery*. 2006;1(3):383–96.
5. Rogers MJ, Gordon S, Benford HL, Coxon FP, Luckman SP, Monkkonen J, et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Action of Bisphosphonates. *CANCER*. 2000;88(12):2961–78.
6. Lin JH. Bisphosphonates: A review of their pharmacokinetic properties. *Bone*. 1996;18(2):75–85.
7. Fleisch H. The role of bisphosphonates in breast cancer: Development of bisphosphonates. *Breast Cancer Res*. 2001;4(1):30.
8. Arboleya L, Alperi M, Alonso S. Efectos adversos de los bisfosfonatos. *Reumatol Clin*. 2011;7(3):189–97.
9. Khosravi SP, Díaz MDLEV. Bifosfonatos en oncología. *An Med Interna (Madrid)*. 2005;22(11):544–7.
10. Garbayo AJ, Villafranca E, de Blas A, Tejero A, Eslava E, Manterola A, et al. Enfermedad metastásica ósea. Diagnóstico y tratamiento. *Anales Sis San Navarra*. 2004;27:137–53.
11. Vogtmann E, Corley Douglas A, Almers LM, Cardwell CR, Murray LJ, Abnet CC. Oral bisphosphonates and colorectal cancer. *Sci Rep*. 2017;7(1):1–7.
12. Rennert G, Pinchev M, Rennert HS, Gruber SB. Use of Bisphosphonates and Reduced Risk of Colorectal Cancer. *J Clin Oncol*. 2011;29(9):1146–50.

13. Pazianas M, Abrahamsen B, Eiken PA, Eastell R, Russell RGG. Reduced colon cancer incidence and mortality in postmenopausal women treated with an oral bisphosphonate: Danish National Register Based Cohort Study. *Osteoporos Int.* 2012;23(11):2693–701.
14. Bonovas S, Nikolopoulos G, Bagos P. Bisphosphonate use and risk of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Br J Clin Pharmacol.* 2013;76(3):329–37.
15. Singh S, Singh AG, Murad MH, Limburg PJ. Bisphosphonates Are Associated With Reduced Risk of Colorectal Cancer: A Systematic Review and Meta-analysis. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2013;11(3):232-239.e1.
16. Sassa S, Okabe H, Nemoto N, Kikuchi H, Kudo H, Sakamoto S. Ibadronate may prevent colorectal carcinogenesis in mice with ulcerative colitis. *Anticancer res.* 2009;29(11):4615–9.
17. Madka V, Kumar G, Pathuri G, Zhang Y, Lightfoot S, Asch AS, et al. Bisphosphonates Zometa and Fosamax Synergize with Metformin to Prevent AOM-Induced Colon Cancer in F344 Rat Model. *Cancer Prev Res.* 2020;13(2):185–94.
18. Zhu J, Liu M, Liu Y, Zhang Y, Yang B, Zhang W. Zoledronic Acid Regulates Autophagy and Induces Apoptosis in Colon Cancer Cell Line CT26. *Biomed Res Int.* 2017;2017:1–6.
19. Varesano S, Zocchi MR, Poggi A. Zoledronate Triggers V δ 2 T Cells to Destroy and Kill Spheroids of Colon Carcinoma: Quantitative Image Analysis of Three-Dimensional Cultures. *Front Immunol.* 2018;9(998):1–13.
20. Hawkins CF, Jódar GE, Martínez DGG. Bases Moleculares del Mecanismo de Acción de los Bifosfonatos. *REEMO.* 2000;9(5):169–71.
21. Lai DH, Poropat E, Pravia C, Landoni M, Couto AS, Pérez RFG, et al. Solanesyl Diphosphate Synthase, an Enzyme of the Ubiquinone Synthetic Pathway, Is Required throughout the Life Cycle of *Trypanosoma brucei*. *Eukaryot Cell.* 2014;13(2):320–8.
22. Dunford JE, Rogers MJ, Ebetino FH, Phipps RJ, Coxon FP. Inhibition of Protein Prenylation by Bisphosphonates Causes Sustained Activation

- of Rac, Cdc42, and Rho GTPases. *J Bone Miner Res.* 2006;21(5):684–94.
23. Torregrosa J v, Ramos AM. Uso de Bifosfonatos en la Enfermedad Renal Crónica. *Nefrología (Madr).* 2010;30(3):288–96.
 24. Park J, Pandya VR, Ezekiel SJ, Berghuis AM. Phosphonate and Bisphosphonate Inhibitors of Farnesyl Pyrophosphate Synthases: A Structure-Guided Perspective. *Front Chem.* 2021;8:612728.
 25. Russell RGG. Bisphosphonates: The first 40years. *Bone.* 2011;49(1):2–19.
 26. Green JR. Bisphosphonates: Preclinical Review. *Oncologist.* 2004;9(S4):3–13.
 27. Mönkkönen H, Auriola S, Lehenkari P, Kellinsalmi M, Hassinen IE, Vepsäläinen J, et al. A new endogenous ATP analog (Apppl) inhibits the mitochondrial adenine nucleotide translocase (ANT) and is responsible for the apoptosis induced by nitrogen-containing bisphosphonates. *Br J Pharmacol.* 2006;147(4):437–45.
 28. Dominguez LJ, di Bella G, Belvedere M, Barbagallo M. Physiology of the Aging Bone and Mechanisms of Action of Bisphosphonates. *Biogerontology.* 2011;12(5):397–408.
 29. Fisher JE, Rogers MJ, Halasy JM, Luckman SP, Hughes DE, Masarachia PJ, et al. Alendronate Mechanism of Action: Geranylgeraniol, an Intermediate in the Mevalonate Pathway, Prevents Inhibition of Osteoclast Formation, Bone Resorption, and Kinase Activation in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(1):133–8.
 30. Russel RGG, Xia Z, Dunford JE, Opperman U, Kwaasi A, Hulley PA, et al. Bisphosphonates: an update on mechanisms of action and how these relate to clinical efficacy. *Ann N Y Acad Sci.* 2007;1117(1):209–57.
 31. Dwan K, Phillipi CA, Steiner RD, Basel D. Bisphosphonate therapy for osteogenesis imperfecta. *Cochrane Database Syst Rev.* 2016;2016(10):CD005088.
 32. Vidal MA, Medina C, Torres LM. Seguridad de los bifosfonatos. *Rev Soc Esp Dolor.* 2011;18(1):43–55.

33. Vidal MA, Medina C, Torres LM. Seguridad de los bifosfonatos. *Rev Soc Esp Dolor*. 2011;18(1):43–55.
34. Rodríguez PG, Pellicer JMÀ. ¿Qué hacemos con el consumo crónico de bifosfonatos? A propósito de fracturas y de fibrilación auricular. *Aten Primaria*. 2011;43(8):395–7.
35. Carroll MRR, Seaman HE, Halloran SP. Tests and investigations for colorectal cancer screening. *Clin Biochem*. 2014;47(10–11):921–39.
36. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209–49.
37. Francisco LK. Actualizaciones en el diagnóstico y tratamiento quirúrgico de los pacientes con cáncer de colon. *Rev méd Clín Las Condes*. 2013;24(4):645–53.
38. Abed J, Maalouf N, Manson AL, Earl AM, Parhi L, Emgård JEM, et al. Colon Cancer Associated *Fusobacterium nucleatum* May Originate From the Oral Cavity and Reach Colon Tumors via the Circulatory System. *Front Cell Infect Microbiol*. 2020;10:400.
39. Sanabria MC, Umaña A, Serrano ML, Sánchez M, Mesa J, Hernández GA. Vías de carcinogénesis colorrectal y sus implicaciones clínicas. *Rev Colomb de Cancerol*. 2012;16(3):170–81.
40. Sargent C, Murphy D. Lo que necesita saber sobre el cáncer colorrectal. *Nursing (Brux)*. 2003;21(7):8–13.
41. Carroll MRR, Seaman HE, Halloran SP. Tests and investigations for colorectal cancer screening. *Clin Biochem*. 2014;47(10–11):921–39.
42. Cruz BCD. Genética molecular del cáncer colorrectal. *Rev esp enferm dig*. 2004;96(1):48–59.
43. Binefa G. Colorectal cancer: From prevention to personalized medicine. *World J Gastroenterol*. 2014;20(22):6786–808.
44. Betés IM, Muñoz NM. Factores pronósticos del cáncer colorrectal. *An Med Interna (Madrid)*. 2008;25(7):317–20.
45. Markowitz SD, Dawson DM, Willis J, Willson JK v. Focus on colon cancer. *Cancer Cell*. 2002;1(3):233–6.

46. Machado PM, Rodríguez FZ, González TJH, Rodríguez RR. Relación diagnóstico y supervivencia en el cáncer de colon. *MEDISAN*. 2011;15(11):1566–76.
47. Sáez LP, Filipovich VE, Martínez PJ, Jiménez MS. Cáncer colorrectal en el anciano. Tratamiento quirúrgico, quimioterápico y aportación desde la geriatría. *Rev Esp Geriatr Gerontol*. 2017;52(5):261–70.
48. OECD. *The Application of the Principles of GLP to in vitro Studies*. Paris: OECD Publishing; 2004. 18 p.
49. Ramos T. Current context of preclinical studies. *Bionatura*. 2016;1(3):103–4.
50. ICH guideline S6 (R1)-preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals [Internet]. London: EMA. 2011 [cited 2021 Sep 14]. Available from: <https://www.ema.europa.eu/en/ich-s6-r1-preclinical-safety-evaluation-biotechnology-derived-pharmaceuticals>
51. Fina BL, Lombarte M, Rigalli A. Investigación de un fenómeno natural: ¿Estudios in vivo, in vitro o in silico? *Actual Osteol*. 2013;9(3):239–40.
52. Alfonso G, Guerrero M, Lorenzana JM. Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Rev Fac Med UNAM*. 2009;52(6):260–4.
53. Zurita CJN, Barbosa CL, Villasís KMÁ. De la investigación a la práctica: fases clínicas para el desarrollo de fármacos. *Rev alerg Méx*. 2019;66(2):246–53.
54. Marañón CT, León RR. La investigación clínica. Un primer acercamiento. *Humanidades Médicas* [Internet]. 2015 [cited 2021 Sep 16];15(1):163–84. Available from: http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1727-81202015000100010&lng=es&nrm=iso&tlng=es
55. Marovac J. Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. *Rev méd de Chile*. 2001;129(1):99–106.
56. Suvarna V. Phase IV of Drug Development. *Perspect Clin Res*. 2010;1(2):57–60.
57. Mirón HA. Riesgo biológico: evaluación y prevención en trabajos con cultivos celulares. Madrid: INSHT; 2011. 6 p.

58. Takeshi Y, Shinya K, Eishi A, Tomonori H, Taira M. Zoledronic Acid - a Multiplicity of Anti-Cancer Action. *Curr Med Chem.* 2007;14(20):2126–35.
59. Coleman R, Cook R, Hirsh V, Major P, Lipton A. Zoledronic acid use in cancer patients. *Cancer.* 2011;117(1):11–23.
60. Guillermo J, Eduardo J. El uso de los bifosfonatos en urología. *urol.colomb* [Internet]. 2009 [cited 2021 Sep 22];XVIII(2):29–40. Available from: <https://www.redalyc.org/comocitar.oa?id=149113065005>
61. Brown H, Holen I. Anti-Tumour Effects of Bisphosphonates - What have we Learned from In Vivo Models? *Curr Cancer Drug Targets.* 2009;9(7):807–23.
62. Coleman RE. Bisphosphonates: Clinical Experience. *Oncologist.* 2004;9(S4):14–27.
63. Tolia M, Zygogianni A, Kouvaris JR, Meristoudis C, Margari N, Karakitsos P, et al. The Key Role of Bisphosphonates in the Supportive Care of Cancer Patients. *Anticancer Res.* 2014;34(1):23–37.
64. Normas de buena práctica clínica [Internet]. España: Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios; 2002 [cited 2021 Dec 12]. 1–57 p. Available from: https://www.aemps.gob.es/industria/inspeccionBPC/docs/guia-BPC_octubre-2008.pdf
65. Bariani GM, Celis FACR, Precivale M, Arai R, Saad ED, Riechelmann RP. Sample Size Calculation in Oncology Trials. *Am J Clin Oncol* [Internet]. 2015 [cited 2021 Oct 11];38(6):570–4. Available from: <https://journals.lww.com/00000421-201512000-00006>
66. Gralow JR, Barlow WE, Paterson AHG, M'iao JL, Lew DL, Stopeck AT, et al. Phase III Randomized Trial of Bisphosphonates as Adjuvant Therapy in Breast Cancer: S0307. *JNCI* [Internet]. 2020 [cited 2021 Aug 11];112(7):698–707. Available from: <https://academic.oup.com/jnci/article/112/7/698/5613900>
67. Mystakidou K, Stathopoulou E, Parpa E, Kouloulis V, Kouskouni E, Vlahos L. Oral versus intravenous ibandronic acid: a comparison of

- treatment options for metastatic bone disease. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2008;134(12):1303–10.
68. Peredo LF, Rodríguez G, Herzberg AZ. Participación de las bombas de calcio del retículo endoplásmico en el cáncer. *Rev Educ Bioquímica* [Internet]. 2013 [cited 2021 Dec 8];32(4):137–44. Available from: <https://www.medigraphic.com/cgi-bin/new/resumen.cgi?IDARTICULO=74444#.YbHi96NSQIY.mendeley>
 69. Rasmussen H, Barrett P, Smallwood J, Bollag W, Isales C. Calcium ion as intracellular messenger and cellular toxin. *Environ Health Perspect* [Internet]. 1990 [cited 2021 Jul 11];84:17–25. Available from: <https://ehp.niehs.nih.gov/doi/10.1289/ehp.908417>
 70. Ubierna HD. Expresión diferencial de canales de calcio en células normales y tumorales de colon humano [Internet] [master's thesis]. [Valladolid]: Universidad de Valladolid y CSIC; 2013 [cited 2021 Dec 7]. Available from: <http://uvadoc.uva.es/handle/10324/3586>
 71. Journé F, Kheddoumi N, Chaboteaux C, Duvillier H, Laurent G, Body JJ. Extracellular calcium increases bisphosphonate-induced growth inhibition of breast cancer cells. *Breast Cancer Res* [Internet]. 2008;10(1):R4. Available from: <http://breast-cancer-research.biomedcentral.com/articles/10.1186/bcr1845>
 72. Aranda AE. Tratamiento del cáncer de colon estadios II, III y IV. *Oncología (Barc)*. 2004;27(4):130–3.