

# Laboratorios de Investigación en Biotecnología Médica

**Estudios Preclínicos en Investigación, Desarrollo e Innovación Biotecnológica**

EDITOR:  
Dr. N. Emmanuel Díaz-Martínez



CONACYT



CIATEJ

**Laboratorios de Investigación en Biotecnología Médica**  
Estudios preclínicos en investigación, desarrollo e innovación biotecnológica

**EDITOR:**

**Dr. Néstor Emmanuel Díaz Martínez**

Investigador

Biotecnología Médica y Farmacéutica

Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Primera edición

D.R. Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco  
Av. Normalistas No. 800 Colinas de la Normal. Gdl., Jal., 44270

ISBN: 978-607-97421-0-2

Diseño de portada: Dr. N. Emmanuel Díaz-Martínez

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio  
sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.

Printed and made in Mexico.

## AUTORES:

---

Néstor Emmanuel Díaz Martínez  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

María José Rivas Arreola  
Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, Campus Guadalajara.

Alba Adriana Vallejo Cardona  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Eduardo Padilla Camberos  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Yanet Karina Gutiérrez-Mercado  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Sergio Sandoval Ávila  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Estefanía Vázquez Méndez  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Mario Alberto Flores Valdez  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Ana Laura Márquez Aguirre  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

José Agustín Cota Coronado  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Jorge Bravo Madrigal  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Erika Nahomy Marino Marmolejo  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Zaira Yunuen García Carvajal  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Hugo Espinosa Andrews  
Unidad de Tecnología Alimentaria  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Alberto Gutiérrez Becerra  
Universidad de Guadalajara

Oscar Miguel Bermejo Gallardo  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Alejandro Rodríguez Ávila  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Jorge Armando Jiménez Avalos  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Carlos Cesar Bravo Reyna  
Departamento de Cirugía Experimental  
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición “Salvador Zubirán”

Rodolfo Hernández Gutiérrez  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Antonio Ocegüera Villanueva  
Instituto Jalisciense de Cancerología  
Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde

Claudio Frausto Reyes  
Centro de Investigaciones en Óptica

Julia Nava Vargas  
Departamento de Ciencias de la Tierra y de la Vida  
Universidad de Guadalajara

María de la Luz Miranda Beltrán  
Centro Universitario de los Lagos  
Universidad de Guadalajara

Benjamín Macuil Rojas  
Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia  
Universidad Nacional Autónoma de México

Elia Reza Escobar  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Mirna Burciaga Flores  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Omar Eliel García García  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Sandeep Surendra Panikar  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Tanya Amanda Camacho Villegas  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Michel de Jesús Aceves Sánchez  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Marisela Gonzalez Ávila  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Ricardo García Gamboa  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

María Gretel Michel Barba  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

María Cristina Velasquillo Martínez  
Subdirección de Investigación Tecnológica  
Instituto Nacional de Rehabilitación

José Clemente Ibarra Ponce de León  
Director  
Instituto Nacional de Rehabilitación

David Garcíadieago Cazares  
Instituto Nacional de Rehabilitación

Francisco Manuel Sánchez Arévalo  
Universidad Nacional Autónoma de México

Adelaida Sara Minia Zepeda Morales  
Top Health

Norma Lizette Michel García  
Top Health

Alfonso López Vázquez  
Top Health

Blanca Elizabeth Ruiz Álvarez  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Rudy Antonio García Reyes  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Melissa Rivera Escoto  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Nadxeli Saharay Gálvez Álvarez  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Gerardo Arrevillaga Boni  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Yerendira Paolah Gaytán Dávila  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Dr. Rodrigo Ramos Zúñiga  
Centro Universitario de Ciencias de la Salud  
Universidad de Guadalajara

Brenda Vega Ruiz  
Centro Universitario de Ciencias de la Salud  
Universidad de Guadalajara

Guadalupe García López  
Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular  
Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

Daniela Ávila-Gonzalez  
Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular  
Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

Anayansi Molina Hernández  
Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular  
Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

Néstor Fabián Díaz Martínez  
Departamento de Fisiología y Desarrollo Celular  
Instituto Nacional de Perinatología “Isidro Espinosa de los Reyes”

Flor Yohana Flores Hernández  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Alejandra Navarro Hurtado  
Oficina de Propiedad Intelectual  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Norma Angélica Paniagua Buelnas  
Oficina de Propiedad Intelectual  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

Jorge Gaona Bernal  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

José Miguel Flores- Fernández  
Tecnológico de Estudios Superiores de Villa Guerrero

**Inocencio Higuera Ciapara**  
**Director General**  
**Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco,**  
**A.C.**

CONTENIDO:

---

Prólogo

Dr. N. Emmanuel Díaz Martínez

Capítulo I.....1

**La Propiedad Intelectual (PI) en la fase de estudios preclínicos del proceso de I+D de un desarrollo biotecnológico**

*Alejandra Navarro Hurtado, Norma Angélica Paniagua Buelnas*

Capítulo II..... 13

**Procedimiento y regulación de estudios preclínicos en Biofarmacéutica**

*Rivas- Arreola M.J.*

Capítulo III.....20

**Estudios preclínicos en farmacología**

*Vega Ruiz Brenda, Ramos Zuñiga Rodrigo*

Capítulo IV.....29

**Protocolos preclínicos para evaluación toxicológica de fármacos**

*Eduardo Padilla Camberos, Yanet Karina Gutiérrez Mercado, José Miguel Flores Fernández*

Capítulo V.....37

**Evaluación de la seguridad, eficacia y perfil farmacocinético de la eritropoyetina recombinante en un modelo de Enfermedad Renal Crónica**

*Estefanía Vázquez Méndez, Ana Laura Márquez Aguirre*

Capítulo VI.....46

**Ingeniería de Tejidos para remodelación ósea: Matriz ósea desmineralizada**

*Rogelio Rodríguez Rodríguez, Eduardo Padilla Camberos, Emmanuel Díaz, Benjamín Macuil Rojas, Lizette Michel García, Sara Minia Zepeda Morales, Alfonso López Vázquez, María Cristina Velasquillo Martínez, Clemente Ibarra Ponce de León, David Garcíadieago Cazerres, Francisco Sánchez Arévalo, Zaira Yunuen García Carvajal*

Capítulo VII.....	59
<b>Posible Aplicación Terapéutica De Las Células Troncales Pluripotentes Humanas</b> <i>García López Guadalupe, Ávila Gonzalez Daniela, Molina-Hernández Anayansi, Díaz-Martínez Néstor Emmanuel &amp; Díaz Fabián</i>	
Capítulo VIII.....	70
<b>Modelo transgénico de la enfermedad de Parkinson en estudios preclínicos.</b> <i>Agustín Cota, Sergio Sandoval, Paolah Gaytán, Carlos Bravo &amp; Emmanuel Díaz</i>	
Capítulo IX.....	80
<b>Estudios preclínicos para la evaluación de anticuerpos monoclonales usados como inmunomoduladores</b> <i>Elia Reza, Mirna Burciaga, Omar García, Tanya Camacho</i>	
Capítulo X.....	93
<b>Estudios preclínicos en un Simulador de Tracto Digestivo Humano ARIS (Automatic and Robotic Intestinal System)</b> <i>Blanca Elizabeth Ruíz Álvarez, María Gretel Michel Barba, Rudy Antonio García Reyes, Nadxeli Saharay Gálvez Álvarez, Ricardo García Gamboa, Melissa Rivera Escoto, Zaira Yunuen García Carvajal, Gerardo Arrevillaga Boni, Marisela González Ávila</i>	
Capitulo XI.....	109
<b>Modelos animales para la evaluación de vacunas contra tuberculosis</b> <i>Michel de Jesús Aceves Sánchez y Mario Alberto Flores Valdez</i>	
Capitulo XII.....	118
<b>Ensayos preclínicos de inmunotoxinas para la terapia de cáncer de mama</b> <i>Sandeep Panikar, Elia Reza, Adriana Vallejo, Tanya Camacho</i>	
Capitulo XIII.....	137
<b>Análisis de Biopsias de Mama Cancerígenas Mediante la Técnica SERS</b> <i>Julia Nava Vargas, Claudio Frausto Reyes, Antonio Ocegüera Villanueva, María de la Luz Miranda Beltrán y Rodolfo Hernández Gutiérrez</i>	
Capitulo XIV.....	151
<b>Nanomateriales manufacturados (NMM) en los alimentos: Implicaciones en la Seguridad Alimentaria y la salud del consumidor.</b>	

*Alejandro Rodríguez Ávila, Oscar Miguel Bermejo Gallardo, Armando Jiménez Ávalos, Hugo Espinosa Andrews, Marisela Gonzalez Ávila, Alberto Gutiérrez Becerra, Zaira Yunuen García Carvajal*

CAPITULO XV.....169

**Implementación de un modelo metodológico para la evaluación de células beta pancreática diferenciadas a partir de células troncales**

*Flores Hernández Flor Yohana, Marino Marmolejo Erika Nahomy, Díaz Emmanuel, Bravo Madrigal Jorge, Gaona Bernal Jorge.*

Laboratorios de Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Estudios preclínicos en investigación, desarrollo e innovación biotecnológica

## PRÓLOGO

En las últimas décadas la creciente demanda para el desarrollo y descubrimiento de un medicamento o un dispositivo médico antes de llegar al ser humano involucran la aprobación y validación en un modelo *in vitro* o en animales de experimentación. Existen diversas metodologías y ensayos en donde se desprende la información necesaria para decidir la necesidad de estudios más amplios en seres humanos todo esto acompañado de la documentación necesaria y buenas prácticas de laboratorio. Por lo que, la selección apropiada y la aplicación correcta de los diferentes modelos junto con la apropiada interpretación de los resultados, son factores determinantes en la toma de decisiones para que un medicamento pueda pasar a la fase clínica sin conducir a riesgos innecesarios. Por otra parte, el estudio preclínico nos accede a una mayor información, permitiendo comprender mejor el metabolismo, la distribución/absorción, el medio de transporte, la biodisponibilidad y la seguridad de muchos candidatos biotecnológicos. El objetivo de este libro es dar a conocer los diferentes estudios y métodos desarrollados en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. y colaboradores referentes a Estudios Preclínicos.

Dr. Emmanuel Díaz  
Investigador  
Biotecnología Médica y Farmacéutica  
Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.

## AGRADECIMIENTOS

Este libro fue conducido bajo el auspicio del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, (CIATEJ) A.C. Se agradece el apoyo y la ayuda de cada investigador que con su experiencia y conocimiento contribuyó a la realización y culminación de esta obra intelectual. Cada autor es responsable de la información contenida en este texto.

Este trabajo fue impreso gracias al Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, (CIATEJ) A.C.

Proyecto FONDO CONACyT 2016 Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica. No. 271307.

Red Temática de Células Troncales y Medicina Regenerativa del CONACyT

**La Propiedad Intelectual (PI) en la fase de estudios preclínicos del proceso de I+D de un desarrollo biotecnológico**

*Alejandra Navarro Hurtado, Norma Angélica Paniagua Buelnas*

INTRODUCCIÓN

Uno de los enfoques de mayor prioridad para la biotecnología moderna es el de la salud humana, y para este objetivo se involucra una multiplicidad de disciplinas, que conducen a la generación de conocimientos y tecnologías de frontera que además de los beneficios a la humanidad como primordial propósito, adquieren un papel trascendental en el entorno económico del sector salud y de la industria farmacéutica, cuyas actividades y desarrollos biotecnológicos se enfocan de manera primordial en dos vertientes generadoras de valor, por una parte el desarrollo de fármacos y por otra el desarrollo de nuevas y mejoradas vacunas. (Martha Fors López, 2001)

En cualquiera de estos casos, antes de iniciar la fase de evaluación clínica en seres humanos para validar la seguridad y sea posible su liberación al mercado; dichos productos se someten a una serie de pruebas de laboratorio, que constituyen la fase de estudios preclínicos mediante los cuales se predice cómo actuará el producto en el posible usuario. Y, aunque el objetivo final es la materialización en el mercado ya sea de un fármaco o una vacuna, se debe tener en mente que existe la posibilidad de que durante la fase de estudios preclínicos, como parte del proceso de I+D, se dé origen a materia que por sí misma puede representar para los desarrolladores una oportunidad de generar valor comercial y económico mediante la apropiación de los resultados de su I+D a través de la protección de la Propiedad Industrial e Intelectual. Por lo que desde las fases tempranas del proceso de I+D de los desarrollos biotecnológicos hay una serie de intereses en principio contrapuestos; por una parte, el sector público que busca proporcionar los productos médicos, farmacéuticos y/o servicios que resultan de los nuevos desarrollos biotecnológicos al público al menor costo posible a fin de que la mayoría pueda tener acceso a estos. Por otra parte, el sector privado tiene como interés principal obtener el mayor beneficio posible del resultado de su inversión, que consiste generalmente de grandes sumas de dinero aunado al considerable riesgo comercial que dicha inversión supone, razón por la cual el sector privado está mayormente motivado a proteger sus resultados de I+D en un documento de patente. Incluso para algunas empresas y/o países la obtención de una patente biotecnológica es por sí misma el producto final deseado, puesto que pueden entonces transferir este derecho a un tercero, bajo el adecuado contrato de licenciamiento, y facilitar el posicionamiento y

comercialización del nuevo desarrollo biotecnológico, aumentando la probabilidad de tener un retorno de inversión deseado. Es así que, la protección de los derechos de PI es la moneda que sirve como una medida de valor del desarrollo tecnológico y del crecimiento económico. De hecho, el número de documentos de patentes biotecnológicas se puede tomar como un indicador de la actividad de innovación en biotecnología de un país reflejando su actividad productiva en torno a esta disciplina. Se toma como muestra con lo ilustrado en el gráfico 1, que se obtuvo al realizar una búsqueda de documentos de patente, tomando como enfoque los términos estudios preclínicos, *in vivo*, *in vitro*, *in situ*, *in silico* y *ex vivo*, mediante el uso de la base de datos de Thomson Innovation. De acuerdo con el gráfico, es Estados Unidos el país con un mayor número de documentos de patente con el 47% de los registros; esto pone de manifiesto el grado de inversión de Estados Unidos en los procesos de I+D para desarrollos biotecnológicos así como el celo para proteger sus resultados de I+D. Países como Gran Bretaña (5%), China (3%), Francia (3%) y Alemania (3%), tienen asimismo una participación importante en la protección de sus resultados de I+D. Cabe hacer mención de que en porcentaje de participación, el 22% es de solicitudes ingresadas vía el Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT) son las que tienen la segunda posición y Europa (7%) con el tercer sitio.

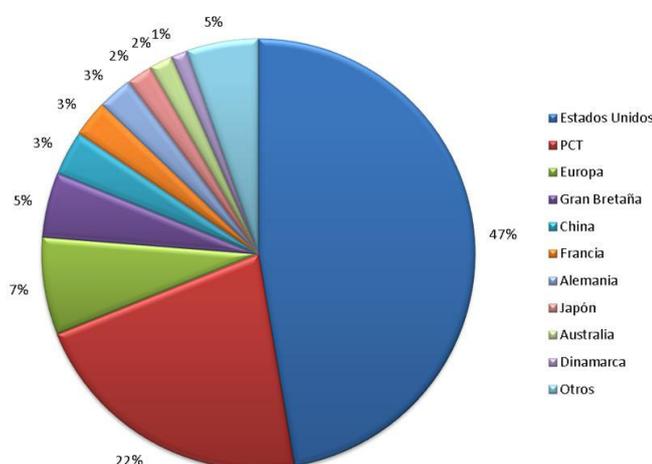


Gráfico 1. **Países con mayor participación.** Fuente: Thomson Data Analyzer. La búsqueda arrojó más de 13,651 invenciones utilizando los siguientes criterios de búsqueda: en las reivindicaciones aparecen las siguientes palabras: *In vivo*, *in vitro*, *in situ*, *ex vivo*, *in silico*, animal model, cell lines, cell culture, non-human model, preclinic, pre-clinic or pre clinic. Además, se incluyen dentro del texto palabras derivadas de biotech. Para fines ilustrativos solamente se agregan en el gráfico los resultados estadísticos relevantes.

A fin de analizar qué corporativos farmacéuticos o entidades han contribuido más con los registros de documentos de PI encontrados en esta búsqueda, se hizo una selección de las 10 organizaciones con mayor participación como se muestra en el gráfico 2. Lo que observamos es que 4 de ellos corresponden a entidades gubernamentales de

investigación como la Universidad de California que ha hecho un aporte de 222 registros; el Departamento de Salud y Servicios Humanos de US con 179 registros; el INSERM (Instituto Nacional de la Salud e Investigación Médica de Francia) que ha participado con 151 registros, y el CNRS (Centro Nacional de Investigación Científica de Francia) que ha aportado 147 registros. En tanto que los 6 restantes son corporativos farmacéuticos con fuerte presencia en el mercado como la empresa china BODE GENE DEVELOPMENT CO LTD SHANGAI que posee 391 de los registros; la empresa SMITHKLINE BEECHMAN CORP, actualmente fusionada al grupo GLAXOSMITHKLINE, y que es dueña de 224 de los registros; las compañías farmacéuticas estadounidenses ISIS PHARMACEUTICALS INC con 204 registros, y HUMAN GENOME SCI INC con 183 registros; el corporativo farmacéutico suizo HOFFMANN LA ROCHE & CO AGF que tiene 119 de los registros; y la empresa químico-farmacéutica de origen alemán BAYER SHERING PHARMA AG que ha aportado 107 de los registros encontrados en relación a este tipo de tecnologías.

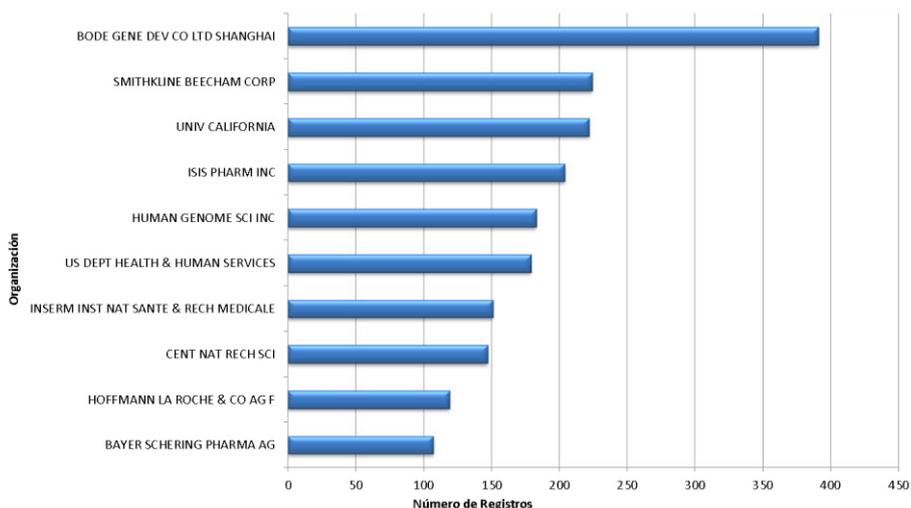


Gráfico 2. **Organizaciones con mayor participación.** Fuente: Thomson Data Analyzer.

De lo anterior se tiene que si bien la fuerza impulsora principal de los desarrollos biotecnológicos en el área de la salud y de la industria farmacéutica, al igual que en el caso de otras ramas tecnológicas, está constituida por las empresas, vemos cada vez una mayor participación del sector público representado por Centros de Investigación, Universidades y otras entidades gubernamentales. Aunque no aparecen en el gráfico, se ha considerado pertinente mencionar la participación de otras universidades estadounidenses con portafolios considerables de documentos de patentes, en este sector tecnológico, como la Universidad de Johns Hopkins (101); el Sistema Universitario de Texas (91); la Universidad de Leland Stanford Junior (68); la

Universidad de Harvard (64); la Universidad de Pennsylvania (57); y la Universidad de Washington (50).

La pregunta que sigue de lo anterior es ¿Cómo se protegen los resultados del proceso de I+D de un desarrollo biotecnológico? La respuesta en principio no es simple, dado que en este tipo de invenciones se involucra material biológico y de aquí el surgimiento de una serie de debates éticos que se han venido produciendo y que han dado pie al establecimiento de nuevos criterios, directrices y normas jurídicas que permiten delimitar lo que se puede o no puede patentarse. Aunque los sistemas de patentes continúan sujetos a cambios propiciados por los retos de las invenciones biotecnológicas, es sumamente importante contar con un panorama general que permita saber si alguna de las actividades realizadas durante el proceso de I+D ha dado lugar a una invención biotecnológica que pueda protegerse con una patente. Con este fin, se debe considerar en primer lugar que, para obtener la protección de una invención biotecnológica se deben cumplir los requisitos básicos de patentabilidad, como en el caso de invenciones de otros campos tecnológicos, a saber: 1) *novedad*, esto es, que no se encuentre en el estado de la técnica, definido como el conjunto de conocimientos técnicos que se han hecho públicos mediante una descripción oral o escrita, por la explotación o por cualquier otro medio de difusión o información, en el país o en el extranjero; 2) *actividad inventiva*, que se define como el proceso creativo cuyos resultados no se deduzcan del estado de la técnica en forma evidente para un técnico en la materia, es decir para una persona que tiene un nivel de conocimiento medio en el campo de la invención; y 3) *aplicación industrial*, que alude a la posibilidad de que una invención tenga una utilidad práctica o pueda ser producida o utilizada en cualquier rama de la actividad económica, para los fines que se describan en la solicitud.

En adición a lo anterior, debe tomarse en cuenta la legislación del país o países en donde se tiene interés de proteger la invención biotecnológica, así como los acuerdos y/o tratados a los que dicho país o países estén adheridos, por ejemplo el Convenio de Diversidad Biológica (CDB) que es un tratado internacional que versa sobre la conservación de la diversidad biológica, la utilización sostenible de sus componentes y la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos. O el protocolo de Nagoya, que se gestó como instrumento complementario al CDB, para establecer una serie de principios y reglas cuyo objetivo es como se muestra en su artículo 1:

*“...la participación justa y equitativa en los beneficios que se deriven de la utilización de los recursos genéticos, incluso por medio del acceso apropiado a los recursos genéticos y por medio de la transferencia apropiada de tecnologías pertinentes, teniendo en*

*cuenta todos los derechos sobre dichos recursos y tecnologías y por medio de la financiación apropiada, contribuyendo por ende a la conservación de la diversidad biológica y la utilización sostenible de sus componentes”.*

Otra pauta para armonizar los criterios de patentabilidad en las invenciones biotecnológicas, es el caso de los acuerdos establecidos en la Directiva Europea en relación a la protección de invenciones biotecnológicas, que establecen que se acepta la patentabilidad de:

- 1) las invenciones biotecnológicas que incluyen material biológico como:
  - a) Un microorganismo: teniendo una definición para fines de protección de la Propiedad Industrial, con mayor alcance que el de la definición biológica original, y se incluye en este grupo a bacterias, algas, virus, plásmidos, hongos, protozoarios, células derivadas de humanos, de animales o de plantas. Para este tipo de invenciones biotecnológicas el IMPI (Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial) toma criterios afines a los de la EPO (Oficina Europea de Patentes) y la USPTO (Oficina de Marcas y Patentes de los Estados Unidos), y admite la patentabilidad en tanto se demuestre que el microorganismo, la molécula biológica, y/o el organismo superior involucran un efecto técnico, es decir sirve para un fin claramente identificado y descrito suficientemente en la solicitud de patente que corresponda, demostrando así que va más allá de un mero descubrimiento. Cabe señalar que si bien la EPO y el IMPI excluyen la protección de variedades vegetales, no es así en el caso de la USPTO que si la considera como materia patentable. Otro caso relevante de mencionar es el del INPI (Instituto Nacional de la Propiedad Industrial) entidad que establece en la Ley de patentes de invención y modelos de utilidad de Argentina que es materia no patentable“...la totalidad del material biológico y genético existente en la naturaleza o su réplica...” de manera que cualquier materia viva queda excluida.
  - b) Una molécula biológica: como ADN, ARN, proteínas, fragmentos de dichas moléculas como nucleótidos o péptidos, o los productos recombinantes de cualquiera de ellos, bajo la premisa de que dicha molécula debe estar identificada, aislada, purificada, y caracterizada con base en su secuencia ya sea de nucleótidos o de aminoácidos; y que también se indique claramente en la solicitud la aplicación industrial de dicha molécula, es decir la utilidad específica aprovechable en cualquier rama de la actividad económica. Este criterio es común ante la EPO, USPTO e IMPI; sin embargo ante el INPI (Argentina) y otros países latinoamericanos se considera una exclusión de la patentabilidad; y en estos casos una alternativa es buscar la protección de si es

el caso de un proceso de aislamiento o de producción de tal molécula que sea novedoso e implique actividad inventiva. (Manual de la OMPI de redacción de solicitudes de patente)

- c) Organismo superior modificado: Una planta o un animal que se han manipulado mediante ingeniería genética con un propósito definido, por ejemplo para su uso como bio-reactor para la producción de una secuencia de ADN, de un péptido o de una proteína, como modelo de simulación de una enfermedad, o para llevar a cabo los estudios preclínicos de un nuevo fármaco o de una nueva vacuna. En este caso el IMPI tiene un criterio afín al de la EPO y quedan excluidas las variedades vegetales y las razas animales; mientras que la USPTO considera materia patentable las variedades vegetales.
- 2) las invenciones biotecnológicas que incluyen procesos o procedimientos que utilizan material biológico, que incluyan una intervención sobre el mismo, o que sirvan para producir material biológico. Ejemplo de ello son aquellos procesos para preparar y/o modificar moléculas biológicas (ADN/ARN), microorganismos u organismos superiores. Y se considerarían también como invenciones de este grupo aquellas que involucran aparatos por ejemplo fermentadores o kits para medición, identificación y/o detección del sistema biológico involucrado. (WIPO )

Ambos tipos de invenciones biotecnológicas patentables pueden surgir durante la ejecución de la fase de estudios preclínicos como parte del proceso de I+D. Más existe también la posibilidad de que durante dicha fase de estudios preclínicos se encuentre que un producto ya conocido: molécula biológica (ADN/ARN), microorganismo u organismo superior modificado tenga una aplicación o un uso médico/terapéutico distinto, que no se había siquiera considerado previamente, siendo en este caso posible la protección como patente de segundo uso.

Retomando el análisis de la búsqueda técnica de documentos de patente se observa que las invenciones biotecnológicas de los grupos antes descritos, son agrupadas de acuerdo con los criterios de la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) en los sectores tecnológicos mostrados en el gráfico 3. Destacan los sectores tecnológicos A61, que hace referencia a invenciones relacionadas a preparaciones de uso médico, dental o para el aseo; C12N, relacionado a las invenciones que incluyen microorganismos o enzimas, composiciones que los contienen, propagación, cultivo o conservación de microorganismos, técnicas de mutación o de ingeniería genética, y medios de cultivo; C07K relacionado a péptidos; A61P en relación a la actividad terapéutica específica de compuestos químicos o de preparaciones medicinales; G01N

de investigación o análisis de materiales por determinación de sus propiedades químicas o físicas, C12Q que agrupa invenciones que involucran procesos de medida, investigación o análisis en los que intervienen enzimas o microorganismos, composiciones o papeles reactivos para este fin, procesos para preparar estas composiciones, procesos de control sensibles a las condiciones del medio en los procesos microbiológicos o enzimológicos. Ya con una menor cantidad de registros de documentos de patente se observa el sector C12P que agrupa invenciones relacionadas a procesos de fermentación o procesos que utilizan enzimas para la síntesis de un compuesto químico dado o de una composición dada, o para la separación de isómeros ópticos a partir de una mezcla racémica. Y aún con una menor cantidad de registros se observa el sector tecnológico C07H que incluyen invenciones relacionadas a azúcares, sus derivados, nucleósidos, nucleótidos, ácidos nucleicos.

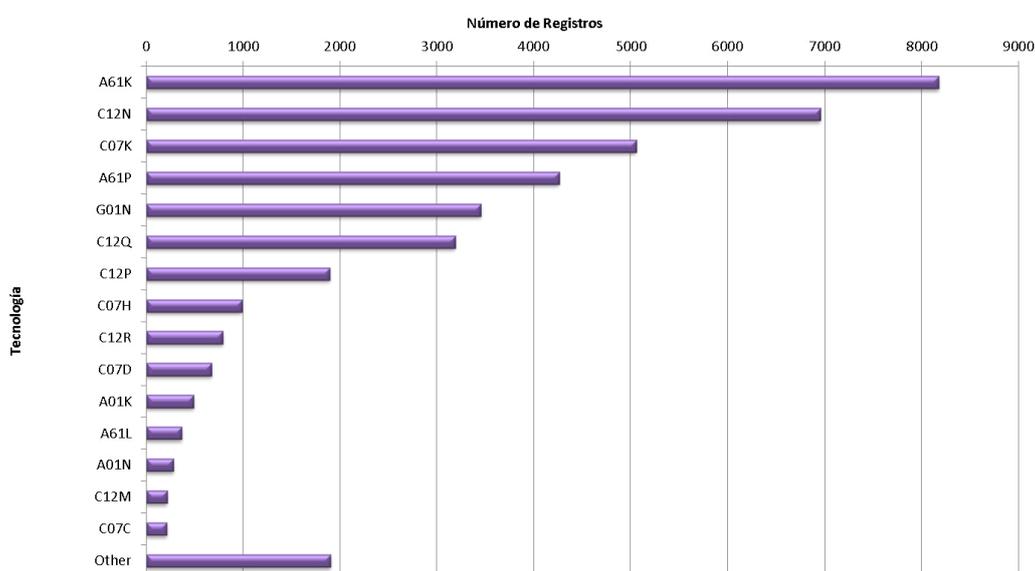


Gráfico 3. **Distribución de las invenciones de acuerdo a la Clasificación Internacional de Patentes.** Fuente Thomson Data Analyzer. Es importante destacar que una patente puede tener más de una clasificación

A lo largo del capítulo se ha enfatizado la importancia de la protección de los resultados del proceso de I+D en donde se incluye la fase preclínica de un desarrollo biotecnológico porque es bien sabido que particularmente en la biotecnología moderna, la investigación básica y la aplicada se relacionan entre sí muy estrechamente al grado de que no es poco frecuente que la investigación considerada de entrada básica constituya finalmente la base para la aplicación comercial del desarrollo tecnológico, y que constituya en consecuencia materia de protección de PI. De aquí la relevancia de tomar en cuenta que una publicación prematura, sin un previo análisis de las implicaciones económicas

de los resultados obtenidos en el proceso de I+D de los desarrollos biotecnológicos podría representar pérdidas importantes. Y en el mismo tenor se encuentra el caso del cuidado que debe seguirse para llevar a cabo el registro de las actividades realizadas y los resultados obtenidos de las mismas durante dicha fase de I+D, que de manera común es mediante el uso de las bitácoras.

### **El Resguardo de la Información en Bitácoras**

Las bitácoras o cuadernos de trabajo son pieza clave dentro de todo protocolo de investigación, en ellas se reportan los avances y resultados preliminares, tanto positivos como negativos de manera tal que pueda reproducirse el experimento o protocolo de investigación. Las bitácoras pueden tener tanto fines académicos como de protección del conocimiento generado.

Es necesario que en la bitácora se lleve un registro claro, preciso y detallado de cada una de las actividades y experimentos realizados, estos datos sin lugar a duda son fundamentales para publicaciones posteriores, así como para la entrega de información al cliente final de la investigación. Sin embargo no es lo único; en caso de generarse alguna innovación al realizar el protocolo de investigación se puede identificar alguna invención susceptible de ser protegida y para cuya protección será necesario recurrir al cuaderno de trabajo.

Hablando de invenciones, el cuaderno de trabajo se convierte en una evidencia de la invención la cual puede ser requerida para soportar el trabajo realizado por el inventor y demostrar su autenticidad así como reclamar una fecha de prioridad. Es importante mantener un registro original, detallado y duradero que permita preservar la información generada. Tanto para el protocolo de investigación como para la defensa de una invención, cada dato registrado es de suma importancia, y si el dato que lleva a la invención no está registrado no tiene soporte.

Es importante establecer reglas claras para el llenado de bitácoras que sean aplicables para el laboratorio o institución en la cual se esté adscrito para llevar a cabo la investigación. Los cuadernos deben ser resguardados por lo menos por un periodo de cinco años posterior al proyecto. Sin embargo, si se deriva una invención que se proteja por alguna figura de propiedad intelectual deberá resguardarse mientras se mantengan vigentes los derechos de dicha invención.

Además, en caso de que durante la realización del protocolo de investigación sea necesaria la transferencia de material biológico, esta actividad deberá asimismo registrarse en la bitácora, indicando el contrato o acuerdo de transferencia del material

biológico, el nombre de la persona que proporciona el material y las condiciones bajo las cuales fue firmado dicho acuerdo, esto debido a la importancia que tienen los resultados obtenidos a partir del material protegido y el uso que se pueda dar a dichos resultados. Este tema se abunda en el punto siguiente.

### **Importancia del Material Biológico**

Durante el desarrollo de un protocolo de investigación es común el uso de material biológico que es de vital importancia para obtener resultados experimentales o para reproducirlos. Por ello es de suma importancia mantener una adecuada administración de dicho material y registrar en la bitácora el contrato o acuerdo de transferencia del material biológico, el nombre de la persona que proporciona el material y las condiciones bajo las cuales fue firmado dicho acuerdo, esto debido a la importancia que tienen los resultados obtenidos a partir del material protegido y el uso que se pueda dar a dichos resultados.

Para este fin, se debe entender como material biológico a: cepas de microorganismos (incluyendo bacterias, hongos, virus, células derivadas de animales (incluyendo humanos), células derivadas de plantas, plásmidos, algas, protozoarios; ADN, ARN, proteínas, o fragmentos de estas biomoléculas; plantas y animales modificados para fines experimentales.

Cuando se realiza la transferencia de material biológico es necesario contar con un acuerdo previo. El objetivo es prevenir malos entendidos acerca de quién tiene los derechos para hacer qué y con qué material, para direccionar las responsabilidades por defectos o problemas que puedan ocurrir, y asegurar que se puede publicar libremente. Lo más común para hacer esto es mediante un acuerdo de transferencia de material biológico (por sus siglas en inglés material transfer agreement, MTA) o un acuerdo de transferencia de datos (por sus siglas en inglés data transfer agreement, DTA).

La firma de un acuerdo de transferencia de material biológico es un contrato entre el dueño del material y quien quiere hacer uso de él con fines de investigación u otros propósitos. El material puede estar patentado o no. La finalidad del MTA es documentar la transferencia del material y señalar los términos de uso, incluyendo identificación de la investigación o tareas de proyecto, términos de confidencialidad, publicación y responsabilidad. Al generar los acuerdos de material biológico es también importante aclarar a quien le pertenecerán los resultados obtenidos. Por ejemplo, en el caso de que la fase de estudios preclínicos consista en la evaluación de la viabilidad de una vacuna, el material proporcionado seguirá correspondiendo al desarrollador de la vacuna, así como los resultados obtenidos; es decir, si la vacuna es viable, el

desarrollador podrá continuar con su proceso para llevarla al mercado y tendrá también derecho a la información que le permita contar con esa validación. No obstante los datos experimentales generados durante la validación en el estudio preclínico, pertenecerán a quien haya realizado dicho estudio preclínico. Por ello será importante señalar también dentro del MTA a quien pertenece esta información generada y con qué fines se puede utilizar. En caso de transferirse estos datos se recomienda la firma del DTA.

Un adecuado control del manejo, almacenamiento y etiquetado del material también es necesario para preservar la calidad del material biológico sin contaminación. Y el registro de datos como secuencias, mapas, número de registro, nombre, descripción del microorganismo o material debe quedar anotado en las bitácoras de trabajo para futuras referencias. Por ejemplo, la información referente a la secuencia de un ADN plasmídico se puede añadir en la bitácora como una copia impresa, firmada por el responsable de la investigación y el dueño de la bitácora. Estas firmas son requeridas para fines de soportar la autenticidad de datos en caso de ser requerido para la defensa de una tecnología.

### **Libertad de Operación.**

La obtención de un derecho de propiedad intelectual otorga el derecho de EXCLUIR a terceros de obtener beneficios de su comercialización, sin embargo no asegura que se pueda llevar la invención al mercado.

Así como deben ser cubiertos varios requisitos para obtener una patente, deben seguirse varias normatividades para poder llevar a mercado una invención. Pero además es necesario asegurar que se tenga la libertad de operación para dicha invención. Esto se refiere a que se tenga libertad de usar, vender o reproducir un producto, proceso o uso dentro de una identificación geográfica sin infringir los derechos de propiedad intelectual de un tercero. La libertad de operación debe ser un componente integral de los esfuerzos realizados. El análisis de libertad de operación incluye un análisis detallado de los productos o servicios en consideración, involucra el análisis de reivindicaciones, revisar material de transferencia u obligaciones contractuales y proveer una interpretación legal del análisis. Otro punto es el de contar con las aprobaciones regulatorias para la importación o exportación de productos protegidos.

En México, cuando empleamos tecnología protegida con fines de investigación no existe violación a los derechos de propiedad intelectual protegidos, lo cual facilita la investigación y desarrollo y los avances que esto pueda tener en consecuencia. Sin embargo, cada vez es más común el trabajo colaborativo entre centros de investigación,

universidades y empresas con fines de llevar invenciones al mercado, lo cual lleva a tomar medidas precautorias.

Desde el inicio hasta la culminación de la investigación, debe mantenerse una vigilancia activa respecto de la tecnología que es de interés desarrollar, para conocer todo aquello que se ha estado protegiendo y realizar un análisis de las reivindicaciones otorgadas y el alcance de protección que se tiene. Esta tarea ayuda a conocer si se estaría infringiendo los derechos de un tercero, sin embargo no asegura al 100% su libertad. Cabe señalar que es responsabilidad de los titulares de la tecnología vigilar su buen uso y que no esté siendo explotado por un tercero, por lo que en caso de haber realizado todo el análisis pertinente y aun así recibir alguna notificación por parte de un tercero será necesario proceder a negociar con el tercero en caso de encontrarse la falta de libertad de operación.

Una falta clara de libertad de operación es cuando se utiliza material biológico de terceros para el desarrollo de una nueva tecnología. Por ello es importante revisar minuciosamente el acuerdo y saber si lo desarrollado será para beneficio de la parte contratante o si deberá considerarse el pago de regalías o incluso titularidad por parte del proveedor de dicho material biológico. Este tema no debe pasarse por alto, siempre deben establecerse los convenios necesarios para su aclaración.

### **Conclusiones.**

El tema de propiedad intelectual es muy amplio e importante de considerar sobretodo en temas de investigación y desarrollo. Los estudios preclínicos son parte fundamental en la protección de derechos toda vez que la información generada es de utilidad para validar los resultados y dar soporte a un documento de patente.

Así como se trabaja en la parte de validación de la tecnología, debe trabajarse en la protección de la misma, para poder tener una ventaja competitiva que permita retribuir el esfuerzo realizado para lograr los resultados.

En este capítulo abordamos de manera general algunos puntos a tomar en cuenta en esta materia sin embargo es recomendable contar con asesoría de especialistas en materia de propiedad intelectual y abogados en cada proyecto realizado para la revisión de convenios, acuerdos de transferencia de material biológico y contratos con los clientes.

## REFERENCIAS.

1. Fors López, M. & Peña Amador, D., *Desarrollo de la Evaluación de Productos Farmacéuticos, Biotecnológicos y Equipos Médicos. Algunas Consideraciones*, Rev Cubana Esomatol, 38(3), 205-208 (2001)
2. Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial, *Ley de la Propiedad Industrial*, (vigente), <http://www.ordenjuridico.gob.mx/Documentos/Federal/pdf/wo12931.pdf>
3. Organización Mundial de la Propiedad Intelectual, Manual de la OMPI de redacción de solicitudes de patente, [http://www.wipo.int/edocs/pubdocs/es/patents/867/wipo\\_pub\\_867.pdf](http://www.wipo.int/edocs/pubdocs/es/patents/867/wipo_pub_867.pdf)
4. United Nations, *Convenio sobre la Diversidad Biológica*, <http://www.un.org/es/events/biodiversityday/convention.shtml>
5. Convention on Biological Diversity & United Nations, *Nagoya Protocol on Access to Genetic Resources and the Fair and Equitable Sharing of Benefits Arising from their Utilization to the Convention on Biological Diversity*, <https://www.cbd.int/abs/doc/protocol/nagoya-protocol-es.pdf>
6. Alandete-Sáez, M., Figueroa-Balderas, R. & Chi-Ham, C., *Cuaderno de Laboratorio. Guía de Buenas Prácticas para Resguardar el Conocimiento y la Innovación*, (Fundación para la Innovación Agraria, Programa FIA-PIPRA, 2010).
7. Krattiger, A. *et al. Intellectual Property Management in Health and Agricultural Innovation* 1317-1394 (MIHR-PIPRA, 2007).

## **Procedimiento y regulación de estudios preclínicos en Biofarmacéutica**

*Rivas- Arreola M.J.*

### **Introducción; Panorama internacional.**

La medicina regenerativa, la ingeniería de tejidos, el desarrollo de productos biofarmacéuticos, los nuevos métodos y técnicas de diagnóstico, son áreas de desarrollo científico y tecnológico tan controversiales como el uso de células humanas embrionarias y el comercio de muestras biológicas. Los desarrollos científicos que han generado nuevos productos biofarmacéuticos han crecido exponencialmente a nivel mundial durante los últimos 20 años. Existen nuevas moléculas o procesos producción, pero en el descubrimiento de estas biomoléculas y la producción de productos biofarmacéuticos, existen algunas preguntas y limitaciones de las moléculas que no pueden ser definidas tomando únicamente los aspectos de síntesis y purificación. Conforme ha aumentado el desarrollo y la producción de biofármacos se han establecido etapas y procedimientos que permiten a las industrias ofrecer a la sociedad productos más seguros. El proceso de desarrollo de un biofármaco es largo, alrededor de 14 años, y consta de etapas que deben de registrarse y cumplirse satisfactoriamente para que este pueda ser liberado en el mercado. De manera general, la agencia de alimentos y medicamentos de Estados Unidos (FDA, por sus siglas en inglés) ha definido cinco etapas para el cumplimiento de este proceso con la finalidad cumplir estándares de calidad, generar menos efectos tóxicos en los pacientes y disminuir las posibilidades de retirar del mercado medicamentos. En la figura 1 se presenta el esquema general el proceso establecido para el desarrollo de un medicamento de acuerdo a la FDA.

El objetivo principal de la evaluación preclínica es definir los efectos farmacológicos y toxicológicos de un biofármaco, estos permitirán identificar una posible dosis segura, los órganos blanco de efectos tóxicos y proporcionar parámetros seguros para el monitoreo clínico. El cumplimiento de los requisitos de esta etapa justifica el potencial que tiene un fármaco para poder someterlo a estudios clínicos con riesgos menos elevados.

Los estudios preclínicos son una etapa fundamental en el proceso de desarrollo de un producto biofarmacéutico, ya que la evidencia de toxicidad o los resultados no favorables en el tema de respuesta inmune implican reestructurar las investigaciones previas y detener las etapas futuras. En el pasado fue posible tener aspectos o criterios que permitían la confusión en los aspectos que marcaba la regulación, por ejemplo, en la década de los 70's, la revisión de algunos procedimientos y resultados de estudios

preclínicos permitió detectar las inconsistencias con las que estos se realizaban en Estados Unidos; con la finalidad de evitar estos problemas para 1979 la FDA ya había generado un proceso de su regulación efectivo utilizando los protocolos de buenas prácticas en el laboratorio (GLP, por sus siglas en inglés).

#### 1. Descubrimiento y desarrollo

- A través de probar compuestos bioactivos
- Obtención de información de las dosis adecuadas: absorción, distribución, metabolismo y desecho

#### 2. Estudios preclínicos

- *In vitro, in vivo*: proporcionan información de dosis y niveles de toxicidad
- Se decide cual es el fármaco que deberá probarse en personas

#### 3. Estudios clínicos

- Estudios que se realizan en personas
- Tienen 4 fases de duración

#### 4. Revisión FDA

- Se prueba que el fármaco es seguro y efectivo
- Se entregan los estudios preclínicos y clínicos a las oficinas de FDA, el proceso puede durar 10 meses

#### 5. Monitoreo de seguridad

- El panorama general de seguridad de un producto incluye el monitoreo de meses o años de ese producto en el mercado. Estos resultados pueden causar cambios en las dosis y usos del medicamento.

Fig. 1. Proceso de desarrollo de un fármaco de acuerdo a la FDA (Food Drug Administration).

Por otro lado, con el compromiso de mantener la calidad de los estudios preclínicos la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD, por sus siglas en inglés) ha publicado sus principios de GLP, sus guías y anexos, en los cuales se establecen los lineamientos de: seguridad, realización, supervisión, registro y archivo de información para estudios preclínicos. Los países miembros de la OECD han incorporado estos protocolos para sus regulaciones nacionales. Ya que estos estudios permiten la consideración de un fármaco como seguro para ser probado en personas, involucra la evaluación de los siguientes aspectos:

- Toxicidad con efectos sobre la reproducción
- Potencial mutagénico
- Potencial carcinogénico
- Estudios toxicinéticos

La FDA considera en los ensayos preclínicos la evaluación del biofármaco sobre la actividad biológica *in vitro* o/y *in vivo*. Para esto se permite el uso de líneas celulares o

cultivos primarios para evaluar el efecto sobre el fenotipo celular y la proliferación. El uso de animales implica una cuidadosa selección y manipulación de la especie, tomando en cuenta: la edad, el estado fisiológico y la estabilidad del material de prueba en las condiciones de aplicación. Entre las especies más usadas se encuentran los: roedores, perros, cerdos, primates no humanos y para casos muy específicos, animales transgénicos. La cantidad de animales en un ensayo preclínico es fundamental ya que en una población muy pequeña tal vez no se observe algún evento tóxico y se genera información falsa. Para los resultados sobre las relaciones dosis-respuesta de fármacos de dosis únicas, que son aquellas en las que solo se expone a una dosis alta del fármaco, pueden ser obtenidos a través de la realización de un único estudio de toxicidad o un único estudio con animales modelo; en estos casos se recomienda la consideración de la evaluación de parámetros farmacológicos. Para estudios de dosis repetidas, la duración del ensayo y la vía de administración deben ser reflejo de lo deseado para la exposición clínica; se recomienda incluir estudios de toxicocinética, y sobre todo, la evaluación de estos parámetros un periodo de recuperación suficiente como para generar evidencia de las complicaciones de los efectos tóxicos con el tiempo o bien su reversibilidad; generalmente duran 3 meses. Cuando los datos *in vitro* son motivo de preocupación sobre el potencial cancerígeno, se indica que es necesario realizar más estudios en modelos animales relevantes e incorporar los índices sensibles de la proliferación celular por administración a largo plazo. Para los estudios preclínicos de biofármacos con indicaciones crónicas se recomienda la evaluación de los aspectos involucrados para biofármacos de dosis repetida pero con una duración de hasta 6 meses.

En una visión internacional se pueden considerar tres regiones en las que se alinean las partes involucradas de los países para el registro de nuevos fármacos: en Estados Unidos está la FDA, en Europa la Agencia Europea de Medicinas (EMA, por sus siglas en inglés) y en Japón la Agencia Farmacéutica y de Dispositivos Médicos (PMDA, por sus siglas en inglés). Estos organismos han surgido por las necesidades que cada una de las regiones ha enfrentado para solucionar sus problemas de salud pública. Sin embargo, los distintos puntos de vista entre las industrias biofarmacéuticas y las instituciones involucradas en el proceso de ensayos preclínicos, hacen que los procedimientos de registro y evaluación sean complicados. Con la finalidad de unificar criterios y facilitar el procedimiento para todas las partes involucradas, se creó el Consejo Internacional de Armonización de los requisitos técnicos para medicamentos de uso humano (ICH, por sus siglas en inglés), que es un vínculo que unifica criterios entre las autoridades y las industrias farmacéuticas. El ICH, existe una serie de guías y

apéndices disponibles con la descripción de criterios, requisitos y consideraciones que debe contener un estudio preclínico. En la tabla 1 se muestra la lista de criterios a evaluar y las guías que el ICH marca como referencia.

Tabla 1. Guías de seguridad y apéndices de referencia que el ICH declara para estudios necesarios en la etapa de ensayos preclínicos.

Estudios preclínico ( <i>in vitro/ in vivo</i> )	Criterio	Referencia ICH
	Actividad biológica	ICH S6 (1997) Apéndice ICH S6 (2009)
	Selección de las especies	ICH S6 (1997) Apéndice ICH S6 (2009)
	Inmunogenicidad	ICH S6 (1997) Apéndice ICH S6 (2009) ICH S8 (2005)
	Toxicidad	ICH S4 (1998)
	Genotoxicidad	ICH S2(R1) (2011) CH S2B ()
	Carcinogenicidad	ICH S1 (2012) ICH S1A (1995) ICH S1B (1997) ICH S1C (R2) (2008)

### Panorama nacional.

Cada país tiene sus propios aspectos regulatorios, México es un país que ha crecido en los últimos años en lo que al desarrollo de medicamentos biotecnológicos se refiere. Para vigilar y garantizar la calidad de este tipo de productos en México existen las Normas Oficiales Mexicanas (NOM) y reglamentos de salud, emitidos por la Secretaría de Salud Pública (SSP), que definen los criterios involucrados en estos desarrollos y establecen los procedimientos para evaluar las características técnicas del producto, servicio o proceso. En la figura 2 se presentan las NOM's y los reglamentos de la SSP que obligan a las industrias interesadas en tener en el mercado algún producto biofarmacéutico y que por lo tanto requieren de la información que los estudio preclínicos generan.

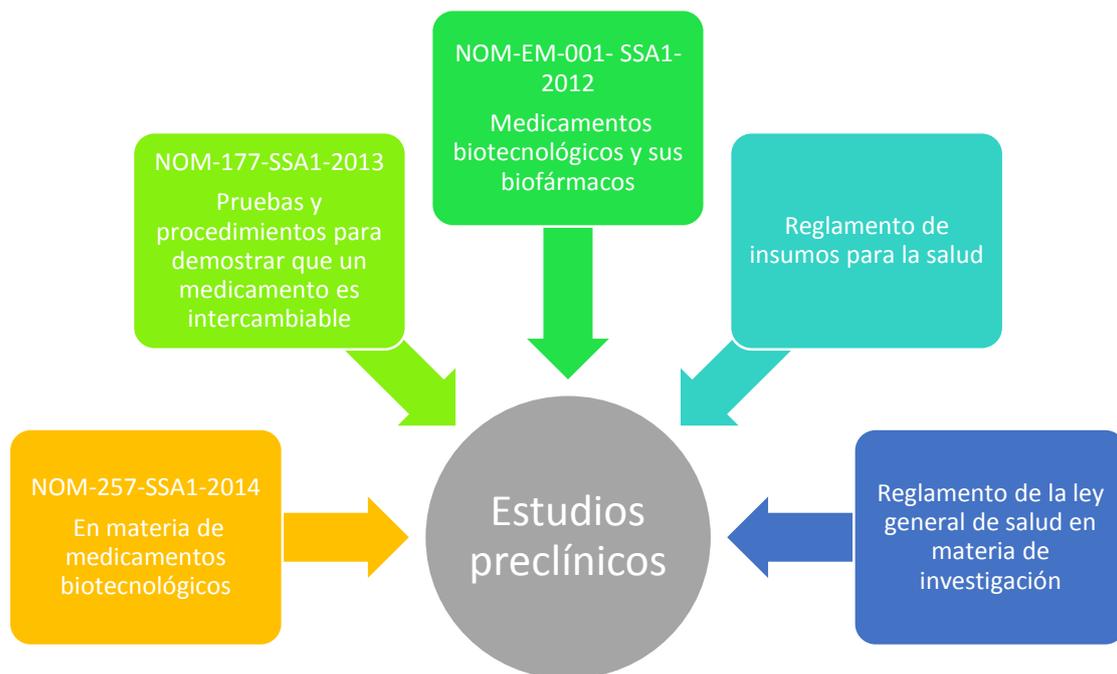


Fig. 2. NOM y reglamentos de la SSP que requieren de los estudios preclínicos

Es una realidad que el crecimiento del desarrollo de productos biofarmacéuticos ha obligado a nuestra institución reguladora a realizar modificadores y consideraciones para no frenar el desarrollo y evaluar adecuadamente los biofármacos con protocolos estandarizados. En México, el proceso de estos desarrollos consta de las mismas fases que se encuentran declaradas por la FDA en este tema. El registro de estas etapas se realiza ante la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y los estudios y sus criterios de evaluación se enlistan en la tabla 2.

Tabla 2. Estudios y criterios involucrados para evaluar los estudios preclínicos y someterlo a revisión ante COFEPRIS

Estudios	Criterios involucrados
Farmacodinámicos	Mecanismo de acción
Farmacocinéticos	Absorción, distribución, vida media, concentración máxima, excreción
Toxicológicos	Efecto en la reproducción, genotoxicidad, mutagenidad y teratogenicidad

En México desde el 2015 existen tres Instituciones que se encuentran autorizadas por COFEPRIS para realizar pruebas de caracterización y estudios preclínicos:

- Instituto de Biotecnología de la UNAM (IBT)
- Unidad de Investigación Preclínica de Facultad de Química de la UNAM (UNIPREC)
- Unidad de Desarrollo e Investigación de Bioprocesos de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN (UDIBI)

Cada una de estas instituciones cuentan con unidades de evaluación especializadas que desarrollan los estudios con protocolos estandarizados y que generan resultados validos para poder tener información solida del efecto del biofármaco y su potencial uso en personas. Con esta serie de protocolos y procedimientos en México se han generado mejores posibilidades para garantizar que los biofármacos en evaluación cumplen con requisitos y estándares internacionales, y se transforma directamente en el incremento del desarrollo de medicamentos biotecnológicos.

## REFERENCIAS.

Handbook: good laboratory practice (GLP): quality for regulated non-clinical research and development- 2nd ed. WHO. 2009.

Guidance for Industry S6 preclinical safety evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. ICH. 1997.

Guidance for Industry S6 Addendum to preclinical safety evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. ICH. 2012

Code of federal regulation, title 21. Part 58. [Good laboratory practice for nonclinical laboratory studies](#). FDA. 2015.

M3(r2) nonclinical safety Studies for the conduct of Human clinical trials and Marketing authorization for Pharmaceuticals. ICH. 2010.

Guerrero, G. A. M., & Lorenzana-Jiménez, M. (2009). Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos. *Rev Fac Med UNAM*, 52(6).

Bayona, A., & Fajardo, N. (2012). Desarrollo de nuevos medicamentos: oportunidades y beneficios para el Perú. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 29(4), 521-528.

Lovera Arellano, A. A. (2014). Regulación en medicina alternativa y complementaria en América Latina: experiencia y reglamentación en países seleccionados^ ies.

NOM-257-SSA1-2014. En materia de medicamentos biotecnológicos.

NOM-EM-001- SSA1-2012. Medicamentos biotecnológicos y sus biofármacos

NOM-EM-001- SSA1-2012. Medicamentos biotecnológicos y sus biofármacos

Reglamento de insumos para la salud

Reglamento de la ley general de salud en materia de investigación

C. López- Silva. México retoma un liderazgo regulatorio sobre medicamentos biotecnológicos y biocomparables. *Gaceta Médica de México*. 2012.

Espinosa Morales, R., Díaz Borjón, A., Barile Fabris, L. A., Valerio, E., Antonio, J., Medrano Ramírez, G., & Flores Murrieta, F. J. (2013). Medicamentos biocomparables en México: la postura del Colegio Mexicano de Reumatología, 2012. *Reumatología Clínica*, 9(2), 113-116.

## ESTUDIOS PRECLINICOS EN FARMACOLOGIA

*Vega Ruiz Brenda, Ramos Zuñiga Rodrigo*

### Introducción; Fase preclínica

El desarrollo preclínico de un medicamento hace referencia al conjunto de estudios de eficacia y seguridad del principio activo que se deben realizar en sistemas biológicos diferentes al ser humano. Debido a que un determinado grupo de estudios debe realizarse antes de comenzar las primeras pruebas en humanos (ensayo clínico) y otros antes de comenzar las restantes fases clínicas, es por lo que a esta parte del desarrollo se le llama “preclínico”.

### Objetivos de estudio

El desarrollo de un nuevo medicamento es un proceso largo y costoso cuyo objeto es demostrar en distintas fases preclínica y clínica, que el nuevo fármaco reúne los requisitos de eficacia, seguridad del medicamento en animales o sistemas “*in vitro*” y cumple con la calidad exigidos para su comercialización y administración al ser humano. Es requisito indispensable para obtener la autorización por parte de las entidades reguladoras a proceder al ensayo en humanos, presentar en un dossier toda la información preclínica obtenida.

Las fases que se llevan a cabo para la validación de una nueva molécula de fármaco son:

A. Fase de descubrimiento; **B. Fase preclínica**; C. Fase clínica (humanos); D. Fase de aprobación y registro; E. Fase de desarrollo químico farmacéutico.

Dentro del desarrollo global de un nuevo producto farmacéutico a nivel mundial, se define el ámbito y la necesidad del **desarrollo preclínico**, así como su ubicación en todo su recorrido desde el laboratorio al paciente.

Los estudios preclínicos constituyen una etapa crucial en el desarrollo de nuevas moléculas y terapias, y actualmente constituyen un filtro de aprobación en el desarrollo farmacéutico, concretamente para el paso de moléculas a fase clínica. Antes de iniciar con la fase preclínica existe una etapa latente y de importancia que es el descubrimiento de las nuevas moléculas que funcionaran como los nuevos fármacos; a lo largo de la historia muchos medicamentos fueron descubiertos por mediación del azar; hoy en día sin embargo poco se deja al azar, y el descubrimiento de fármacos, así como su posterior desarrollo, se ha convertido en un proceso largo y complejo, muy estructurado y que además requiere un concienzudo diseño previo.

La búsqueda de posibles fármacos para una determinada enfermedad puede hacerse a través de un abordaje biológico (consiste en definir el objetivo terapéutico, es decir, el componente del organismo implicado en el desarrollo de la patología sobre el cual se desea actuar, y buscar posibles fármacos que alteren su función) o a través de un abordaje químico (consiste en probar una batería de compuestos previamente disponibles en un sistema modelo de la enfermedad hasta observar cuáles de ellos tienen un efecto sobre el desarrollo de la misma).

Los ensayos de cribado habituales para la selección de las nuevas moléculas es altamente complejo y poco eficiente para la toma de decisiones; por eso se utilizan técnicas asociadas al High Throughput Screening (HTS), o cribado de alta capacidad,

que permiten seleccionar rápidamente las nuevas moléculas capaces de reconocer una determinada diana. Estas moléculas son conocidas en el sector como *hit*.

Estos *hits* son de gran interés porque informan sobre los requerimientos estructurales necesarios para interacciones con el receptor, sin embargo a menudo su actividad es débil, su estructura químicamente inestable, y resultan tóxicos o poco selectivos.

Para mejorar sus propiedades se emprende un proceso de optimización de los *hits* que incluye ensayos para confirmar su afinidad por la diana, modificaciones para aumentar su afinidad y finalmente la selección de aquellos que, por tener mejores propiedades que los demás, serán los potenciales candidatos al desarrollo. Estos candidatos a fármacos se conocen como **Leads**.

## Desarrollo del proyecto

Una vez seleccionados los “**leads**” se diseñará el programa de la fase preclínica para caracterizar principalmente el perfil de seguridad del candidato a fin de reducir y anticipar en lo posible el riesgo existente para humanos antes de comenzar el ensayo clínico. De la fase de “Drug Discovery” a la preclínica lo determina la identificación de “leads” definidos, según criterios seleccionados individualmente, por el patrocinador del desarrollo (empresa, grupo de investigación, etc.). Sin embargo, el paso de la fase preclínica a la clínica está sujeto a la obtención de la aprobación por parte de las Autoridades Regulatorias pertinentes (FDA-Food and Drug Administration, EMA-European Medicines Agency, etc.).

Las fases que involucran el desarrollo de fármacos se describe a continuación de manera más explícitas abarcando los pasos siguientes: descubrimiento, fase preclínica y fase clínica (Tabla 1).

En términos generales la fase preclínica regulatoria, realizada exclusivamente en laboratorio (ya sea en animales o en cultivos de células), sirve sobre todo para demostrar la falta de efectos adversos de las nuevas moléculas de fármacos.

El **desarrollo preclínico** comprende una fase inicial de **selección de las nuevas moléculas candidatas**, seguida de la **investigación de su potencial acción farmacológica**, y finalmente de la **evaluación de su seguridad**. La clave del éxito es que las moléculas candidatas posean ciertas propiedades favorables: actividad biológica y solubilidad adecuada, capacidad para atravesar barreras críticas, razonable estabilidad metabólica y seguridad en su administración al hombre.

Cada fármaco particular necesita su propio desarrollo preclínico debiendo tenerse en cuenta diversos factores: tipo de compuesto, mecanismo de acción e indicaciones clínicas. Es especialmente importante conocer el ámbito regulatorio y las guías que aplican. En este sentido es fundamental contemplar dónde se va a realizar el desarrollo clínico, ya que en ocasiones los requisitos regulatorios de EEUU (“Food and Drug Administration”, FDA) y Europa (“European Medicines Agency”, EMA) pueden diferir, etc. Igualmente importante para definir el desarrollo preclínico más adecuado es tener en cuenta el diseño del ensayo clínico, así como duración del tratamiento, vía y pauta de administración, tipo de población sujeta a estudio, etc.

Son de vital importancia la realización de los ensayos preclínicos y esto toma relevancia en el concepto Eficacia versus Seguridad; ya que en las fases iniciales del desarrollo de un medicamento las agencias regulatorias enfocan su interés en los estudios de seguridad, por lo que suelen ser comparativamente menos exigentes en cuanto a la caracterización de la eficacia del compuesto, permitiendo aportar todavía información reducida acerca del mecanismo de acción del mismo con objeto de justificar la exposición de los pacientes a esa nueva terapia.

Ello da lugar a que exista poca o nula regulación entorno a los estudios realizados para comprobar la eficacia de los compuestos utilizados en esta fase temprana del desarrollo de un medicamento en específico.

Los estudios de eficacia tienen como objetivo poder: **a) evaluar el mecanismo de acción, b) verificar la actuación frente a la diana terapéutica** seleccionada, **c) establecer la dosis mínima eficaz** y la curva dosis-respuesta que posteriormente, en futuros ensayos clínicos, ayudarán a estimar una dosis terapéutica, **d) establecer la pauta y vía de administración más adecuadas** en función de la farmacodinamia del compuesto y su perfil farmacocinético.

Los ensayos relativos a la eficacia en los estudios preclínicos son necesarios tomar en consideración; ya que la Farmacodinamia (FD) examina más específicamente como el compuesto ejerce su acción farmacológica, como interactúa y el tipo de reacciones que tienen lugar a nivel celular, tisular y de órgano, así como la curva de dosis-respuesta; la FD es crucial para el diseño de los estudios de toxicología así como para la evaluación y extrapolación de los datos toxicológicos a humanos.

Los estudios de eficacia se realizan tanto “*in vitro*” como “*in vivo*”. Los aspectos que hay que considerar a la hora de su diseño son la relación entre la estructura y la actividad, la correcta elección de los sistemas experimentales tanto “*in vitro*”, líneas y cultivos celulares, como la elección de los modelos animales con respecto a la patología humana a tratar, modelos regulatoriamente aceptados, modelos con disfunción inducida (farmacológica, patología, etc.).

El objetivo de estos estudios del desarrollo preclínico es salvaguardar, en esta fase tan temprana del desarrollo de un medicamento, la seguridad del paciente, es decir, detectar y evitar todo riesgo o posible daño para el ser humano.

Estos estudios deben dar respuesta a las siguientes cuestiones:

- Caracterización de los efectos tóxicos y reversibilidad de los mismos.
- Identificación de los órganos diana.
- Determinación de la relación dosis-respuesta: qué dosis ejercen qué efectos.
- Establecimiento del NOAEL (“Non-observed Adverse Effects Level”).
- 

Así mismo, se deben correlacionar los efectos tóxicos con la exposición sistémica al compuesto mediante la toxicocinética e identificar biomarcadores para la estimación de una dosis inicial segura y un diseño adecuado en los futuros ensayos clínicos en humanos.

Los ensayos que deben realizarse para evaluar una correcta fase preclínica son las siguientes:

➤ **Farmacocinética/toxicocinética y metabolismo (ADME-Tox)**

La farmacocinética (FC) describe lo que le sucede al fármaco por acción del organismo. La farmacocinética depende de la dosis administrada, de la vía de administración y del estado fisiológico del organismo así como de las propiedades físico-químicas del compuesto (solubilidad, estabilidad, etc.)

El estudio permite identificar, si los hubiera, efectos tóxicos del compuesto así como la forma de administración más apropiada y la dosis a utilizar. Tradicionalmente los estudios de ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción) se realizan en dos especies de mamíferos, una de ellas de roedor, utilizando diferentes dosis y aplicadas a hembras y machos.

Mientras que los modelos animales se siguen utilizando para los estudios toxicocinéticos, en la última década se ha desarrollado una importante variedad de ensayos “in vitro” que ayudan a predecir las propiedades ADME-Tox. Entre estos destacan los cultivos celulares (Caco-2; HT 29, T-84, etc.) y modelos fisiológicos (Tecnomouse, Log P, etc.).

Mientras que los modelos animales se siguen utilizando para los estudios toxicocinéticos, en la última década se ha desarrollado una importante variedad de ensayos “in vitro” que ayudan a predecir las propiedades ADME-Tox. Entre estos destacan los cultivos celulares (Caco-2; HT 29, T-84, etc.) y modelos fisiológicos (Tecnomouse, Log P, etc.).

Un solo ensayo no puede sustituir la complejidad del sistema experimental “in vivo”, por lo que sigue la estrategia de intentar validar métodos que puedan sustituir algunos aspectos o etapas de los estudios principales en el animal. Así pues, toda la aproximación “in vitro” a la predicción de la toxicidad, debe de considerar una batería de ensayos diferentes tendientes a cubrir el mayor número de respuestas posibles y permitir la confirmación de los resultados.

El uso de estos ensayos permite obviar en parte las limitaciones de los “in vivo”, alto costo, variaciones inter-especies y problemas éticos. La combinación de estudios “in vitro” junto con los datos toxicocinéticos “in vivo” obtenidos en los estudios de toxicología han permitido relegar otros análisis “in vivo” más costosos para fases posteriores del desarrollo (antes de fase III) y/o siempre que esté justificada su realización.

- **Farmacovigilancia:** Los estudios de farmacovigilancia están concebidos para caracterizar las acciones farmacológicas no deseadas del medicamento sobre los diferentes sistemas funcionales del organismo. En primera instancia, se evaluarán los efectos del fármaco sobre órganos o funciones vitales, lo que incluye el sistema nervioso central (SNC), sistema cardiovascular (SCV) y sistema respiratorio (SR). Puede requerirse también la evaluación de los efectos sobre otros sistemas como renal, gastrointestinal o nervioso autónomo si existen indicios o alertas específicas para el compuesto o para la clase farmacológica a la que pertenece.
- **Ensayos de Toxicidad:** Con estos estudios se pretende identificar la potencial toxicidad del candidato tan temprano como sea posible. Con el fin de armonizar los requerimientos, en cuanto al tipo y duración de estudios necesarios para cada fase del desarrollo de un medicamento, se han establecido numerosas guías.

Los estudios toxicológicos se clasifican en:

- **Toxicología general:** su objetivo es demostrar cualquier tipo de efecto tóxico que afecte morfológica o funcionalmente a los distintos órganos o sistemas del individuo.
- **Toxicidad a dosis única.** Evaluación de los efectos adversos resultado de una sola exposición a una sustancia.
- **Toxicidad por dosis repetida.** Se pretende evaluar el efecto tóxico de la administración reiterada durante un periodo de tiempo más largo (desde dos semanas hasta varios meses). Puede revelar efectos acumulativos e identificar los órganos diana.
- **Genotoxicidad.** El objetivo es evaluar los efectos del medicamento sobre el material genético (genes y cromosomas). Se determina mediante una batería de estudios acotada y que incluye ensayos “in vitro” e “in vivo”. Como la Fase clínica

l se limita a un número pequeño de voluntarios solamente se requieren resultados de los test “in vitro” de mutagénesis bacteriana y estudios en líneas celulares de mamífero en cultivo.

- **Toxicología de la reproducción y desarrollo.** Consiste en el estudio de los efectos del medicamento sobre la capacidad reproductiva de los progenitores y sobre la descendencia a lo largo de los tres segmentos de la reproducción: fertilidad y desarrollo embrionario temprano, desarrollo embrionfetal (o período de organogénesis) y desarrollo peri y posnatal.
- **Tolerancia local.** El objetivo es evaluar el efecto tóxico en el sitio de administración y la regresión de las lesiones en caso de producirse. La prueba de tolerancia local tiene como objetivo evaluar el daño local provocado por la administración de un medicamento, diferenciando entre el daño tisular causado por efectos puramente físicos (temperatura, volumen de muestra, método de administración) o químicos (pH, corrosividad) y el originado por los efectos fármaco-toxicológicos.
- **Toxicología especial:** son aquellos estudios que se clasifican en función del efecto que se quiere investigar ya sea por el órgano (Ej. hepatotoxicidad) o sistema (Ej. neurotoxicidad) o para entender mecanismos de toxicidad.
- **Inmunotoxicología.** Consiste en la evaluación de la capacidad del medicamento para inducir efectos tóxicos sobre el sistema inmunitario. Un caso particular que a menudo se debe investigar en medicamentos de origen biotecnológico es la inducción de inmunogenicidad, es decir, la capacidad del compuesto para inducir la formación de anticuerpos anti-fármaco.

### Elección del Modelo preclínico

En la toma de decisiones para seleccionar el modelo preclínico adecuado siempre se plantea la pregunta, ¿qué tipo de modelo debo incluir en mis ensayos? ¿“In Vitro”, “in vivo”, “in silico”?

**“Siempre que haya una alternativa “in vitro” viable y validada que sustituya a un ensayo con animales, no se deberán utilizar animales”**

Directiva 86/609/EEC (Diario Oficial de la Unión Europea)

El valor predictivo de los ensayos, “in vivo” e “in vitro”, en la evaluación del riesgo de toxicidad para el hombre de nuevas moléculas depende de un diseño y elaboración correcto de la batería de ensayos así como de un análisis muy cuidadoso de la información obtenida primeramente “in vitro” y secundariamente “in vivo” y de su, también, correcta interpretación.

Esta tendencia ha propiciado de forma extraordinaria el desarrollo de modelos “in vitro” alternativos a la experimentación animal para estudios de actividad farmacológica y toxicológica en las fases iniciales de desarrollo, lo que permite de manera eficaz reducir el número de posibles candidatos a fármacos.

Por su propia naturaleza los modelos “in vitro” son una simplificación de una realidad mucho más compleja, el ser vivo, por eso en muchas ocasiones la información que son capaces de proporcionar es limitada y, a menudo, tienen una mala correlación con los resultados obtenidos “in vivo”. Aun así, no cabe ninguna duda de que ofrecen ventajas intrínsecas muy destacables para evaluar características esenciales de los futuros medicamentos, dada su simplicidad, disponibilidad, bajo coste, fácil control de las variables experimentales, necesidad de cantidades muy pequeñas de la molécula en estudio y la posibilidad de realizar estudios en etapas muy tempranas de desarrollo.

La disponibilidad de cultivos de células humanas de diferentes órganos y tejidos así como de diferentes patologías, permite una mayor aproximación al ser humano. Constituyen una alternativa capaz de reemplazar a los animales para determinados estudios del desarrollo preclínico, o de complementarlos. Sin embargo, los tejidos, sólo proporcionan una condición “*ex vivo*” aislada, que no es del todo representativa de la respuesta “*in vivo*” debido a que la acción del fármaco a menudo implica al metabolismo y la interacción entre diferentes tejidos.

El uso de animales en las pruebas preclínicas es obligado (ensayos “*in vivo*”), ya que datos procedentes de los distintos modelos animales validados forman parte de la información contenida en el Dossier remitido a las autoridades regulatorias para la autorización del ensayo clínico. Una parte de los estudios encaminados a evaluar el riesgo de toxicidad del compuesto se debe de llevar a cabo en animales de experimentación, que aun siendo de gran valor para la evaluación del riesgo tóxico, proporcionan resultados que no siempre han podido ser extrapolados al hombre. De hecho, hay compuestos que fallan en etapas tardías del desarrollo lo que demuestra que los animales modelo no son suficientemente predictivos de la situación real en humanos.

A continuación se describen los distintos modelos animales que se utilizan en los estudios ADME/Toxicocinética para la fase preclínica: Rata 45%, Ratón 25%, Perro 11%, Conejo 10%, Cerdo de guinea 2%, Hamster 1%, Primate 1%, Otros 1%.

Existen otros modelos, vertebrados e invertebrados, cuya inclusión en el desarrollo no clínico debe de ser considerada; los organismos invertebrados más típicos son *Drosophila melanogaster* y *Caenorhabditis elegans*, en los modelos vertebrados se encuentra el pez cebra (*Danio rerio*).

En relación a nuevos modelos con mayor valor predictivo o alternativas en las tecnologías “*in silico*”, existe actualmente una gran demanda. Se han hecho avances significativos en el desarrollo de estos modelos para predecir las propiedades ADME-Tox en fármacos candidatos. Por ejemplo, la convergencia de aspectos estructurales de compuestos potenciales, con datos de investigación “*in vivo*” e “*in vitro*”, permite el modelado computacional y matemático del comportamiento de los compuestos, lo que puede a su vez ser utilizado para predecir las respuestas humanas “*in vivo*”. Además, las tecnologías “*in silico*” están avanzando en su capacidad para trazar respuestas en relación con una enfermedad.

### **Método del procedimiento de operación.**

El tipo de pruebas requeridas para aprobar el desarrollo de un fármaco dependerá de diferentes factores:

- Tipo de medicamento: hay regulaciones diferentes para medicamentos de origen químico, biológico, biotecnológico o terapia avanzada.
- Tipo de pacientes: hay grupos poblacionales para los cuales se exigen requisitos especiales, por ejemplo mujeres embarazadas, niños, ancianos...
- Tipo de patologías: existen patologías, como por ejemplo las oncológicas para las cuales se exigen requisitos especiales.
- Distribución geográfica: existen diferentes agencias regulatorias para diferentes territorios.

En la realización de la fase preclínica implica la necesidad de disponer de métodos analíticos validados, sensibles y reproducibles que permitan la detección del fármaco y de sus metabolitos. Para ello es necesario seguir lineamientos específicos desarrollados

por organizaciones especializadas en este campo como la OCDE ((Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico), la cual emite guías muy específicas acerca de cómo llevar a cabo los estudios preclínicos de seguridad. es el organismo que ha emitido una serie de guías o directrices acerca de las Buenas Prácticas de Laboratorio (BPLs-GLPs). Estas guías se consideran de referencia para la implementación de las GLPs en los laboratorios preclínicos, así como el seguimiento y la ejecución de los ensayos preclínicos de seguridad.

### **Análisis Y Reporte.**

Hasta el momento de iniciar el primer ensayo en humanos, se habrían evaluado parámetros de toxicidad y eficacia tan sólo en cultivos “in vitro” y en animales “in vivo”. Estas opciones, aunque apropiadas, representan una variabilidad biológica limitada en comparación con la inmensa variabilidad que supone la población humana mundial. De ahí que el salto a humanos siempre constituye un riesgo y para poder optar a la solicitud de un ensayo clínico tiene que existir un balance beneficio-riesgo adecuado. Una vez realizadas las pruebas exigidas en la preclínica, se integran los resultados en un único informe que se presenta a la autoridad regulatoria para que se autorice el comienzo de la fase clínica, es decir, la realización de pruebas en humanos.

### **Aseguramiento de la calidad.**

Los ensayos preclínicos están ampliamente regulados ya que suponen la llave de entrada para un ensayo clínico en humanos y esta manera de regulación es una forma de asegurar la calidad de los medicamentos que serán comercializados y utilizados para el consumo humano, es por eso que existen varios organismos reguladores, directrices, legislaciones y guías de diferente aplicación según el país.

La FDA tiene el control exclusivo sobre las decisiones ejecutivas en relación con la aprobación de fármacos en los Estados Unidos. Sin embargo, en Europa, es posible tener un fármaco aprobado por vías diferentes. Esto se debe a que en la Unión Europea (UE) se puede solicitar la aprobación europea a través de la EMA (“European Medicines Agency”) o a través de las agencias nacionales (en el caso de España, la AEMPS - Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios). No obstante, desde noviembre de 2005, todos los nuevos fármacos destinados al tratamiento de determinadas enfermedades (SIDA, cáncer, diabetes, enfermedades neurodegenerativas) así como los fármacos desarrollados por medio de procesos biotecnológicos y los que constituyen terapias avanzadas (génica y celular), deben ser aprobados por la EMA.

Con la globalización de la industria farmacéutica, la **Conferencia Internacional sobre Armonización** (ICH) implantó una normalización en el contenido de las solicitudes de autorización de fármacos. Japón, Estados Unidos y la UE deben cumplir con los requisitos de **calidad, seguridad y eficacia de nuevos fármacos**.

La conferencia Internacional para la Armonización de los Requisitos Técnicos para el Registro de Productos Farmacéuticos para Uso Humano es el organismo, por excelencia a nivel mundial, que reúne a las autoridades reguladoras y a la industria farmacéutica de Europa, Japón y Estados Unidos.

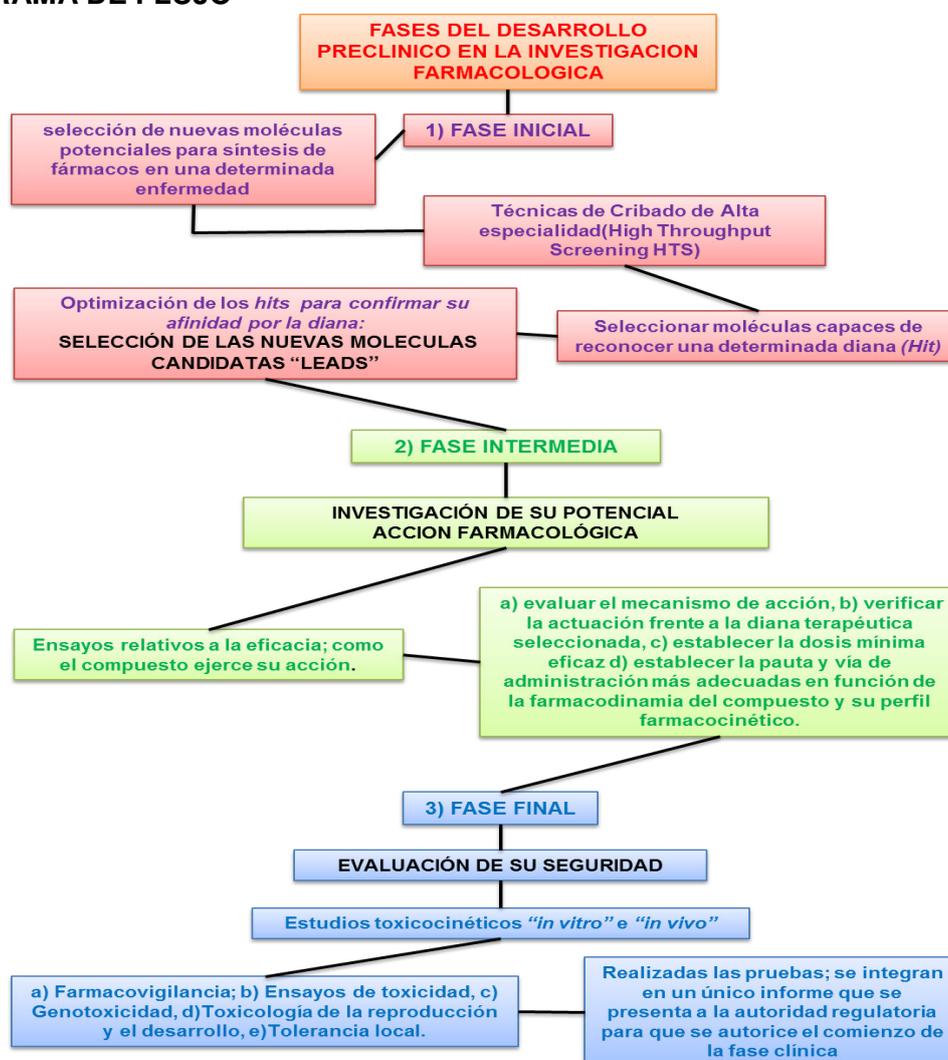
La armonización se logra con el consenso entre científicos, expertos reguladores y la industria de las tres regiones de la ICH. Fruto de ello se elaboran guías aceptadas por las autoridades reguladoras de estas regiones:

- EMA (European Medicines Agency): en Europa
- FDA (Food and Drug Administration): en Estados Unidos
- MHLW (Ministry of Health, Labour and Welfare): en Japón

La ICH emite guías de interés estructuradas en cuatro ámbitos:

- Guías en el área de calidad (Nomenclatura: código Q- seguido de un número): relativas a la realización de estudios de estabilidad, la definición de límites relevantes para pruebas de impurezas y un enfoque a la calidad de productos farmacéuticos basados en GMP (Good Manufacturing Practices).
- Guías en el área de seguridad (Nomenclatura: código S- seguido de un número): directrices para riesgos potenciales como la carcinogenicidad, genotoxicidad y toxicidad para la reproducción.
- Guías en el área de eficacia (Nomenclatura: código E- seguido de un número): para el diseño, desarrollo, seguridad y comunicación de ensayos clínicos. También hay directrices para medicamentos derivados de procesos biotecnológicos, uso de farmacogenética y técnicas genómicas para producción de medicamentos más específicas.
- Guías en áreas multidisciplinares (Nomenclatura: código M- seguido de un número): para temas transversales que no se ajustan únicamente a una de las categorías anteriores (calidad, seguridad y eficacia).

## DIAGRAMA DE FLUJO



## REFERENCIAS

- 1 Mercedes de Miguel, C. G., Luis Martin, Mercedes Escribano. Guía de desarrollos preclínicos. Funcación para el desarrollo de la investigación en genómica y proteómica. España. (2012).
- 2 Patel, N. *Predictive ADME and Toxicology Strategies: Challenges and Opportunities for in Vivo, in Vitro and in Silico Predictive Technologies*. (Business Insights Limited, 2006).
- 3 Cuadrado, A. M., Burgos, C. & Álvarez-Builla, J. in *El fármaco y su desarrollo: diez preguntas y una consideración*. 13-21 (Real Sociedad Española de Química, 2006).
- 4 Guideline, I. H. T. Note for guidance on toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies S3A. ICH Harmonisation for better health, . Geneva, Switzerland. (1994).
- 5 Guideline, I. H. T. Pharmacokinetics: Guidance for Repeated Dose Tissue Distribution Studies Geneva, Switzerland. (1994).
- 6 CPMP. SAFETY PHARMACOLOGY STUDIES FOR HUMAN PHARMACEUTICALS. EMEA. United Kingdom. (2000).
- 7 Guideline, I. H. T. The non-clinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (Qt Interval Prolongation) by human pharmaceuticals. S7B (<http://www.ich.org/products/guidelines/safety/article/safety-guidelines.html>) (2005).
- 8 Guideline, I.-H. T. S4A: duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non-rodent toxicity testing). (2006).
- 9 CHMP & Committee for Human Medicinal Products. Guideline on repeated dose toxicity. European Medicines Agency. United Kingdom. (2010).
- 10 Guideline, I. H. T. in *Guidance on genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use S2 (R1)*. 1-25 (2011).
- 11 Tripartite, I. H. Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5 (R2). ICH Harmonised Tripartite. Geneva, Switzerland. (2005).
- 12 Guideline, I. H. T. in *Guideline on the Need for Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals S1A*. (1996).
- 13 Guideline, I. H. T. in *Immunotoxicity Studies FOR Human Pharmaceuticals S8*. (2006).
- 14 Harmonisation, I. C. f. *ICH Guidelines*, <<http://www.ich.org/products/guidelines.html>> (2005).
- 15 Rocio Ramirez Herrera, N. E. S. R. Estudios pre-Clínicos y Clínicos. Secretaria de Salud. México.
- 16 Vasen, W. & Fiorentino, R. M. UNA HERRAMIENTA POCO UTILIZADA. *Medicina (Buenos Aires)* **66**, 257-262 (2006).
- 17 Valdés, S. M., Álvarez, Á. L. & del Barrio, G. Los modelos animales en la evaluación preclínica de antivirales contra los virus del herpes simple. *Revista de Salud Animal* **31**, 86-92 (2009).
- 18 Gámez, R. Aspectos generales de los estudios toxicológicos preclínicos más empleados. *Revista CENIC Ciencias Biológicas* **38** (2007).
- 19 Medina, M. F., Arrebola, D. F. A., López, Y. & Bourzac, I. Diseños experimentales para los estudios de toxicología preclínica en el Instituto Finlay. (2003).

## PROTOS COLOS PRECLÍNICOS PARA EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE FÁRMACOS

*Eduardo Padilla Camberos, Yanet Karina Gutiérrez Mercado, José Miguel Flores Fernández*

### INTRODUCCIÓN.

Los medicamentos utilizados para la prevención y tratamiento de enfermedades pueden clasificarse por su naturaleza en varios tipos, los más comunes son los elaborados con fármacos químicos sintéticos, aunque también existen los homeopáticos, herbolarios, vacunas y biotecnológicos.

El desarrollo de los medicamentos involucra varias etapas que abarcan desde la investigación básica que demuestra la actividad biológica de la molécula o compuesto, su mecanismo de acción, aspectos de farmacología y seguridad hasta llegar al registro ante las instancias regulatorias y su posterior comercialización. Cada una de las etapas requiere el sustento científico para lo cual se realizan estudios no clínicos y estudios clínicos<sup>1</sup>.

Los estudios no clínicos o preclínicos se ejemplifican en el siguiente esquema.

ESTUDIOS NO CLINICOS (PRECLINICOS)		
<b>FARMACODINAMIA</b>	FARMACOCINETICA	TOXICOLOGIA
<b>Primaria (efectos en el órgano diana)</b>	Absorción	Aguda
<b>Secundaria (efectos en sitios diferentes al órgano diana)</b>	Distribución	Subaguda y subcrónica
<b>Seguridad farmacológica</b>	Metabolismo	Crónica y Carcinogénesis
	Excreción	Reproducción y Desarrollo
		Genotoxicidad

En este capítulo se abordarán únicamente los estudios toxicológicos que se realizan durante la etapa preclínica del desarrollo de medicamentos.

### IMPORTANCIA DE LOS ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS PARA MEDICAMENTOS.

La investigación y desarrollo de nuevos medicamentos conlleva varias etapas como son el descubrimiento e investigación de moléculas con actividad biológica y sus mecanismos de acción, la etapa de desarrollo donde se evalúa el comportamiento de esas moléculas en el organismo y sus posibles interacciones farmacológicas, incluyendo las reacciones adversas o toxicológicas, antes de pasar a la etapa de investigación clínica donde la evaluación se realiza en humanos y continua hasta la etapa postprobatoria con la farmacovigilancia<sup>2</sup>.

Durante el transcurso de las diferentes etapas de desarrollo de medicamentos se realizan estudios toxicológicos para lo cual se han desarrollado diversas metodologías que pueden agruparse en base al tipo de organismo o sistema biológico empleado<sup>3</sup>:

- a) Modelos con animales completos. Son los métodos más reconocidos y utilizados.

- b) Organismos inferiores en la escala filogenética. Por ejemplo, plantas, insectos, moluscos, hongos y bacterias.
- c) Órganos aislados de vertebrados. Por ejemplo órganos perfundidos.
- d) Cultivos celulares. Como los ensayos de citotoxicidad que emplean líneas celulares y tejidos de origen humano o animal.
- e) Sistemas subcelulares. Como enzimas y receptores
- f) Otros. Como los estudios predictivos *in silico*.

Los estudios preclínicos de toxicidad representan una etapa importante ya que sirven para la toma de decisiones que impactan directamente en el seguimiento del desarrollo de nuevos fármacos<sup>4</sup>.

Lo anterior queda demostrado por el hecho de que la mayoría de los fármacos en desarrollo se detiene en la fase preclínica y solo uno de cada 20 compuestos logra completar el proceso hasta la fase clínica, siendo una de las causas principales la falta de comprobación de eficacia y los efectos no deseados o toxicológicos. Esto ha llevado a las empresas farmacéuticas a buscar nuevas estrategias para conocer con oportunidad la toxicidad de las moléculas en desarrollo mediante métodos de evaluación y predicción que eviten el consumo de tiempo y el gasto innecesario, este nuevo proceso se ha denominado como “fallar a tiempo, fallar barato”<sup>5</sup>.

Las evaluaciones toxicológicas pretenden caracterizar los efectos adversos de las moléculas o compuestos, con respecto al órgano blanco, la dependencia del efecto con la dosis, la relación con la exposición y su posible reversibilidad<sup>6</sup>.

La evaluación del perfil toxicológico permite extrapolar el efecto a otras especies, con énfasis en las posibles afectaciones a humanos. Asimismo permite determinar niveles seguros de exposición. Por otra parte, Los resultados de los estudios toxicológicos permiten establecer las dosis adecuadas para realizar los estudios en fase clínica e identificar los parámetros de seguimiento de potenciales efectos adversos en dichos estudios<sup>7</sup>.

ETAPAS Y ESTUDIOS DURANTE EL DESARROLLO DE MEDICAMENTOS				
ETAPA:	INVESTIGACIÓN	DESARROLLO	REGISTRO	POSTAPROBACIÓN (FARMACOVIGILANCIA)
TIPO DE ESTUDIOS:	No clínicos (Preclínicos)		Estudios clínicos Fase I Fase II Fase III Fase IV	
MÉTODOS:	<i>in vitro</i> , <i>in silico</i> , modelos animales		En humanos	

Existen diferentes regulaciones a nivel internacional que establecen los criterios para determinar los estudios toxicológicos que deben realizarse a los medicamentos. Por tal motivo, las autoridades regulatorias y asociaciones farmacéuticas de las principales regiones del mundo como Japón, Estados Unidos y Europa, sostuvieron reuniones en la década de 1990 y propusieron la creación de la conferencia internacional de armonización (ICH, por sus siglas en inglés) quien determina los requerimientos técnicos para el registro de productos farmacéuticos de uso humano<sup>8</sup>.

Las guías armonizadas para los estudios preclínicos de toxicología quedaron establecidas en la guía ICH M3 (R2), para el caso específico de los medicamentos biotecnológicos, le corresponden las guías ICH S6<sup>9</sup>.

La forma de elaborar los reportes de estudios preclínicos toxicológicos también han sido objeto de armonización y deben presentarse en el formato denominado Documento Técnico Común (CTD, por sus siglas en inglés), esto bajo la guía ICH M4S<sup>10</sup>.

Si bien las guías ICH son las más utilizadas para estudios preclínicos toxicológicos, existen otras guías útiles como las FDA y OECD. Estas guías establecen de forma general los estudios toxicológicos, sin embargo los estudios específicos que se requieren dependerán del tipo de medicamento, por ejemplo los medicamentos que se emplean durante largos periodos de tiempo requerirán de estudios que representen esta situación, mientras que los medicamentos y vacunas que se utilicen en niños, no será necesaria la evaluación de los efectos en la reproducción<sup>11</sup>.

## **PRINCIPALES PROTOCOLOS PRECLÍNICOS PARA EVALUACIÓN TOXICOLÓGICA DE FÁRMACOS**

De manera general los estudios toxicológicos preclínicos *in vitro* e *in vivo* para la evaluación de medicamentos pertenecen a las siguientes categorías:

- Seguridad farmacológica
- Toxicidad aguda
- Toxicidad subaguda y subcrónica
- Toxicidad crónica
- Genotoxicidad
- Carcinogenicidad
- Toxicidad reproductiva y del desarrollo

Los estudios de seguridad farmacológica tienen la finalidad de evidenciar algún efecto negativo en la funcionalidad de los sistemas cardiovascular, respiratorio, nervioso, gastrointestinal y renal, así como de otros órganos. En particular, las posibles afectaciones de los tres primeros sistemas se requieren evaluar previo a los estudios clínicos. Los estudios de seguridad farmacológica pueden ejecutarse de manera separada o incorporadas en los estudios de toxicidad en dosis repetidas.

**Toxicidad aguda.** Estos estudios se conocen también como estudios de dosis única y se realizan empleando dos especies, una de ellas debe ser de roedor. Tradicionalmente el objetivo de los estudios de toxicidad aguda era determinar la Dosis Letal Media (DL<sub>50</sub>) es decir aquella dosis que ocasione la muerte a la mitad de los animales en experimentación. Actualmente los estudios de toxicidad aguda tienen establecidas dosis límite, por lo general a 1000 o 2000 mg/kg, debido a que los estudios clínicos difícilmente utilizaran dosis mayores<sup>12</sup>.

Una variante de los estudios de toxicidad aguda son los estudios de irritación dérmica e irritación ocular que se realizan para evaluar efectos de medicamentos cuya vía de administración es en órganos específicos como ojos y piel.

**Toxicidad subaguda y subcrónica.** En estos estudios la administración es en dosis repetidas al igual que los estudios de toxicidad aguda, se requiere la evaluación en dos especies, tanto de roedores como no roedores y se utiliza la vía de administración que se empleará en los estudios clínicos.

La duración de los estudios depende de los efectos que se vayan a evidenciar en los protocolos clínicos, de tal manera que se pueden realizar estudios por periodos de una a cuatro semanas, denominados estudios subagudos, mientras que los estudios con duración de uno a tres meses se denominan estudios de toxicidad subcrónica.

La importancia de estos estudios es que se determinan relaciones dosis-respuesta y niveles donde se presentan los primeros efectos o valores umbrales como NOAEL (por sus siglas en inglés). Estos valores es posible conocerlos en virtud de que se realizan análisis bioquímicos en sangre y orina, así como estudios histopatológicos de los animales al término de los estudios<sup>13</sup>.

**Toxicidad crónica.** Los estudios de toxicidad crónica tienen una duración de seis meses a un año, por lo que ofrecen la posibilidad de observar entre otros parámetros, la reversibilidad de los efectos tóxicos. La guía ICH S4A recomienda estudios de seis meses cuando se emplean roedores y de nueve meses utilizando especies no roedores. En medicamentos utilizados durante toda la vida del paciente o cuyo ingrediente activo es una molécula nueva se recomiendan los estudios con una duración de 12 meses<sup>14</sup>.

**Genotoxicidad.** La evaluación de genotoxicidad tiene por objeto detectar compuestos que provocan mutaciones génicas o alteraciones en cromosomas por daños o cambios en su número. Este tipo de daños están asociados con el proceso de carcinogénesis o con efectos en la descendencia.

En virtud de que no existe una prueba que pueda detectar los diferentes tipos de daños genéticos, la norma ICH S2B recomienda una batería de pruebas que comienza con la prueba de mutagenicidad en bacterias, siendo el Test de Ames la prueba más utilizada, posteriormente sugiere la evaluación citogenética de daños en cromosomas utilizando células de mamífero o la prueba *in vitro* de mutación de timidina quinasa de linfoma de ratón y finalmente, propone el ensayo de micronúcleos en ratón. Las nuevas revisiones en esta guía incluyen la prueba del cometa para detectar rompimientos en el ADN de células hepáticas y detección de mutaciones mediante citometría de flujo<sup>15, 16</sup>.

**Carcinogenicidad.** Los estudios de carcinogenicidad tienen como objetivo primordial evaluar la posible inducción de tumores en animales a causa de fármacos o medicamentos que se espera sean utilizados por al menos seis meses en pacientes o de manera intermitente para tratamientos de padecimientos crónicos. De acuerdo a la guía ICH S1B los estudios se realizan en dos especies de roedores, normalmente ratón y rata. La duración del estudio es por lo general de dos años a fin de poder evidenciar la aparición de tumores<sup>14, 17</sup>.

**Toxicidad reproductiva y del desarrollo.** Existen diversos estudios en modelos animales para determinar los potenciales efectos en la reproducción y desarrollo que pudieran ocasionar los medicamentos. Estos estudios se realizan en la mayoría de los casos, con ratones, ratas, conejos o hamsters.

Las funciones reproductivas se evalúan mediante estudios de fertilidad donde se observan afectaciones en la etapa desde la concepción hasta la implantación. Durante la embriogénesis se evalúan efectos en la formación de órganos en estudios con hembras preñadas y finalmente, se realizan estudios para evaluar los efectos en la descendencia<sup>18</sup>. Cabe destacar que no solo la mortalidad y las malformaciones congénitas son registradas, sino que también se consideran aspectos de alteraciones funcionales, de comportamiento, de reducción de peso y en caso de que el medicamento pretenda ser utilizado en niños, las guías ICH recomiendan realizar estudios con animales neonatos para evaluar afectaciones en la madurez sexual de los animales<sup>19, 20</sup>.

## PROTOSCOLOS PARA EVALUAR SEGURIDAD DE VACUNAS

La evaluación toxicológica de vacunas en fase preclínica es algo diferente al resto de medicamentos debido principalmente a su modo de acción y su composición la cual puede contener:

- Microorganismos inactivados que retienen cierta inmunogenicidad
- Organismos vivos no virulentos o atenuados
- Fracciones antigénicas extraídas de microorganismos o producidas mediante ADN recombinante<sup>2</sup>.

Uno de los estudios preclínicos requeridos para vacunas es el de toxicidad sistémica, mismo que puede ser el de toxicidad aguda y el de toxicidad en dosis repetidas. Por lo general se realizan en ratón o rata con diferentes dosis a fin de determinar un margen de seguridad entre el efecto inmunogénico y el posible efecto de toxicidad sistémica.

En ambos estudios se requiere la evaluación en solo una especie animal, sin embargo para las vacunas producidas por ADN recombinante es necesario realizar los estudios con dos especies<sup>21</sup>.

El estudio de toxicidad en dosis repetidas se justifica por el hecho de que algunas vacunas se aplican en varias ocasiones durante la vida de la persona. La rata y el simio son las especies más utilizadas en estos estudios, se evalúan al menos dos dosis siendo la menor, la dosis inmunogénica en la especie de prueba mientras que la dosis mayor es generalmente la dosis que se aplica en humanos.

Otro de los estudios requeridos para vacunas es el de Tolerancia Local en el que se debe realizar una examinación macroscópica e histológica del sitio de inyección. Esta metodología puede ser parte del estudio de toxicidad en dosis repetidas.

Las reacciones pirogénicas pueden presentarse con algunas vacunas por lo que es recomendable realizar estudios de pirogenicidad. Por su parte las reacciones de hipersensibilidad aunque se presentan con poca frecuencia, son de los efectos más severos que pueden presentar las vacunas. Esta evaluación se realiza con el Modelo de Anafilaxis Sistémica en cobayos pero no es aplicable cuando la formulación contiene sustancias de origen humano o antígenos humanizados<sup>22</sup>.

Para estudiar las enfermedades de autoinmunidad se utilizan los modelos de animales genéticamente modificados como la cepa NZB/NZW F1 para lupus y el ratón NOD para diabetes tipo I.

Los estudios para evaluar el efecto en la reproducción por las vacunas no se requieren cuando son de aplicación en niños, solo se requieren para el caso de vacunas que serán aplicadas a mujeres en edad reproductiva<sup>23</sup>.

Los estudios de genotoxicidad no son requeridos para vacunas excepto cuando se presenten impurezas de origen desconocido o cuando se utilicen nuevos adyuvantes, preservativos y/o excipientes<sup>24</sup>.

## TENDENCIAS EN LA APLICACIÓN DE ESTUDIOS TOXICOLÓGICOS PRECLÍNICOS.

A pesar de que los estudios convencionales de seguridad farmacológica son esenciales en el desarrollo de medicamentos, resulta costoso la evaluación de gran cantidad de compuestos que se encuentran en la etapa de candidatos para desarrollo de fármacos, por tal motivo, se requiere de métodos alternativos para evaluación de seguridad que sean rápidos y de menor costo, que ayuden a la selección de moléculas de interés.

Los métodos *in vitro* son una de las alternativas para identificar posibles riesgos toxicológicos, durante etapas tempranas de investigación y desarrollo de fármacos<sup>25</sup>.

Además de las ventajas en disminución de costos y tiempos de ejecución, los métodos *in vitro* proporcionan información referente a los mecanismos de acción de las moléculas, estudiar efectos específicos en células, tejidos u órganos blanco y además permiten diseñar adecuadamente los parámetros de evaluación para los posteriores estudios preclínicos y clínicos.

Los estudios *in vitro* utilizan varios tipos de células de diferentes organismos por lo que pueden proporcionar información no solo de citotoxicidad, sino de aspectos de función mitocondrial o integridad de membrana, liberación de citocinas y daños del material genético. En algunas ocasiones los métodos *in vitro* pueden llegar a sustituir a los métodos en animales, por ejemplo los tejidos de keratinocitos para evaluación de irritación dérmica.

Recientemente se han desarrollado métodos empleando células troncales y modelos organotípicos en tres dimensiones a fin de establecer modelos de enfermedad *in vitro*<sup>26</sup>.

Por otra parte, los avances recientes en la automatización y tecnologías de información proporcionan una plataforma efectiva para la evaluación de la seguridad de moléculas mediante análisis computacionales comparativos y predictivos, como los modelos cuantitativos de relación estructura-actividad<sup>27</sup>.

## REFERENCIAS

- 1 DiMasi, J. A., Feldman, L., Seckler, A. & Wilson, A. Trends in risks associated with new drug development: success rates for investigational drugs. *Clinical pharmacology and therapeutics* **87**, 272-277, doi:10.1038/clpt.2009.295 (2010).
- 2 WHO (World Health Organization). NON-CLINICAL SAFETY TESTING HANDBOOK. *Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases*. **TDR/PRD/NCT/04.1** (2004).
- 3 Rahman, A. , Choudhary, M. & Thomsen, W. *Bioassay Techniques for Drug Development.*, (CRC Press., 2001).
- 4 Chapman, K. L. *et al.* Pharmaceutical toxicology: designing studies to reduce animal use, while maximizing human translation. *Regulatory toxicology and pharmacology : RTP* **66**, 88-103, doi:10.1016/j.yrtph.2013.03.001 (2013).
- 5 Rovida, C. *et al.* Toxicity testing in the 21st century beyond environmental chemicals. *Altex* **32**, 171-181, doi:<http://dx.doi.org/10.14573/altex.1506201> (2015).
- 6 van Meer, P. J., Graham, M. L. & Schuurman, H. J. The safety, efficacy and regulatory triangle in drug development: Impact for animal models and the use of animals. *European journal of pharmacology* **759**, 3-13, doi:10.1016/j.ejphar.2015.02.055 (2015).
- 7 Dixit, R. & Boelsterli, U. A. Healthy animals and animal models of human disease(s) in safety assessment of human pharmaceuticals, including therapeutic antibodies. *Drug discovery today* **12**, 336-342, doi:10.1016/j.drudis.2007.02.018 (2007).
- 8 Cavagnaro, J. & Silva Lima, B. Regulatory acceptance of animal models of disease to support clinical trials of medicines and advanced therapy medicinal products. *European journal of pharmacology* **759**, 51-62, doi:10.1016/j.ejphar.2015.03.048 (2015).
- 9 ICH (International Conference on Harmonisation) S6(R1)., I. g. Preclinical Safety Evaluation of Biotechnologically-derived Pharmaceuticals. (2011).
- 10 ICH (International Conference on Harmonisation)M4., I. g. M4: Organization of the CT. *Guidance for Industry* (2001).
- 11 Kille, J. W. *Regulatory Toxicology in: Faqi, A. S. (Ed.). A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development.* 677-713 (Academic Press., 2013).
- 12 Denny, K & Stewart, C. *Acute, Sub-Acute, Sub-Chronic and Chronic General Toxicity Testing for Preclinical Drug Development. in: Faqi, A. S. (Ed.). A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development.* 87-106 (Academic Press, 2013).
- 13 Yan, J.S., Chen, M. & Wang, Q. *New Drug Regulation and Approval in China. in: Faqi, A. S. (Ed.). A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development.* (Academic Press., 2013).
- 14 Colerangle, J. B. *Preclinical Development of Non-Oncogenic Drugs (Small and Large Molecules). in: Faqi, A. S. (Ed.). A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development.* 517-541 (Academic Press, 2013).
- 15 ICH (International Conference on Harmonisation) S2B., I. A Standard Battery for Genotoxicity Testing of Pharmaceuticals. (1998).
- 16 Nicolette., J. *Genetic Toxicology Testing. in: Faqi, A. S. (Ed.). A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development.* 141-166 (Academic Press, 2013).
- 17 ICH (International Conference on Harmonisation)S1A., I. The Need for Long-term Rodent Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. *Guideline for Industry* (1996).
- 18 Barrow, P. C. Reproductive toxicity testing for pharmaceuticals under ICH. *Reproductive toxicology* **28**, 172-179, doi:10.1016/j.reprotox.2009.03.013 (2009).
- 19 Faqui, S. Hobermany, A. Lewisy, E. & Stump, D. *Developmental and Reproductive Toxicology. in: Faqi, A. S. (Ed.). A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development.* 336-365 (Academic Press., 2013).
- 20 ICH (International Conference on Harmonisation) R2, I. S. Guidance on Reproductive Toxicology and Male Fertility: Detection of Toxicity to Reproduction for Medicinal Products. (2005).
- 21 Brennan, F. R. & Dougan, G. Non-clinical safety evaluation of novel vaccines and adjuvants: new products, new strategies. *Vaccine* **23**, 3210-3222, doi:10.1016/j.vaccine.2004.11.072 (2005).
- 22 Sun, Y., Gruber, M. & Matsumoto, M. Overview of global regulatory toxicology requirements for vaccines and adjuvants. *Journal of pharmacological and toxicological methods* **65**, 49-57, doi:10.1016/j.vascn.2012.01.002 (2012).
- 23 Verdier, F. Non-clinical vaccine safety assessment. *Toxicology* **174**, 37-43 (2002).

- 24 Green, M.D. *Preclinical Toxicology Of Vaccines*. in: Faqi, A. S. (Ed.). *A comprehensive guide to toxicology in preclinical drug development*. 619-647 (Academic Press., 2013).
- 25 Bowes, J. *et al.* Reducing safety-related drug attrition: the use of in vitro pharmacological profiling. *Nature reviews. Drug discovery* **11**, 909-922, doi:10.1038/nrd3845 (2012).
- 26 Tralau, T. *et al.* Wind of change challenges toxicological regulators. *Environmental health perspectives* **120**, 1489-1494, doi:10.1289/ehp.1104782 (2012).
- 27 Lei, T. *et al.* ADMET evaluation in drug discovery: 15. Accurate prediction of rat oral acute toxicity using relevance vector machine and consensus modeling. *Journal of cheminformatics* **8**, 6, doi:10.1186/s13321-016-0117-7 (2016).

**Evaluación de la seguridad, eficacia y perfil farmacocinético de la eritropoyetina recombinante en un modelo de Enfermedad Renal Crónica**

*Estefanía Vázquez Méndez, Ana Laura Márquez Aguirre*

El descubrimiento de una nueva molécula farmacéutica es un proceso largo, que se divide a grandes rasgos en cuatro fases: a) la elección e identificación de una molécula potencialmente terapéutica seguido de b) su evaluación de eficacia y seguridad en un contexto pre-clínico, cuya finalidad es predecir cómo actúa el organismo sobre el candidato a fármaco (farmacocinética), c) cómo actúa el candidato a fármaco sobre el organismo (farmacodinamia) y d) si el candidato a fármaco puede entrañar posibles riesgos para la salud o efectos secundarios tóxicos (Rupa, 2016).

Evaluación de la seguridad y eficacia de un biofármaco en un modelo pre-clínico.

En nuestro estudio en particular, se evaluó la seguridad, eficacia y perfil farmacocinético de la eritropoyetina recombinante (rHuEPO). -La eritropoyetina (EPO) es una hormona hematopoyética producida por los fibroblastos peritubulares en el epitelio renal en respuesta a las concentraciones de O<sub>2</sub>. Actúa sobre las colonias formadoras de blastos eritroides en médula ósea en donde participa en la reproducción y supervivencia de las células de linaje eritroide (Jelkmann, 2013). Desde hace más de dos décadas se dispone de eritropoyetina recombinante humana para el tratamiento de la anemia en pacientes con Enfermedad Renal Crónica (ERC). La ERC se define como la pérdida progresiva y definitiva de la función renal más allá de 3 meses (Eckardt *et al* 2013). Los pacientes con ERC en estadios terminales cursan con anemia, resultado del daño en el parénquima renal, para lo cual está indicado el tratamiento con rHuEPO. En épocas recientes, diversos estudios tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado la capacidad de la EPO para ejercer efectos citoprotectores en diversos linajes celulares, incluyendo células del tejido renal (Cerami *et al* 2011). Estos efectos citoprotectores de la EPO se han encontrado a dosis muy superiores a las terapéuticas, por lo que su uso con fines nefroprotectores en ERC aún no se ha establecido (Tasanarong *et al* 2013, Zhang *et al* 2010, Brines *et al* 2004, Moore & Bellomo 2011).

**Objetivo General**

Evaluar el efecto de la administración de rHuEPO sobre los parámetros de seguridad, eficacia y farmacocinética en un modelo murino de Enfermedad Renal Crónica.

**Objetivos específicos**

1. Caracterizar el modelo de ERC por intoxicación por adenina.
  - 1.1. Valorar los parámetros de toxicidad, cambios en el consumo de agua y alimento, los cambios en la ganancia de peso en las ratas tratadas con rHuEPO.
  - 1.2 Valorar los parámetros de función renal: tasa de filtración glomerular (TFG), creatinina, volumen urinario, hemoglobina (Hb).
2. Evaluar la seguridad de rHuEPO en animales sanos a diferentes dosis:
3. Evaluar la eficacia de la dosis alta de 1050 UI/kg de rHuEPO (Hb, hematocrito –Htc- volumen corpuscular medio –VCM-), en animales sanos y con ERC a 4 semanas.
4. Establecer y comparar los parámetros de farmacocinéticos (tiempo para llegar a concentración máxima ( $t_{m\acute{a}x}$ ), concentración máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), área bajo la curva (AUC),

biodisponibilidad (F), de rHuEPO en la dosis alta (1050 UI/kg) en animales sanos y con ERC.

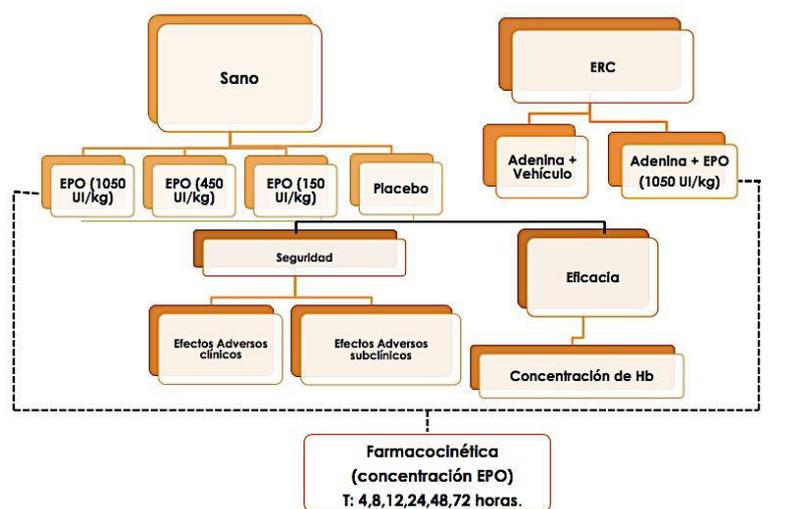
### Elección del modelo preclínico.

Para nuestro estudio, se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar, con un peso inicial de 250-300 g. Se elige este modelo animal debido a que se ha descrito la factibilidad de inducir ERC (Diwan *et al*, 2013), además de la similitud en la secuencia de EPO con la humana –homología de 83% en la secuencia-, lo que garantiza que el efecto terapéutico y los posibles efectos tóxicos de rHuEPO puedan ser cuantificados y extrapolados en humanos (Wen *et al*, 1993).

Se tomó como la dosis baja la reportada como la mínima terapéutica para ejercer un efecto cuantificable, la dosis alta, la necesaria para obtener aproximadamente 10 veces el efecto obtenido por la dosis mínima y como dosis media, la media entre estas dosis. Por ejemplo, la dosis baja consistiría en la dosis mínima requerida para ejercer su efecto eritropoyético en varias dosis semanales y la dosis alta, la requerida para administrar solamente una vez por semana.

### Desarrollo del estudio.

El estudio se llevó a cabo en el bioterio de la Unidad de Evaluación Pre-clínica en las instalaciones del Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología del Estado de Jalisco (CIATEJ). Los animales tuvieron una semana de aclimatación a las condiciones de alojamiento, posterior a lo cual se les separó de manera aleatoria en los siguientes grupos de estudio:



Diseño Experimental

### Grupos de estudio

- I. Dosis Alta 1050 UI/kg 1 por vía subcutánea (s.c) 1 vez por semana durante 4 semanas en ratas sanas.
- II. Dosis Media 450 UI/kg s.c 2 veces por semana durante 4 semanas en ratas sanas.
- III. Dosis Baja EPO 150 UI/kg s.c 3 veces por semana durante 4 semanas en ratas sanas.

- IV. Grupo control con vehículo sol salina 0.9% 0.2 ml s.c 3 veces por semana 4 semanas.
- V. Grupo ERC administración de adenina 100 mg/kg/día vía oral (v.o.) durante 28 días.
- V. Dosis Alta 1050 UI/kg 1 s.c. 1 vez por semana durante 4 semanas en ratas con ERC.

**Variables de estudio.** La finalidad del estudio, además de determinar la seguridad de las diferentes dosis de rHuEPO era de evaluar el efecto que esta ejercía sobre la función renal, es por esto que se realizaron pruebas bioquímicas, biometría hemática y se registraron constantes de consumo de alimento, agua y peso corporal.

**Condiciones de alojamiento.** Condiciones medioambientales: macroambiente filtrado y controlado a una temperatura de 19-23 °C, humedad relativa de 45-55%, control de luz 12:12. Figura 1.

Tipo de caja: Policarbonato con rejilla y tapa con filtro. Bebedero de polisulfonato de dimensiones 23 ancho x 43 largo x 20 cm altura dando una superficie de 989 cm<sup>2</sup>, tapa de polipropileno con pipeta de acero.

Número de animales por caja: 5 a peso ≤ 300 g (989/5 ratas = 197.8) y de 3 animales por caja a peso ≥300 g. Cambio de cama: tres veces por semana con encamado de importación Aspen Chip. Mientras que el lavado y desinfección de cajas y bebederos se realizó una vez por semana.

Ingesta de agua y alimento: Se suministró agua purificada potable a libre acceso.

Dieta: Dieta estándar (STD) catálogo 20128S Tekland Harlan a libre acceso.



Figura 1. Condiciones de alojamiento.

**Método y codificación del procedimiento de operación.** Procedimientos durante el estudio.

**Vías de administración y dosis.** Se administró vía oral una suspensión de adenina a una concentración de 20 mg/mL (disuelta en agua bidestilada y preparada según la ficha técnica del producto, Sigma – Aldrich #cat A8626): en un volumen de 1.5 ml utilizando una cánula curva para rata. La administración de la eritropoyetina (Exetin-A @ Laboratorios Pisa,) se realizó vía subcutánea con jeringa de 1 ml en dorso, re-suspendida en solución salina al 0.9% en un volumen total de 200 µl, frecuencia de administración del grupo de dosis alta, media o baja, acorde a la Guía para la Evaluación Preclínica de Seguridad para los Fármacos Biotecnológicos de la EMEA, 2011.

**Toma de muestras y parámetros de medición.** Peso corporal: Se registra una vez por semana de manera individual, y en base al peso de cada animal se realizó el cálculo de la dosis de rHuEPO o adenina. Para el análisis farmacocinético, posterior a la última administración de rHuEPO en los grupos de dosis altas se procedió a tomar muestras de sangre de vena caudal de manera rotatoria, de manera que se muestrearon 3 animales por tiempo, con la finalidad de no muestrear más de 3 veces al mismo animal en el periodo de 72 horas. Los tiempos de muestreo posterior a la última administración fueron de 4, 8, 12, 24, 48 y 72 horas, donde se obtuvieron 500 µL de sangre, por rata, en tubo adicionado con EDTA. Una alícuota fue llevada para realizar biometría hemática, mientras que la otra fue centrifugada a temperatura ambiente a 3500 rpm durante 20 minutos para separar el plasma y almacenarlo a -80 °C hasta el momento de procesamiento.

Para el cálculo de la tasa de filtración glomerular los animales fueron colocados en jaulas metabólicas individuales provistas con agua y comida para recolección de orina de 24 horas.

**Inducción de ERC.** El modelo de inducción de ERC que utilizamos se basó en el publicado por Diwan *et al* (2013), en el cual se administra la base púrica adenina vía oral durante 30 días, a una dosis de 100 mg/kg/día, como fuente de urato catalizada por medio de la xantina oxidasa. La causa del daño se le atribuye al subproducto formado por el metabolismo de la adenina que es 2,8-dihidroxiadenina, que provoca precipitaciones y cristales en el epitelio de los túbulos proximales, la acumulación de estos cristales causa la degradación de los túbulos (Philips *et al* 1951). El resultado es la infiltración de moléculas inflamatorias en el espacio intersticial y fibrosis, dilatación de los túbulos y una calcificación de la membrana basal tubular.

**Eutanasia.** Una vez concluido el estudio, se procedió a realizar la eutanasia por sobredosis de anestésico (40-60 mg/kg pentobarbital sódico vía intra-peritoneal). Posterior a la anestesia, se realizó punción cardíaca a blanco. La muerte del animal se confirmó por el cese de la respiración y del latido cardíaco.

### **Recolección de datos**

Las observaciones de manifestaciones clínicas detalladas y el registro de eventos adversos, se realizaron diariamente en caso de presentarse. Las reacciones adversas que observaron con mayor frecuencia fueron: producción de secreciones nasales, piloerección, fragilidad capilar y diarrea. Todas estas manifestaciones se encuentran descritas para EPO incluso a dosis terapéuticas. Tomando en cuenta que el efecto adverso más severo reportado para rHuEPO es la aplasia pura de células rojas; una reacción inmunológica en donde se generan anticuerpos no sólo hacia la EPO exógena, sino también contra la endógena, se realizó un hemograma completo para todas las dosis estudiadas. Tabla 1.

Tabla 1. Valores expresados en promedios  $\pm$  DE

	Placebo	150 UI/kg	450 UI/kg	1050 UI/kg
<b>Eritrocitos (millones/mm<sup>3</sup>)</b>	7.82 $\pm$ 0.7	11.6 $\pm$ 0.35	10.3 $\pm$ 1.4	8.43 $\pm$ 0.06
<b>Hb (g/dL)</b>	14.9 $\pm$ 1.1	23.2 $\pm$ 1.01	21.2 $\pm$ 0.2	16.83 $\pm$ 0.4
<b>Htc (%)</b>	46.1 $\pm$ 4.4	73.0 $\pm$ 1	62.4 $\pm$ 8.7	52.47 $\pm$ 1.1
<b>Volumen Corpuscular Medio (fL)</b>	59 $\pm$ 0.8	64.2 $\pm$ 3.86	60.6 $\pm$ 0.7	61.53 $\pm$ 0.8
<b>Hb corpuscular media</b>	19.10.8	19.4 $\pm$ 0.23	21.0 $\pm$ 2.5	19.77 $\pm$ 0.5

Los parámetros a evaluar de manera principal fueron la cantidad total de eritrocitos y la hemoglobina, y como se puede observar en la tabla anterior, ningún grupo presenta una menor cantidad de eritrocitos o menor concentración de Hb que el grupo control, por lo que de manera indirecta se concluye que no hubo aplasia de células rojas.

Las concentraciones de rHuEPO en plasma fueron determinadas por el método de Inmuno Ensayo Ligado a Enzimas (ELISA por sus siglas en inglés) utilizando un kit comercial de la marca R&D Quantikine Systems IVD ® número de catálogo DEP00. Se reporta las concentraciones séricas de rHuEPO en los tiempos determinados para todos los grupos y las diferentes dosis.

La sangre para biometría hemática y química sanguínea fue recolectada en tubo adicionado con EDTA y procesado en un tiempo no mayor a 4 horas en un analizador automatizado de hematología modelo *SYSMEX kx-21N*®. En el caso de los parámetros hematológicos, los datos reportados son sólo del punto final del estudio (28 días).

Las determinaciones de creatinina sérica y urinaria se llevaron a cabo en el equipo Vitros 250® de Ortho-Clinical Diagnosis ®. De igual manera, se reportan los valores obtenidos de todos los grupos y dosis en el punto final del estudio.

Para la evaluación de los parámetros farmacocinéticos se utilizó el programa *R Pkfit: A Data Analysis* versión 1.2.5. El cual utiliza el algoritmo de Nelder-Mead para obtener valores de constante de absorción ( $k_a$ ), constante de eliminación ( $k_{el}$ ) y volumen de distribución ( $V_d$ ). El modelo farmacocinético descrito es un modelo de regresión no lineal de un compartimento para administración no parenteral de un fármaco.

Las diferencias estadísticas entre los grupos de estudio de seguridad de las diferentes dosis de rHuEPO se determinaron mediante un análisis de varianza de una vía (ANOVA), aplicando la prueba post hoc correspondiente según el tipo de datos, mediante el programa *GraphPad Prism v 6*. Se consideró una diferencia estadística cuando el valor de  $p < 0.05$ . Los resultados se presentan como el promedio  $\pm$  desviación estándar. Para comparación de valores determinantes de enfermedad renal crónica, creatinina, TFG, hemoglobina y los valores farmacocinéticos AUC,  $C_{max}$  y  $T_{max}$  se compara el grupo control versus el grupo al que se le administró adenina mediante T de Student. Para determinar diferencia estadística del AUC se comparará la media del grupo sano vs el enfermo, junto con los intervalos de confianza del 95% con una  $\alpha 0.05$ ,

y se considerará significativo un valor de  $p < 0.05$ . Los resultados se presentan en tablas como promedio  $\pm$  desviación estándar e intervalos de confianza.

### Análisis y Reporte

Con el fin de determinar la seguridad del rHuEPO, se analizaron datos farmacocinéticos (unidosis) y fisiológicos (dosis múltiples) en los grupos de sanos y con ERC. Se miden concentraciones en sangre a tiempos determinados obteniendo los siguientes resultados. Tabla 2.

Tabla 2. Concentración de EPO en mUI/mL posterior a una aplicación de 1050 UI/kg en animales sanos y con ERC. Valores promedio por tiempo  $\pm$  DE.

Grupo	Tiempo	Concentración	Grupo	Tiempo	Concentración
Sano + EPO	4	150 $\pm$ 22.00	ERC + EPO	4	135.54 $\pm$ 29.12
	8	1309.45 $\pm$ 53.54		8	1844.22 $\pm$ 73.10
	12	1910.04 $\pm$ 920.88		12	1660 $\pm$ 650.28
	24	555.16 $\pm$ 129.15		24	785.43 $\pm$ 34.37
	48	82.85 $\pm$ 6.23		48	189.98 $\pm$ 59.93
	72	18.05 $\pm$ 2.05		72	31.08 $\pm$ 1.29

La concentración máxima fue mayor en el grupo de ERC, y el tiempo para llegar a la concentración máxima fue menor, sin embargo, se encuentra dentro de los rangos esperados para EPO administrada vía subcutánea.

En cuanto a las variables fisiológicas se reportan aquellas que son relevantes de acuerdo al mecanismo de acción de rHuEPO (Hb, Htc) y en las que se esperan cambios relacionados con la fisiopatología de ERC (creatinina, TFG). Tabla 3.

Tabla 3. Tabla. Parámetros farmacocinéticos en animales sanos y con ERC.

	Sano	Sano + EPO	ERC	ERC + EPO	Rango normal y unidad de medida
<b>Hemoglobina</b>	14.46 $\pm$ 1.4	16 $\pm$ 0.86	9.9 $\pm$ 1.44	18.34 $\pm$ 1.48	12.2 a 14.8 g/dL
<b>Hematocrito</b>	46.10 $\pm$ 4.41	52.47 $\pm$ 1.02	36.8 $\pm$ 5.6	50.1 $\pm$ 3.3	39.6 -52.5 %
<b>Tasa Filtración Glomerular</b>	1.84 $\pm$ 0.55	1.126 $\pm$ 0.24	0.21 $\pm$ 0.23	0.46 $\pm$ 0.29	>1 mL/min/100 g peso corporal
<b>Creatinina</b>	0.34 $\pm$ 0.05	0.32 $\pm$ 0.08	2.68 $\pm$ 1.6	0.52 $\pm$ 0.1	0.2 a 0.7 mg/dL

Los parámetros de funcionalidad se obtuvieron después de 4 administraciones semanales de EPO a la dosis más alta (1050 U/kg) en sanos y enfermos, y se observa que conforme a lo esperado, hemoglobina y hematocrito incrementan en los grupos tratados con EPO, y los parámetros de función renal tienden hacia la mejoría en el grupo de ERC + EPO. Por lo tanto se concluye que EPO es segura y eficaz a la dosis de 1050 U/kg en animales sanos y enfermos. Tabla 4.

Tabla 4. Parámetros funcionales en animales sanos y con ERC, valores promedio  $\pm$  DE.

<b>Grupo</b>	<b>C<sub>max</sub></b> <b>(mUI/mL)</b>	<b>T<sub>max</sub></b> <b>Horas</b>	<b>Constante de absorción</b>	<b>Constante de eliminación</b>	<b>Velocidad de distribución</b>
Sano + EPO	1619.59	12	0.086	0.086	0.318
ERC + EPO	1858.32	8	0.084	0.0841	0.2794

### **Aseguramiento de la calidad.**

El diseño metodológico se realiza tomando en cuenta los lineamientos y recomendaciones de las normas oficiales correspondientes (NORMA Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas y la NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Además, se toman medidas que garanticen la validez del estudio como el cálculo correcto de animales por grupo, la presencia de grupos control, el registro y etiquetado correcto de las muestras y resultados. Una vez obtenidos los resultados, se comparan con los disponibles en la bibliografía.

### **CONCLUSIONES**

El modelo de intoxicación con adenina representa de manera útil y adecuada la ERC, ya que presenta los parámetros que definen a la enfermedad como aumento crónico de la concentración de creatinina sérica, disminución de la tasa de filtración glomerular y la hemoglobina. Además de estos criterios, se encontraron datos de fibrosis renal, pérdida de peso, anorexia y adinamia, cambios en el patrón de consumo de agua y aumento en la diuresis de 24 horas.

La administración de las distintas dosis de EPO, 150, 450 y 1050 UI/kg es segura durante un periodo de 28 días en ratas sanas. Si bien el incremento en los niveles de Hb en grupo de 150 UI fue importante y más allá de lo deseado en un panorama terapéutico, en este periodo de tiempo no se presentaron eventos tromboticos en los animales. Los eventos adversos presentados en los distintos grupos fueron los descritos para EPO, a excepción de la fragilidad cutánea en el grupo de 1050, la cual no puede ser directamente atribuida a un efecto de EPO. Aún en la dosis más alta de EPO, no se mostraron indicios de reacciones inmunológicas como aplasia pura de células rojas.

La dosis alta de EPO en animales con ERC es segura siguiendo los siguientes criterios: No se presentaron efectos adversos más allá de los esperados en animales sanos. Los indicadores de función renal no sólo se mantuvieron estables, sino que mostraron mejoría hablando de los niveles séricos de creatinina y la tasa de filtración glomerular.

La dosis alta de EPO es eficaz en el modelo de ERC al incrementar la hemoglobina significativamente mejor que su contraparte de animales sanos.

Se encontraron cambios en los parámetros de C<sub>max</sub> y T<sub>max</sub>, siendo más alta la concentración en los animales con ERC y alcanzando esta en 8 horas vs los animales sanos que alcanzaron su C<sub>max</sub> a las 12 horas. A pesar de la diferencia en estos parámetros, ambos se encuentran dentro de los rangos reportados para EPO

subcutánea. El análisis de AUC y el porcentaje de biodisponibilidad entre los grupos no mostraron diferencia significativa, a pesar de esto, la eficacia de EPO fue mucho mayor en el grupo de ERC que en el grupo de sanos. La vía de administración subcutánea presenta alta variabilidad incluso en un modelo experimental, debido a factores como porcentaje de grasa corporal, sitio de la inyección, nivel de actividad física, estado inmunológico.

## REFERENCIAS

Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A, Ghezzi P, Fratelli M *et al* Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta sub-unit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101 (41):14907-12.

Cerami -Hand Carla, and Brines Michael. Promises and Pitfalls in Erythropoietin-Mediated Tissue Protection: Are Nonerythropoietic Derivatives a Way Forward?. *J Investig Med* . 2011 October; 59(7): 1073–1082

Chen D, Kannan K, Tan H, Zheng ZG, Feng YL, et al. Bisphenol Analogues Other Than BPA: Environmental Occurrence, Human Exposure, and Toxicity – A Review. 2016, *Environ Sci Technol*.

Diwan V, Mistry A, Gobe G, Brown L. Adenine-induced chronic kidney and cardiovascular damage in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2013, 68(2):197-207.

European Medicines Agency. Guideline on non-clinical and clinical development of similar biological medicinal products containing recombinant erythropoietins. Julio 2009 EMEA/CHMP/BMWP/30163672008.

European Medicines Agency. ICH guideline S6 (R1) – preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. Junio 2011; EMA/CHMP/ICH/731268/1998.

Jelkmann W. Physiology and pharmacology of erythropoietin. *Transfus Med Hemother*.2013 Oct; 40 (5):302-9.

Koszalka GW, Johnson NW, Good SS, Boyd L, Chamberlain SC et al. Preclinical and Toxicology studies of 1263W94, a potent and selective inhibitor of human Cytomegalovirus Replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2002; 46(8): 2373–2380.

Moore E, Bellomo R. Erythropoietin (EPO) in acute kidney injury. *Annals of Intensive Care* 2011, 1:3

Norma Oficial Mexicana PROY-NOM-257-SSA1-2013, Autorización de medicamentos, registro, renovación y modificaciones.

Note for guidance on Non-clinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical trials for Pharmaceuticals (CPMP/ICH/286/95; ICH M3 (R2)):

Note for Guidance on Toxicokinetics: A Guidance for Assessing Systemic Exposure in Toxicology Studies (CPMP/ICH/384/95; ICH S3A)

Philips F, Thiersch J, Bendich A. Adenine intoxication in relation to in-vivo formation and deposition of 2,8 dioxadenine in renal tubules. *Pharmacology and Protein Sections, Sloan-Kettering Institute for Cancer Research*, 1951

Rupa Guha. Preclinical Pharmacology and Toxicology: an Important Aspect in Drug Discovery. *Adv clin Toxic* 2016; 1(1):

Wen D, JP Boissel, TE Tracy, RH Gruninger, LS Mulcahy, J Czelusniak, M Goodman, HF Bunn. Erythropoietin structure-function relationships: high degree of sequence homology among mammals. *Blood*. 1993 82:1507-1516

## Capítulo VI

### **Ingeniería de Tejidos para remodelación ósea: Matriz ósea desmineralizada**

*Rogelio Rodríguez Rodríguez, Eduardo Padilla Camberos, Emmanuel Díaz, Benjamín Macuil Rojas, Lizette Michel García, Sara Minia Zepeda Morales, Alfonso López Vázquez, María Cristina Velasquillo Martínez, Clemente Ibarra Ponce de León, David Garcíadiego Cazerres, Francisco Sánchez Arévalo, Zaira Yunuen Garcia Carvajal*

#### **Introducción. Terapia avanzada para remodelación ósea**

Los productos medicinales de terapia avanzada (Advanced Therapy Medicinal Products, ATMPs, por sus siglas en inglés), están definidos como productos de terapia génica (GTMPs, Gene Therapy Medicinal Products), terapia celular somática y productos de ingeniería tisular (Tissue-Engineered Products, TEPs). Todos ellos constituyen una clase importante de productos terapéuticos innovadores que están siendo investigados como tratamientos para varias enfermedades. A pesar del éxito de muchos de estos productos en estudios con animales, pocos han alcanzado el éxito comercial debido a la alta regulación a la que deben estar sometidos<sup>1</sup>.

La incidencia mundial de trastornos y afecciones óseas ha mostrado una tendencia al alza abruptamente y se espera que se duplique para el año 2020, especialmente en las poblaciones donde el envejecimiento está acoplado con el aumento de la obesidad y la escasa actividad física. El desarrollo de ATMPs para la reparación ósea se espera que revolucione el sistema de salud para el tratamiento clínico de los defectos óseos. El desarrollo de ATMPs conteniendo células bien caracterizadas jugará un papel crucial para cumplir con las necesidades de la creciente demanda de injertos de hueso biológicamente funcionales. Se espera que los ATMPs puedan reparar, sustituir y/o regenerar el tejido dañado o la falta de éste; e inclusive proporcionar tratamientos para las patologías intratables actualmente de una manera rentable<sup>2</sup>.

A pesar de esto, los resultados de los tratamientos clínicos con ATPMs (incluyendo células) para lesiones óseas que han sido probados, están lejos de ser impresionantes. Por una parte, los resultados clínicos se han visto obstaculizados debido a la simplicidad de los primeros productos comerciales existentes. Actualmente, existen productos potenciales de segunda generación que se han quedado “estancados” en la investigación y desarrollo. Esto se debe a varias razones: la falta de un marco regulatorio evolucionado en esta temática, escasez de tecnologías de fabricación industrial para hacer frente a estos nuevos productos, establecimiento de técnicas y metodologías robustas que aseguren la No toxicidad y eficacia sin empelar animales y que satisfagan a los entes regulatorios de aprobar su salida al mercado, entre otras<sup>3</sup>.

Durante décadas, los investigadores se han dado a la tarea de encontrar en los injertos ciertas características que respondan a cada una de las necesidades de reconstrucción del hueso; este hecho ha llevado a estudiar y comparar los beneficios de estructuras óseas procedentes de donaciones cadavéricas; las cuales pueden incrementar las probabilidades de éxito de la reparación ósea y disminuyen considerablemente los posibles riesgos y complicaciones del tratamiento pre y post quirúrgico. De igual manera, se han estudiado diversos implantes óseos sintéticos, pero éstos no poseen la capacidad natural de inducir el proceso de regeneración ósea, haciendo de ellos materiales inertes, biocompatibles, de "relleno", que no sustituyen las características del hueso, pero utilizados conjuntamente con los procedentes de las donaciones cadavéricas pueden mejorar los resultados<sup>4</sup>.

Existen productos comerciales como la matriz ósea desmineralizada (MOD) con un largo historial de uso clínico la MOD que se fabrica en distintas formas farmacéuticas (polvo, masilla, astilla o en gel), de acuerdo a las necesidades del cirujano, inclusive en el mismo evento quirúrgico. Lo que tiene genera interés del sector de dispositivos médicos en fabricar productos innovadores a base de MOD. En este capítulo de libro se pretende ofrecer un panorama general del uso de MOD y la evaluación de seguridad y eficacia exigida por los entes regulatorios para su comercialización.

### **Uso de células troncales en remodelación ósea.**

Si hablamos de Terapias de reemplazo celular nos surge a la mente la posibilidad de substituir un tejido o tipo celular por otro con las mismas características, sin embargo, esta idea no es nueva ya que un tratamiento médico que ha sido utilizado desde hace muchos años han sido las transfusiones sanguíneas y el trasplante de médula ósea (Thomas, Lochte et al. 1959) por citar algunos ejemplos.

El objetivo principal del conocimiento de la biología y fisiología de las CT es la búsqueda de su aplicación exitosa en terapias de reemplazo celular. Éste tipo de tratamientos, conocidos en conjunto como Citoterapia, tiene su origen a principios siglo XX con la colaboración de diferentes científicos cuyo principal objetivo era la prolongación de la vida humana individual y el revitalizamiento de las personas a través de técnicas radicales, entre las que destacan los estudios de aloinjertos y xenoinjertos en humanos de Serge Voronoff (1866-1951), los orígenes de la ciencia de Ingeniería de Tejidos y preservación de órganos y tejidos en ambientes extracorpóreos de Alexis Carrel (1873-1944), y la *Zellular-therapie* de Paul Niehans (1882-1971), quien inyectaba a sus pacientes con células obtenidas de órganos específicos de animales, dependiendo de la patología a tratar, e incluso células humanas obtenidas a partir de productos abortados (Haubold 1954, Augier, Salf et al. 1996, Lefrere and Berche 2010).

Hoy en día, gracias al avance de las ciencias médicas y biológicas, éstas técnicas de origen rudimentario se han refinado a muy altos niveles. Comenzando desde los estudios de trasplante de médula ósea, y por consiguiente de progenitores celulares, en 1939 se realizó el tratamiento de anemia aplásica con transfusiones sanguíneas e inyección intravenosa de médula ósea (Munoz, Shah et al. 2014). Para el año de 1957, E. Donall Thomas. realizó los primeros trasplantes alogénicos de médula ósea en pacientes en tratamiento por leucemia (Thomas, Lochte et al. 1957). A partir de éstos primeros resultados experimentales, la citoterapia ha avanzado y se ha diversificado hasta su estado actual, en el que las técnicas se han refinado y el conocimiento de varias patologías susceptibles a éste tratamiento se ha profundizado. Podemos clasificar, en términos generales, a la citoterapia dependiendo del tipo celular potencialmente utilizable: trasplante de precursores hematopoyéticos, citoterapia alogénica (Kroger, Giorgino et al. 2015, Tsushima, Sakurai et al. 2015), terapia con precursores neurales (Bonnamain, Neveu et al. 2012, Tincer, Mashkaryan et al. 2016), terapia con células embrionarias y pluripotentes inducidas (Leeper, Hunter et al. 2010, Ghaedi and Niklason 2016, Gill, Hung et al. 2016), y terapia con CEM (Zaher, Harkness et al. 2014, You, Namgoong et al. 2015).

Para trabajar con células troncales en el país, se requiere una autorización sanitaria y el centro debe contar con un comité interno de trasplantes. Está prohibido comerciar con células de cualquier tipo y se requiere permiso especial para sacarlas del territorio nacional (Ley General de Salud) (Hurtado 1984). No existen sanciones para la experimentación con células embrionarias, sin embargo, en el Distrito Federal está prohibido utilizar gametos

para propósitos no autorizados por los donantes y no está autorizada la creación de blastocistos para fines distintos a la procreación (Codigo Penal DF) (Obrador 2002). Debido a la falta de una legislación clara al respecto, se ha frenado hasta cierto punto el desarrollo del estudio de células troncales. A pesar de esto, existen varias instituciones públicas, Centros de Investigación como el CIATEJ e Instituciones privadas que se dedican a la investigación con CT de distintos orígenes, con reportes de resultados de la utilización de terapia celular; como, la utilización de células troncales embrionarias en un modelo murino de lesiones traumáticas oculares, observándose disminución de la inflamación y recuperación de la integridad histológica (Vazquez-Zapien, Rojas-Lopez et al. 2014). Por otro lado, se ha demostrado que el trasplante de células troncales mesenquimales en una avulsión de la raíz espinal en un modelo murino tienen efecto neuroprotector y de reinervación después de la avulsión (Torres-Espin, Corona-Quintanilla et al. 2013). Éste potencial de regeneración, así como el de promoción de los mecanismos endógenos que presentan las CT las hace una alternativa fuerte y viable para corregir o mejorar el estatus de los pacientes con falla orgánica o tisular considerable, con un riesgo menor considerando otras alternativas terapéuticas invasivas (Parekkadan and Milwid 2010).

### **Matriz ósea desmineralizada (MOD).**

Los injertos óseos son utilizados para la regeneración de defectos óseos causados por traumatismo, neoplasia y/o infecciones. La regeneración del tejido sucede mediante 3 procesos; osteogénesis, osteoconducción y osteoinducción. El tejido óseo contiene fibras de colágeno tipo I organizadas en una triple hélice, en estas se depositan los cristales de hidroxiapatita  $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ <sup>5</sup>.

La MOD es un biomaterial comercial que tiene la propiedad de formar hueso. Ha sido catalogado como dispositivo médico y aprobado para rellenar fisuras óseas en patologías periodontales y ortopédicas<sup>6</sup>. Se utiliza hueso en polvo cortical o esponjoso para producir MOD<sup>7</sup>. La MOD debe ser un producto seguro, preparado mediante un proceso aséptico y esterilizado. La MOD se constituye por colágeno y distintas proteínas morfogénicas<sup>8</sup>, las cuales promueven la osteoinducción y osteoconducción. Con un largo historial de uso clínico la MOD se fabrica en distintas formas farmacéuticas como polvo, masilla, astilla o en gel, de acuerdo a las necesidades del cirujano, inclusive en el mismo evento quirúrgico<sup>9</sup>. Haciendo honor a su nombre y como una matriz orgánica es extraído con ácido a partir de fuentes de huesos humanos. La MOD conserva gran parte de los componentes proteicos nativos los de hueso, con pequeñas cantidades de sólidos a base de calcio, fosfatos inorgánicos y algunos restos de células. Muchos de los componentes proteicos de la MOD (por ejemplo, factores de crecimiento, proteínas morfogénicas) son conocidos por ser agentes osteogénicos potentes. La MOD contiene 8 % de calcio, el proceso de desmineralización se realiza con ácido clorhídrico a una concentración de 0.5 – 0.6 N<sup>10</sup>. En la Tabla 1 se muestran las principales proteínas morfogénicas relacionadas en la formación de hueso humano y que muchas de ellas se encuentran en la MOD.

La MOD proporciona una matriz biodegradable que se coloca quirúrgicamente para llenar defectos óseos y facilita la liberación endógena de estas proteínas morfogénicas favoreciendo la inducción de formación de hueso nuevo y acelerar su reparación.

**Tabla 1. Principales proteínas morfogénicas relacionadas en la formación de hueso humano.** EIF2AK3, Cinasa alfa 3 factor de iniciación de la translación de eucariotas; EIF2A Factor 2A de iniciación de la translación de eucariotas, ATF4, Factor 4 activador de la transcripción; SMAD, proteína madre contra decapentaplegica homologa; TGF- $\beta$ , Factor de crecimiento estimulante beta.

Proteína	Grupo	Función
<b>BMP 1</b>	Metaloproteasa	Coadyuvante en el desarrollo de cartílago, escinde el extremo carboxilo terminal del Procolágeno I, II y III <sup>11</sup> .
<b>BMP 2</b>	Súperfamilia TGF- $\beta$	Induce condrogénesis, osteogénesis y revascularización. Estimula la osteogénesis mediante la activación de la vía EIF2AK3-EIF2A - ATF4 <sup>12</sup> .
<b>BMP 4</b>	Súperfamilia TGF- $\beta$	Permite la activación de factores de transcripción SMAD's, influye en el desarrollo de cartílago y hueso. Tiene efecto sobre proliferación, apoptosis y movilidad celular <sup>13</sup> .
<b>BMP 7</b>	Súperfamilia TGF- $\beta$	Coadyuva en la diferenciación de células mesenquimales en condroblastos y osteoblastos. Induce la fosforilación de proteínas SMAD 1/5 <sup>8</sup> .
<b>BMP 8</b>	Súperfamilia TGF- $\beta$	Proteína osteoinductiva y condrogénica, pudiera estar involucrada en la osteogénesis epitelial <sup>12</sup> .
<b>BMP 14</b>	Factor de crecimiento de diferenciación (GDF5)	Participa en la condrogénesis, potencia la curación de tendones y la formación de hueso <sup>13</sup> .

Dada la larga trayectoria clínica de la MOD y su accesibilidad comercial en diferentes formas y procedente de diferentes fuentes estándar, la oportunidad de desarrollar y validar MOD como biomaterial óseo versátil en la reparación ortopédica y medicina regenerativa, es atractiva para cualquier empresa del sector de los dispositivos médicos que desea innovar en esta temática.

### **Obtención de DBM: procuración de tejido óseo.**

1. Procuración de Tejido óseo. Actualmente, la procuración de tejido óseo se realiza en instituciones autorizadas. En Estados Unidos de América (EUA) la Asociación Americana de Banco de Tejidos (AATB, American Association of Tissue Bank) es una institución que unifica los criterios de las actividades de los bancos de tejido<sup>14</sup>. En México, el CENATRA (Centro Nacional de Trasplantes) se encarga de la difusión, coordinación y distribución de los órganos y tejidos y la COFEPRIS (Comisión Federal para la Prevención de Riesgos Sanitarios) de vigilar y autorizar a los institutos generadores de órganos y tejidos, de los bancos de tejidos y fabricación de dispositivos médicos. Los bancos de tejidos procesan, almacenan y distribuyen el tejido, asegurando su calidad y la máxima eficiencia clínica al ser implantados en los receptores.

Las pruebas del donador, incluyen anticuerpos contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana I/II (anti-VIH-1 y anti VIH-2), prueba de ácidos nucleicos (NAT) para VIH, antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg), anticuerpos totales contra el antígeno del núcleo de hepatitis B (anti-HBc-total, incluyendo IgG e IgM), anticuerpos contra hepatitis C, y la prueba rápida de plasma contra sífilis<sup>14,15</sup>.

2. Protocolos. Si el donador cadavérico ha permanecido a temperatura ambiente después de su muerte, el tiempo límite para la procuración del tejido óseo son 15 horas, pero si ha estado en refrigeración, es de 24 horas. Los tejidos deberán ser procurados en un área aséptica o cuarto limpio, realizando la preparación quirúrgica estándar con paquetes, instrumental y técnicas estériles<sup>15</sup>.

Todas las superficies de las mesas de trabajo deben estar previamente desinfectadas con un agente bactericida y antimicrobiano. Los técnicos deben usar la bata quirúrgica, cubrir la cabeza, enguantarse y toda la vestimenta quirúrgica debe ser llevada con la misma diligencia que se realiza para procedimientos quirúrgicos rutinarios. Debe respetarse la técnica aséptica. La piel del donador debe ser preparada mediante lavado quirúrgico. El área de escisión debe quedar sin vello y lavada con un agente antimicrobiano<sup>15</sup>. Para la apropiada extracción del tejido, es necesario un equipo quirúrgico; un cirujano, dos técnicos y un circulante<sup>14</sup>. Durante la extracción del tejido se debe evitar la contaminación cruzada. Las áreas de la piel que presenten alguna abrasión o heridas deben ser evitadas al realizar la escisión inicial<sup>15</sup>. Por lo general, un protocolo de procuración se inicia con la disección de la piel de extremidades inferiores, se separa la fascia lata, enseguida se separa la cabeza femoral del acetábulo, en la porción distal se separa el calcáneo de los huesos propios del cuboide y escafoide. Respecto a la extremidad torácica, se hace un corte longitudinal desde el hombro hasta la muñeca, se disecciona hasta al hueso. La cabeza del húmero se separa de la cavidad glenoidea y en la sección distal el radio y el cúbito son separados del escafoide, semilunar y pisiforme. Al final, ambas crestas ilíacas son el último tejido óseo a procurar. Una vez removido el tejido óseo del donador, estos se colocan en bolsas estériles identificadas con el número de donador y se transportan en contenedores térmicos a 4 °C.

### **Evaluación de la funcionalidad biológica.**

1. Formación de Tejido Óseo. Durante la reparación o regeneración de tejido óseo ocurren tres procesos naturales para reparar o reconstituir la falta de tejido óseo: osteogénesis, osteoinducción y osteoconductividad. No es lo mismo reparar un hueso por fractura que por pérdida (por ejemplo: amputación de la punta de la falange distal de un dedo). En una fractura esta reparación se puede realizar de forma natural y sólo tratando de unir y acercar lo más posible las zonas que quedaron separadas durante la fractura ósea<sup>16</sup>.

A grandes rasgos se explica cómo se repara una fractura ósea: una vez que está la lesión y existe ruptura de hueso y fragmentos del mismo, se llevan a cabo los 3 procesos en mayor o menor medida: Cuando células precursoras de hueso - preosteoblastos y osteoblastos- están en el tejido dañado y proceden del periostio ocurre **osteogénesis**. Fragmentos de hueso roto en la zona de la fractura quedan y pueden servir como guía para que las células que van a conformar el tejido nuevo lo utilicen como un andamio provisional, esto es conocido como **osteoconductividad**<sup>17</sup>. Finalmente, en estos restos de hueso en la zona de la fractura se pueden encontrar moléculas como las BMP, que inducen la formación de hueso nuevo, a partir de células troncales del periostio, o de las provenientes de la sangre periférica, incluso del tejido conjuntivo adyacente, conocido como **osteoinducción**<sup>18</sup>.

Esto mismo se intenta lograr cuando en alguna lesión se ha perdido parte importante de tejido óseo que ya no es posible reparar de forma natural debido a la cantidad de tejido óseo faltante y al gran espacio que hay entre un extremo y otro del hueso dañado. Es el caso de daños al hueso de la mandíbula, en el cual falta una cantidad importante de tejido y que mediante la reparación natural no será posible recuperar. Este tipo de lesiones se han intentado reparar con tejidos óseos que se extraen de la cresta ilíaca del paciente. Este tejido tiene aún células que podrán volver a formar hueso, de tal forma que se puede formar hueso mediante el proceso conocido como osteogénesis. Se podría reparar mediante un andamio sin células que sirva como osteoconductor, o finalmente con un andamio con células que secreten los factores osteoinductores, o que esos factores estén embebidos en dicho andamio<sup>18</sup>.

## 2. Protocolos. Osteogénesis.

La osteogénesis se realiza principalmente por células progenitoras de hueso o incluso mediante células troncales mesenquimales que puedan dirigir su diferenciación hacia un linaje óseo. La fuente necesaria para obtener este tipo de células es a partir del periostio, ahí se encuentran las células progenitoras de hueso, pero es necesario que se traten con algún factor de crecimiento para activar su programa de diferenciación. Esta población de células va disminuyendo con la edad, así que en personas mayores será más difícil obtener una buena cantidad. En estas condiciones podrían utilizarse las células troncales mesenquimales, estas células se pueden obtener a partir de diversos tejidos como médula ósea, linfocitos de la sangre periférica, de cordón umbilical, de tejido adiposo, etc. Estas células también requieren de condiciones especiales para dirigir su diferenciación a tejido óseo. Los factores de crecimiento que promueven fuertemente la formación de hueso en estas células progenitoras o troncales, son las de la súper familia de los TGF-beta, principalmente las BMP (Proteínas Morfogénicas de Hueso)<sup>19</sup>.

Existen varias BMP's, pero la BMP-7 (OP-1) es la más potente para formar hueso<sup>20</sup>. Sin embargo, existe un cruce de señalizaciones entre las vías TGF- $\beta$ /BMP y de varias citosinas, como por ejemplo, las vías Wnt, Hedgehog, Notch, PTHrP y FGF, las cuales coordinan la osteogénesis, el desarrollo del esqueleto y la homeostasis de hueso. Finalmente, el hueso formado deberá estar vascularizado y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) será una molécula fundamental para este proceso.

En productos a base de ingeniería de tejidos, la Osteogénesis ocurre principalmente cuando se implanta hueso autólogo, proveniente de la cresta iliaca, o cuando se utiliza tejido heterólogo cadavérico. Ya que las células que contiene el tejido pueden ser ontogénicas. La forma de evaluar la osteogénesis consiste en detectar células nuevas que a partir de células no diferenciadas se vayan diferenciando en células precursoras de hueso y finalmente en osteoblastos. Para ello, se deben tomar muestras del tejido implantado y detectar la expresión de los genes marcadores de células osteogénicas; Runx-2 es un factor de transcripción que sirve como marcador temprano de la formación de hueso, y osteopontina y osteocalcina son proteínas extracelulares que se depositan cuando el hueso ya está consolidado.

La detección tanto de los genes como de las proteínas de estas moléculas se puede realizar mediante RT-PCR y Western Blot para determinar la cantidad de transcrito y de proteína respectivamente. En forma complementaria, se pueden detectar tanto los genes como las proteínas *in situ*, y así ubicar que células son las que están diferenciándose a hueso, esto mediante hibridación *in situ* e inmunohistoquímica respectivamente.

**Osteoinducción.** Existen diversas moléculas tanto de matriz extracelular como factores de crecimiento que promueven la formación de hueso. Tal es el caso de la colágena I y la BMP-7, estos son unos potentes inductores de hueso para las células con potencial osteogénico<sup>16</sup>. Los materiales hechos a base de colágena I, y/o los que contienen BMP-7 son ideales para la osteoinducción. Estas moléculas inducen entre otros a los genes de diferenciación temprana de hueso como son Runx-2, y también a moléculas de transición a formar hueso como la integrina alfa V y el VGEF, y de hueso consolidado como la osteopontina y osteocalcina.

En un andamio compuesto con colágena I, se pueden sembrar células mesenquimales y en cultivo adicionar BMP-7 100 nM, esto hará que células precursoras o troncales

mesenquimales inicien la formación de hueso. Este proceso lo podemos evaluar de la misma forma que lo descrito previamente, para detectar la expresión de los genes y proteínas relacionadas con la formación de hueso. Adicionalmente, se pueden hacer tinciones de safranina para detectar la formación inicial de cartílago, y mediante una tinción de Von Kosa evaluar la formación de hueso.

**Osteoconductividad.** La osteoconductividad está fuertemente relacionada con un andamio que permitirá la migración de células osteogénicas sobre él y de esa forma sirve de guía para la formación de hueso. Entre los materiales más importantes se encuentran los andamios hechos a base de colágena I y/o hidroxiapatita, entre otros<sup>17</sup>. Sin embargo, las propiedades físicas y químicas de estos andamios son importantes<sup>21</sup>. Por ejemplo, la capacidad de hidratarse, de soportar fuerza de tensión o compresión, el tamaño del poro, si el andamio contiene factores de crecimiento o proteínas de Matriz extracelular. Para evaluar la osteoconductividad es importante determinar que las células que se adhieren al andamio, tienen la capacidad de migrar sobre él y además establecerse y formar tejido óseo. La adhesión se puede determinar mediante citofluorescencia para detectar la expresión de integrinas relacionadas con la adhesión de los osteoblastos con la colágena I, como son las integrinas alfa1, alfa2 y la integrina alfav que se expresa en el hueso en transición. El arreglo del citoesqueleto es fundamental para detectar la formación de puntos focales que nos indican la capacidad de migrar de las células sobre el andamio.

Finalmente, para conseguir la mejor calidad de reparación de hueso es necesario combinar estas características: utilización de células competentes para generar hueso, factores que promuevan la diferenciación de las células competentes y un biomaterial que dirija estos procesos para la reparación final del hueso faltante. De esta forma podremos dirigir la morfogénesis de los andamios con células hacia el linaje óseo<sup>22,23</sup>.

### **Evaluación de las propiedades Biomecánicas.**

Hoy en día, uno de los temas que más ha atraído a la investigación aplicada es la caracterización mecánica de tejidos biológicos. Existen varias pruebas mecánicas (tracción, compresión, flexión, inflamamiento<sup>24</sup>) por mencionar algunas, que brindan información sobre la respuesta mecánica de dichos tejidos; sin embargo, se requiere de una selección minuciosa del tipo de prueba considerando el tipo de tejido a estudiar. En particular en este capítulo nos enfocaremos en el tejido óseo.

El tejido óseo se puede clasificar básicamente en dos tipos: en hueso cortical y hueso trabecular; el primero se caracteriza por ser un hueso compacto que ofrece buena resistencia y el segundo se caracteriza por ser un hueso poroso tipo esponja que presenta mayor flexibilidad que el cortical; presentando módulos elásticos de 17.1 GPa para el cortical y de 1-14 GPa para el trabecular<sup>25</sup>. Mecánicamente, la combinación de ambos forman un elemento con cubierta resistente –capaz de soportar cargas grandes– y en su interior se presenta una estructura porosa y flexible capaz de absorber energía.

La pregunta que surge en este momento es: ¿Cómo estimar de mejor manera las propiedades mecánicas del tejido óseo? Antes de proponer una respuesta a dicha pregunta se presentará, de manera breve, el estado del arte al respecto.

Lin, et al.<sup>26</sup> realizaron pruebas de compresión a matriz ósea desmineralizada obtenida de hueso bovino; utilizó heparina como agente entrecruzante y obtuvo una mejoría para el módulo de compresión de hasta siete veces respecto a la muestra control<sup>26</sup>. En el mismo

año Bigham, et al. <sup>27</sup> realizaron pruebas de flexión en tres puntos en huesos de conejo tratados con matriz ósea desmineralizada obtenida de hueso bovino; los huesos de conejo fueron autoinjertados y xenoinjertados reportando que no existe una diferencia significativa histológicamente hablando; sin embargo, en la parte mecánica dejan fuera detalles importantes como la sección transversal del hueso ensayado en flexión; así mismo no se muestran los valores de porosidad del hueso mismos que deben ser considerados el cálculo del área de la sección transversal del hueso a estudiar.

Un estudio reciente realizado por Babiker, et al. <sup>28</sup> midieron a través de una prueba de compresión propiedades mecánicas tales como resistencia a la compresión, rigidez y tenacidad; aunque es un estudio interesante, en dicho reporte se omiten detalles sobre la obtención de las curvas esfuerzo vs deformación y por lo tanto no es claro si se considera la porosidad de las matrices óseas. Sin duda el considerar una sección transversal efectiva –y no una sólida– repercutirá notablemente en valores como resistencia última a la tracción, módulo elástico, tenacidad, etc.

A pesar de que se ha reportado un gran avance en la comprensión del comportamiento mecánico del tejido óseo, aún se encuentran vigentes varios retos para la investigación experimental y teórica respecto a la respuesta mecánica del tejido óseo<sup>25</sup>. Rho, et al. <sup>29</sup> plantean una serie de preguntas que hasta el momento siguen vigentes y vale la pena presentar: ¿El tamaño del hueso tiene influencia en su comportamiento mecánico?, en caso afirmativo la siguiente pregunta que se debe plantear es ¿si el tamaño del hueso tiene influencia en una cierta propiedad y cuál sería? Dado que el tejido óseo se puede considerar como un material compuesto, ¿cuál sería la influencia de su microestructura, orientación, localización y disposición sobre las propiedades mecánicas para ambos casos (hueso cortical y hueso trabecular)?.

Considerando una escala distinta, de acuerdo a Rho, et al. <sup>25</sup>, surgen otras preguntas por ejemplo: ¿Cuáles son las propiedades mecánicas de una sola lamela? Al tratar de responder esta pregunta se ha encontrado que existe más de un tipo de lamelas y que varían en composición, tipo de arreglo y orientación; estos factores dificultan su clasificación y caracterización mecánica. Ahora si nos enfocamos en el hueso trabecular existen preguntas como: ¿Por qué el tejido óseo trabecular cuando se aísla (una sola trabécula), presenta un módulo elástico promedio inferior al que presenta el hueso cortical en bulto? En cuanto a la parte teórica no existe conocimiento suficiente para entender la interacción producida en la interfaz de los constituyentes del hueso; en otras palabras es necesario conocer la respuesta mecánica a micro escala para conocer los mecanismos de deformación en ella y su influencia y correlación en la respuesta macromecánica del tejido óseo. Esto no es una tarea sencilla ya que se requieren estudios macro y micromecánicos del tejido óseo en conjunto y de cada uno de sus constituyentes; a la par se requiere aplicar teorías matemáticas capaces de considerar las estructuras periódicas laminadas del hueso o considerar modelos que contemplen estructuras jerárquicas en configuración cilíndrica que presenten estructuras bien definidas tipo núcleo-coraza con la finalidad de determinar propiedades elásticas efectivas.

En resumen para lograr un mejor entendimiento del comportamiento mecánico del tejido óseo se requieren mediciones experimentales que contemplen de manera simultánea las respuestas macro y micromecánica del tejido óseo; esta información servirá para plantear modelos matemáticos capaces de predecir propiedades elásticas efectivas donde las particularidades del tejido como la organización jerárquica tipo núcleo-coraza o la organización lamelar o combinaciones de ambas sean consideradas.

## Seguridad de productos obtenidos por ingeniería de tejidos para remodelación ósea.

La evaluación de seguridad en el uso de productos para remodelación ósea es un tema de suma importancia en el desarrollo de este tipo de productos, así como para el cumplimiento de la normatividad aplicable en los diferentes países. En este sentido, la regulación internacional no es del todo armonizada debido a que la investigación en ingeniería de tejidos avanza de forma más rápida que los aspectos regulatorios.

Tal es el caso de la matriz de hueso desmineralizada (MOD) que de acuerdo a la regulación de la FDA en Estados Unidos de América requiere demostrar la prevención de enfermedades aunque no requiere de un registro de pre-comercialización. Sin embargo existen productos que no solo contienen matriz de hueso desmineralizada, sino que están combinados con otros componentes como hialuronato de sodio, glicerol o fosfato de calcio que según la FDA afectan la estructura o función del organismo por lo que deben considerarse como dispositivos médicos y cumplir con la normatividad específica para dispositivos<sup>30-32</sup>.

Por su parte la EMA en Europa establece que los productos a base MOD en conjunto con células osteogénicas se deben considerar como un producto de ingeniería de tejidos<sup>33</sup>. En un esfuerzo para intentar armonizar la evaluación biológica que pudieran ocasionar los dispositivos médicos, la Organización Internacional para Estandarización (ISO, por sus siglas en inglés) establece en sus guías ISO 10993, una serie de estándares para realizar pruebas de biocompatibilidad para este tipo de productos. La capacidad de un dispositivo médico para realizar su función con una respuesta apropiada del receptor en una situación específica define a la biocompatibilidad<sup>34</sup>.

La primera parte de las guías ISO se basa en un proceso de manejo de riesgos con un enfoque que considera la información existente antes de determinar si se requieren las pruebas de biocompatibilidad. Las nuevas revisiones de las regulaciones tienen como finalidad disminuir la cantidad de animales de prueba y promover la evaluación mediante métodos *in vitro* siempre y cuando estas metodologías demuestren que los resultados obtenidos proporcionen información similar a la que otorgan los métodos *in vivo*.

Las principales pruebas que se requieren para evaluar la seguridad en las pruebas de biocompatibilidad se basan en las guías ISO. Estas pruebas incluyen la citotoxicidad *in vitro*, toxicidad aguda y subcrónica, irritación, sensibilización, hemocompatibilidad, implantación, genotoxicidad, carcinogenicidad y efectos en la reproducción y desarrollo<sup>35</sup>.

La selección de pruebas depende de las características físicas del dispositivo, aplicación, público al que va dirigido y el tipo de contacto que tendrá con el cuerpo humano. De hecho, podrán requerirse pruebas adicionales como neurotoxicidad e inmunotoxicidad para aquellos dispositivos que estarán en contacto con partes del cerebro como fluido cerebroespinal o parénquima del cerebro. Asimismo, algunas pruebas de biocompatibilidad no serán necesarias cuando se justifique que ya existen en el mercado materiales que han sido ampliamente caracterizados física y químicamente en la literatura y son utilizados sin evidenciar efectos indeseables en la población.

En la nueva reglamentación de FDA se establecen algunas consideraciones importantes para las pruebas de biocompatibilidad, por ejemplo para las pruebas de citotoxicidad se recomienda realizar la extracción del dispositivo a una temperatura de 37°C por 24 a 72 horas utilizando un vehículo como medio de cultivo para células de mamífero, que permite

la extracción de componentes polares y no polares. Los métodos recomendados para productos nuevos en el mercado son el de contacto directo y el de elución<sup>36</sup>.

En las pruebas de sensibilización se recomienda utilizar el método Buehler para aquellos dispositivos de uso tópico que estarán en contacto con la piel. Sin embargo el método más utilizado es el método de maximización en cobayos donde se recomienda utilizar animales de ambos sexos y realizar pruebas con controles positivos al menos cada seis meses. Otro método utilizado para evaluar la sensibilización es la prueba de nódulos linfáticos (LLNA, por sus siglas en inglés) que se realiza en ratones y se recomienda para evaluar productos metálicos, de preferencia en soluciones acuosas. Esta prueba no es recomendable para productos nuevos en el mercado o dispositivos que no penetren la piel<sup>37</sup>.

Las pruebas de hemocompatibilidad se realizan para evaluar dispositivos que vayan a estar en contacto con sangre circulante del individuo y se recomienda las pruebas de hemólisis, activación del complemento y trombogenicidad<sup>38</sup>. Las pruebas de pirogenicidad tienen como objetivo evaluar las posibles reacciones febriles que pudieran ocasionar los dispositivos implantables que estarán en contacto con el sistema linfático, así como dispositivos estériles con contacto directo o indirecto con sistema cardiovascular o fluido cerebrospinal. Las fuentes de pirógenos pueden ser el propio material del dispositivo o bien las endotoxinas bacterianas, en el primer caso las pruebas se realizan en conejos, mientras que la fuente de pirógenos bacterianos se realiza con el test de lisado de amebocitos de limulus<sup>39</sup>.

En las pruebas de implantación se requiere hacer una evaluación previa de la relevancia clínica de la prueba, en función del grado de riesgo que pueda representar el dispositivo a fin de determinar el sitio u órgano adecuado para realizar el implante.

Respecto a la evaluación de genotoxicidad, al no haber una prueba que detecte los diferentes tipos de genotoxinas es recomendable realizar la prueba de mutagenicidad con cepas de *Salmonella typhimurium* junto con otra prueba in vitro ya sea el ensayo de mutación génica de linfoma de ratón, el ensayo de aberraciones cromosómicas o bien el ensayo de micronúcleos en células de mamífero<sup>40</sup>. En caso de nuevos materiales utilizados en el dispositivo se requiere también de pruebas in vivo, ya sea cuantificación de micronúcleos y aberraciones cromosómicas en medula osea o micronúcleos en sangre periférica de ratón.

Los estudios de carcinogenicidad se requieren para dispositivos que vayan a tener contacto permanente con el organismo por un tiempo mayor a treinta días<sup>41</sup>. Finalmente, para las pruebas de efectos en la reproducción y el desarrollo para los dispositivos que carecen de información acerca de estos efectos, por ejemplo materiales implantables nuevos en el mercado o aquellos que estarán en contacto con órganos reproductivos. Las evaluaciones sugeridas son las de teratogenicidad, afectación a la función reproductiva y efectos en el desarrollo prenatal y postnatal<sup>42</sup>.

## REFERENCIAS

1. Maciulaitis, R., D'Apote, L., Buchanan, A., Pioppo, L. & Schneider, C. K. Clinical development of advanced therapy medicinal products in Europe: evidence that regulators must be proactive. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **20**, 479-482, doi:10.1038/mt.2012.13 (2012).
2. Baroli, B. From natural bone grafts to tissue engineering therapeutics: Brainstorming on pharmaceutical formulative requirements and challenges. *Journal of pharmaceutical sciences* **98**, 1317-1375, doi:10.1002/jps.21528 (2009).
3. Leijten, J. *et al.* Cell based advanced therapeutic medicinal products for bone repair: Keep it simple? *Advanced drug delivery reviews* **84**, 30-44, doi:10.1016/j.addr.2014.10.025 (2015).
4. Carlos, F., Clark, P., Galindo-Suarez, R. M. & Chico-Barba, L. G. Health care costs of osteopenia, osteoporosis, and fragility fractures in Mexico. *Archives of osteoporosis* **8**, 125, doi:10.1007/s11657-013-0125-4 (2013).
5. Castro-Ceseña, A. B., Novitskaya, E. E., Chen, P. Y., Hirata, G. A. & McKittrick, J. Kinetic studies of bone demineralization at different HCl concentrations and temperatures. *Materials Science and Engineering: C* **31**, 523-530, doi:10.1016/j.msec.2010.11.003 (2011).
6. Gruskin, E., Doll, B. A., Futrell, F. W., Schmitz, J. P. & Hollinger, J. O. Demineralized bone matrix in bone repair: History and use. *Advanced drug delivery reviews* **64**, 1063-1077, doi:10.1016/j.addr.2012.06.008 (2012).
7. Borden, M. in *Bone Graft Substitutes and Bone Regenerative Engineering* (eds CT. Laurencin & T Jiang) Ch. 2do, 50-54 (ASTM, 2014).
8. Cheng, C. W., Solorio, L. D. & Alsberg, E. Decellularized tissue and cell-derived extracellular matrices as scaffolds for orthopaedic tissue engineering. *Biotechnology advances* **32**, 462-484, doi:10.1016/j.biotechadv.2013.12.012 (2014).
9. Chen, D., Zhao, M. & Mundy, G. R. Bone morphogenetic proteins. *Growth factors* **22**, 233-241, doi:10.1080/08977190412331279890 (2004).
10. Figueiredo, M. *et al.* Influence of hydrochloric acid concentration on the demineralization of cortical bone. *Chemical Engineering Research and Design* **89**, 116-124, doi:10.1016/j.cherd.2010.04.013 (2011).
11. Kessler, E., Takahara, K., Biniaminov, L., Brusel, M. & Greenspan, D. S. Bone Morphogenetic Protein-1: The Type I Procollagen C-Proteinase. *Science* **271**, 360-362 (1996).
12. Tanaka, K. *et al.* Involvement of the osteoinductive factors, Tmem119 and BMP-2, and the ER stress response PERK-eIF2alpha-ATF4 pathway in the commitment of myoblastic into osteoblastic cells. *Calcified tissue international* **94**, 454-464, doi:10.1007/s00223-013-9828-1 (2014).
13. Alarmo, E. L. *et al.* Bone morphogenetic protein 4 expression in multiple normal and tumor tissues reveals its importance beyond development. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **26**, 10-21, doi:10.1038/modpathol.2012.128 (2013).
14. Sierra-Suarez, L. & John C. Richmond, J. Overview of Procurement, Processing, and Sterilization of Soft Tissue Allografts for Sports Medicine. *Sports Medicine and Arthroscopy Review* **15**, 106-113 (2007).
15. banking, S. f. t. American association of tissue banks. *AATB*, 25-51 (2012).
16. D'Mello, S. *et al.* Bone Regeneration Using Gene-Activated Matrices. *The AAPS journal*, doi:10.1208/s12248-016-9982-2 (2016).
17. Sunarso, R. T., Tsuru, K. & Ishikawa, K. Immobilization of calcium and phosphate ions improves the osteoconductivity of titanium implants. *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications* **68**, 291-298, doi:10.1016/j.msec.2016.05.090 (2016).
18. Wu, M., Chen, G. & Li, Y. P. TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone research* **4**, 16009, doi:10.1038/boneres.2016.9 (2016).
19. Bustos-Valenzuela, J. C., Fujita, A., Halcsik, E., Granjeiro, J. M. & Sogayar, M. C. Unveiling novel genes upregulated by both rhBMP2 and rhBMP7 during early osteoblastic transdifferentiation of C2C12 cells. *BioMed Central* **4**, 1-15 (2011).
20. Chen, X., Kidder, L. S., Schmidt, A. H. & Lew, W. D. Osteogenic Protein-1 Induces Bone Formation in the Presence of Bacterial Infection in a Rat Intramuscular Osteoinduction Model. *Journal of Orthopaedic Trauma* **18** (2004).

21. Hasegawa, M. *et al.* Fibronectin adsorption on osteoconductive hydroxyapatite and non-osteoconductive  $\alpha$ -alumina. *Biomedical Materials* **11** (2016).
22. Man, Z. *et al.* Transplantation of allogenic chondrocytes with chitosan hydrogel-demineralized bone matrix hybrid scaffold to repair rabbit cartilage injury. *Biomaterials* **108**, 157-167, doi:10.1016/j.biomaterials.2016.09.002 (2016).
23. Tong, S., Xu, D. P., Liu, Z. M., Du, Y. & Wang, X. K. Synthesis of and in vitro and in vivo evaluation of a novel TGF- $\beta$ 1-SF-CS three-dimensional scaffold for bone tissue engineering. *International journal of molecular medicine* **38**, 367-380, doi:10.3892/ijmm.2016.2651 (2016).
24. Huang, Y. P. & Zheng, Y. P. in *Measurement of Soft Tissue Elasticity in Vivo: Techniques and Applications* (eds Y P. Huang & Y P. Zheng) (CRC Press, 2016).
25. Rho, J. Y., Tsui, T. Y. & Pharr, G. M. Elastic properties of human cortical and trabecular lamellar bone measured by nanoindentation. *Biomaterials* **18**, 1325-1330 (1997).
26. Lin, H. *et al.* The effect of crosslinking heparin to demineralized bone matrix on mechanical strength and specific binding to human bone morphogenetic protein-2. *Biomaterials* **29**, 1189-1197, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.11.032 (2008).
27. Bigham, A. S., Dehghani, S. N., Shafiei, Z. & Torabi Nezhad, S. Xenogenic demineralized bone matrix and fresh autogenous cortical bone effects on experimental bone healing: radiological, histopathological and biomechanical evaluation. *Journal of orthopaedics and traumatology : official journal of the Italian Society of Orthopaedics and Traumatology* **9**, 73-80, doi:10.1007/s10195-008-0006-6 (2008).
28. Babiker, H., Ding, M. & Overgaard, S. Demineralized bone matrix and human cancellous bone enhance fixation of porous-coated titanium implants in sheep. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine* **10**, 245-251, doi:10.1002/term.1685 (2016).
29. Rho, J. Y., Kuhn-Spearing, L. & Zioupos, P. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. *Medical Engineering & Physics* **20**, 92-102 (1998).
30. (FDA), F. a. D. A. Jurisdictional Update: Human Demineralized Bone Matrix. (2010).
31. Gruskin, E., Doll, B. A., Futrell, F. W., Schmitz, J. P. & Hollinger, J. O. Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. *Advanced drug delivery reviews* **64**, 1063-1077, doi:10.1016/j.addr.2012.06.008 (2012).
32. Stevens, M. M. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today* **11**, 18-25, doi:10.1016/s1369-7021(08)70086-5 (2008).
33. (EMA), E. M. A. Scientific recommendation on classification of advanced therapy medicinal products. *EMA/90882/2013* (2013).
34. Black, J. *Biological Performance of Materials: Fundamentals of Biocompatibility*. (CRC Press, 2005).
35. 10993-1, I. Biological evaluation of medical devices – Part 1 Evaluation and testing within a risk management process. (2009).
36. (FDA), F. a. D. A. Use of International Standard ISO 10993-1, "Biological evaluation of medical devices - Part 1: Evaluation and testing within a risk management process. . *Guidance for Industry and Food and Drug Administration Staff* (2016).
37. 10993-10, I. Biological evaluation of medical devices – Part 10: Tests for irritation and skin sensitization. (2010).
38. Sokolov, A., Hellerud, B. C., Lambris, J. D., Johannessen, E. A. & Mollnes, T. E. Activation of Polymorphonuclear Leukocytes by Candidate Biomaterials for an Implantable Glucose Sensor. *Journal of Diabetes Science and Technology* **5**, 1490-1498 (2011).
39. Unger, R. E., Peters, K., Sartoris, A., Freese, C. & Kirkpatrick, C. J. Human endothelial cell-based assay for endotoxin as sensitive as the conventional Limulus Amebocyte Lysate assay. *Biomaterials* **35**, 3180-3187, doi:10.1016/j.biomaterials.2013.12.059 (2014).
40. 474, O. Guidelines for the Testing of Chemicals – Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. (2014).
41. Benigni, R. Predicting the carcinogenicity of chemicals with alternative approaches: recent advances. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology* **10**, 1199-1208 (2014).
42. Yslas, E. I. *et al.* Polyaniline nanofibers: acute toxicity and teratogenic effect on *Rhinella arenarum* embryos. *Chemosphere* **87**, 1374-1380, doi:10.1016/j.chemosphere.2012.02.033 (2012).

43. Thomas, E. D., H. L. Lochte, Jr., J. H. Cannon, O. D. Sahler and J. W. Ferrebee (1959). "Supralethal whole body irradiation and isologous marrow transplantation in man." *J Clin Invest* 38: 1709-1716.
44. Haubold, H. (1954). "[Cellular therapy according to Paul Niehans or K. Fr. Bauer's method]." *Med Klin* 49(37): 1468-1472.
45. Augier, F., E. Salf and J. B. Nottet (1996). "[Dr. Samuel Serge Voronoff (1866-1951) or "the quest for eternal youth"]." *Hist Sci Med* 30(2): 163-171.
46. Lefrere, J. J. and P. Berche (2010). "[Doctor Brown-Sequard's therapy]." *Ann Endocrinol (Paris)* 71(2): 69-75.
47. Munoz, J., N. Shah, K. Rezvani, C. Hosing, C. M. Bollard, B. Oran, A. Olson, U. Popat, J. Molldrem, I. K. McNiece and E. J. Shpall (2014). "Concise review: umbilical cord blood transplantation: past, present, and future." *Stem Cells Transl Med* 3(12): 1435-1443.
48. Kroger, N., T. Giorgino, B. L. Scott, M. Ditschkowski, H. Alchalby, F. Cervantes, A. Vannucchi, M. Cazzola, E. Morra, T. Zabelina, M. Maffioli, A. Pereira, D. Beelen, H. J. Deeg and F. Passamonti (2015). "Impact of allogeneic stem cell transplantation on survival of patients less than 65 years of age with primary myelofibrosis." *Blood* 125(21): 3347-3350; quiz 3364.
49. Tsushima, F., J. Sakurai and H. Harada (2015). "A case of upper gingiva carcinoma with chronic graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation." *Aust Dent J* 60(3): 404-407.
50. Bonnamain, V., I. Neveu and P. Naveilhan (2012). "Neural stem/progenitor cells as a promising candidate for regenerative therapy of the central nervous system." *Front Cell Neurosci* 6: 17.
51. Tincer, G., V. Mashkaryan, P. Bhattarai and C. Kizil (2016). "Neural stem/progenitor cells in Alzheimer's disease." *Yale J Biol Med* 89(1): 23-35.
52. Leeper, N. J., A. L. Hunter and J. P. Cooke (2010). "Stem cell therapy for vascular regeneration: adult, embryonic, and induced pluripotent stem cells." *Circulation* 122(5): 517-526.
53. Ghaedi, M. and L. E. Niklason (2016). "Human Pluripotent Stem Cells (iPSC) Generation, Culture, and Differentiation to Lung Progenitor Cells." *Methods Mol Biol*.
54. Gill, K. P., S. S. Hung, A. Sharov, C. Y. Lo, K. Needham, G. E. Lidgerwood, S. Jackson, D. E. Crombie, B. A. Nayagam, A. L. Cook, A. W. Hewitt, A. Pebay and R. C. Wong (2016). "Enriched retinal ganglion cells derived from human embryonic stem cells." *Sci Rep* 6: 30552.
55. Zaher, W., L. Harkness, A. Jafari and M. Kassem (2014). "An update of human mesenchymal stem cell biology and their clinical uses." *Arch Toxicol* 88(5): 1069-1082.
56. You, H. J., S. Namgoong, S. K. Han, S. H. Jeong, E. S. Dhong and W. K. Kim (2015). "Wound-healing potential of human umbilical cord blood-derived mesenchymal stromal cells in vitro--a pilot study." *Cytotherapy* 17(11): 1506-1513.
57. Hurtado, M. d. I. M. (1984). "LEY GENERAL DE SALUD. ." *Diario Oficial de la Federación, México D F.* : 257.
58. Obrador, A. M. L. (2002). "CÓDIGO PENAL PARA EL DISTRITO FEDERAL. ." *Gaceta Oficial del Distrito Federal*.
59. Vazquez-Zapien, G. J., M. Rojas-Lopez, R. J. Delgado-Macuil, L. R. Martinez-Nava, D. G. Perez-Ishiwara and M. M. Mata-Miranda (2014). "Histologic and spectroscopic study of pluripotent stem cells after implant in ocular traumatic injuries in a murine model." *Stem Cell Res Ther* 5(5): 119.
60. Torres-Espin, A., D. L. Corona-Quintanilla, J. Fores, I. Allodi, F. Gonzalez, E. Udina and X. Navarro (2013). "Neuroprotection and axonal regeneration after lumbar ventral root avulsion by re-implantation and mesenchymal stem cells transplant combined therapy." *Neurotherapeutics* 10(2): 354-368.
61. Parekkadan, B. and J. M. Milwid (2010). "Mesenchymal stem cells as therapeutics." *Annu Rev Biomed Eng* 12: 87-117.

## **POSIBLE APLICACION TERAPEUTICA DE LAS CELULAS TRONCALES PLURIPOTENTES HUMANAS**

*García-López G. \*, Avila-González D. \*, Molina-Hernández A, Díaz-Martínez N.E. & Díaz F.*

### Células troncales embrionarias y células pluripotentes inducidas humanas

Las células troncales (CT) pluripotentes (CTP) tienen la capacidad de auto renovarse en un estado indiferenciado y dar origen teóricamente a cada uno de los tipos celulares que conforman un organismo a excepción de los anexos fetales (placenta, cordón umbilical y membranas fetales) <sup>1</sup>. A lo largo de la historia se han podido derivar diferentes tipos de CTP en los vertebrados entre las cuales podemos mencionar: a las células troncales embrionarias (CTE), las células troncales del epiblasto, las células pluripotentes inducidas (iPSC, por sus siglas en inglés induced pluripotent stem cells), entre otras. En este capítulo se utilizará el termino CTP solo para referirse a las CTE e iPSC.

Las CTE humanas (CTEH) fueron derivadas en 1998 por el grupo de Thomson, a partir de la donación de embriones humanos pre-implantación supernumerarios, obtenidos mediante técnicas de reproducción asistida. De esta forma, utilizando métodos similares a los reportados para la obtención de CTE de ratón y primate, los embriones fueron cultivados in vitro hasta la etapa de blastocisto para posteriormente aislar la masa celular interna y ser cultivada sobre una capa nodriza de fibroblastos embrionarios de ratón (MEF, por sus siglas en inglés) <sup>2</sup>. Las CTEH en estado indiferenciado forman colonias planas, compuestas por células con núcleo grande, un nucléolo prominente y citoplasma pequeño. Asimismo, tienen un cariotipo normal, expresan niveles altos de telomerasa y presentan marcadores de superficie celular entre los cuales podemos mencionar SSEA3 (por sus siglas en inglés, Stage-Specific Embryonic Antigen-3), SSEA4, TRA-1-60 (por sus siglas en inglés, Tumor Rejection Antigen-1-60), TRA-81 y son positivas a la enzima fosfatasa alcalina tejido inespecífica. Además, presentan una plétora de factores de transcripción involucrados en el mantenimiento de una red intrínseca de pluripotencia, siendo OCT4, SOX2 y NANOG los principales genes maestros que regulan dicha red. Otra característica esencial de estas células es que pueden diferenciarse in vitro mediante diversos procedimientos hacia células especializadas de las tres capas embrionarias (endodermo, mesodermo y ectodermo) <sup>2,3</sup> y pueden formar teratomas (tumores que incluyen tejidos diferenciados de las tres capas germinales) después de ser trasplantadas en ratones inmunodeficientes, siendo esta una de las pruebas más rigurosas para determinar en células de origen humano la pluripotencia <sup>4</sup>. No obstante, en los últimos años, se han sugerido otros tipos de prueba basándose en el análisis masivo de datos para analizar la pluripotencia, por ejemplo: el PluriTest y Epi-pluri-score<sup>5,6</sup>.

Por otra parte, en el 2006 se reportó un hallazgo extraordinario y que posteriormente le diera el premio nobel a su descubridor, el cual consistió en reprogramar una célula somática a un estado pluripotente. El grupo del Dr. Yamanaka lo realizó primero en MEF al sobre expresar mediante un sistema retroviral a Oct4, Sox2, Klf4 y c-myc y un año después, lo logro en fibroblastos de la dermis humana con el mismo set de factores de transcripción <sup>7,8</sup>. Las células reprogramadas (iPSC) humanas eran similares a las CTEH en su morfología, capacidad de proliferación, expresión de genes y antígenos de superficie, actividad de la telomerasa y su potencial de diferenciación y formación de teratomas. De manera paralela, el grupo del Dr. Thompson también reprogramo células somáticas humanas, sin embargo, ellos utilizaron otra combinación de factores de transcripción (OCT4, NANOG, SOX2 y

LIN28)<sup>9</sup>. De esta forma, los métodos de reprogramación han evolucionado de utilizar vectores retrovirales que se integran al DNA y vehículos basados en trasposones o lentivirus, hacia sistemas no integrativos como son los episomas o mediante RNA (vectores de virus Sendai y transfección por RNA mensajero)<sup>10</sup>.

Potencial terapéutico de las CTP humanas.

Debido a sus características antes mencionadas, tanto las CTE como las iPSC de origen humano son una herramienta que podrían ser usadas para obtener un número ilimitado de células especializadas con fines de terapias de reemplazo celular y con ello tratar diversos padecimientos como: insuficiencia cardíaca, diabetes, desórdenes neurodegenerativos, pérdida de la visión y audición, lesiones de la medula espinal, osteoartritis, insuficiencia renal, entre otras. En conjunto estas enfermedades son resultado de la pérdida de una o más poblaciones celulares que el cuerpo es incapaz de reemplazar o sustituir<sup>11</sup>. Razón por la cual, existe una gran área de investigación que evoluciona constantemente y como resultado se reportan protocolos más complejos que producen tipos celulares especializados in vitro más parecidos a sus contrapartes in vivo, las cuales al ser retadas en modelos animales de enfermedades humanas han obtenido resultados alentadores. A continuación, se mencionarán algunos ejemplos; Melton y colaboradores lograron diferenciar CTEH hacia células tipo  $\beta$ -pancreáticas mediante un proceso de diferenciación de 4 etapas (simulando el proceso de desarrollo in vivo mediante el uso de factores de crecimiento), las células diferenciadas expresaron marcadores del páncreas y eran capaces de sintetizar y liberar insulina. Además, al ser trasplantadas en ratas hiperglicémicas fueron capaces de disminuir sus niveles de glucosa<sup>12</sup>. Asimismo, se han podido diferenciar hacia cardiomiocitos, los cuales después de ser trasplantados en un modelo de infarto de miocardio en la rata; proliferaron, maduraron y formaron uniones gap con células residentes y mejoraron la función del miocardio determinada por ecocardiografía<sup>13</sup>. Por otra parte, en un modelo de escleroderma (caracterizada por lesiones vasculares y destrucción de las células endoteliales) en el ratón, al trasplantarse células diferenciadas (positivas a marcadores endoteliales como CD-31, CD-144 y CD 146) tanto de CTEH como iPSC humanas, se reportó que las células participaron en la recuperación de los vasos, demostrado tanto por un incremento en el depósito de colágena y en el número de mastocitos como una mejoría en el sitio de la lesión superficial<sup>14</sup>. De la misma forma, se han utilizado CTEH para obtener células con características de hepatocitos neonatales, siguiendo un protocolo de diferenciación que asemeja al desarrollo hepático in vivo, los cuales después de ser trasplantados en un modelo de falla aguda del hígado (inducida por acetaminofén) en ratones, eran capaces de restablecer hasta en un 10% la población del hígado, disminuir el nivel de las transaminasas y no formar tumores<sup>15</sup>. También, se ha demostrado la capacidad de derivar tejido de la retina a partir de CTEH, el cual podría sobrevivir, madurar e integrarse con células bipolares del ojo, en modelos primates de retinitis pigmentosa (enfermedad caracterizada por la pérdida progresiva de los fotorreceptores)<sup>16</sup>. De la misma manera, se han reportado protocolos para la obtención de células neurales a partir de CTEH e iPSC humanas con alta eficiencia y pureza<sup>17</sup>. Particularmente, se ha demostrado que neuronas dopaminérgicas sobreviven por largos periodos de tiempo y restauran la neurotransmisión in vivo mediante una inervación específica de blancos a largas distancias en el cerebro hospedero. Finalmente, las células presentan propiedades fisiológicas similares a neuronas dopaminérgicas de cerebro medio de fetos humanos<sup>18</sup>.

Todos estos reportes de obtención de tipos celulares específicos es principio de prueba de que las PSC humanas pueden ser una herramienta útil para la terapia de reemplazo celular,

sin embargo, antes de poder ser considerado su uso en humanos, se tienen que resolver ciertos problemas.

Problemas a resolver en la investigación básica y preclínica de las CTP humanas antes de ser utilizadas en la Medicina Regenerativa.

Desde su derivación las CTEH estuvieron involucradas en una serie de aspectos éticos controversiales, los cuales limitaban su posible uso en la medicina regenerativa, ya que el proceso de su obtención como tal conlleva la destrucción de un embrión humano. No obstante, se han perfeccionado y refinado las técnicas para su derivación, por ejemplo, hasta el día de hoy se han reportado más de 1000 líneas en el mundo utilizando diferentes etapas del desarrollo embrionario (masa celular interna, morula y blastocisto tardío), así como la obtención de ellas sin destruir el embrión<sup>19</sup>, la creación de líneas mediante transferencia nuclear somática<sup>20</sup> y utilizando de embriones de mala calidad los cuales son descartados para su uso en las técnicas de reproducción asistida<sup>21-23</sup>.

Por otra parte, la derivación de las CTP humanas fue posible a la tecnología de tejidos establecida en la década de 1950. De forma histórica los MEF inactivados mitóticamente han sido utilizados para sustentar el crecimiento clonal de las células HeLa, dicha “capa nodriza” fue eventualmente usada para cultivar células del carcinoma embrionario (línea pluripotente) y posteriormente obtener CTE e iPSC tanto de ratón como de humano. Asimismo, para poder mantenerlas en estado indiferenciado in vitro a las primeras líneas derivadas de CTEH se utilizó de una serie de componentes, en adición a la capa nodriza; por ejemplo, el medio de cultivo se suplementó con suero, así como el factor de crecimiento de fibroblastos básico. Sin embargo, se ha reportado que las CTEH cultivadas con medio que contengan suero o sobre capas nodrizas de origen animal expresan Neu5Gc (ácido siálico de origen no humano), el cual podría ser inmunogénico en células con fines de terapia celular<sup>24</sup>. Motivo por el cual, diversas líneas de investigación se han dado a la tarea de proponer métodos alternativos para que las CTP humanas sean derivadas y mantenidas en condiciones libres de componentes animales, con el objetivo de conseguir líneas de grado clínico. De esta forma, se ha sugerido el mantenimiento de las CTEH como de las iPSC humanas en matrices sintéticas como el Matrigel<sup>25</sup>. Finalmente, se ha propuesto el uso de capas nodriza provenientes de origen humano, por ejemplo, se ha reportado que los fibroblastos de la piel<sup>26</sup> y las células del epitelio amniótico<sup>21</sup> pueden ser usados para tal fin, así como matrices humanas, como es el caso de laminina 511 recombinante (componente natural del nicho de las CTP), la cual puede mantener a las CTP en autorrenovación presentando un cariotipo normal hasta por lo menos 4 meses<sup>27</sup>.

Por lo que se refiere al uso de las iPSC humanas, si bien pueden ser obtenidas del propio paciente y evitar los problemas éticos de derivación de las CTEH, existen otro tipo de inconvenientes debido al método de reprogramación por sí mismo, de las cuales podemos mencionar: diferencias genéticas y epigenéticas (variaciones en el número de copias y mutaciones), procesos incompletos de demetilación y remetilación, inestabilidad en el proceso de impronta (cromosoma X), los cuales pueden llevar a la obtención de células parcialmente reprogramadas con un potencial de diferenciación distinto al de las células completamente reprogramadas o enmascarar el impacto que tienen las variaciones genéticas al querer ser utilizadas como modelos de estudio de enfermedades humanas in vitro<sup>28-30</sup>.

Una vez que se haya logrado obtener líneas de CTP humanas de grado clínico, la investigación preclínica se enfrenta a otra serie de problemas asociados con el estado

pluripotente de las células, así como de sus derivados, entre los cuales podemos mencionar la formación de tumores, la inestabilidad cromosómica y el rechazo inmune, así como el establecimiento de condiciones de cultivo que permitan la producción a gran escala de células especializadas y la obtención de poblaciones celulares homogéneas.

La presencia de CTP indiferenciadas en los tejidos ya especializados representa un riesgo latente debido a la posibilidad de que se formen teratomas en el hospedero después del trasplante; dado que las CTEH expresan niveles altos de c-MYC y/o KLF4 (genes involucrados en la formación de los teratomas y se encuentran presentes en células cancerosas)<sup>31</sup>. Por lo que se refiere a las iPSC humanas, los métodos tradicionales que se usan para su derivación, integran secuencias virales que expresan dichos oncogenes, los cuales podrían reactivarse durante los protocolos de expansión o diferenciación. A pesar que las posibilidades de la formación de un tumor son mínimas, un estudio demostró que 1x10<sup>2</sup> de CTEH son suficientes para que ratones inmunodeficientes desarrollen teratomas<sup>32</sup>. Además, está el potencial de la formación de otros tipos de neoplasias embrionarias correspondientes del linaje específico<sup>4</sup>. Finalmente cabe señalar que durante los estudios preclínicos se realizan trasplantes de los tejidos derivados de PSC en modelos animales para evaluar la posible formación de tumores, sin embargo, hay que tomar en cuenta dos limitaciones: 1) la cantidad de células necesarias para formar tumores puede ser subestimada, debido a la inmunidad adquirida de los animales o por posibles diferencias inter-especies de los factores requeridos para el crecimiento de los tumores y 2) la relativa vida media corta de los modelos animales lo cual excluye el seguimiento a largo plazo de los injertos que pueden persistir en los pacientes durante años o incluso décadas, por lo que se ha sugerido el desarrollo de identificación de biomarcadores *in vitro* que si bien no sustituyan por completo los modelos *in vivo*, sean ensayos complementarios<sup>4</sup>.

Por otra parte, se ha demostrado que las actuales condiciones de cultivo pueden afectar la estabilidad genómica de las CTP humanas, reportándose acumulación de aneuploidías y mutaciones del tipo duplicación o delección<sup>33</sup>, lo que conlleva un incremento en la posibilidad de desarrollar tumores, la desregulación de procesos celulares como son la apoptosis y el ciclo celular, comprometiendo su posible uso en la clínica<sup>34</sup>.

Otro problema es la respuesta del sistema inmune del hospedero ante el trasplante de células derivadas de CTEH, que puede conducir a la pérdida de función de las células administradas y en consecuencia comprometer la actividad terapéutica. Sin bien las CTEH se han caracterizado como “inmunoprivilegiadas”, una vez que se diferencian comienzan a ser más inmunogénicas debido a la regulación del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, por sus siglas en inglés Major Histocompatibility Complex) propio de células somáticas<sup>35</sup>. Es por ello que se ha propuesto la creación de un banco de líneas de células pluripotentes, de tal manera que exista la compatibilidad entre el MHC del donador con el hospedero para disminuir los problemas de un posible rechazo del injerto<sup>36</sup>. Otra solución sería que los trasplantes fueran autólogos con derivados de iPSC, pero todavía la idoneidad de estas células para su aplicación en la terapia celular personalizada ha sido cuestionada por la presencia de aberraciones genéticas y epigenéticas durante el proceso de reprogramación<sup>28</sup>, que como se comentó en el párrafo previo, dichas alteraciones pueden comprometer los procesos para obtener poblaciones específicas celulares, así como aumentar el potencial de desarrollar tumores.

Finalmente cabe mencionar, no importando el tipo celular que se use en terapias de reemplazo celular están deben de cumplir al menos con 4 criterios: seguridad, identidad, pureza y potencia.

El estado de arte de las HPSC en la aplicación clínica.

A pesar de todos estos desafíos que se necesitan resolver para que en un futuro las CTP humanas puedan utilizarse de forma rutinaria en la terapia celular, algunas empresas han comenzado las fases de pruebas clínicas con tejidos derivados de estas, es importante mencionar que previamente se habían realizado estudios preclínicos (Figura 1). Hasta el 2016, solo hay cinco reportes de ensayos clínicos con aprobación de instituciones gubernamentales (la mayoría en Estados Unidos) los cuales se comentarán a continuación:  
4.1 Oligodendrocitos para lesiones en médula espinal

Una lesión en la médula espinal ocasiona que los oligodendrocitos (células que se encargan de formar la mielina alrededor de los axones) comiencen a morir y en consecuencia las neuronas motoras sufren la destrucción de la mielina, ocasionando la pérdida de la conducción neural en tractos ascendentes y descendentes. Dependiendo de la ubicación y extensión de la lesión, los pacientes pueden sufrir parálisis parcial o completa, así como pérdida de la sensibilidad<sup>37</sup>. Por lo que la estrategia para recuperar la habilidad locomotora ante este daño, consiste en generar nuevas células productoras de mielina, que sean capaces de integrarse en el sitio de la lesión y formarla de nuevo<sup>38</sup>. De esta forma, la empresa Geron Corporation derivó células progenitoras de oligodendrocitos a partir de CTEH (denominadas GRN-OPC1) cultivadas en suspensión en un medio definido adicionado con los factores de crecimiento fibroblástico y epidérmico, para tratar lesiones de médula espinal en humanos<sup>39</sup>. Cabe señalar, que este fue el primer reporte en donde se evaluó la seguridad de trasplantar células pluripotentes humanas (GRN-OPC1) en pacientes con daño a la médula espinal con fines terapéuticos. La prueba clínica de fase 1, consistió en un estudio de dosis escala, en el cual los pacientes inmunosuprimidos recibieron una dosis de  $2 \times 10^6$  células en suspensión, inyectadas directamente en el sitio de la lesión<sup>40</sup>. Hay que hacer énfasis que, dado el número de células trasplantadas fue muy pequeño (se calculó que el número para observar efectos tendría que ser de al menos  $2 \times 10^7$ ), no se esperaban resultados positivos en la recuperación de los pacientes. Desafortunadamente, por razones económicas Geron suspendió las pruebas, pero fueron retomadas por Asterias Biotherapeutics y las células derivadas fueron renombradas AST-OPC1. Con la repetición de la fase 1, cinco pacientes fueron trasplantados con las células sin presentar efectos adversos de rechazo como la formación de tumores o de anticuerpos, durante un año. Sin embargo, la evaluación de la seguridad del trasplante continuará hasta por quince años<sup>40</sup>. En la actualidad, Asterias tiene una aprobación para llevar a cabo una segunda prueba de fase 1 seguida por la fase 2 (con el número de identificación NCT02302157 en la página <https://clinicaltrials.gov/>).

Neuronas dopaminérgicas para tratar la enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson es un desorden degenerativo ocasionado por la pérdida selectiva, progresiva e irreparable de las neuronas productoras de dopamina de la sustancia nigra, lo que conlleva a severos déficits motores en los pacientes, incluso a la demencia en las etapas más avanzadas de la enfermedad<sup>41</sup>. A pesar de que se han diseñado diferentes terapias para contrarrestar los efectos de la enfermedad, ninguna puede reemplazar la pérdida celular, por lo que diferentes laboratorios han investigado la obtención de neuronas dopaminérgicas a partir de CTP humanas. En la actualidad, los grupos de investigación dirigidos por el Dr. Lorenz Studer del Memorial Sloan Kettering, por el Dr. Jeanne Loring del The Scripps Research Institute y por el Dr. Jun Takahashi de Kyoto University, han confirmado sus planes para iniciar fases clínicas 1 y 2, después de haber recibido apoyo financiero de instituciones como el New York State Stem Cell Science y el California Institute

for Regenerative Medicine <sup>42</sup>. Asimismo, la empresa australiana Cyto Therapeutics, subsidiaria del consorcio International Stem Cell Corporation, se encuentra en la fase de reclutamiento de participantes, de acuerdo al registro de pruebas clínicas del National Institute of Health (NCT02452723) <sup>43</sup>. Si bien la mayoría de estos ensayos aún no han iniciado, es importante mencionarlos, puesto que indican la relevancia de buscar tratamientos contra el Parkinson basados en la terapia celular con CTP.

#### Cardiomiocitos para el tratamiento de la insuficiencia cardíaca.

La insuficiencia cardíaca es un problema de salud pública mundial. Motivo por el cual, se han realizado múltiples estudios preclínicos, los cuales han demostrado que el músculo cardíaco derivado de CTP humanas puede mejorar la función cardíaca en modelos animales <sup>44,45</sup>. Por lo que se refiere a su empleo en humanos solo se ha reportado una prueba clínica de Fase I, en la cual solo se ha reclutado un paciente de 68 años con insuficiencia cardíaca crónica, quien fue sometido a una cirugía de bypass coronario junto con un injerto de progenitores de cardiomiocitos derivados de CTEH. Tres meses después, el paciente desarrolló anticuerpos específicos, lo cual indicaba una respuesta inmune alogénica a causa del injerto. Sin embargo, no presentó efectos adversos como crecimiento anormal en el corazón o arritmias, además de que hubo mejoras en su estado clínico (aumento de la contractilidad cardíaca de la zona dañada, así como un incremento en fracción de eyección y en su habilidad para caminar); aunque no se determinó si los efectos fueron por la revascularización resultado de la cirugía o por el injerto <sup>46</sup>. Cabe resaltar que este es el primer estudio acerca del efecto de trasplantar cardiomiocitos derivados de CTP humanas en un paciente con insuficiencia cardíaca.

#### Células del epitelio pigmentario de la retina para el tratamiento de la degeneración macular.

El epitelio pigmentario de la retina (RPE, por sus siglas en inglés retinal pigment epithelium) es el tipo celular derivado de CTP humanas que tiene hasta el momento el mayor número de ensayos clínicos. El RPE cumple diversas funciones en el ojo, como el suplir de nutrientes y de factores tróficos a los fotorreceptores para su sobrevivencia. Por ello, su destrucción progresiva en la mácula conlleva al deterioro de los fotorreceptores, lo cual se traduce en una eventual pérdida de la visión. Esta patología se relaciona con diferentes distrofias de la retina, incluyendo la degeneración macular relacionada con la edad (AMD, por sus siglas en inglés aged-related macular degeneration) y la enfermedad de Stargardt <sup>47</sup>. En 2011, Advanced Cell Technology (posteriormente se cambió el nombre a Ocata Therapeutics) realizó pruebas de fase 1 y 2 en pacientes con la enfermedad de Stargardt y AMD, en las cuales se les inyectó células diferenciadas (Ma09-hRPE) en el espacio subretinal de la mácula pericentral, previa inmunosupresión de los pacientes. Con una media de 22 meses posterior al trasplante, ninguno de los pacientes presentó complicaciones como la formación de tumores, proliferación maligna o rechazo del injerto y en 11 de 18 pacientes presentaron una mejoría en la agudeza visual después de la cirugía <sup>48,49</sup>. Estos resultados proporcionan la primera evidencia de la seguridad a mediano y largo plazo, así como el mantenimiento del injerto (hasta por 37 meses) y la posible aplicación terapéutica de las células derivadas de CTP humanas. A su vez, el Jules Stein Eye Institute en colaboración con Cha Biotech, obtuvieron los permisos para llevar a cabo pruebas de fase 1 y 2 en pacientes con AMD y con Stargardt. Doce meses después del trasplante, 3 de 4 pacientes reportaron una mejoría en su agudeza visual y ninguno de ellos presentó efectos adversos<sup>50</sup>; corroborando los datos obtenidos por Ocata Therapeutics. Hasta septiembre del 2016, el Instituto Nacional de salud de los Estados Unidos de América tiene aprobados otros tres estudios de fase I y II con RPE derivado de CTEH para tratar la AMD,

uno promovido por Pfizer en colaboración con University College of London (NCT0169126), otro por Regenerative Patch Technologies (NCT02590692) y el último por Cell Cure Neurosciences Ltd (NCT02286089) <sup>42</sup>. A su vez, el California Project to Cure Blindness ha anunciado su interés en pedir a la FDA (Food and Drug Administration) la aprobación para iniciar fases tempranas de prueba. Por último, en el Instituto RIKEN de Japón, la distrofia AMD es el objetivo de la primera terapia con células derivadas de iPSC. De esta manera, células obtenidas de la piel de dos pacientes con AMD fueron reprogramadas y diferenciadas a tejido RPE para ser utilizado como trasplante autólogo. Sin embargo, las pruebas fueron suspendidas porque se detectaron mutaciones en las iPSC del segundo paciente, corroborando lo que se mencionó en secciones anteriores acerca del riesgo de la presencia de anomalías genéticas en las células pluripotentes <sup>42</sup>.

Células beta pancreáticas (Diabetes mellitus tipo I).

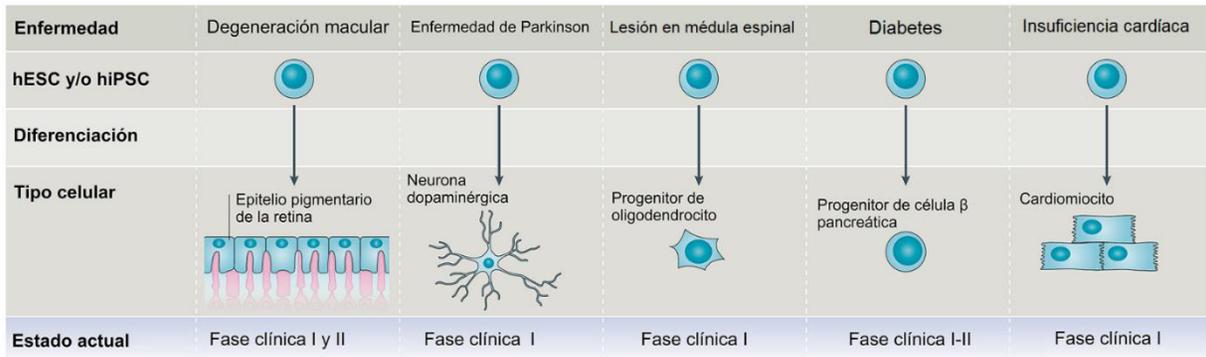
La Diabetes tipo I es el resultado de la destrucción autoinmune de las células  $\beta$ -pancreáticas productoras de insulina, por lo que los pacientes dependen de por vida de la administración de exógena insulina para regular su metabolismo. Como una posible solución, se ha sugerido la obtención de células productoras de insulina derivadas de CTP humanas <sup>12,51,52</sup>. En 2014 dio inicio la primera prueba clínica, en donde Viacyste, Inc. desarrolló el producto VC-01, el cual consiste en células  $\beta$  pancreáticas derivadas de CTEH (denominadas PEC-01) envueltas en una cápsula semipermeable, la cual protege a las PEC-01 del rechazo inmune, además de permitir que el oxígeno y los nutrientes penetren en la cápsula, así como la liberación de la insulina producida en respuesta a los niveles de insulina <sup>53</sup>. Actualmente, la prueba se encuentra en la fase de reclutamiento de sujetos con Diabetes mellitus tipo I, con el objetivo de evaluar la seguridad, eficacia y tolerancia de los implantes VC-01 (NCT02239354).

Consideraciones finales para el uso de hPSC en la terapia celular.

Actualmente las CTP humanas aún no pueden ser consideradas como un producto aprobado para su uso en la clínica, sin embargo, los grupos de investigación biomédica y consorcios que estén interesados en utilizar a futuro la terapia celular con base en células pluripotentes (así como de otro tipo de células troncales), deben seguir los lineamientos establecidos en la Guía para la investigación y el uso clínico de células troncales establecida por la Sociedad Internacional de Investigación de Células Troncales ([www.isscr.org](http://www.isscr.org)), que si bien no puede sustituir las leyes locales, es una guía para llevar a cabo con ética y profesionalismo la investigación preclínica y posibles fases clínicas, cuyos procedimientos no están regulados en la legislación actual de muchos países, como es el caso de México. Por último, para la posible obtención de un producto clínico derivado de CTPH, se tiene que seguir un proceso muy riguroso, ya que la seguridad y eficacia del producto se determina mediante extensas pruebas preclínicas y clínicas, al evaluar el potencial tumorigénico, la respuesta inmune, la capacidad funcional del tejido derivado, así como su sobrevivencia en el hospedero, etc. A pesar que en los últimos años se han logrado progresos alentadores, estos problemas aún no están resueltos del todo, por lo que la aplicación terapéutica de las CTP humanas sigue siendo un desafío para la investigación biomédica.

## Agradecimientos

Este trabajo se realizó con financiamiento del Instituto Nacional de Perinatología (212250-21071, 212250-3230-21214-02-16), CONACYT (202717 y 272968) y de la Red de Células Troncales y Medicina Regenerativa del CONACYT. G-L G y A-G D son estudiantes de Doctorado del Programa de Ciencias Biomédicas de la UNAM. \* G-L G y A-G D contribuyeron de manera equivalente.



**Figura 1.** Progresos en la aplicación clínica de células derivadas de CTP humans. En los últimos años se han desarrollado estrategias que permiten la diferenciación de células pluripotentes humanas hacia un tipo celular con una función específica, como células del epitelio pigmentario de la retina, neuronas dopaminérgicas, progenitores de oligodendrocitos y de células productoras de insulina así como cardiomiocitos, con el propósito de tratar enfermedades como la degeneración de la mácula, la enfermedad de Parkinson, lesiones en la médula espinal, diabetes y problemas cardíacos. Actualmente se están llevando a cabo las primeras pruebas clínicas en fase I y II con este tipo de células, cuyo propósito es evaluar la seguridad y eficacia de los trasplantes en pacientes. Modificado de Trounson & DeWitt.

## Referencias

- 1 Donovan, P. J. & Gearhart, J. The end of the beginning for pluripotent stem cells. *Nature* 414, 92-97, doi:10.1038/35102154 (2001).
- 2 Thomson, J. A. et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* 282, 1145-1147 (1998).
- 3 Marti, M. et al. Characterization of pluripotent stem cells. *Nature protocols* 8, 223-253, doi:10.1038/nprot.2012.154 (2013).
- 4 Cunningham, J. J., Ulbright, T. M., Pera, M. F. & Looijenga, L. H. Lessons from human teratomas to guide development of safe stem cell therapies. *Nature biotechnology* 30, 849-857, doi:10.1038/nbt.2329 (2012).
- 5 Lenz, M. et al. Epigenetic biomarker to support classification into pluripotent and non-pluripotent cells. *Scientific reports* 5, 8973, doi:10.1038/srep08973 (2015).
- 6 Williams, R., Schuldt, B. & Muller, F. J. A guide to stem cell identification: progress and challenges in system-wide predictive testing with complex biomarkers. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 33, 880-890, doi:10.1002/bies.201100073 (2011).
- 7 Takahashi, K. et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* 131, 861-872, doi:10.1016/j.cell.2007.11.019 (2007).
- 8 Takahashi, K. & Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676, doi:10.1016/j.cell.2006.07.024 (2006).
- 9 Yu, J. et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* 318, 1917-1920, doi:10.1126/science.1151526 (2007).
- 10 Ji, P., Manupipatpong, S., Xie, N. & Li, Y. Induced Pluripotent Stem Cells: Generation Strategy and Epigenetic Mystery behind Reprogramming. *Stem cells international* 2016, 8415010, doi:10.1155/2016/8415010 (2016).
- 11 Murry, C. E. & Keller, G. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell* 132, 661-680, doi:10.1016/j.cell.2008.02.008 (2008).
- 12 Pagliuca, F. W. et al. Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro. *Cell* 159, 428-439, doi:10.1016/j.cell.2014.09.040 (2014).
- 13 Caspi, O. et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes improves myocardial performance in infarcted rat hearts. *Journal of the American College of Cardiology* 50, 1884-1893, doi:10.1016/j.jacc.2007.07.054 (2007).
- 14 Azhdari, M., Baghaban-Eslaminejad, M., Baharvand, H. & Aghdami, N. Therapeutic potential of human-induced pluripotent stem cell-derived endothelial cells in a bleomycin-induced scleroderma mouse model. *Stem cell research* 10, 288-300, doi:10.1016/j.scr.2012.12.004 (2013).
- 15 Tolosa, L. et al. Transplantation of hESC-derived hepatocytes protects mice from liver injury. *Stem cell research & therapy* 6, 246, doi:10.1186/s13287-015-0227-6 (2015).
- 16 Shirai, H. et al. Transplantation of human embryonic stem cell-derived retinal tissue in two primate models of retinal degeneration. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113, E81-90, doi:10.1073/pnas.1512590113 (2016).
- 17 Kelava, I. & Lancaster, M. A. Stem Cell Models of Human Brain Development. *Cell stem cell* 18, 736-748, doi:10.1016/j.stem.2016.05.022 (2016).
- 18 Grealish, S. et al. Human ESC-derived dopamine neurons show similar preclinical efficacy and potency to fetal neurons when grafted in a rat model of Parkinson's disease. *Cell stem cell* 15, 653-665, doi:10.1016/j.stem.2014.09.017 (2014).
- 19 Klimanskaya, I., Chung, Y., Becker, S., Lu, S. J. & Lanza, R. Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres. *Nature* 444, 481-485, doi:10.1038/nature05142 (2006).
- 20 Tachibana, M. et al. Human embryonic stem cells derived by somatic cell nuclear transfer. *Cell* 153, 1228-1238, doi:10.1016/j.cell.2013.05.006 (2013).
- 21 Avila-Gonzalez, D. et al. Human amniotic epithelial cells as feeder layer to derive and maintain human embryonic stem cells from poor-quality embryos. *Stem cell research* 15, 322-324, doi:10.1016/j.scr.2015.07.006 (2015).
- 22 Lerou, P. H. et al. Derivation and maintenance of human embryonic stem cells from poor-quality in vitro fertilization embryos. *Nature protocols* 3, 923-933, doi:10.1038/nprot.2008.60 (2008).

- 23 Lerou, P. H. et al. Human embryonic stem cell derivation from poor-quality embryos. *Nature biotechnology* 26, 212-214, doi:10.1038/nbt1378 (2008).
- 24 Ludwig, T. E. et al. Derivation of human embryonic stem cells in defined conditions. *Nature biotechnology* 24, 185-187, doi:10.1038/nbt1177 (2006).
- 25 Crocco, M. C., Frantz, N. & Bos-Mikich, A. Substrates and supplements for hESCs: a critical review. *Journal of assisted reproduction and genetics* 30, 315-323, doi:10.1007/s10815-012-9914-8 (2013).
- 26 Inzunza, J. et al. Derivation of human embryonic stem cell lines in serum replacement medium using postnatal human fibroblasts as feeder cells. *Stem cells* 23, 544-549, doi:10.1634/stemcells.2004-0201 (2005).
- 27 Rodin, S. et al. Long-term self-renewal of human pluripotent stem cells on human recombinant laminin-511. *Nature biotechnology* 28, 611-615, doi:10.1038/nbt.1620 (2010).
- 28 Ma, H. et al. Abnormalities in human pluripotent cells due to reprogramming mechanisms. *Nature* 511, 177-183, doi:10.1038/nature13551 (2014).
- 29 Mikkelsen, T. S. et al. Dissecting direct reprogramming through integrative genomic analysis. *Nature* 454, 49-55, doi:10.1038/nature07056 (2008).
- 30 Ohnuki, M. et al. Dynamic regulation of human endogenous retroviruses mediates factor-induced reprogramming and differentiation potential. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 12426-12431, doi:10.1073/pnas.1413299111 (2014).
- 31 Mohseni R, H. A., Verdi J, Hassani AS Safe Transplantation of Pluripotent Stem Cell by Preventing Teratoma Formation. *Journal Stem Cell Research and Therapy* 4 (2014).
- 32 Gropp, M. et al. Standardization of the teratoma assay for analysis of pluripotency of human ES cells and biosafety of their differentiated progeny. *PloS one* 7, e45532, doi:10.1371/journal.pone.0045532 (2012).
- 33 Garitaonandia, I. et al. Increased risk of genetic and epigenetic instability in human embryonic stem cells associated with specific culture conditions. *PloS one* 10, e0118307, doi:10.1371/journal.pone.0118307 (2015).
- 34 Ben-David, U. et al. Aneuploidy induces profound changes in gene expression, proliferation and tumorigenicity of human pluripotent stem cells. *Nat Commun* 5, 4825, doi:10.1038/ncomms5825 (2014).
- 35 Pearl, J. I., Kean, L. S., Davis, M. M. & Wu, J. C. Pluripotent stem cells: immune to the immune system? *Sci Transl Med* 4, 164ps125, doi:10.1126/scitranslmed.3005090 (2012).
- 36 Jacquet, L. et al. Strategy for the creation of clinical grade hESC line banks that HLA-match a target population. *EMBO Mol Med* 5, 10-17, doi:10.1002/emmm.201201973 (2013).
- 37 McDonald, J. W. & Sadowsky, C. Spinal-cord injury. *Lancet* 359, 417-425, doi:10.1016/S0140-6736(02)07603-1 (2002).
- 38 Keirstead, H. S. et al. Human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitor cell transplants remyelinate and restore locomotion after spinal cord injury. *J Neurosci* 25, 4694-4705, doi:10.1523/JNEUROSCI.0311-05.2005 (2005).
- 39 Nistor, G. I., Totoiu, M. O., Haque, N., Carpenter, M. K. & Keirstead, H. S. Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation. *Glia* 49, 385-396, doi:10.1002/glia.20127 (2005).
- 40 Lebkowski, J. Phase 1 clinical trial of human embryonic stem cell-derived oligodendrocyte progenitors inpatients with neurologically complete thoracic spinal cord injury: Results and next steps. American Society of Gene & Cell Therapy annual meeting presentation. (2014).
- 41 Barzilai, A. & Melamed, E. Molecular mechanisms of selective dopaminergic neuronal death in Parkinson's disease. *Trends Mol Med* 9, 126-132 (2003).
- 42 Thies, R. S. & Murry, C. E. The advancement of human pluripotent stem cell-derived therapies into the clinic. *Development* 142, 3614, doi:10.1242/dev.131250 (2015).
- 43 Trounson, A. & DeWitt, N. D. Pluripotent stem cells progressing to the clinic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17, 194-200, doi:10.1038/nrm.2016.10 (2016).
- 44 Chong, J. J. et al. Human embryonic-stem-cell-derived cardiomyocytes regenerate non-human primate hearts. *Nature* 510, 273-277, doi:10.1038/nature13233 (2014).
- 45 Fernandes, S. et al. Comparison of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes, Cardiovascular Progenitors, and Bone Marrow Mononuclear Cells for Cardiac Repair. *Stem Cell Reports* 5, 753-762, doi:10.1016/j.stemcr.2015.09.011 (2015).

- 46 Menasche, P. et al. Towards a clinical use of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors: a translational experience. *Eur Heart J* 36, 743-750, doi:10.1093/eurheartj/ehu192 (2015).
- 47 Ramsden, C. M. et al. Stem cells in retinal regeneration: past, present and future. *Development* 140, 2576-2585, doi:10.1242/dev.092270 (2013).
- 48 Schwartz, S. D. et al. Embryonic stem cell trials for macular degeneration: a preliminary report. *Lancet* 379, 713-720, doi:10.1016/S0140-6736(12)60028-2 (2012).
- 49 Schwartz, S. D. et al. Human embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium in patients with age-related macular degeneration and Stargardt's macular dystrophy: follow-up of two open-label phase 1/2 studies. *Lancet* 385, 509-516, doi:10.1016/S0140-6736(14)61376-3 (2015).
- 50 Song, W. K. et al. Treatment of macular degeneration using embryonic stem cell-derived retinal pigment epithelium: preliminary results in Asian patients. *Stem Cell Reports* 4, 860-872, doi:10.1016/j.stemcr.2015.04.005 (2015).
- 51 Kumar, S. S. et al. Recent developments in beta-cell differentiation of pluripotent stem cells induced by small and large molecules. *International journal of molecular sciences* 15, 23418-23447, doi:10.3390/ijms151223418 (2014).
- 52 Rezania, A. et al. Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology* 32, 1121-1133, doi:10.1038/nbt.3033 (2014).
- 53 Schulz, T. C. Concise Review: Manufacturing of Pancreatic Endoderm Cells for Clinical Trials in Type 1 Diabetes. *Stem Cells Transl Med* 4, 927-931, doi:10.5966/sctm.2015-0058 (2015).

## INTRODUCCIÓN.

Los modelos animales representan un recurso esencial en las ciencias biomédicas para la generación de nuevo conocimiento sobre los procesos fisiopatológicos de muchas enfermedades, la identificación de dianas terapéuticas y consecuentemente el desarrollo de nuevos tratamientos. En la actualidad los modelos genéticos o transgénicos, en los cuales se reproduce con mucha exactitud los síntomas característicos de la enfermedad, ya sea integrando o eliminando los genes responsables de la patología, permiten identificar la base molecular de diversas enfermedades que pueden ayudar en el desarrollo de nuevas terapias que logren curarlas o aliviarlas. Algunos ejemplos de modelos transgénicos de enfermedades humanas son; cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes y obesidad, enfermedades metabólicas y neurodegenerativas, dando como consecuencia modelos que imitan las condiciones patológicas para el estudio de procesos como es el Alzheimer y la enfermedad de Parkinson (EP).

### Enfermedad de Parkinson.

La enfermedad de Parkinson (EP), es la segunda enfermedad neurodegenerativa más común a nivel mundial, aproximadamente afecta al 1-2% de los adultos mayores a 60 años; actualmente se estima que más de 10 millones de personas alrededor del mundo la padecen<sup>1,2</sup>. La etiología de la EP es poco conocida, ya que implica el conjunto de múltiples factores que actúan a la vez, como el envejecimiento, la vulnerabilidad genética y el ambiente<sup>3</sup>. Por lo que, resulta de gran importancia su estudio en modelos animales que mimeticen de manera adecuada tanto las bases moleculares de este padecimiento, como los factores ambientales que pudieran estar involucrados. La utilización de modelos transgénicos animales y celulares en el estudio de este padecimiento ha conllevado a un entendimiento más completo de los mecanismos fisiopatológicos y las bases moleculares de la enfermedad, propiciando aunadamente estudios farmacológicos y toxicológicos de mayor impacto y precisión.

Actualmente, la gama de modelos transgénicos para el estudio de la EP es amplia, algunos de ellos inclusive ya se han realizado en animales superiores como primates no-humanos, los cuales tienen como ventaja frente a otros modelos animales, el poder observar la evolución de la enfermedad durante algunos años, sin embargo no alcanzan a desarrollar por completo los signos clínicos observados en humanos<sup>4</sup>. Por otra parte, también se encuentran los modelos genéticamente modificados que no son mamíferos como el pez cebra<sup>5</sup>, el nematodo *Caenorhabditis elegans*<sup>6</sup> y la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*<sup>7</sup>, que por su fácil manipulación en el laboratorio, son candidatos idóneos para la observación de moléculas que pudieran estar involucradas en la patogénesis de la enfermedad. Sin embargo, el modelo más empleado hasta el día de hoy para transgénesis en la EP sigue siendo el ratón, por ser un homólogo humano en un 99% del genoma<sup>8</sup>. Las modificaciones que más comúnmente se realizan en el modelo murino están enfocadas en los genes *SNCA* (alfa sinucleína), *LRRK2* (cinasa 2 rica en repeticiones de leucina), *PARK7* (deglicasa asociada a parkinsonismo), *PARK2* (parkina), *PINK1* (cinasa putativa PTEN

inducida), ya que se ha observado una fuerte asociación de estos con la etiología de la EP de origen familiar, estos genes representan hasta un 10% del total de los pacientes<sup>9</sup>. Los principales modelos transgénicos que se han generado en roedores y su aplicación en estudios preclínicos se discuten a continuación.

#### Gen SNCA.

El gen alfa sinucleína (SNCA) codifica una proteína denominada alfa-sinucleína la cual es abundante en el cerebro y en ligeras cantidades en corazón y músculo. Algunas investigaciones documentan, que la expresión de este gen en condiciones normales, mantiene una administración adecuada de vesículas en las terminales presinápticas, así como la participación en la regulación de la dopamina<sup>10,11</sup>. Cuando existen mutaciones en SNCA se forman conformaciones insolubles denominadas protofibrillas que derivan en los denominados cuerpos de Lewis, los cuales generan cambios en la homeóstasis celular y muerte neuronal, característicos de la EP<sup>12</sup>. Se ha realizado la sobreexpresión de mutaciones del gen de SNCA (A30P y A53T) en ratones y ratas, observándose defectos en la transmisión de dopamina y la presencia de depósitos de  $\alpha$ -sinucleína alrededor del cerebro<sup>13</sup>. Estos modelos transgénicos no muestran pérdida neuronal pero sí un ligero cambio conductual similar a lo que se observa en los pacientes<sup>14</sup>. Otro modelo para la inducción de  $\alpha$ -sinucleína en roedores, se realiza por medio de virus-Cav para sobreexpresar la proteína  $\alpha$ -sinucleína en la *sustancia nigra* de ratas y ratones, su utilización es la más recomendable ya que es menos inmunogénico comparado con otros virus. El protocolo de colocación es por medio de una inyección unilateral del virus en el estriado, causando la pérdida de neuronas dopaminérgicas y la presencia posterior de inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína. Este modelo presenta la ventaja de poder analizar el comportamiento del ratón al realizar la prueba de rotaciones.

Otro ejemplo de modelo de inducción, es mediante el uso de vectores virales Adeno-asociados recombinantes, los cuales se utilizan para expresar el gen completo de  $\alpha$ -sinucleína en ratas o primates no humanos. Este método se realiza por medio de una inyección unilateral del virus en el estriado o en la corteza cerebral, dando como resultado la disminución de las neuronas dopaminérgicas dependiendo del sitio de inyección<sup>15</sup>. Una de las principales características de este modelo, es que puede mimetizar la etapa final de la EP en donde las inclusiones de  $\alpha$ -sinucleína se encuentran localizadas en la corteza cerebral. Figura 1.

**Estudios preclínicos.** Se han generado diversos modelos Knock-out para SNCA, en donde se exponen a los ratones a 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), el cual es un compuesto tóxico que mimetiza la fisiopatología típica de la enfermedad, reportando una resistencia parcial o total a MPTP, indicando una estrecha relación de la expresión del gen SNCA durante la EP<sup>16-18</sup>. Por otra parte, cuando se trata a los ratones con anfetaminas se induce la liberación de dopamina, lo cual lleva a una recuperación de la actividad motora en el ratón con la EP ya establecida<sup>19</sup>.

Existen otros modelos donde se realiza una sobreexpresión de las mutaciones puntuales *Ala30Pro* (A30P) y A53T, las cuales se presentan en la EP del tipo familiar. Donde se ha reportado que los ratones con sobreexpresión de A30P expuestos al tóxico MPTP, tienen una susceptibilidad incrementada a disminuir la producción de dopamina, sin embargo en la sobreexpresión de la mutación A53T, las neuronas dopaminérgicas de la *sustancia nigra pars compacta* no se ven afectadas a MPTP<sup>20</sup>. También cuando los ratones expresan la variante humana normal (wild type) mediante el promotor Thy1, se producen daños

mitocondriales a la intoxicación con MPTP, esto tiene como consecuencias: degeneración axonal, agregación de filamentos neuríticos y la formación de inclusiones citoplasmáticas perinucleares en la *substantia nigra*<sup>21</sup>.

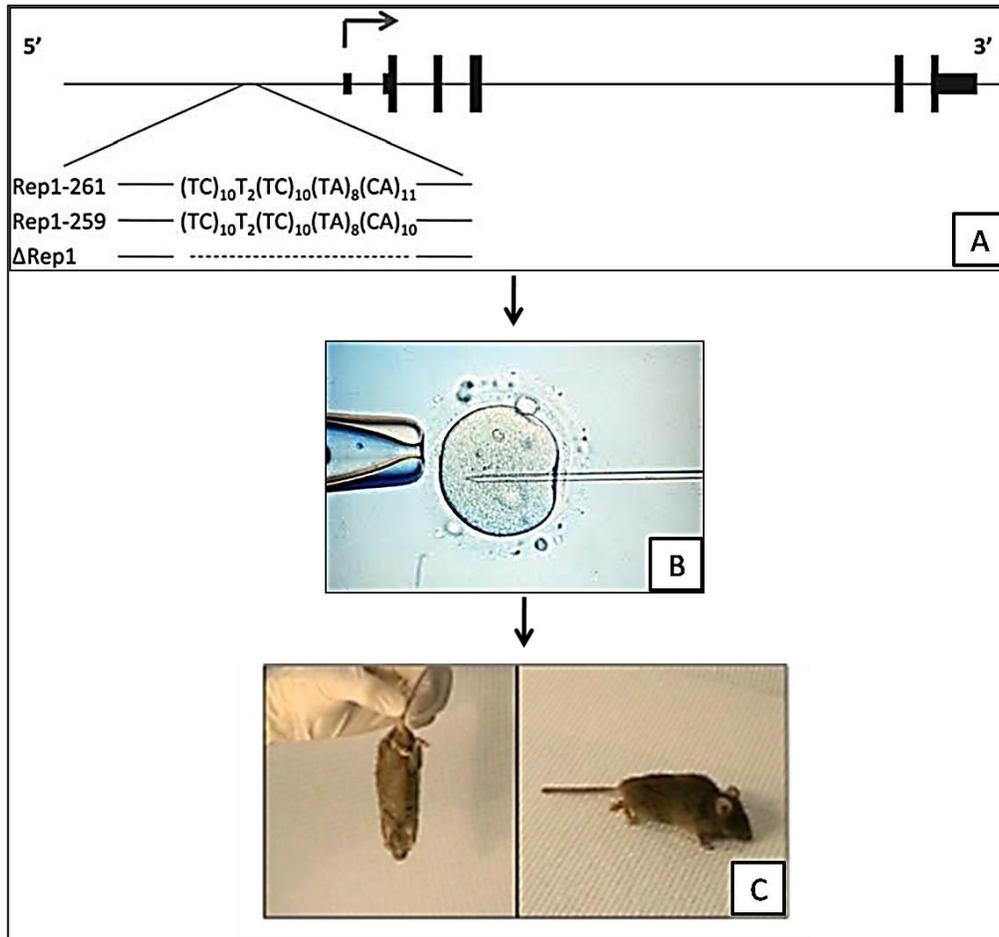


Figura 1. Representación esquemática para la construcción de un ratón transgénico de  $\alpha$ -sinucleína. A) Esquema de la PAC (27M07) usado para generar líneas de ratones transgénicos que incluye el locus humano de  $\alpha$ -sinucleína<sup>59</sup>. B) El ADN transgénico es microinyectado en los óvulos de ratón y su posterior implantación en el útero. C) Linajes transgénicos homocigotos<sup>60</sup>.

## Gen *LRRK2*

El gen *LRRK2* codifica una proteína denominada dardarina y está activo en cerebro y otros tejidos alrededor del cuerpo<sup>22</sup>. Una parte de la dardarina está constituida por una región rica en leucina la cual tiene funciones importantes en interacción con otras proteínas, como en la señalización celular y la estructura del citoesqueleto, a su vez mostrando funciones enzimáticas de cinasa<sup>23</sup>. Se han identificado más de 100 mutaciones para *LRRK2* en poblaciones alrededor del mundo. La mutación con mayor relevancia, es una sustitución del aminoácido glicina por serina en la posición 2019 de la proteína y se ha encontrado en diversas poblaciones; árabes, africanas, judías, asiáticas y del norte, centro y este de Europa, involucrando del 3 al 7% de los casos con Parkinson familiar<sup>24</sup>. Otra mutación común es la sustitución de arginina por glicina en la posición 1441 de la proteína y es

denominada R1441G. Esta es una causa común de EP en una región entre Francia y España<sup>25</sup>.

**Estudios preclínicos.** Es por esto, que en el laboratorio se realiza la sobreexpresión de las mutaciones R1441G y G2019 y así hacer susceptibles o establecer la EP en los ratones. Se han creado roedores transgénicos LRRK2 que presentan una afectación en el sistema nigroestriatal, incluyendo el decremento de la liberación de dopamina o déficits en el comportamiento que son sensibles a dopamina<sup>26</sup>. En los modelos con estas mutaciones se generan agregados de proteína de  $\alpha$ -sinucleína y tau fosforilada la cual puede realizar agregados oligoméricos tóxicos (similares a  $\alpha$ -sinucleína), los cuales conllevan a la inducción de EP.

#### Gen *PARK7*

Codifica la proteína DJ-1, la cual se encuentra en diversos tejidos incluyendo el cerebro. No se sabe con certeza las funciones de este gen, pero se asocia con protección a la célula frente a estrés oxidativo<sup>27</sup>, sin embargo, las funciones de la proteína que codifica DJ-1 son más reconocidas, la más remarcable, es que funge como chaperona que participa en el acompañamiento de proteínas seleccionadas hacia los proteosomas.

**Estudios preclínicos.** Por lo que las mutaciones realizadas en los modelos transgénicos, son modificaciones que producen una proteína no funcional o la delección de una gran parte del gen *PARK7*, lo cual previene la producción de cualquier proteína DJ-1 funcional. En ratones knock-out de este gen, no presentan anormalidades anatómicas o neuronales, pero son más sensibles a MPTP, por lo que hay mayor pérdida de neuronas en la *substancia nigra* y una incrementada denervación dopaminérgica en el estriado<sup>28</sup>. Se ha observado en otros estudios que la sobreexpresión de la proteína DJ-1 en cultivo neuronal *in vitro*, le confiere un efecto neuroprotector que no se ha podido demostrar en ratones como modelo transgénico<sup>29</sup>.

#### Gen *PARK2*

El gen *PARK2* codifica una proteína denominada Parkina, la cual pertenece al grupo de las ligasas de ubiquitina E3 y es abundante en cerebro. Interviene en la maquinaria que degrada el exceso de proteínas innecesarias, mediante el etiquetado a través de ubiquitina<sup>30</sup>. Las funciones específicas de esta proteína están relacionadas con el mantenimiento de la mitocondria, por lo que se ha indagado más en su estructura y función<sup>31</sup>. Por otra parte, se ha documentado que puede intervenir como una proteína supresora de tumores, ya que previene el crecimiento y desarrollo celular sin control, así como en la regulación y liberación de las vesículas sinápticas<sup>32</sup>.

**Estudios preclínicos.** Se conocen cerca de 200 mutaciones del gen *PARK2* relacionadas con EP, todas ellas relacionadas con dos propósitos; 1) realizar una proteína disfuncional de Parkina la cual es rápidamente degradada por la célula y 2) inserciones, delecciones o sustituciones de ADN, para formar una proteína defectuosa o que no llegue a producirse. El primer tipo de mutación tiene como consecuencia una disrupción del funcionamiento de la mitocondria produciendo los signos y síntomas característicos de EP<sup>33</sup>. El segundo tipo de mutación conlleva a defectos en el sistema ubiquitina-proteosoma, generando acumulación de proteínas e interviniendo en la liberación de las vesículas sinápticas, especialmente las que contienen dopamina<sup>34</sup>. Un modelo Knock-out de Parkina, se caracteriza por un mal funcionamiento o la muerte de las células dopaminérgicas,

simulando la pérdida de neuronas dopaminérgicas como sucede específicamente en EP<sup>35</sup> (Shimura et al., 2000).

En otros estudios se ha observado que las mutaciones del gen *PARK2* no muestran déficits en la función neurológica sistémica, emocional, de aprendizaje o de memoria que simule a la EP. A pesar de ello este modelo transgénico, se emplea para simular el parkinsonismo autosómico recesivo juvenil, ya que se ha observado en pacientes con EP, que las mutaciones asociadas a la proteína Parkina provocan el desarrollo de la enfermedad antes de los 20 años y en algunos casos es la forma más común de EP, de inicio tardío después de los 50 años<sup>36,37</sup>.

### Gen *PINK1*

El gen *PINK1* codifica la proteína cinasa putativa PTEN inducida 1, se encuentra distribuida en diferentes células alrededor del cuerpo (corazón, músculos y testículos) e intracelularmente se localiza en mitocondria<sup>30</sup>. Aunque sus funciones no están completamente dilucidadas, se le asocia con la protección del mal funcionamiento mitocondrial durante periodos de estrés celular<sup>38</sup>. Estudios adicionales muestran dos estructuras especializadas para llevar a cabo la protección mitocondrial: 1) el motivo blanco-mitocondrial y 2) el dominio de quinasa<sup>10</sup>. Se han encontrado cerca de 70 mutaciones para el gen *PINK1* asociadas a EP, la mayoría provoca alteraciones o eliminan el dominio de quinasa, dando lugar a una disfunción de la proteína. Por otra parte, se ha encontrado al menos una mutación que afecta el motivo blanco-mitocondrial, exhibiendo una disrupción en la entrega de proteínas a la mitocondria<sup>39,40</sup>.

**Estudios preclínicos.** La delección del gen *PINK1* en ratones tiene como consecuencia el decremento de los niveles de dopamina, provocando deficiencias motrices y alteraciones de la plasticidad sináptica<sup>41</sup>. Un ratón Knock-out (*PINK1* <sup>-/-</sup>) genera un fenotipo característico de la EP en su etapa temprana incluyendo la marcha alterada, el olfato y la denervación serotoninérgica<sup>42</sup>. Aunadamente este modelo proporciona una respiración mitocondrial deficiente<sup>41</sup>. La relevancia del ratón Knock-out de *PINK1*, es la muestra de síntomas de comportamiento de las fases iniciales de EP, por lo que su función podría fungir en la búsqueda de biomarcadores tempranos de la enfermedad.

### Modelos transgénicos asociados a factores de transcripción necesarios para el desarrollo de neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo

El desarrollo de las neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo (mNDA) comienza alrededor del día 8 del desarrollo embrionario en ratón y se requiere de la inducción de factores progenitores para lograr la proliferación, maduración, migración búsqueda de caminos axonales y sinaptogénesis<sup>43,44</sup>. El paso subsiguiente de la generación de las mNDA progenitoras, es la maduración acompañada de factores de transcripción adicionales como *Hence*, *Nurr1* y *Pitx3*, necesarios para la codificación de proteínas como tiroxina hidroxilasa (TH), transportador de dopamina (DAT y transportador monoamina vesicular 2 (VMAT2), dopa descarboxilasa (AADC), receptor de dopamina D2 (DRD2), o la familia 1 de aldehído deshidrogenasa, miembro A1 (ALDH1A1), las cuales determinan que son mNDA maduras. Posteriormente la transcripción de *Nurr-1* y *Pitx3* son esenciales para el desarrollo del fenotipo dopaminérgico en neuronas de la *substancia nigra*<sup>45</sup>. También en diferentes trabajos se ha encontrado que un decremento en la expresión de los factores del gen *Nurr-1* y los polimorfismos *Nurr-1* y *Pitx3* están asociados con EP<sup>46,47</sup>.

Es por esto que se han generado modelos Knock-out para estos factores de transcripción, los cuales son importantes para la generación, desarrollo y mantenimiento de las NDA adultas. Proporcionando una simulación de la pérdida de las NDA adultas de la *substancia nigra pars compacta*, mimetizando una de las características fundamentales para el desarrollo de EP. Los modelos transgénicos murinos más relevantes sobre factores de transcripción de mNDA se describen a continuación.

#### Aphakia (ak)

El modelo es un ratón con deficiencia en el gen Pitx3, lo cual conlleva a una disfunción debido a la degeneración dopaminérgica. A nivel celular existe una pérdida de neuronas dopaminérgicas en la *substancia nigra pars compacta*, menos en el área tegmental central. El ratón tiene como consecuencia déficits motrices sensibles a L-DOPA. En este modelo no se presenta la agregación de proteínas<sup>48-50</sup>.

#### Ratón Nurr1

Es un ratón Knock-out heterocigoto del factor de transcripción Nurr1, el cual es necesario para el desarrollo y mantenimiento de las neuronas dopaminérgicas: *Nurr1*<sup>+/-</sup>. La depleción del factor, tiene como consecuencia un desempeño deficiente en la prueba de rotarod y un decremento en las actividades locomotoras. A nivel celular existe una pérdida de células dependientes de la edad en la *substancia nigra* y una reducción de la dopamina en el estriado. Se crea una elevada vulnerabilidad a la neurotoxina 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridina (MPTP), el cual conlleva a la destrucción de neuronas en la *substancia nigra*<sup>51,52</sup>. En el estudio desarrollado por Kadkhodaei et al., 2013, muestran que la delección de Nurr-1 inducida por medio de tamoxifem en ratones de 5 semanas de edad, conduce a una patología progresiva asociada con la pérdida o reducción de la dopamina estriatal, la alteración motriz y axones distróficos<sup>53</sup>.

#### Ratón Mitopark

Es un modelo Knock-out (KO) del factor de transcripción mitocondrial A (Tfam), en neuronas dopaminérgicas de mesencéfalo, esto provoca una reducción de la expresión del ADN mitocondrial (ADNmt) y defectos en la cadena respiratoria. El ratón sufre de ralentización y un progresivo decaimiento de la actividad locomotora, el cual tiene una mejoría con el efecto de L-DOPA. También hay degeneración en el estriado-nigro relacionado con la adultez y reducción de los niveles de dopamina. En este modelo se forman inclusiones intracelulares que dan positivo para marcadores mitocondriales de carácter proteico (no sinucleína)<sup>54,55</sup>.

#### Ratón “engrailed”

Se realiza una escisión de la caja de factores de transcripción (homeobox) Engrailed-1 y Engrailed-2, los cuales son necesarios para la supervivencia de la neuronas dopaminérgicas del Sistema Nervioso Central (SNC): *En1*<sup>+/-</sup>, *En2*<sup>-/-</sup>. Esto conlleva a un sutil déficit en la actividad motriz y una consecuente pérdida de neuronas del SNC y dopamina en estriado. No existen depósitos de proteína<sup>56</sup>. Específicamente en el ratón *En1*<sup>+/-</sup>, se observa el número normal de mNDA hasta las 6 semanas de edad, donde comienzan a morir progresivamente. La muerte celular alcanza el 40% en la *substancia nigra pars compacta* a las 48 semanas de edad y se relaciona con la disminución del contenido de dopamina en el cuerpo estriado, decremento en la actividad locomotriz, aumento en la sensibilidad a la anfetamina el cual es un estimulante del SNC y disminución

sobre la actividad motora y el aprendizaje sensoriomotor observado en la prueba de rotarod<sup>57</sup>. Las mNDA en este ratón son muchísimo más susceptibles a la muerte inducida por MPTP. Otro de los hallazgos en el modelo *En1+/-*, es la falla de las proteínas motoras en el transporte axonal, una característica observada en la etapa temprana de EP<sup>58</sup>.

## **CONCLUSIÓN.**

La información aportada por los modelos genéticos de EP es crucial para tener una mejor comprensión de su etiopatogénesis, ya que permiten emular síntomas clave de la enfermedad y el desabrimento de nuevas dianas terapéuticas. Asimismo es remarcable puntualizar que no existen modelos transgénicos que expliquen por completo la fisiopatogenia de la Enfermedad de Parkinson, por lo que el trabajo postrero está enfocado en probar y evaluar nuevas moléculas para esta condición. Con ello se abren esperanzas de poder encontrar tratamientos realmente eficaces para detener o ralentizar la progresión de la enfermedad.

## **AGRADECIMIENTOS**

FONDO CONACyT 2016 Apoyo al Fortalecimiento y Desarrollo de la Infraestructura Científica y Tecnológica. No. 271307

## REFERENCIAS

- 1 Driver, J. A., Logroscino, G., Gaziano, J. M. & Kurth, T. Incidence and remaining lifetime risk of Parkinson disease in advanced age. *Neurology* **72**, 432-438, doi:10.1212/01.wnl.0000341769.50075.bb (2009).
- 2 Sandoval-Avila, S. *et al.* Neuroprotective effects of phytochemicals on dopaminergic neuron cultures. *Neurologia*, doi:10.1016/j.nrl.2016.04.018 (2016).
- 3 Li, X. T. & Cai, D. F. [Advance research on association between environmental compound and parkinson's disease]. *Zhonghua yu fang yi xue za zhi [Chinese journal of preventive medicine]* **50**, 922-926, doi:10.3760/cma.j.issn.0253-9624.2016.10.018 (2016).
- 4 Fox, S. H. & Brotchie, J. M. The MPTP-lesioned non-human primate models of Parkinson's disease. Past, present, and future. *Progress in brain research* **184**, 133-157, doi:10.1016/S0079-6123(10)84007-5 (2010).
- 5 Sun, L., Li, X. L., Lu, L., Zhao, S. S. & Chen, D. Y. [Establishment of a zebrafish model of Parkinson's disease]. *Zhongguo ying yong sheng li xue za zhi = Zhongguo yingyong shenglixue zazhi = Chinese journal of applied physiology* **29**, 431-432, 440 (2013).
- 6 Zheng, J. *et al.* Dietary Plant Lectins Appear to Be Transported from the Gut to Gain Access to and Alter Dopaminergic Neurons of *Caenorhabditis elegans*, a Potential Etiology of Parkinson's Disease. *Frontiers in nutrition* **3**, 7, doi:10.3389/fnut.2016.00007 (2016).
- 7 Pandareesh, M. D., Shrivash, M. K., Naveen Kumar, H. N., Misra, K. & Srinivas Bharath, M. M. Curcumin Monoglucoside Shows Improved Bioavailability and Mitigates Rotenone Induced Neurotoxicity in Cell and *Drosophila* Models of Parkinson's Disease. *Neurochemical research*, doi:10.1007/s11064-016-2034-6 (2016).
- 8 Ahmad-Annuar, A., Tabrizi, S. J. & Fisher, E. M. Mouse models as a tool for understanding neurodegenerative diseases. *Current opinion in neurology* **16**, 451-458, doi:10.1097/01.wco.0000084221.82329.29 (2003).
- 9 Dauer, W. & Przedborski, S. Parkinson's disease: mechanisms and models. *Neuron* **39**, 889-909 (2003).
- 10 Nuytemans, K., Theuns, J., Cruts, M. & Van Broeckhoven, C. Genetic etiology of Parkinson disease associated with mutations in the SNCA, PARK2, PINK1, PARK7, and LRRK2 genes: a mutation update. *Human mutation* **31**, 763-780, doi:10.1002/humu.21277 (2010).
- 11 Federoff, M., Schottlaender, L. V., Houlden, H. & Singleton, A. Multiple system atrophy: the application of genetics in understanding etiology. *Clinical autonomic research : official journal of the Clinical Autonomic Research Society* **25**, 19-36, doi:10.1007/s10286-014-0267-5 (2015).
- 12 Puschmann, A., Bhidayasiri, R. & Weiner, W. J. Synucleinopathies from bench to bedside. *Parkinsonism & related disorders* **18 Suppl 1**, S24-27, doi:10.1016/S1353-8020(11)70010-4 (2012).
- 13 Spillantini, M. G. *et al.* Alpha-synuclein in Lewy bodies. *Nature* **388**, 839-840, doi:10.1038/42166 (1997).
- 14 Zarranz, J. J. *et al.* The new mutation, E46K, of alpha-synuclein causes Parkinson and Lewy body dementia. *Annals of neurology* **55**, 164-173, doi:10.1002/ana.10795 (2004).
- 15 Kirik, D. *et al.* Parkinson-like neurodegeneration induced by targeted overexpression of alpha-synuclein in the nigrostriatal system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **22**, 2780-2791, doi:20026246 (2002).
- 16 Dauer, W. *et al.* Resistance of alpha -synuclein null mice to the parkinsonian neurotoxin MPTP. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 14524-14529, doi:10.1073/pnas.172514599 (2002).
- 17 Drolet, R. E., Behrouz, B., Lookingland, K. J. & Goudreau, J. L. Mice lacking alpha-synuclein have an attenuated loss of striatal dopamine following prolonged chronic MPTP administration. *Neurotoxicology* **25**, 761-769, doi:10.1016/j.neuro.2004.05.002 (2004).
- 18 Schluter, O. M. *et al.* Role of alpha-synuclein in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-induced parkinsonism in mice. *Neuroscience* **118**, 985-1002 (2003).
- 19 Abeliovich, A. *et al.* Mice lacking alpha-synuclein display functional deficits in the nigrostriatal dopamine system. *Neuron* **25**, 239-252 (2000).
- 20 Dong, Z., Ferger, B., Feldon, J. & Bueler, H. Overexpression of Parkinson's disease-associated alpha-synucleinA53T by recombinant adeno-associated virus in mice does not increase

- the vulnerability of dopaminergic neurons to MPTP. *Journal of neurobiology* **53**, 1-10, doi:10.1002/neu.10094 (2002).
- 21 Song, D. D., Shults, C. W., Sisk, A., Rockenstein, E. & Masliah, E. Enhanced substantia nigra mitochondrial pathology in human alpha-synuclein transgenic mice after treatment with MPTP. *Experimental neurology* **186**, 158-172, doi:10.1016/S0014-4886(03)00342-X (2004).
- 22 Kumar, A. & Cookson, M. R. Role of LRRK2 kinase dysfunction in Parkinson disease. *Expert reviews in molecular medicine* **13**, e20, doi:10.1017/S146239941100192X (2011).
- 23 Cookson, M. R. The role of leucine-rich repeat kinase 2 (LRRK2) in Parkinson's disease. *Nature reviews. Neuroscience* **11**, 791-797, doi:10.1038/nrn2935 (2010).
- 24 Ross, O. A. *et al.* Association of LRRK2 exonic variants with susceptibility to Parkinson's disease: a case-control study. *The Lancet. Neurology* **10**, 898-908, doi:10.1016/S1474-4422(11)70175-2 (2011).
- 25 Lesage, S. *et al.* LRRK2 G2019S as a cause of Parkinson's disease in North African Arabs. *The New England journal of medicine* **354**, 422-423, doi:10.1056/NEJMc055540 (2006).
- 26 Li, Y. *et al.* Mutant LRRK2(R1441G) BAC transgenic mice recapitulate cardinal features of Parkinson's disease. *Nature neuroscience* **12**, 826-828, doi:10.1038/nn.2349 (2009).
- 27 Abou-Sleiman, P. M., Healy, D. G., Quinn, N., Lees, A. J. & Wood, N. W. The role of pathogenic DJ-1 mutations in Parkinson's disease. *Annals of neurology* **54**, 283-286, doi:10.1002/ana.10675 (2003).
- 28 Kim, R. H. *et al.* Hypersensitivity of DJ-1-deficient mice to 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) and oxidative stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5215-5220, doi:10.1073/pnas.0501282102 (2005).
- 29 Taira, T. *et al.* DJ-1 has a role in antioxidative stress to prevent cell death. *EMBO reports* **5**, 213-218, doi:10.1038/sj.embor.7400074 (2004).
- 30 Abou-Sleiman, P. M., Muqit, M. M. & Wood, N. W. Expanding insights of mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Nature reviews. Neuroscience* **7**, 207-219, doi:10.1038/nrn1868 (2006).
- 31 Denison, S. R., Callahan, G., Becker, N. A., Phillips, L. A. & Smith, D. I. Characterization of FRA6E and its potential role in autosomal recessive juvenile parkinsonism and ovarian cancer. *Genes, chromosomes & cancer* **38**, 40-52, doi:10.1002/gcc.10236 (2003).
- 32 Picchio, M. C. *et al.* Alterations of the tumor suppressor gene Parkin in non-small cell lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**, 2720-2724 (2004).
- 33 Pramstaller, P. P. *et al.* Lewy body Parkinson's disease in a large pedigree with 77 Parkin mutation carriers. *Annals of neurology* **58**, 411-422, doi:10.1002/ana.20587 (2005).
- 34 Narendra, D. P. & Youle, R. J. Targeting mitochondrial dysfunction: role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control. *Antioxidants & redox signaling* **14**, 1929-1938, doi:10.1089/ars.2010.3799 (2011).
- 35 Shimura, H. *et al.* Familial Parkinson disease gene product, parkin, is a ubiquitin-protein ligase. *Nature genetics* **25**, 302-305, doi:10.1038/77060 (2000).
- 36 Goldberg, M. S. *et al.* Parkin-deficient mice exhibit nigrostriatal deficits but not loss of dopaminergic neurons. *The Journal of biological chemistry* **278**, 43628-43635, doi:10.1074/jbc.M308947200 (2003).
- 37 Perez, F. A. & Palmiter, R. D. Parkin-deficient mice are not a robust model of parkinsonism. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 2174-2179, doi:10.1073/pnas.0409598102 (2005).
- 38 Chu, C. T. A pivotal role for PINK1 and autophagy in mitochondrial quality control: implications for Parkinson disease. *Human molecular genetics* **19**, R28-37, doi:10.1093/hmg/ddq143 (2010).
- 39 Rogaeva, E. *et al.* Analysis of the PINK1 gene in a large cohort of cases with Parkinson disease. *Archives of neurology* **61**, 1898-1904, doi:10.1001/archneur.61.12.1898 (2004).
- 40 Silvestri, L. *et al.* Mitochondrial import and enzymatic activity of PINK1 mutants associated to recessive parkinsonism. *Human molecular genetics* **14**, 3477-3492, doi:10.1093/hmg/ddi377 (2005).
- 41 Gispert, S. *et al.* Parkinson phenotype in aged PINK1-deficient mice is accompanied by progressive mitochondrial dysfunction in absence of neurodegeneration. *PLoS one* **4**, e5777, doi:10.1371/journal.pone.0005777 (2009).

- 42 Glasl, L. *et al.* Pink1-deficiency in mice impairs gait, olfaction and serotonergic innervation of the olfactory bulb. *Experimental neurology* **235**, 214-227, doi:10.1016/j.expneurol.2012.01.002 (2012).
- 43 Smidt, M. P. & Burbach, J. P. How to make a mesodiencephalic dopaminergic neuron. *Nature reviews. Neuroscience* **8**, 21-32, doi:10.1038/nrn2039 (2007).
- 44 Blaess, S. & Ang, S. L. Genetic control of midbrain dopaminergic neuron development. *Wiley interdisciplinary reviews. Developmental biology* **4**, 113-134, doi:10.1002/wdev.169 (2015).
- 45 Nunes, I., Tovmasian, L. T., Silva, R. M., Burke, R. E. & Goff, S. P. Pitx3 is required for development of substantia nigra dopaminergic neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 4245-4250, doi:10.1073/pnas.0230529100 (2003).
- 46 Fuchs, J. *et al.* The transcription factor PITX3 is associated with sporadic Parkinson's disease. *Neurobiology of aging* **30**, 731-738, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.08.014 (2009).
- 47 Bergman, O. *et al.* PITX3 polymorphism is associated with early onset Parkinson's disease. *Neurobiology of aging* **31**, 114-117, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2008.03.008 (2010).
- 48 Hwang, D. Y. *et al.* 3,4-dihydroxyphenylalanine reverses the motor deficits in Pitx3-deficient aphakia mice: behavioral characterization of a novel genetic model of Parkinson's disease. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **25**, 2132-2137, doi:10.1523/JNEUROSCI.3718-04.2005 (2005).
- 49 Hwang, D. Y., Ardayfio, P., Kang, U. J., Semina, E. V. & Kim, K. S. Selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra of Pitx3-deficient aphakia mice. *Brain research. Molecular brain research* **114**, 123-131 (2003).
- 50 van den Munckhof, P., Gilbert, F., Chamberland, M., Levesque, D. & Drouin, J. Striatal neuroadaptation and rescue of locomotor deficit by L-dopa in aphakia mice, a model of Parkinson's disease. *Journal of neurochemistry* **96**, 160-170, doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03522.x (2006).
- 51 Jiang, C. *et al.* Age-dependent dopaminergic dysfunction in Nurr1 knockout mice. *Experimental neurology* **191**, 154-162, doi:10.1016/j.expneurol.2004.08.035 (2005).
- 52 Oh, S. M. *et al.* Combined Nurr1 and Foxa2 roles in the therapy of Parkinson's disease. *EMBO molecular medicine* **7**, 510-525, doi:10.15252/emmm.201404610 (2015).
- 53 Kadkhodaei, B. *et al.* Transcription factor Nurr1 maintains fiber integrity and nuclear-encoded mitochondrial gene expression in dopamine neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 2360-2365, doi:10.1073/pnas.1221077110 (2013).
- 54 Ekstrand, M. I. & Galter, D. The MitoPark Mouse - an animal model of Parkinson's disease with impaired respiratory chain function in dopamine neurons. *Parkinsonism & related disorders* **15 Suppl 3**, S185-188, doi:10.1016/S1353-8020(09)70811-9 (2009).
- 55 Li, X. *et al.* Cognitive dysfunction precedes the onset of motor symptoms in the MitoPark mouse model of Parkinson's disease. *PLoS one* **8**, e71341, doi:10.1371/journal.pone.0071341 (2013).
- 56 Haubenberger, D. *et al.* Association of transcription factor polymorphisms PITX3 and EN1 with Parkinson's disease. *Neurobiology of aging* **32**, 302-307, doi:10.1016/j.neurobiolaging.2009.02.015 (2011).
- 57 Sonnier, L. *et al.* Progressive loss of dopaminergic neurons in the ventral midbrain of adult mice heterozygote for Engrailed1. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* **27**, 1063-1071, doi:10.1523/JNEUROSCI.4583-06.2007 (2007).
- 58 Chu, Y. *et al.* Alterations in axonal transport motor proteins in sporadic and experimental Parkinson's disease. *Brain : a journal of neurology* **135**, 2058-2073, doi:10.1093/brain/aws133 (2012).
- 59 Cronin, K. D. *et al.* Expansion of the Parkinson disease-associated SNCA-Rep1 allele upregulates human alpha-synuclein in transgenic mouse brain. *Human molecular genetics* **18**, 3274-3285, doi:10.1093/hmg/ddp265 (2009).
- 60 Emmer, K. L., Waxman, E. A., Covy, J. P. & Giasson, B. I. E46K human alpha-synuclein transgenic mice develop Lewy-like and tau pathology associated with age-dependent, detrimental motor impairment. *The Journal of biological chemistry* **286**, 35104-35118, doi:10.1074/jbc.M111.247965 (2011).

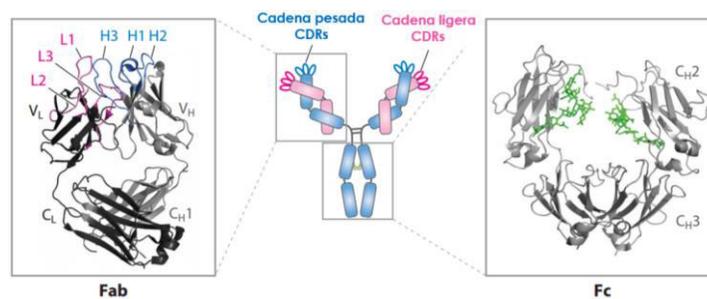
## ESTUDIOS PRECLÍNICOS PARA LA EVALUACIÓN DE ANTICUERPOS MONOCLONALES USADOS COMO INMUNOMODULADORES

*Elia Reza, Mirna Burciaga, Omar García, Tanya Camacho*

### INTRODUCCIÓN. Definición de Anticuerpos monoclonales y de inmunomodulador.

Los anticuerpos son proteínas producidas por los vertebrados en respuesta a la exposición a antígenos. Son la forma secretada y soluble de los receptores de células B (Kathryn, 2015). Estas proteínas, presentan gran diversidad y juegan un papel central en la inmunidad humoral, debido a su capacidad para unirse a los antígenos con alta afinidad y especificidad, así como el rol que presentan como moléculas adaptadoras y reclutadoras de células inmunes para que se lleven a cabo diversas funciones efectoras. Existen cinco clases principales de anticuerpos en el humano: IgA, IgD, IgE, IgG, y IgM. Las IgG, constituyen aproximadamente el 75% del repertorio de inmunoglobulina sérica, siendo la clase más abundante de anticuerpos (Kathryn E, 2015).

En general, los anticuerpos están formados por cuatro cadenas de polipéptido: dos cadenas ligeras y dos cadenas pesadas, y puede considerarse que forman una estructura en forma de una Y flexible (Figura 1). Cada una de las cadenas en su amino terminal, tiene su respectiva región variable (V), que contribuye al sitio de unión a antígeno. Además, tienen una región constante (C), que determina el isotipo del anticuerpo. Las cadenas ligeras están unidas a las cadenas pesadas mediante interacciones no covalentes y enlaces disulfuro. Las regiones V de las cadenas pesadas y ligeras, establecen pares en cada brazo de la Y para crear dos sitios idénticos de unión a antígenos (Murphy et al., 2009). El tronco de la Y es llamado fragmento Fc y está compuesto de los dominios del grupo carboxilo terminal de las cadenas pesadas. Las regiones bisagra, difieren entre anticuerpos de isotipo, lo que determina sus propiedades funcionales. La estructura tridimensional de las inmunoglobulinas les confiere un carácter multifuncional, siendo ésta una de las numerosas razones para el interés generalizado en el uso de anticuerpos monoclonales (mAb) como agentes terapéuticos (Abbas et al., 2007; Murphy et al., 2009).



**Figura 1.** Estructura molecular de una inmunoglobulina IgG1. Las IgG consisten de dos cadenas pesadas (azul) y dos cadenas ligeras (rosa). *Izquierda:* Estructura cristalina de un Fab (PDB: 3NZ8). *Derecha:* Estructura cristalina de un fragmento Fc (PDB: 1E4K) (Modificada de Kathryn, 2015).

Cuando se habla de los anticuerpos monoclonales (mAb), se hace referencia a aquella inmunoglobulina secretada por una población idéntica de células o clones. La mayoría de los mAb, son producidos por líneas celulares de hibridoma a través de la inmortalización de linfocitos B con células de mieloma, donde la fusión es estimulada químicamente. De tal forma que los mAb, son homogéneos en estructura y especificidad de unión. Aunque la técnica de hibridoma es ampliamente empleada, existen otras variantes que permiten la obtención de anticuerpos monoclonales, por ejemplo, el despliegue en fagos, el despliegue en levaduras, el despliegue en ribosomas, entre otros. Dentro de las ventajas de estas técnicas se encuentran: una reducción en el tiempo de obtención de los anticuerpos y una reducción en costos de producción. Adicionalmente, se han desarrollado diversos formatos de anticuerpos empleando diferentes estrategias de multimerización (Figura 2).

Desde la década de los 80, los mAb han sido aceptados para su uso en humanos como inmunomoduladores, ofreciendo un nuevo enfoque para el tratamiento de enfermedades infecciosas, alérgicas y autoinmunes, así como en el tratamiento contra tumores (Mateos M, 2006). Cabe mencionar, que el mercado de los mAbs se ha visto influenciado positivamente, de tal forma que en las últimas décadas, la tasa de aprobación de productos y las ventas de mAbs ha incrementado de manera sorprendente. De acuerdo a Ecker et al. (2015) durante el año 2013, los productos de mAbs representaron casi la mitad de ventas globales de todos los productos biofarmacéuticos, con aproximadamente \$75 millones de dólares (Tabla I).

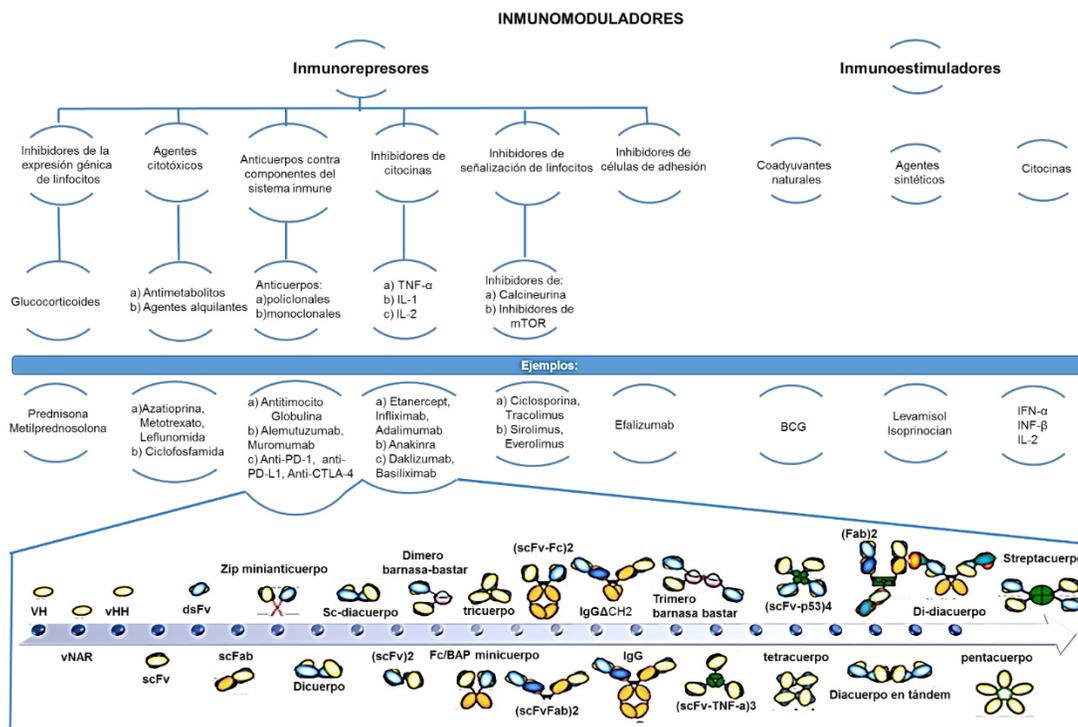
Marca (Denominación Común Internacional, INN)	Solicitante de BLA/MMA	Compañía que reporta la venta	Año de aprobación	Ventas globales en 2013 (millones de dólares)
<b>Actemra® (tocilizumab)</b>	Roche	Roche	2009	1,119
<b>Adcetris® (brentuximab vedotin)<sup>a</sup></b>	Seattle Genetics	Seattle Genetics	2011	253
<b>Alprolix®<sup>b</sup></b>	Biogen Idec	Biogen Idec	2014	-
<b>Arcalyst®<sup>c</sup> (rilonacept)</b>	Regeneron Pharmaceuticals	Regeneron Pharmaceuticals	2008	17
<b>Avastin® (bevacizumab)</b>	Genentech	Roche	2004	6,748
<b>Cimzia® (certolizumab pegol)<sup>d</sup></b>	UCB	UCB	2008	789
<b>Eloctate®<sup>e</sup></b>	Biogen Idec	Biogen Idec	2014	-
<b>Enbrel®<sup>f</sup> (etanercept)</b>	Immunex	Amgen	1998	8,235
<b>Eylea®<sup>g</sup> (aflibercept)</b>	Pharmaceuticals Bayer	Pharmaceuticals Bayer	2011	1,851
<b>Herceptin® (trastuzumab)</b>	Genentech	Roche	1998	6,559
<b>Humira® (adalimumab)</b>	Abbott Laboratories	AbbVie	2002	10,659
<b>Inflectra™<sup>q r</sup> (infliximab)</b>	Hospira	N/A	2013	<1
<b>Lucentis® (ranibizumab)</b>	Genentech	Roche	2006	4,205
<b>Nulojix®<sup>k</sup> (belatacept)</b>	Bristol-Myers Squibb	Bristol-Myers Squibb	2011	26
<b>Orencia®<sup>l</sup> (abatacept)</b>	Bristol-Myers Squibb	Bristol-Myers Squibb	2005	1,444
<b>Xolair® (omalizumab)</b>	Genentech	Roche	2003	14,565
<b>Xolair® (omalizumab)</b>	Genentech	Roche	2003	1,465
<b>Zaltrap®<sup>n</sup> (ziv-aflibercept)</b>	Sanofi Aventis	Sanofi	2012	70
<b>Unituxin® (Dinutuximab)</b>	United Therapeutics	United Therapeutics	2015	-
<b>Repatha® (Evolocumab)</b>	Amgen Inc	Amgen Inc	2015	-
a) Anticuerpo conjugado a droga, MMAE. b) Fc Proteína de fusión, Fc-Factor IX. c) Fc Proteína de fusión, Fc-IL1R. d) Fab Conjugado, PEG (producido por fermentación microbiana). e) Fc Proteína de fusión, Fc-Factor VIII. f) Fc Proteína de fusión, Fc-TNFR (p75). g) Fc Proteína de fusión, Fc-VEGFR. h) Anticuerpo biosimilar.		i) Anticuerpo conjugado a droga, DM1. j) Fc Proteína de fusión, Fc-TPO-R unión a péptido (producido por fermentación microbiana). k) Fc Proteína de fusión, Fc-CTLA-4 con sustituciones aminoacídicas. l) Fc Proteína de fusión, Fc-CTLA-4. m) Biespecíficos, anticuerpo tri-funcional. n) Fc Proteína de fusión, Fc-VEGFR. Anticuerpo Conjugado, Y-90. - No se cuenta con información		

**Tabla I.** Listado de anticuerpos monoclonales aprobados por FDA y empleados en humanos. BLA: licencia biológica; MMA: autorización de comercialización. (Modificado de Ecker et al., 2015; Cai et al., 2016).

Los inmunomoduladores, son sustancias que presentan la capacidad de modular la respuesta inmune, ya sea estimulándola (inmunoestimulador) o suprimiéndola

(inmunosupresor) (Nagarathna et al., 2013). Actúan a diferentes niveles del sistema inmune y frecuentemente, en el tratamiento de los pacientes son empleados en combinación con la quimioterapia y/o la radioterapia. Pese a la investigación científica que se ha llevado a cabo en años recientes, sigue siendo evidente la necesidad de desarrollar agentes que puedan inhibir o intensificar selectivamente poblaciones o subpoblaciones de células para activar la respuesta inmune, tales como: linfocitos, macrófagos, neutrófilos, células asesinas (NK) y linfocitos citotóxicos; o para producir mediadores solubles, por ejemplo las citocinas. Motivo por el cual, la inmunología experimental se ha adentrado en investigaciones dirigidas a, conseguir y evaluar nuevas sustancias con actividad inmunomoduladora, como es el caso de los antisueros policlonales y de los anticuerpos monoclonales. Muchos productos de anticuerpos están diseñados para modular las vías de señalización mediante la unión a receptores celulares (Figura 2), con lo cual se da la activación o el bloqueo de eventos río abajo, y/o se regulan funciones efectoras de los anticuerpos. Los resultados históricos más relevantes se han obtenido por el uso de los anticuerpos anti-TNF $\alpha$  principalmente Infliximab, Adalimumab y Certolizumab Pegol. Estos anticuerpos, se unen a la citocina soluble o a su receptor, disminuyendo ya sea de forma localizada o sistémica la concentración de TNF $\alpha$  y por lo tanto la inflamación. Sin embargo, debido a la función proinflamatoria de TNF $\alpha$  en el sistema inmune del paciente, causar una inmunosupresión total puede ocasionar efectos secundarios como la reactivación de tuberculosis latente, infecciones de histoplasmosis, listeriosis, aspergilosis, candidiasis, neumonía y coccidiomicosis.

Por este motivo, es necesario realizar modificaciones a los formatos de los anticuerpos, además de sus propiedades como: maduración de la afinidad, la "humanización" que consiste en modificar aminoácidos específicos con base en las secuencias de los anticuerpos humanos. Otras estrategias incluyen la disminución del tamaño del anticuerpo, la eliminando la región Fc y el mantenimiento al mínimo el sitio de reconocimiento del epítopo (anticuerpos de dominio sencillo vH de humano).



**Figura 2.** Clasificación de los inmunomoduladores, así como diversos formatos de anticuerpos que pueden ser generados y empleados con aplicaciones terapéuticas o diagnósticas. Se muestra la clasificación según su peso molecular. (Modificado de Kathryn, 2015; Katzung et al., 2009; Rang et al., 2007; Callahan, et al., 2010; Phillips et al., 2014).

### Objetivos del estudio preclínico de anticuerpos inmunomoduladores

Hoy en día, una gran cantidad de los mAbs terapéuticos han sido modificados para incorporarles características únicas con el fin de reducir la inmunogenicidad y mejorar su función efectora hacia su blanco (Schrama et al., 2006). Aunado a la obtención de anticuerpos monoclonales por producción recombinante en diversas líneas celulares, conlleva a la necesidad de evaluar la seguridad de éstas moléculas desde los ensayos preclínicos. Por lo tanto, se han establecido como principales objetivos de estos estudios: 1) Definir las propiedades toxicológicas del mAb de interés y proporcionar información para su desarrollo, 2) Identificar los órganos diana para determinar la toxicidad y si es reversible después del tratamiento, 3) Identificar una dosis inicial segura para los humanos que participan en los ensayos clínicos de Fase I y los esquemas de escalamiento de dosis posteriores, 4) Proporcionar información para monitorear los parámetros de seguridad en los ensayos clínicos y 5) Proporcionar datos de seguridad para respaldar las afirmaciones sobre el etiquetado del producto (Cavagnaro et al., 2008).

Con el fin de cumplir los objetivos anteriormente mencionados, se recomienda que durante el desarrollo de éstos productos terapéuticos se tome en consideración: 1) el plan de trabajo para la caracterización del mAb de interés, mediante ensayos de identidad, pureza, seguridad y potencia, con el fin de conocer los cambios inherentes del complejo biológico (anticuerpo-antígeno-células o alguna otra molécula a la cual este conjugado); las

propiedades farmacológicas del anticuerpo (citotoxicidad, afinidad y sitio de unión al blanco); la relación dosis-respuesta, la estimación de parámetros farmacocinéticos y la definición del diseño para los ensayos clínicos (Lynch et al., 2009, Vatsan et al., 2013); 2) La planeación del desarrollo y optimización de estudios de seguridad preclínicos para determinar la dosis necesaria de mAbs, así como las concentraciones de mAbs en sueros de animales tratados en ensayos de farmacocinética y toxicocinética mediante ensayos de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay); así también, 3) Detectar mediante ensayos de inmunogenicidad la respuesta inmune inducida por los mAbs si son administrados en dosis repetidas (Lynch et al., 2009). La evaluación de la respuesta inmune y los efectos adversos provocados por la administración de mAbs en los estudios preclínicos es de suma importancia en cuestión de seguridad. Estos estudios, se consideran una base científica relevante para los ensayos clínicos, debido a que nos aporta datos predictivos de la respuesta en humanos. Con esto, se logran minimizar los riesgos inherentes de las reacciones adversas. Además, permite definir los esquemas de dosis, seguridad y monitoreo durante los ensayos clínicos (Brennan et al., 2010; Mould y Meibohm, 2016).

#### Elección del modelo preclínico

Los estudios iniciales pueden ser realizados *in silico*, *in vitro*, *ex vivo* con células o tejidos animales o en tejidos humanos, e *in vivo* con un modelo animal relevante (Brennan et al., 2004). La elección del modelo preclínico dependerá del blanco molecular de interés y este debe presentarse o sobreexpresarse en el modelo elegido. Además, el modelo debe mantener un perfil de reactividad cruzada similar a los humanos y debe permitir que el mAbs sea farmacológicamente activo (Hall et al., 2008).

Para realizar un análisis de predicción de identidad, homología o toxicidad comparando con bases de datos de proteínas humanas se puede emplear la aproximación *in silico*. Para observar la especificidad, el efecto de toxicidad del mAbs con las diversas formulaciones generadas y no se cuente con un modelo animal relevante a la enfermedad, se puede emplear la aproximación *in vitro*. Si se desea observar el efecto farmacodinámico y toxicocinético de la formulación y obtener la estimación de la primera dosis en humanos mediante los métodos NOEL (Nivel sin efecto adverso observable) y MABEL (nivel de dosis anticipado que produce un efecto biológico mínimo) se puede emplear la aproximación *in vivo* (EMA 2007; COFEPRIS, 2014).

Otra de las consideraciones primordiales en el diseño del estudio preclínico es la elección de la especie animal en modelos *in vivo* que permita evaluar la seguridad de los mAbs. Entre las especies más ampliamente usadas, se encuentran los roedores y los primates no humanos. Estas especies, deben expresar el antígeno blanco y despertar una respuesta farmacológicamente como la esperada en los humanos, es decir, el modelo animal debe simular el padecimiento y la respuesta del humano. Los roedores, se consideran necesarios para caracterizar y obtener el estándar científico y normativamente aceptable en algunas enfermedades, como la artritis reumatoide o algunos tumores. Actualmente, se emplean ratones transgénicos o knockout, para obtener una expresión apropiada de los blancos humanos de interés (Chapman et al., 2009). Sin embargo, los estudios en primates no humanos por ejemplo los monos *Cynomolgus*, *Rhesus* y *Callithrix* son los más requeridos. Debido a su proximidad evolutiva con los humanos, las funciones de su sistema inmune innato y adaptativo son comparables. Además, son naturalmente infectados por patógenos

similares a los que afectan a humanos y el tamaño del organismo permite el muestreo frecuente de sangre para su análisis (Hart et al., 2015).

Existen varias agencias regulatorias internacionales que dictaminan la normatividad para regular y evaluar la producción de mAbs (Tabla II). La finalidad de la regulación es proveer información útil para la manufactura (FDA-PCT, 1997), ensayos de seguridad (ICH S6, 2011), ensayos de inmunotoxicidad (ICH S8, 2005), duración recomendada de los ensayos en las diferentes fases de desarrollo (ICH M3-R2; 2010), monitoreo, documentación y reporte de datos (EMA, 2007). En nuestro país, en la Ley General de Salud y la NOM-EM-001-SSA1-2012 establecen de manera general, las directrices para la fabricación y evaluación de la seguridad de mAbs que están considerados como biofármacos.

Tipo de documento	Nombre del documento	Autoridad que lo implementa	Año de actualización
<b>Normas internacionales</b>			
ICH S6	Preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals	EMA/FDA/MHLW/JPMA/ Health Canada/Swissmedic	2011
ICH M3	Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals M3(R2)	EMA/FDA/MHLW/JPMA/ Health Canada/Swissmedic	2010
ICH S9	Nonclinical evaluation for anticancer pharmaceuticals S9	EMA/FDA/MHLW/JPMA/ Health Canada/Swissmedic	2009
ICH S8	Note for guidance on immunotoxicity studies for human pharmaceuticals	EMA/FDA/MHLW/JPMA	2005
ICH S5a	Detection of toxicity to reproduction for medicinal products & toxicity to male fertility S5(R2)	FDA/MHLW/JPMA	2005
ICH S4	Duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non rodent toxicity testing) S4	EMA/FDA/MHLW/JPMA/ Health Canada/Swissmedic	1998
Reporte Técnico	Technical Report Series 822 Annex 3	WHO	1992
<b>Normas Estadounidenses</b>			
FDA PCT	Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use	FDA	1997
CFR	21CFR58:Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory studies	FDA	2004
CDER	Immunotoxicology Evaluation of Investigational New Drugs	FDA	2002
<b>Normas Europeas</b>			
EMA	Concept paper on immunogenicity assessment of monoclonal antibodies intended for <i>in vivo</i> clinical use	EMA/CHMP/BWP	2009
EMA	Guideline on development, production, characterization and specification for monoclonal antibodies and related products	EMA/CHMP/BWP	2007
EMA	Guideline on immunogenicity assessment of biotechnology-derived therapeutic proteins	EMA/CHMP/BWP	2006
<b>Normas Japonesas</b>			
Proyecto de guía	Draft Guidance for Immunotoxicity Testing	MHLW/JPMA	2001
<small>ICH:International Council for Harmonisation of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use, FDA: Food and Drug Administration, EMA: European Medicines Agency, CHMP: Committee for Human Medicinal Products, BWP: Biotechnology Working Party, MHLW/JPMA: Ministry of Health, Labour and Welfare/Japan Pharmaceutical Manufacturers Association, WHO: World Health Organization, CFR: Code of Federal Regulations, CDER: Center for Drug Evaluation and Research. (Modificado de Chapman et al., 2009, Lynch et al., 2009, Mould y Meibohm, 2016.)</small>			

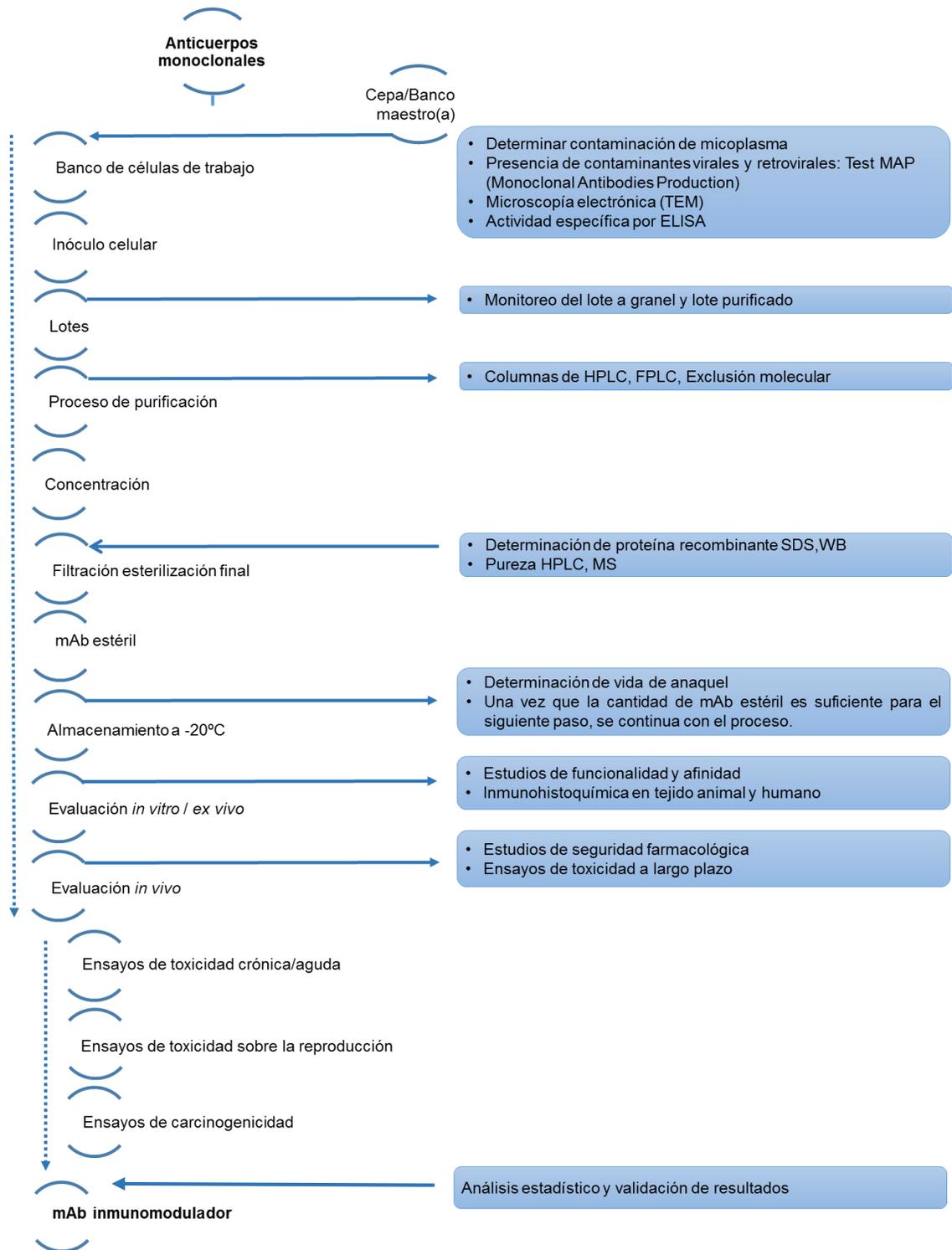
**Tabla II.** Resumen de las normativas internacionales para el desarrollo y evaluación de la seguridad preclínica de anticuerpos monoclonales (Modificado de Chapman et al., 2007).

## Desarrollo del estudio preclínico

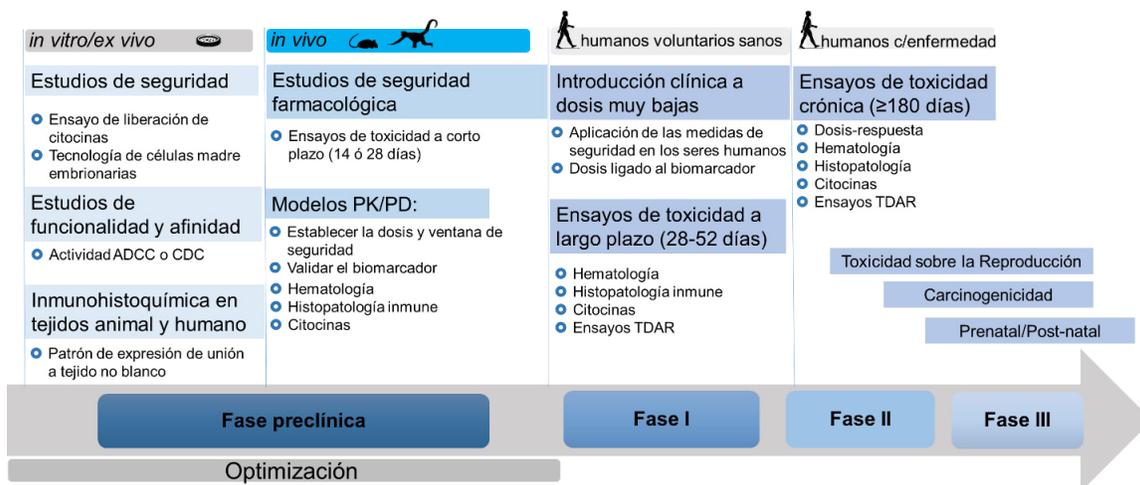
La producción por la tecnología de hibridomas para obtener los mAbs, inicia con la preparación de bancos de trabajo que permitirán tener una fuente confiable y continua de células para producir el mAb de manera homogénea y estable entre lotes. Es también recomendable preparar bancos maestros y bancos de trabajo del vector si fuera el caso, además de establecer pruebas de estabilidad genética del sistema de expresión. Se realiza una transformación o transfección del vector en líneas celulares inmortalizadas humanas, en levaduras, bacterias o células de insecto, dependiendo de las características del anticuerpo monoclonal inmunomodulador y de la estrategia de producción que se va seguir. Es indispensable mantener las Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP) para evitar contaminaciones en el proceso de producción. Una vez bien caracterizado el bioproceso, se prosigue con la purificación del anticuerpo que permite eliminar proteínas animales, ADN, endotoxinas, pirógenos, restos de los componentes del medio de cultivo, de la columna de purificación y de virus (Figura 3).

Se continúa con la caracterización de la integridad de la estructura, la especificidad y la potencia del anticuerpo monoclonal, para descartar proteólisis o pérdida de la afinidad y determinar mediante ensayos de unión, su actividad y función *in vitro* como *in vivo*. Los ensayos de inmunohistoquímica y citoquímica *in vitro*, se realizarán en células o tejidos que sean específicos al antígeno de interés y que permitan determinar el efecto y reactividad cruzada de los mAbs. Generalmente, se analizan los tejidos de pulmón, hígado, riñón, vejiga, bazo, estómago, intestino, páncreas, tiroides, suprarrenales, hipófisis, cerebro, corazón, ovario, testículo, piel, vasos sanguíneos, etc. (EMA, 1995). Para los estudios *in vivo*, se usan generalmente roedores y primates no humanos, que deben ser modelos de la enfermedad a tratar para llevar a cabo ensayos de toxicidad y determinación de esquemas de escalamiento de dosis.

Estos estudios preclínicos, son la base para continuar con los estudios farmacológicos de los mAbs en humanos. Los estudios clínicos, pueden ser categorizados en fase clínica I, II y III y se inician una vez que se cuenta con el sólido soporte de los resultados obtenidos en la fase preclínica. El objetivo final de los ensayos clínicos incluye determinar fielmente los mecanismos de acción, la farmacocinética y la toxicología del mAbs de interés (Figura 4).



**Figura 3.** Diagrama general de proceso para la generación de anticuerpos monoclonales inmunomoduladores.



**Figura 4.** Representación esquemática de ensayos preclínicos y ensayos clínicos para el desarrollo de mAbs con efecto inmunomodulador. ADCC: Citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos, CDC: Citotoxicidad dependiente de complemento; PK/PD: Farmacocinética y Farmacodinamia. (Modificado de Chapman et al., 2007; Mould y Meibohm, 2016).

### Análisis estadísticos o validación de resultados.

Para el caso de los modelos estadísticos relacionados a la evaluación de fármacos, la FDA recomienda para procedimientos generales, aplicar modelos lineales para el análisis de los datos farmacocinéticos derivados de los estudios de bioequivalencia *in vivo*. Además, sugiere realizar un análisis de varianza (ANOVA) en los parámetros farmacocinéticos, y el uso de modelos estadísticos apropiados al diseño del estudio de bioequivalencia en caso que este aplique (FDA, 2001). Adicionalmente, se recomienda revisar la información publicada por Knezevica y colaboradores (2015), donde se detallan dos escenarios hipotéticos de anticuerpos monoclonales que cuentan con un bioequivalente en el mercado y que puede ser empleado como un ejemplo de experimentos a seguir y del análisis estadístico que aplica.

Por otra parte, para la evaluación específica de mAbs, la Organización Mundial de la Salud (OMS), recomienda realizar *estudios farmacocinéticos comparativos* y especifica que éstos deben realizarse para confirmar la comparabilidad de los productos bioterapéuticos que existen en el mercado (que pueden ser usados como mAb de referencia) y que tienen una función similar a la del mAb de interés. Adicionalmente, deben realizarse a través de estudios estructurales, funcionales y preclínicos comparativos. En algunas ocasiones, pueden ser necesario realizar *estudios farmacocinéticos comparativos independientes*, que permitan conectar varias condiciones que han sido autorizadas para el mAb de referencia. Otro estudio que se recomienda es el *estudio farmacocinética (PK) de dosis única* aplicado a voluntarios sanos, ya que se puede considerar como una población homogénea sensible. Uno de los modelos quizá más apropiados para la evaluación de mAbs es el *diseño de grupos paralelos* en el cual se emplea un grupo control y un grupo placebo, considerando

un número estadísticamente significativo de pacientes, lo cual suele ser complicado cuando se pretende tratar una enfermedad rara (WHO, 2016).

### **Conclusiones y perspectivas**

A medida que se han desarrollado y comercializado diversos mAbs, se ha generado valioso conocimiento sobre el proceso de producción de anticuerpos monoclonales inmunomoduladores, lo cual ha permitido generar un clima de confianza en relación a las aprobaciones de las autoridades reguladoras globales respecto a los mAbs terapéuticos, razón por la cual constituyen la principal clase de biofarmacéuticos a nivel mundial y la de mayor venta.

Durante el proceso de evaluación preclínica de los mAbs inmunomoduladores, la selección de los modelos que se emplearán es importante y deben representar la patología que se quiere tratar en los humanos. Por lo tanto, no debe perderse de vista que la correcta selección del modelo preclínico, permitirá la identificación de las vías de administración, los tiempos de muestreo, el tratamiento adecuado de las muestras y de los organismos dentro del estudio, la determinación de la toxicidad, la farmacocinética y la farmacodinamia, así como la aplicación de los análisis estadísticos. Sumado a la validación de la sensibilidad y especificidad de los anticuerpos monoclonales, estos resultados proporcionarán la robustez necesaria para lograr pasar de una prueba de concepto a un medicamento terapéutico efectivo.

Son claros los avances que se han realizado en el diseño, evaluación y empleo terapéutico de diversos formatos de anticuerpos monoclonales que son usados como inmunomoduladores. Sin embargo, debido a que es posible que el blanco terapéutico tenga más de una función (por ejemplo las citocinas o algunos receptores de membrana), puede existir un efecto negativo en la respuesta inmune del paciente al recibir un inmunosupresor o un inmunomodulador. Entonces, es necesario continuar con la búsqueda de nuevos biomarcadores que sean específicos de enfermedad y que puedan ser simulados en modelos experimentales similares a los humanos.

El uso de tecnologías cada vez más avanzadas y sofisticadas permite que la producción y evaluación de estos productos continúe. Además, es evidente la necesidad de contar con una guía de consulta rápida sobre el proceso de evaluación de los mAbs desde etapas iniciales hasta llegar a su evaluación clínica, sin embargo, el proceso de evaluación está plenamente relacionado con el blanco molecular del anticuerpo monoclonal. Este capítulo, permite hacer un acercamiento a las consideraciones generales para satisfacer tal necesidad.

## REFERENCIAS

1. Abbas, A., Lichtman A., Pillai S. Inmunología celular y molecular. Reconocimiento de antígenos. Elsevier Saunders. Ed. 6ª edición. 77–94. (2007).
2. Brennan, F. R. et al. Safety and immunotoxicity assessment of immunomodulatory monoclonal antibodies. *MAbs*. **2**, 233–255 (2010).
3. Brennan, F.R. et al. Preclinical safety testing of biotechnology-derived pharmaceuticals: understanding the issues and addressing the challenges. *Mol Biotechnol*. **1**, 59–74 (2004).
4. Cai, H. Therapeutic Monoclonal Antibodies Approved by FDA in 2015. *MOJ Immunol* **3**, 2 (2016).
5. Callahan, K. Wolchok J. Anti-CTLA-4 Antibody Therapy: Immune Monitoring During Clinical Development of a Novel Immunotherapy. *Semin Oncol*. **37**, 473–484 (2010).
6. Cavagnaro, J. A. The principles of ICH S6 and the case-by-case approach. In: Cavagnaro JA, editor. Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken. NJ: Wiley. 45–65 (2008).
7. Chapman, K. et al. Preclinical safety testing of monoclonal antibodies: the significance of species relevance. *Nat Rev Drug Discov*. **2**, 120–6 (2007).
8. Chapman, K. et al. Preclinical development of monoclonal antibodies: Considerations for the use of non-human primates. *MAbs* **1**, 505–516 (2009).
9. COFEPRIS. Guía para establecer la biocomparabilidad de los medicamentos biotecnológicos que contengan como biofármaco RITUXIMAB. (2014).
10. Cordova, A. Los inmunomoduladores frente a la inflamación y daño muscular originados por el ejercicio. *Elsevier Doyma*. **45**. 265–270 (2010).
11. Ecker DM, Jones SD, Levine HL. The therapeutic monoclonal antibody market. *MAbs* 7(1): 9–14 (2015).
12. Food and Drug Administration (FDA). Guidance' for Industry Statistical Aspects of the Design, Analysis, and Interpretation of Chronic Rodent Carcinogenicity Studies of Pharmaceuticals. U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) (2001).
13. Hall, WC, Price-Schiavi SA, Wicks J, Rojko JL. Tissue cross-reactivity studies for monoclonal antibodies: Predictive value and use for selection of relevant animal species for toxicity testing. In: Cavagnaro JA, editor. Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals. Hoboken. *John Wiley and Sons Inc*. 207–240 (2010).
14. Hart, BA, Bogers, WM, Haanstra, KG, Verreck, FA, Kocken, CH. The translational value of non-human primates in preclinical research on infection and immunopathology. *Eur. J. Pharmacol*. **759**, 69–83 (2015).
15. ICH M3 (R2) Guideline: Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorisation for Pharmaceuticals. (2010).
16. Tiller KE and Tessier PM. Advances in Antibody Design. *Annual Rev. Biomed. Eng*. **17** (8); 191–216 (2015).
17. Katzung GB, Trevor JA. *Basic and Clinical Pharmacology*. Ed. 11. 363–435 (2009).
18. Knezevica I, Kanga HN, Thorpeb R. Immunogenicity assessment of monoclonal antibody products: A simulated case study correlating antibody induction with clinical outcomes. *Biologicals* **43**(5): 307–317 (2015).
19. Lynch, C. M., Hart, B. W. & Grewal, I. S. Practical considerations for nonclinical safety evaluation of therapeutic monoclonal antibodies. *MAbs* **1**, 2–11 (2009).
20. Mateos, M. Inmunomoduladores: anticuerpos monoclonales, inhibidores de la calcineurina. Avances en el tratamiento con base inmunológica. *Allergol et Immunopathol*. **34**, 23–45 (2006).
21. Mould, D. R. & Meibohm, B. Drug Development of Therapeutic Monoclonal Antibodies. *BioDrugs* **30**, 275–293 (2016).
22. Murphy, K. et al. Inmunobiología de Janeway. Reconocimiento de antígenos por receptores de células B y T. McGraw Hill. Ed.7ª edición. 111–118 (2009).
23. Nagarathna, P. Reena K, Sriram R, Johnson W. Review on Immunomodulation and Immunomodulatory Activity of Some Herbal Plants. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. **22** (1) **41**, 223–230 (2013).
24. Norma Oficial Mexicana de Emergencia. NOM-EM-001-SSA1-2012. Diario Oficial de la Federación. 17 de abril de 2012.
25. Phillips, G and Atkins M. Therapeutic uses of anti-PD-1 and anti-PD-L1 antibodies. *The Japanese Society for Immunology*. **27**, 39–46. (2014).

26. Rang, H. and Dale M. Pharmacology. Ed. 6. Churchill *Livingstone Elsevier*. 481-488. (2007).
27. Schrama, D., Reisfeld, R. A. & Becker, J. C. Antibody targeted drugs as cancer therapeutics. *Nat Rev Drug Discov* **5**, 147–159 (2006).
28. Vatsan, R. S. et al. Regulation of immunotherapeutic products for cancer and FDA's role in product development and clinical evaluation. *J. Immunother. Cancer* **1**, 1–16 (2013).
29. Weinberg, W. Frazier M, et al. Development and regulation of monoclonal antibody products: challenges and opportunities. *Cancer and Metastasis Reviews*. **24**, 569–584. (2005).
30. WHO. Guidelines on evaluation of monoclonal antibodies as similar biotherapeutic products (SBPs). (2016).
31. Woburn, M. Bioprocess Technology Consultants: Bioprocess Technology Consultants, Inc . BioTRAK. (2014).

## Capítulo X

### **Estudios preclínicos en un Simulador de Tracto Digestivo Humano ARIS (Automatic and Robotic Intestinal System)**

*Blanca Elizabeth Ruíz Álvarez, María Gretel Michel Barba, Rudy Antonio García Reyes, Nadxeli Saharay Gálvez Álvarez, Ricardo García Gamboa, Melissa Rivera Escoto, Zaira Yunuen García Carvajal, Gerardo Arrevillaga Boni, Marisela González Ávila*

#### Introducción.

La complejidad y dinámica de los procesos que se llevan a cabo en el tracto digestivo humano (TDH), tienen implicaciones esenciales en la fisiología como la digestión de nutrientes, protección contra patógenos y respuesta inmune<sup>1</sup>; en estos procesos la microbiota asociada al tracto gastrointestinal, junto con elementos como la fluidez, movimiento, temperatura, pH así como la liberación de enzimas entre otros, poseen un papel fundamental<sup>2</sup>. Para determinar los posibles efectos que tienen los productos que son ingeridos y procesados en el tracto gastrointestinal, se han utilizado de manera efectiva los estudios clínicos y/o de intervención nutricional que figuran como la manera más certera de reconocer el impacto de la ingestión de alimentos, medicamentos, nutracéuticos, excipientes, probióticos, prebióticos etc<sup>3</sup>. Sin embargo, este tipo de estudios además de resultar muy costosos, son difíciles de controlar y tienen implicaciones éticas e imposibilidades técnicas que han hecho necesario el desarrollado de sistemas y modelos preclínicos *in vivo*, *in vitro*, *ex vivo*, e *in silico* que resultan de gran valor, ya que permiten evaluar monitorear y ajustar los efectos de distintos productos de interés para las industrias alimenticia y farmacéutica principalmente<sup>4</sup>. Estos modelos, sin embargo, tienen limitaciones inherentes a su naturaleza, por ejemplo, los estudios *in vivo* en cualquier modelo animal, presentan condiciones fisiológicas distintas al TDH <sup>5-7</sup>, además de que políticas bioéticas como “el remplazo, reducción y refinamiento” promueven el uso y desarrollo de otros modelos. Algunos de los sistemas más exitosos en su capacidad para reproducir las condiciones ecofisiológicas del TDH son los sistemas combinados de simulación fluida *in vitro* con aislados de microbiota gastrointestinal, destacando los sistemas SHIME (Simulator of the Human Intestinal Microbial Ecosystem) de Prodigest, los sistemas TIM-1 y TIM-2 (TNO intestinal model) de TNO <sup>8</sup> y el sistema ARIS (Automatic and Robotic Intestinal System) de CIATEJ. ARIS permite la simulación de cinco secciones del TDH, estómago, intestino delgado, colon ascendente, colon transversal y colon descendente; cuenta con sistemas de funcionamiento independiente en cada sección diferenciándose de los procesos secuenciales de sistemas similares; adicionalmente utiliza muestras de microbiota

de poblaciones metabólicas definidas (población abierta, infantil, adulta, sobrepeso, atlética etc.)<sup>9</sup>; representada de manera estadísticamente significativa en el concentrado microbiológico de estudio. La correlación entre las dinámicas poblacionales y estructuras filogenéticas de la microbiota intestinal encontrada *in vivo* y las de la microbiota presente en el sistema ARIS es positiva, se mantiene con el tiempo y se modula de manera equivalente a los hallazgos en estudios clínicos. Por las características y origen de la muestra, se considera al sistema ARIS como un modelo *ex vivo* (fig. 1) ya que se encuentra depositado el “órgano” completo, es decir la microbiota intestinal. A través de este sistema, es posible obtener muestreos en cualquier momento del proceso digestivo y en cualquier sección, lo que lo convierte en una herramienta de la que se pueden obtener datos que no pueden ser recuperados en estudios clínicos o intervenciones nutricionales. A continuación, se presentan algunos ejemplos del uso de ARIS como modelo de elección preclínica para realizar estudios de interés de la industria alimenticia y farmacéutica; sin embargo, las posibilidades de este sistema no se limitan a las presentadas en este capítulo, solo se ejemplifica con los siguientes estudios representativos: a) Biodisponibilidad y digestibilidad de alimentos, b) Evaluación de probióticos c) Evaluación de prebióticos y d) Evaluación y validación de sistemas de liberación controlada y encapsulados de compuestos activos.

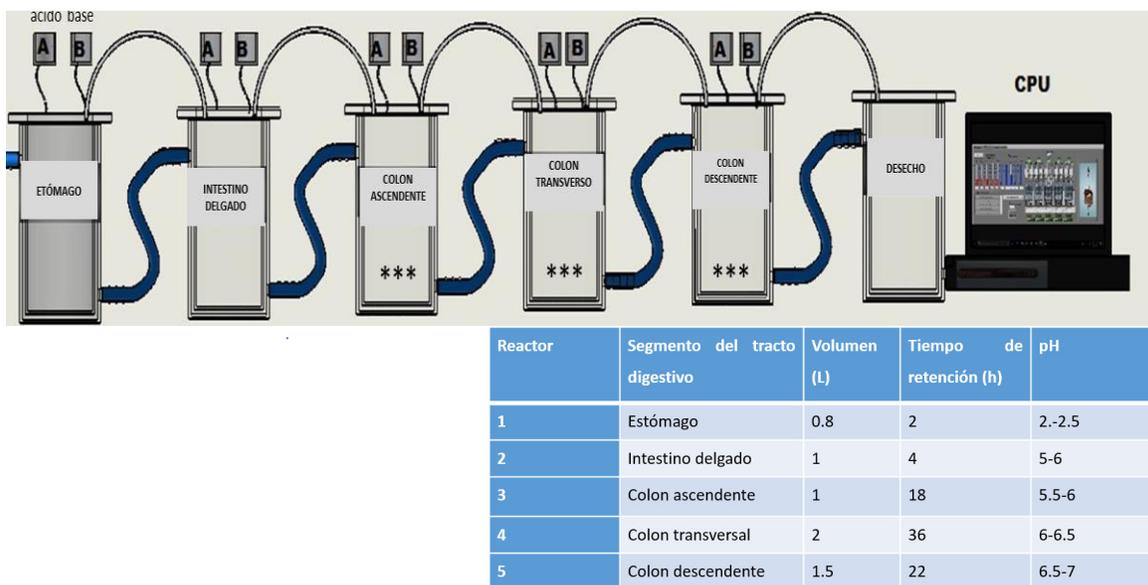


Figura 1.- Representación esquemática del simulador del tracto digestivo humano ARIS ((Automatic and Robotic Intestinal System) y parámetros de operación para una población de estudio, con los que se lleva a cabo el proceso para evaluación de productos en un sistema de digestión normal; los asteriscos (\*\*\*) indican las secciones inoculadas con microbiota intestinal humana, dispensador de ácido (A), dispensador de base (B).

## **BIODISPONIBILIDAD Y DIGESTIBILIDAD DE ALIMENTOS**

La digestión de alimentos resulta esencial en la nutrición, salud y bienestar de los animales en general y del ser humano en particular. El sistema digestivo humano, incluye cuatro etapas operativas fundamentales: el procesamiento oral que permite la reducción del tamaño de las partículas y producción de bolo, el proceso gástrico donde toma lugar la descomposición enzimática, el procesamiento en el intestino delgado donde hay rompimiento de macromoléculas y absorción de nutrientes, y finalmente la etapa de fermentación y remoción de agua que toma lugar en el colon <sup>10</sup>. En el proceso múltiples factores intervienen en la optimización de la obtención de energía como como la producción de saliva, efecto mecánico del procesamiento gástrico, variaciones de pH, liberación enzimática, efectos y cambios en la microbiota, etc <sup>11,12</sup>. La proporción de nutrientes que son digeridos, absorbidos, distribuidos y metabolizados son los nutrientes biodisponibles; la cantidad de nutrientes presentes en una dieta, no reflejan la cantidad que puede ser aprovechada por el organismo <sup>13</sup>. Adicionalmente se debe tomar en cuenta que el proceso digestivo varía entre individuos y poblaciones, la edad, género, clima, hábitos alimenticios, tipo de microbiota y otros factores como patologías. La industria alimenticia y las áreas de la nutrición y salud, requieren sistemas confiables y asequibles que permitan determinar la biodisponibilidad tanto de nutrientes como otros metabolitos (principios activos) de productos específicos para población abierta o con características metabólicas concretas.

### **Objetivo del estudio**

Evaluar la digestibilidad y biodisponibilidad nutrimental de ingredientes o alimentos terminados para uso en humanos con condiciones metabólicas determinadas

### **Elección del modelo preclínico.** Sistema ex vivo ARIS.

Razón: permite evaluar y comparar la cantidad de nutrimentos de un alimento terminado y/o un ingrediente en su presentación final, con la cantidad de nutrimentos susceptibles a ser absorbidos luego de su digestión en cada una de las 5 secciones del tubo digestivo con una administración y/o administración continua del producto de estudio.

### **Desarrollo del estudio y proceso de operación.**

Nota: ver condiciones generales en anexo

El simulador es alimentado cada 24 horas con 200 mL de alimento mezclados con amilasas salivales, éste es estandarizado de acuerdo a los hábitos alimenticios de la población objetivo y se suma el producto a evaluar. El proceso inicia en el estómago donde se mantiene con pH ácido, adición de enzimas pépticas y agitación controlada. Posteriormente la sección del intestino delgado es alimentada con las descargas del estómago se ajusta el pH a condiciones más alcalinas y se adicionan soluciones de pancreatina y bilis, la agitación es controlada. Se continua con el proceso de alimentación en las siguientes tres secciones del colon previamente inoculadas con microbiota intestinal humana, respetando los tiempos de retención fisiológicos en cada sección. Se obtienen muestras de alimento de cada sección del simulador en los días 0 (sin el producto a evaluar), día 4 (digestión completa de una administración) y día 9 (administración continua), tomando en cuenta que una digestión completa de alimento dura 72 hrs. Las muestras se conservan a -20°C para posteriormente realizar la cuantificación de biodisponibilidad de nutrientes.

#### **Recolección, análisis de datos y aseguramiento de calidad.**

Nota: ver condiciones generales en anexo

El análisis de biodisponibilidad de nutrientes requiere la toma de muestras de las 5 secciones del simulador (Estómago, intestino delgado, colon ascendente, transversal y descendente) en diferentes tiempos de administración del producto a evaluar, como control se utiliza la dieta estándar sin el producto y producto a evaluar solo.

El análisis de la biodisponibilidad de carbohidratos, proteínas, grasas, fibra cruda, humedad y cenizas se realiza siguiendo los protocolos oficiales:

- Official methods of analysis, Association of official analytical chemists. 15th Edition, 1990. Volumen I.A.O.A.C. Método 986.25 Carbohydrates, Determination by difference, Proximate Analysis.
- NMX-F-083-1986 Determinación de humedad en productos alimenticios.
- NMX-F-608-NORMEX-2011 Determinación de proteínas en alimentos – Método de prueba.
- NMX-F-607-NORMEX-2013 Determinación de Cenizas en alimentos – Método de prueba.
- NMX-F-615-NORMEX-2004 Determinación de extracto etéreo (método Soxhlet) en alimentos.

- NMX-F-613-NORMEX-2003 Determinación de fibra cruda en alimentos- Método de prueba.

Los aminoácidos libres se determinan por cromatografía líquida de ultra alta presión (UHPLC). La biodisponibilidad de ácidos grasos de cadena corta y media (AGCC (ác. acético, ác. propiónico, ác. butírico, ác. isobutírico y ác. caprónico) y de azúcares (sacarosa, glucosa, fructosa, sucrosa y xilosa) se analizan por cromatografía líquida (HPLC).

### **EVALUACIÓN DE PROBIÓTICOS.**

Los probióticos son definidos como “los microorganismos viables que administrados en suficiente concentración llegan al intestino en estado activo y ejercen un efecto positivo en la salud”. Los géneros *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* contienen a las principales especies de bacterias probióticas conocidas <sup>14,15</sup> Las características que debe tener una bacteria probiotica son la sobrevivida por el tracto gastrointestinal, capacidad de adherirse a las células intestinales, no patógeno, antagonista (prevención de colonización de patógenos por competencia o producción de metabolitos antimicrobiano), crecimiento en el intestino. Los probióticos cuando están metabólicamente activos tienden a producir ácidos grasos de cadena corta y/o bacteriocinas en el intestino, que promueven un ambiente ácido y desfavorable para el crecimiento de microorganismos patógenos. Adicionalmente los ácidos grasos no acumulables tienen un efecto benéfico significativo sobre el control de peso y el Índice de Masa Corporal <sup>17</sup>. La producción de ácidos grasos de cadena corta como el acetato, propionato y butirato es influenciado por el metabolismo de otros microorganismos presentes en el intestino por la competencia de los nutrientes <sup>18</sup>. Las bacteriocinas son péptidos producidos por bacterias activas en contra de otras bacterias y para los que el productor tiene un mecanismo inmune específico. Los efectos de las bacteriocinas en el intestino son como péptidos colonizadores, inhibición de patógenos o señales para comunicación bacteriana <sup>19</sup>. Se han reportado efectos favorables de los probióticos sobre enfermedades infecciosas, como en la prevención y disminución de la diarrea, alivio de la colitis, incremento en la resistencia a infecciones letales por *Salmonella*, *E. coli*, y *L. monocytogenes* <sup>20-22</sup>. La comprensión de la función que los probióticos ejercen sobre el huésped en el mantenimiento de la salud, así como en la prevención y tratamiento de enfermedades, es fundamental para posibilitar su uso y explotación. Las industrias alimentaria y farmacéutica requieren de metodologías que permitan evaluar de manera eficaz y segura bacterias con potencial probiótico tanto en población abierta como en

poblaciones metabólicas determinadas, por ejemplo, la población lactante, diabética, adulta mayor etc.

### **Objetivo del estudio**

Evaluar el potencial probiótico de bacterias o alimentos funcionales con probióticos en un simulador del tracto digestivo humano (ARIS).

### **Elección del modelo preclínico. Sistema ex vivo en ARIS**

Razón: permite dar seguimiento de la bacteria en las cinco secciones del tubo digestivo, determinar su capacidad de sobrevivencia, adaptación, establecimiento, tránsito e incorporación como parte de la microbiota, además de posibilitar la evaluación de su impacto sobre comunidades de bacterias establecidas y de la producción de metabolitos.

### **Desarrollo del estudio**

Una vez realizado el proceso de digestión se obtienen muestras para realizar diferentes ensayos ex sistema. Pruebas de sobrevivencia: Administración y seguimiento de la bacteria por la zona alta del tubo digestivo (estómago e intestino delgado). La viabilidad se mide con microbiología clásica. Esto es con el fin de determinar si el probiótico administrado ha sobrevivido a las condiciones hostiles de estómago e intestino delgado y poder evidenciar un efecto en la sección del tubo digestivo donde ejerce un efecto benéfico. Secreción e identificación de metabolitos por probióticos: Los metabolitos producidos por la bacteria individual y los producidos durante la interacción con la microbiota durante su evaluación en ARIS son identificados por cromatografía líquida de ultra alta eficiencia (UHPLC), los cuales incluyen ácidos grasos de cadena corta y media, nutrimentos disponibles o bacteriocinas. Seguimiento de la bacteria: Identificación de microorganismo durante la digestión por técnicas moleculares como PCR tiempo real. Adhesión bacteriana: Ensayos de adhesión bacterianas de estudio en células de adenocarcinoma de colon.

### **Recolección, análisis de datos y aseguramiento de calidad.**

Nota: ver condiciones generales en anexo

### **EVALUACIÓN DE PREBIÓTICOS.**

Un prebiótico es un ingrediente que fermentado, permite cambios específicos de manera selectiva, tanto en la composición como en la actividad de la microbiota gastrointestinal y que confiere beneficios sobre el bienestar y la salud de hospedero<sup>23</sup>. Los prebióticos deben

cumplir los siguientes criterios: resistencia a la acidez gástrica, a la hidrólisis por las enzimas de mamíferos y a la absorción gastrointestinal; ser fermentado por la microbiota intestinal así como estimular selectivamente el crecimiento y/o actividad de una o un número limitado de especies de bacterias en el colon asociadas con la salud y el bienestar<sup>24</sup>. Los prebióticos son excelentes moduladores de la microbiota intestinal, algunos de los cambios benéficos mejor caracterizados por efecto prebiótico incluyen el aumento de los niveles de bifidobacterias y lactobacilos acompañado de la disminución de bacteria patógenas<sup>25,26</sup>. La fermentación de carbohidratos prebióticos en el tracto gastrointestinal produce metabolitos con actividad biológica importante<sup>25</sup> por ejemplo, los ácidos grasos de cadena corta, tienen un papel importante en el metabolismo, inmunoregulación y en la homeostasis del hospedero. Otros metabolitos significativos son bacteriocinas que influyen directamente en la modulación de la microbiota, al actuar en contra de bacterias, muchas de ellas patógenas que se encuentran en el tracto gastrointestinal<sup>27</sup>. Entre los prebióticos más utilizados se encuentran la inulina, los fructoligosacáridos y los galactoligosacáridos. Hay un gran interés en la investigación e identificación de los prebióticos por parte de las áreas de nutrición y salud, así como de las industria farmacéutica y alimentaria, por lo que se utilizan distintos modelos preclínicos para su estudio (*in vivo*, *in vitro* y *ex vivo*); sin embargo, la mayoría tiene limitaciones en cuanto a su capacidad para reproducir las condiciones del tracto gastrointestinal.

### **Objetivo del estudio**

Evaluación de la asimilación de ingredientes alimenticios (principalmente carbohidratos no digeribles) por bacterias probióticas intestinales, que presenten características prebióticas, tales como; resistencia a hidrolisis enzimática del tracto gastrointestinal alto, alcanzar la sección del colon y ser metabolizados por la microbiota colónica.

### **Elección del método preclínico. Sistema ex vivo en ARIS**

Razón: permite evaluar y comparar el efecto de un prebiótico o una mezcla de estos en distintas dosis y frecuencias de administración sobre las estructuras y comunidades bacterianas en las cinco secciones del tubo digestivo en la microbiota intestinal, además se puede obtener información valiosa como producción de ácidos grasos, bacteriocinas y otros metabolitos de interés.

## **Desarrollo y método de estudio**

Previo a la evaluación en el simulador, se realizan pruebas *in vitro* para determinar que bacterias probióticas y/o patógenas metabolizan el ingrediente, pruebas de reacciones enzimática para determinar en su caso, las enzimas que utiliza determinada bacteria para metabolizar el ingrediente, pruebas de inhibición de crecimiento de bacterias patógenas con probióticos a los que se les administra el ingrediente. Las pruebas anteriores funcionan como método de selección en caso que se requiera elegir un ingrediente para la evaluación en ARIS. Una vez definidas las variables fisiológicas (pH, enzimas temperatura, inóculo, entre otros) y nutricionales de la población blanco, se programa el instrumento (ARIS) tomando en cuenta los resultados de las pruebas preliminares. La microbiota intestinal se inocula en los reactores del colon, el ingrediente se administra en conjunto con la dieta, y sigue un proceso similar al indicado en la sección de pruebas de biodisponibilidad, la administración es dependiente del objetivo del estudio <sup>28</sup>.

## **Recolección, análisis de datos y aseguramiento de calidad.**

Nota: ver condiciones generales en anexo

Se toman muestras en diferentes puntos de corte en las cinco secciones del simulador durante las 72h, que dura un proceso digestivo completo, con el fin de cuantificar la presencia, viabilidad y abundancia relativa de los microorganismos en respuesta al prebiótico. Los datos finales incluyen los referentes a la modificación en la cantidad absoluta y proporción de los distintos grupos bacterianos, generación de metabolitos generados por bacterias intestinales (ácidos grasos de cadena corta, gases, antimicrobianos, entre otros) como control se utiliza la dieta estándar sin el prebiótico a evaluar

## **DISEÑO, EVALUACIÓN Y VALIDACIÓN DE SISTEMAS DE LIBERACIÓN CONTROLADA Y ENCAPSULADOS DE COMPUESTOS ACTIVOS**

Un compuesto activo genera un efecto que puede medirse en un ser vivo, es un ingrediente alimenticio, farmacéutico o nutracéutico; puede variar en sus características moleculares y en sus atributos funcionales. Los compuestos activos se pueden obtener de fuentes naturales o sintetizarse químicamente y se caracterizan a nivel molecular (composición atómica, peso molecular, estructura, polaridad, carga eléctrica, etc.), a nivel fisicoquímico (punto de ebullición, punto de fusión, solubilidad, viscosidad, color, opacidad, oxidación, hidrólisis, etc.) y/o a nivel biológico (interacción con microorganismos, roedores o humanos,

evaluación de actividad prebiótica, actividad antimicrobiana, aroma, sabor o bioactividad). Algunos de los compuestos activos más comunes son los saborizantes, antimicrobianos, antioxidantes, péptidos bioactivos, oligosacáridos, fibras, minerales, vitaminas, lípidos bioactivos<sup>29</sup>.

Una vez que se extraen los compuestos activos surge la necesidad de recurrir a técnicas que los protejan de agentes externos, aumentar su vida de anaquel y/o que el activo se administre en un lugar y tiempo específico del tracto gastrointestinal. Por ejemplo, la encapsulación consiste en la captura de éstos compuestos dentro de algunos tipos de matrices. La matriz puede desarrollarse con uno o varios componentes (como proteínas, polisacáridos, surfactantes, lípidos, agua y/o minerales), y puede tener una estructura simple o compleja, dependiendo de los materiales y procedimientos utilizados para fabricarlo. Existen varias técnicas de encapsulación como secado por aspersión, coacervación, extrusión, liofilización, entre otras<sup>30,31</sup>.

La matriz encapsulante puede fungir como sistema de liberación diseñado para administrar y liberar uno o más componentes activos con una concentración, lugar de acción (la boca humana, la nariz, el estómago, el intestino grueso o el colon) y tiempo específicos<sup>29,31</sup>. Estos sistemas se utilizan en diversas industrias como la farmacéutica, alimentaria, cuidado de la salud y cosméticos. Por este motivo se han desarrollado una gran cantidad de sistemas de liberación con diferente composición y estructuras por ejemplo, nanoemulsiones, hidrogeles, liposomas, emulsiones múltiples, emulsiones multicapa, partículas biopoliméricas, partículas sólidas de lípidos, complejos moleculares, etc<sup>29</sup>.

El comportamiento de estos sistemas depende de muchos factores fisiológicos, incluyendo la temperatura, el volumen y la composición de los fluidos gastrointestinales, enzimas, el tránsito, la motilidad, las bacterias y el pH, que son influenciados además por los alimentos, el sexo, actividad física y la edad. Estos parámetros deben considerarse para el diseño de sistemas de liberación; sin embargo la variabilidad y complejidad de estos factores no se toma en cuenta en las pruebas *in vitro*, de hecho, la variabilidad entre individuos y poblaciones específicas es significativa, por lo que es necesario la evaluación y validación de los sistemas de liberación en modelos preclínicos adecuados<sup>32</sup>. Una vez diseñado deben determinarse los perfiles de liberación (liberación repentina, sostenida, inducida, o dirigida) y mecanismos de liberación (difusión, erosión, fragmentación e hinchamiento). Entre mayor sea la comprensión de los parámetros que interfieren en la liberación, mejor será el diseño y por ende mejor será la correlación *in vitro- in vivo*<sup>33</sup>. El sistema *ex vivo*

ARIS resulta un modelo con ventajas relevantes en comparación con otros ya que se puede monitorear la liberación del activo el cualquiera de las secciones, en cualquier momento, sin usar animales de experimentación.

El desarrollo de tecnologías de última generación resultan necesarios para la comprensión de la interacción y el impacto que puede tener la microbiota intestinal humana con los productos digeridos y con ello mejorar el desarrollo de formulaciones, la validación de encapsulados y sistemas de liberación de compuestos activos <sup>34</sup>.

#### Objetivo de estudio

- Verificar la liberación controlada de compuestos activos encapsulados y contenidos en sistemas diseñados para tal fin.
- Elección del modelo preclínico
- Modelo ex vivo ARIS

#### Desarrollo del estudio

- Seleccionar la población objetivo a quien va dirigido el producto para la inoculación del sistema ARIS con microbiota específica.
- Estabilización de la microbiota.
- Seleccionar condiciones de administración (en ayuno o con alimento).
- Determinar la dosis y frecuencia de administración requerida para el efecto deseado o funcionalidad que se desee validar.
- El ARIS está escalado para que de la dosis requerida sólo se evalúe el equivalente al 10%.
- Prepararla muestra para evaluar los metabolitos de interés o la población microbiana.

#### Método y procesos de operación

- Pruebas de hinchamiento de la matriz
- Pruebas de aceptación de ingredientes
- Pruebas in vitro con condiciones gástricas e intestinales predeterminadas
- Pruebas de digestibilidad ex vivo ARIS
- Identificación, cuantificación y seguimiento del/los metabolito/s por técnicas cromatográficas (ejemplo HPLC).
- Cuantificación (UFC/mL) y/o identificación de microorganismos

#### **Recolección, análisis de datos y aseguramiento de calidad.**

Nota: ver condiciones generales en anexo

## ANEXO GENERAL

Los siguientes puntos resultan válidos para todos los tipos de evaluación en el sistema ex vivo ARIS

### Desarrollo del estudio

Modelo pre clínico de evaluación de digestión ex vivo en ARIS

Figura 1. Diagrama general del proceso



**Selección de la población objetivo.** Ésta se lleva a cabo tomando en cuenta la población a la que irá dirigido el producto a evaluar. Se establecen los criterios de inclusión, de no inclusión y de eliminación. Una vez establecidos estos criterios, se contacta con los sujetos que cumplan con el perfil requerido, a los cuales se les realiza una evaluación médico nutricional de acuerdo a lo establecido por la Ley General de Salud en investigación<sup>35</sup>, la Declaración de Helsinki, donde se estipulan los principios éticos para las investigaciones médicas en seres humanos<sup>36</sup>, y a la NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico.<sup>37</sup> Los sujetos que cumplen con el perfil requerido para el estudio, son preparados para realizar una donación de materia fecal, la cual es recolectada cuidadosamente. La muestra de cada

donador es inmediatamente procesada, con el fin de obtener la mayor viabilidad de la microbiota intestinal autóctona, de acuerdo a lo establecido en la Patente MX/2012/005418.

**Etapa de estabilización.** Con base a los datos obtenidos de los donadores (características fisiológicas y culturales, dieta habitual y hábitos gastrointestinales), se establecen los parámetros a simular en el sistema ARIS. Durante esta etapa, la microbiota intestinal es mantenida en tres secciones del colon, permitiendo la autoselección de la misma para obtener el crecimiento adecuado de los consorcios bacterianos que la habitan de manera natural en la población donadora, manteniendo parámetros específicos de pH, temperatura, presencia o ausencia de oxígeno, dióxido de carbono, metano, y movimiento.

**Etapa de adaptación.** Se formula una dieta estándar de acuerdo a los hábitos de alimentación de los donadores, y se inicia el proceso de digestión. El alimento se tempera y adiciona con amilasas salivales, se deposita el alimento en el estómago, donde lleva a cabo la digestión ácida, mecánica y enzimática, posteriormente pasando por pulsos a la sección de intestino delgado, donde el pH es modificado inmediatamente y se añaden enzimas provenientes del páncreas y bilis. Una vez cumpliendo el tiempo estimado de retención para dicha población, el contenido de éste es pasado por pulsos a la primera sección del colon, donde entra en contacto con la microbiota intestinal y se llevan a cabo otros procesos de digestión y metabolismo por los microorganismos presentes; los productos de dicha digestión pasan nuevamente por pulsos a la sección del colon transversal, donde los productos de la digestión interactúan con otros consorcios de microorganismos, pasando finalmente a la última sección (colon descendente), la cual tiene otras características, diferentes a las del colon ascendente y transversal. Una vez cumpliendo este proceso de digestión, se lleva a cabo la evacuación de los desechos de la digestión.

Este proceso es repetitivo y permite que la microbiota autóctona de los donadores se establezca de mejor manera, ya que la dieta tiene un impacto significativo y determinante para cada tipo de microbiota. El tiempo estimado de esta etapa es de alrededor dos semanas, sin embargo, este puede variar, ya que se deben tomar parámetros específicos para permitir la adaptación de la microbiota, los cuales están determinados en la patente MX/2012/005418.

**Etapa de evaluación.** Para llevar a cabo esta etapa se toma en cuenta el tipo de producto a evaluar (ingrediente, principio activo, producto terminado), con el fin de determinar la

dosis, la frecuencia de la administración, la periodicidad del estudio y los puntos donde se tomarán las muestras.

### **Reporte**

- Informe escrito de los resultados obtenidos con el siguiente contenido: Introducción, objetivo (s), metodología, resultados, discusión, conclusiones, referencias.

### **Aseguramiento de la calidad**

Aseguramiento de calidad.

- Con el fin de asegurar la calidad de la metodología aplicada en los estudios llevados a cabo en el Laboratorio de Digestión ex vivo, los procedimientos se encuentran normalizados, algunos de ellos basados en las Normas Oficiales Mexicanas, Normas Mexicanas o por organizaciones de normalización reconocidas.
- Se cuenta con un registro de las temperaturas de incubadoras, cámaras de refrigeración, refrigeradores y congeladores que se utilizan en la manipulación de las muestras.
- El sistema ex vivo ARIS está automatizado de tal manera que regula constantemente las condiciones de pH, temperatura, vaciados gástricos, etc.
- La alimentación del sistema, la toma de muestras, la evaluación microbiológica y/o seguimiento de metabolitos son realizadas por personal capacitado en la materia.
- La selección, reclutamiento y evaluación de pacientes la realiza el equipo de nutriólogos certificados del laboratorio de digestión ex vivo.
- Se cuenta con la certificación de calibración de micropipetas y equipos, así como el certificado de capacitación del personal para el correcto manejo del UHPLC recientemente adquirido.

Algunas metodologías, surgen del desarrollo de la investigación propia. Para estos métodos se realiza una validación previa tomando en cuenta los siguientes criterios

- Error relativo,
- Límites de detección y de cuantificación,
- Intervalo lineal,
- Reproducibilidad,
- Repetibilidad,

- Sesgo
- Incertidumbre
- Sensibilidad
- Selectividad
- Robustez

Al llevar a cabo estos procedimientos, se documenta el conocimiento, la experiencia y capacitación del personal involucrado en cada método ejecutado. <sup>38</sup>

### **Recolección de datos**

Se toman muestras en diferentes puntos de corte con el fin de cuantificar la presencia, viabilidad y abundancia relativa de los microorganismos.

De acuerdo a los requerimientos de cada estudio, se eligen las técnicas adecuadas de identificación y/o cuantificación de activos y/o microorganismos (como técnicas cromatográficas, técnicas microbiológicas o de biología molecular)

Toda la metodología llevada a cabo, es registrada de acuerdo a lo establecido por PIPRA <sup>39</sup>

Los datos obtenidos son llevados a una base de datos de Microsoft Excel 2010 y/ o STATGRAPHICS Centurion XVI.II, para posteriormente ser analizados.

### **Análisis**

- Análisis estadístico de los resultados para reportar diferencias significativas a través de un ANOVA.
- Cuantificación de metabolitos mediante la integración del área bajo la curva de la señal correspondiente a los estándares de estudio.
- Determinación del límite de detección y de cuantificación de los metabolitos a seguir.

## REFERENCIAS

- 1 Mowat, A. M. & Agace, W. W. Regional specialization within the intestinal immune system. *Nature reviews. Immunology* **14**, 667-685, doi:10.1038/nri3738 (2014).
- 2 Kong, F. & Singh, R. P. Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of food science* **73**, R67-80, doi:10.1111/j.1750-3841.2008.00766.x (2008).
- 3 Siro, I., Kapolna, E., Kapolna, B. & Lugasi, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance--a review. *Appetite* **51**, 456-467, doi:10.1016/j.appet.2008.05.060 (2008).
- 4 Roeselers, G., Ponomarenko, M., Lukovac, S. & Wortelboer, H. M. Ex vivo systems to study host-microbiota interactions in the gastrointestinal tract. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* **27**, 101-113, doi:10.1016/j.bpg.2013.03.018 (2013).
- 5 McConnell, E. L., Basit, A. W. & Murdan, S. Measurements of rat and mouse gastrointestinal pH, fluid and lymphoid tissue, and implications for in-vivo experiments. *The Journal of pharmacy and pharmacology* **60**, 63-70, doi:10.1211/jpp.60.1.0008 (2008).
- 6 Kararli, T. T. Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals. *Biopharmaceutics & drug disposition* **16**, 351-380 (1995).
- 7 DeSesso, J. M. & Jacobson, C. F. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats. *Food and chemical toxicology : an international journal published for the British Industrial Biological Research Association* **39**, 209-228 (2001).
- 8 Williams, C. F. *et al.* Comparative analysis of intestinal tract models. *Annual review of food science and technology* **6**, 329-350, doi:10.1146/annurev-food-022814-015429 (2015).
- 9 Ruiz, B. E. *et al.* A SUPPLEMENT ENRICHED WITH AGAVE FRUCTANS FOR CHILDHOOD OBESITY EVALUATED IN EX VIVO SYSTEM.
- 10 Boland, M. Human digestion--a processing perspective. *Journal of the science of food and agriculture* **96**, 2275-2283, doi:10.1002/jsfa.7601 (2016).
- 11 Jumpertz, R. *et al.* Energy-balance studies reveal associations between gut microbes, caloric load, and nutrient absorption in humans. *The American journal of clinical nutrition* **94**, 58-65, doi:10.3945/ajcn.110.010132 (2011).
- 12 Bornhorst, G. M. & Paul Singh, R. Gastric digestion in vivo and in vitro: how the structural aspects of food influence the digestion process. *Annual review of food science and technology* **5**, 111-132, doi:10.1146/annurev-food-030713-092346 (2014).
- 13 Parada, J. & Aguilera, J. M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. *Journal of food science* **72**, R21-32, doi:10.1111/j.1750-3841.2007.00274.x (2007).
- 14 de Vrese, M. & Schrezenmeir, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **111**, 1-66, doi:10.1007/10\_2008\_097 (2008).
- 15 Vasiljevic, T. & Shah, N. P. Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal* **18**, 714-728 (2008).
- 16 Ouwehand, A. & Vaughan, E. E. *Gastrointestinal microbiology*. (Taylor & Francis, 2006).
- 17 Salazar, N. *et al.* Inulin-type fructans modulate intestinal Bifidobacterium species populations and decrease fecal short-chain fatty acids in obese women. *Clinical Nutrition*, 501-507 (2015).
- 18 Topping, D. L. Short-chain fatty acids produced by intestinal bacteria. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* **5**, 15-19 (1996).
- 19 Dobson, A., Cotter, P. D., Ross, R. P. & Hill, C. Bacteriocin production: a probiotic trait? *Applied and environmental microbiology* **78**, 1-6, doi:10.1128/AEM.05576-11 (2012).
- 20 Nomoto, K., Nagaoka, M., Yokokura, T. & Mutai, M. Augmentation of resistance of mice to bacterial infection by a polysaccharide-peptidoglycan complex (PSPG) extracted from *Lactobacillus casei*. *Biotherapy* **1**, 169-177 (1989).
- 21 Isolauri, E., Kaila, M., Mykkanen, H., Ling, W. H. & Salminen, S. Oral bacteriotherapy for viral gastroenteritis. *Digestive diseases and sciences* **39**, 2595-2600 (1994).

- 22 Gorbach, S. L., Chang, T. W. & Goldin, B. Successful treatment of relapsing *Clostridium difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *Lancet* **2**, 1519 (1987).
- 23 Manning, T. S. & Gibson, G. R. Microbial-gut interactions in health and disease. Prebiotics. *Best practice & research. Clinical gastroenterology* **18**, 287-298, doi:10.1016/j.bpg.2003.10.008 (2004).
- 24 Gibson, G. R., Probert, H. M., Loo, J. V., Rastall, R. A. & Roberfroid, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition research reviews* **17**, 259-275, doi:10.1079/NRR200479 (2004).
- 25 Hutkins, R. W. *et al.* Prebiotics: why definitions matter. *Current opinion in biotechnology* **37**, 1-7, doi:10.1016/j.copbio.2015.09.001 (2016).
- 26 González-Ávila, M. *et al.* EVALUATION OF PREBIOTIC POTENTIAL OF AGAVE FRUCTANS FROM DIFFERENT REGIONS OF COLIMA AND ZACATECAS, MEXICO. *International Journal of Probiotics & Prebiotics* **9**, 93 (2014).
- 27 Patel, S. & Goyal, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. *3 Biotech* **2**, 115-125 (2012).
- 28 Hernández-Moedano, A., Moreno-Ramos, E. F., Herrera-Rodríguez, S.E., & González-Avila, M. Changes in Intestinal Microorganisms Influenced By Agave Fructans in A Digestive Tract Simulator. *Journal of Chemical, Biological and Physical Sciences* **4**, 19-25 (2014).
- 29 McClements, D. Requirements for food ingredient and nutraceutical delivery systems. *Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals*, 3-18 (2012).
- 30 Dias, M. I., Ferreira, I. C. & Barreiro, M. F. Microencapsulation of bioactives for food applications. *Food & function* **6**, 1035-1052 (2015).
- 31 Desai, K. G. H. & Jin Park, H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying technology* **23**, 1361-1394 (2005).
- 32 McConnell, E. L., Fadda, H. M. & Basit, A. W. Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery. *International journal of pharmaceuticals* **364**, 213-226 (2008).
- 33 Benita, S. *Microencapsulation: methods and industrial applications*. (CRC Press, 2005).
- 34 Prakash, S., Rodes, L., Coussa-Charley, M. & Tomaro-Duchesneau, C. Gut microbiota: next frontier in understanding human health and development of biotherapeutics. *Biologics: targets & therapy* **5**, 71 (2011).
- 35 Salud, S. d. Diario Oficial de la Federación. *REGLAMENTO de la Ley General de Salud en Materia de Investigación para la Salud* (2013). <<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/compi/rlgsmis.html>>.
- 36 Mundial, A. M. Declaración de Helsinki. *AMM* (2008). <[http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/17c\\_es.pdf](http://www.wma.net/es/30publications/10policies/b3/17c_es.pdf)>.
- 37 Salud, S. d. Diario Oficial de la Federación. *NORMA Oficial Mexicana NOM-004-SSA3-2012, Del expediente clínico* (2012). <[http://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5272787&fecha=15/10/2012](http://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5272787&fecha=15/10/2012)>.
- 38 EMA. Entidad Mexicana de Acreditación A. C. *Manual de Procedimientos* (2013). <[http://200.57.73.228:75/pqtinformativo/GENERAL/Carpeta\\_2\\_Criterios\\_evaluacion/MP-FE005\\_Criterios\\_de\\_aplicacion\\_NMX-EC-17025-IMNC-2006.pdf](http://200.57.73.228:75/pqtinformativo/GENERAL/Carpeta_2_Criterios_evaluacion/MP-FE005_Criterios_de_aplicacion_NMX-EC-17025-IMNC-2006.pdf)>.
- 39 Alandete-Sáez, M., Figueroa-Baldera, R., Chi-Ha, C. L., Anguita M., P. & Díaz G., F. PIPRA. *Guía de Buenas Prácticas para Resguardar el Conocimiento y la Innovación* (2010). <<http://pipra.fia.cl/media/6635/qu%C3%ADa%20de%20buenas%20pr%C3%A1cticas%20cuaderno%20laboratorio.pdf>>.

## **MODELOS ANIMALES PARA LA EVALUACIÓN DE VACUNAS CONTRA TUBERCULOSIS**

*Q.F.B. Michel de Jesús Aceves Sánchez y Dr. Mario Alberto Flores Valdez*

### **Introducción.**

El desarrollo de una vacuna implica varias fases de estudio, donde el uso de modelos animales en las fases preclínicas continúa siendo de suma importancia para el estudio de candidatos a vacuna en vías de verificar seguridad y eficacia en organismos completos más que en células aisladas en modelos bi- o tri-dimensionales, o por predicciones bioinformáticas únicamente, herramientas que no han podido reemplazar el uso de los modelos para evaluar la respuesta inmune desencadenada contra un patógeno de interés. La semejanza entre la fisiología humana y animal en algunos aspectos de los distintos modelos ha sido útil debido a que proporciona valiosa información acerca de los sistemas humanos. En el estudio de la tuberculosis existen diferentes modelos vivos como ratones, cobayos, conejos, primates, terneros bovinos, pez cebra, ratas, hurones, mini cerdos, moscas de la fruta, nemátodos, planarias, e incluso amibas. A pesar de la contribución de cada modelo, ninguno ha podido emular en su totalidad la enfermedad en humanos. La selección del modelo animal correcto es crítico para el éxito de la evaluación de un candidato a vacuna, además de que esto ayuda a reducir el número animales utilizados en la investigación. En este trabajo, sólo nos enfocaremos a describir el uso preclínico de los modelos más ampliamente estudiados a la fecha.

### **Diseño de vacunas**

El objetivo de cualquier vacuna es provocar una respuesta inmune protectora y de memoria contra un patógeno de interés, por lo cual se requiere contar con los datos necesarios que determinen su viabilidad para conferir protección. Tal información es recopilada durante el diseño de la vacuna y sus ensayos preclínicos. Los modelos animales son de utilidad porque permiten determinar diferentes aspectos en términos de seguridad y eficacia. Respecto a la efectividad, esta se evalúa con distintos parámetros como son i) la protección en el reto a infección del patógeno de interés o la enfermedad, ii) dosis y formulación de la vacuna, iii) ruta óptima de administración, iv) la evaluación de la aparición, duración, tipo y magnitud de la inmunidad y v) la correlación de la inmunogenicidad con respecto a la protección <sup>1</sup>.

Los criterios para considerar a un modelo animal como pertinente, son el grado de similitud de la enfermedad en el modelo respecto a los humanos incluyendo modo y ruta de infección, la dosis infectiva, el acceso a los distintos compartimentos inmunes, la respuesta inmune similar posterior a la vacunación y en la capacidad de correlacionar la protección y la progresión de la enfermedad y patogénesis. En cuanto a este último punto, para la tuberculosis es importante considerar la carga bacteriana, los cambios patológicos en el pulmón, la reducción de los síntomas y la recaída a la enfermedad activa o daños asociados a la misma <sup>1-3</sup>.

Idealmente, se considera que un buen modelo para evaluar la eficacia de una vacuna debe de tener la misma especie patógena a los humanos como agente infeccioso. Sin embargo, en este punto se pueden ubicar dos tipos de modelos disponibles, los cuales son el natural y el sustituto. En los modelos naturales, el agente patógeno en animales es uno similar al agente infeccioso en humanos, pero no infeccioso para estos últimos, el cual se utiliza para evaluar protección de la vacuna desarrollada <sup>4</sup>.

En el caso de las enfermedades zoonóticas, se puede utilizar el mismo agente patógeno, ya que puede causar la misma enfermedad tanto en humanos como en animales. Criterios como la similitud en la genética y antigenicidad de los patógenos, además de los órganos blanco, patogénesis y signos clínicos son clave para utilizar alguna especie como modelo. En el caso de los modelos sustitutos, el patógeno en humanos es utilizado para retar especies animales heterólogas considerando sus debidas restricciones. Para la selección del agente infeccioso, los criterios importantes para la validez de su uso como modelo incluye la similitud de la ruta de entrada y la infección, además del nivel de replicación y enfermedad en los órganos blanco. En estos modelos, el patógeno es capaz de replicarse, pero no necesariamente causar la enfermedad clínica, y si la enfermedad se desarrolla, los síntomas son usualmente menos severos <sup>4</sup>.

Por otro lado, durante el ensayo, también habrá que considerar otras variables que pueden ser controladas en el laboratorio como la dieta, la exposición a otros patógenos y parásitos del medio ambiente, así como y la susceptibilidad genética de cada especie <sup>5</sup>.

## **Comparación de modelos animales para la evaluación de vacunas contra tuberculosis**

Existen diferentes modelos animales aplicados a la investigación de la tuberculosis y aunque ninguno imita por completo las características que ocurren durante la infección del ser humano, todos ellos proporcionan información valiosa respecto alguna etapa de la enfermedad. Su uso permite estudiar varias etapas de la progresión de la TB como la formación del granuloma, licuefacción, formación de cavitaciones y diseminación hematológica en modelos animales. En estos modelos se pueden observar síntomas de la enfermedad como fiebre, pérdida de peso, radiografías anormales y daño pulmonar, y si la enfermedad no es tratada, eventualmente mueren, como es el caso de los humanos. Sin embargo, adicional a cuestiones inmunológicas y similitud de la enfermedad en humanos, la elección de modelo se deberá considerar también el costo, disponibilidad, espacio, así como los requerimientos de bioseguridad. Las diferencias y complejidad de cada modelo animal en conjunto con los recursos disponibles para los ensayos antes mencionados influirán en la reproducibilidad de los resultados y el valor de las pruebas de eficacia en animales, sin embargo, su consideración representa la oportunidad de mejora en un ensayo. Las diferencias se especifican en la Tabla 1.

### **Modelos murinos**

El ratón es uno de los modelos experimentales más popular y ampliamente utilizado contando con varias especies que pueden ser utilizadas como modelo, entre las más comunes se encuentran C57BL/6, BALB/c, DBA/2 y C3H/HeJ, CBA y 129/SvJ, cada una de ellas bien caracterizadas, pero con algunas diferencias a nivel inmunológico y que van en niveles de resistencia/susceptibilidad innata a la TB. Las principales diferencias entre cepas se observan con el grado de susceptibilidad a la infección y sobrevivencia. Las cepas CBA, DBA/2, C3H y 129/SvJ se clasifican como altamente susceptible, mientras que BALB/c y C57BL/6 se consideran altamente resistentes, dada su capacidad de contener la enfermedad<sup>6</sup>. Aunque ambos grupos difieren en la capacidad en el control de la replicación bacteriana en pulmón, siendo menor en los susceptibles, en hígado y bazo ambos son capaces de contener el crecimiento bacilar. Histopatológicamente, los granulomas en ratones resistentes están bien organizados, mientras que las lesiones en los ratones susceptibles son a menudo mal organizadas, necróticas y contienen pocos linfocitos<sup>7</sup>. Por

otro lado, los ratones susceptibles en algunos casos han mostrado un deficiente mantenimiento de la inmunidad o la generación de una respuesta inmune de memoria <sup>8</sup>. Las cepas C57BL/6 y BALB/c inmunizadas por BCG pueden sobrevivir dos veces más que las cepas DBA/2 y C3H/HeJ tras ser retadas con *M. tuberculosis* vía aerosol. Así mismo se ha observado que tras la inoculación intravenosa de la cepa H37Rv en ratones BALB/c y DBA/2, las cuentas en pulmón en la fase estacionaria era 2 log superior en éste último <sup>9,10</sup>. No obstante, entre cepas es diferente el efecto protector después de la vacunación. Mientras que las cepas resistentes C57/BL6 y BALB/c muestran una buena protección inducida por la vacuna, la inmunización parenteral con BCG no confiere eficacia protectora en las cepas sensibles CBA/J o DBA/2 <sup>11</sup>.

Sumado a estas especies se han desarrollado modelos humanizados o deficientes en genes para estudiar alguna etapa de la enfermedad o mecanismo en específico en la patogénesis. También está el uso de ratones desnudos inmunodeficientes para la evaluación de seguridad de vacunas contra la TB en vivo y como sustituto del efecto de la vacunación en personas infectadas por el VIH <sup>12</sup>.

Quizá la ventaja más palpable sea la económica, ya que permite evaluar gran cantidad de vacunas y utilizar un número muy amplio de ratones, además de la disponibilidad de reactivos inmunológicos. Sin embargo, la manipulación y la inducción de la enfermedad también son algo por lo cual se puede considerar. Los ratones pueden ser fácilmente infectados por diferentes vías, incluyendo aerosoles con una baja dosis de microorganismos, con la multiplicación del bacilo en los pulmones y la posterior diseminación al hígado y al bazo. La infección es controlada más no eliminada por la inmunidad mediada por células, principalmente por la respuesta de las células T.

En el ratón se pueden determinar la ruta de inmunización, tipo de adyuvante y cómo el antígeno específico afecta a la capacidad de las células T de memoria a acumularse en el sitio de desafío <sup>6</sup>. En esta estrategia, los ratones son inmunizados y generalmente retados a los 30 días con una baja dosis en aerosol de la cepa virulenta de *M. tuberculosis* el cual puede multiplicarse en los pulmones y diseminarse hacia otros órganos, más notablemente en hígado y bazo. Después de un intervalo de 4 semanas, los ratones son sacrificados y el número de unidades formadoras de colonias (UFC) en pulmón y bazo son enumeradas por extensión en placa en un medio de cultivo. La candidata a vacuna es evaluada por su habilidad de reducir la carga bacteriana a un nivel el cual es estadística y significativamente

menor que el control solución salina. BCG, es tomado como control positivo y en este modelo, es posible obtener la reducción de un logaritmo en cuentas bacilares <sup>2</sup>.

La naturaleza de la protección y la limitada extrapolación en los seres humanos de los resultados observados debido a la resistencia innata del modelo a la tuberculosis y la generación de una fuerte respuesta celular contra la infección por TB constituyen las principales desventajas, sumado a diferencias en las manifestaciones clínicas como la formación del granuloma <sup>13</sup>. Por otra parte, la corta vida del ratón limita algunos estudios como es el caso de la latencia.

No obstante, el modelo murino presenta varias ventajas en los estudios inmunológicos de la TB y se ha encontrado disponible como el primer tamiz de las candidatas a vacuna y la eficacia de nuevas candidatas a vacuna, y para la posterior evaluación en otros modelos animales para la TB una vez que se ha demostrado muestran una buena protección en ratones.

### **Conejillos de indias**

Los conejillos de indias son un modelo bien caracterizado, en el cual se ha observado su extrema sensibilidad a la infección por *M. tuberculosis*. El modelo replica muchos aspectos de la infección de la tuberculosis en los seres humanos, incluyendo la formación de granulomas, primaria y lesiones pulmonares hematógenas, la difusión y la necrosis caseosa <sup>14</sup>. Este modelo es útil para identificar la quimioterapia efectiva contra la tuberculosis, vacunas adecuadas, además del potencial rol de los constituyentes micobacterianos como factores de virulencia <sup>15,16</sup>. Este ha sido un modelo útil para evaluar muchos tipos de vacunas, incluyendo bacilos no viables, micobacterias atenuadas, diferentes cepas de BCG, vacunas subunitarias recombinantes, y vacunas de ADN <sup>6</sup>.

El conejillo de indias también se replica muchos aspectos de la infección de la tuberculosis en los seres humanos (especialmente la tuberculosis infantil y la tuberculosis en pacientes inmunodeprimidos), incluyendo la formación de granulomas, primaria y lesiones pulmonares hematógena, la difusión y la necrosis caseosa <sup>14</sup>. La principal diferencia con los humanos es la inherente susceptibilidad de los conejillos de indias, ya que la mayoría de los seres humanos infectados pueden contener la infección por *M. tuberculosis* <sup>17</sup>.

El conejillo de indias se puede infectar eficientemente con aerosoles a bajas dosis, mostrando un curso invariablemente fatal de la progresión de la enfermedad <sup>18</sup>. Esta característica le proporciona al modelo un parámetro confiable para estudiar la protección para el candidato a vacuna. Durante la evaluación de vacunas, las diferencias en la reducción logarítmica de la carga bacteriana son fácilmente apreciables ya que en comparación con el modelo murino, que se consigue solamente la reducción logarítmica de ~ 1 unidad de la carga bacilar máxima en pulmón por la vacuna BCG, la reducción es de 2-3 unidades logarítmicas en conejillos de indias inmunizados, lo cual proporciona un espectro más amplio para evaluar la eficacia de candidatos a vacunas <sup>15,16</sup>. La reducción o prevención del daño tisular es un criterio importante el cual puede ser fácilmente evaluado en este modelo durante el desarrollo de una vacuna. Este modelo es similar al modelo murino, sin embargo, los experimentos abiertos del tipo de sobrevivencia pueden durar hasta dos años <sup>19</sup>.

Las desventajas del uso como modelo tamiz de primer orden son el alto costo de crianza de los animales en condiciones de bioseguridad comparado con los bajos costos que implican mantener ratones y la limitada disponibilidad de reactivos para evaluar los factores inmunológicos implicados en la protección en estudios vacunales. No obstante, el número de reactivos para el uso en estudios inmunológicos ha ido en aumento.

## **Conejos**

El conejo ha sido utilizado por su resistencia innata a la tuberculosis, además de tener un mostrar características propias de la enfermedad en humanos, incluyendo las mismas etapas de la enfermedad. En los conejos infectados con TB, el tejido pulmonar es destruido, en gran parte como resultado de la reacción del propio huésped a los antígenos del bacilo. El curso de la infección para estos animales entre las cepas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* presenta una marcada diferencia en la virulencia, por lo que el modelo es ha sido utilizado para diferenciar la infección entre tales cepas <sup>6</sup>.

En general, los conejos son resistentes y capaces de contener la enfermedad causada por la cepa virulenta de *M. tuberculosis*. Con la infección *M.bovis*, los conejos forman

crónicamente cavidades pulmonares fibrosas. Finalmente, los granulomas en conejos, con sus centros caseosos <sup>20</sup>.

Las limitaciones de este modelo incluyen la falta de reactivos inmunológicos comerciales, costos de los animales y su mantenimiento, el espacio requerido y variabilidad de los resultados por la falta en la disponibilidad de conejos consanguíneos. Además, el uso de este modelo en la evaluación de vacunas ha sido limitado, por lo cual no se cuenta con información suficiente.

### **Modelos de primates**

Son el modelo de elección ideal para evaluar vacunas humanas contra muchos patógenos. Responden de manera similar a los humanos en muchos aspectos inmunológicos, patológicos y además comparten manifestaciones clínicas comunes para la TB, incluyendo signos y síntomas pulmonares y extrapulmonares. En este modelo la ruta, dosis de infección y la especie infectada determinará si la infección progresa a TB aguda, crónica o latente <sup>21</sup>. Sin embargo, debido a su acceso limitado y alto costo de mantenimiento, se usan sólo en las últimas etapas del desarrollo para ciertos patógenos. La enfermedad en monos es usualmente una enfermedad progresiva pulmonar con diseminación hematológica y bronquial del bacilo. Además, se puede presentar necrosis caseosa extensiva junto con la licuefacción del material caseoso y la formación de cavitación <sup>22</sup>. Adicionalmente, una ventaja sobre otros modelos es la presencia en primates de varias moléculas del huésped implicadas en las infecciones por TB en humanos <sup>23</sup>. Por otro lado, la inmunización con BCG disminuye la carga bacteriana en pulmón y la severidad de la infección después de la exposición al patógeno <sup>19</sup>, previniendo lesiones pulmonares visibles en algunos animales después de la inhalación de bajas dosis de *M. tuberculosis*.

A la fecha se emplean principalmente 2 especies: los monos/macacos Rhesus (*Macaca mulatta*) y los macacos cangrejeros (cynomolgous, *Macaca fascicularis*), siendo estos últimos más resistentes a la infección, pero no tanto como los humanos inmunocompetentes <sup>21,22</sup>. Además, los macacos cangrejeros se protegen de forma más eficiente después de la vacunación con BCG que los monos Rhesus y en consecuencia ofrecen un buen modelo experimental para la evaluación de nuevas vacunas donde la protección podría ser medida

en términos de la capacidad de reducir síntomas, la patología y carga bacteriana <sup>24</sup>. Diferencias adicionales se enlistan en la Tabla 2.

Los primates tienen una ventaja sobre otros modelos por la similitud a la tuberculosis humana, el espectro de la enfermedad y la patología, además de la disponibilidad de reactivos para estudiar los parámetros inmunológicos. Esto se traduce en obtener resultados que son más directamente aplicables al manejo de la enfermedad en humanos. Sin embargo estos modelos tienen algunas desventajas como el alto costo, requerimientos de amplias instalaciones de bioseguridad, el uso de equipos especializados y técnicas estandarizadas para la infección vía aerosol, además de la disponibilidad de animales endógamos. Habrá que considerar que el uso de animales no consanguíneos puede causar variabilidad en los experimentos, sin embargo esto establecerá condiciones más parecidas a lo que ocurre en la población humana. Adicional a esto, se debe tomar en cuenta que los animales con tuberculosis son contagiosos a otros animales, incluyendo otros monos y al personal de laboratorio, poniendo en serio riesgo una instalación animal. Si bien, el modelo de los primates parece ser atractivo para la investigación de la tuberculosis, son estos factores los que limitan el uso de este modelo en muchas instituciones de investigación.

### **Consideraciones finales**

Los modelos animales son de suma importancia en diferentes etapas de la investigación para el desarrollo de vacunas, por que permiten determinar mecanismo, ruta, y la transmisión de la enfermedad, la respuesta inmune del huésped a la infección y vacunación, así como la duración de la protección inducida. Sin embargo, la correcta selección de modelos previamente caracterizados en cuanto a su respuesta inmune y semejanza con el humano respecto a la progresión de la tuberculosis contribuirá a tener datos robustos y confiables y de esta forma avanzar a las siguientes fases en la evaluación de un candidato a vacuna. Habrá que considerar entonces, las ventajas y limitaciones del modelo, a las que se le sumarán requerimientos de espacio y condiciones BSL 3, la disponibilidad de animales, costo de los mismos y su mantenimiento, dificultades de manejo y cuestiones éticas. Si bien el éxito de una vacuna puede ser evaluado en términos de la protección conferida por la capacidad de reducir síntomas, la patología y carga bacteriana, no todos los modelos permiten discriminar dentro de estos parámetros la factibilidad de usar una candidata como vacuna. En la selección del modelo adecuado a fin de mejorar el diseño de la evaluación, no se deberá dejar de lado la susceptibilidad inherente de cada especie

animal, ya que la protección se puede detectar más fácilmente en modelos o cepas susceptibles, evitando que la resistencia a la enfermedad impida apreciar la protección o efectos perjudiciales del tratamiento. Adicional a esto, el uso de protocolos de evaluación en modelos animales bien racionalizados permitirá la elección correcta del modelo, la reducción de animales, la intervención de herramientas informáticas cuando son válidas y necesarias, lo cual a su vez impactará en los resultados y costes.

<b>Tabla 1. Comparación entre modelos animales contra la tuberculosis</b>				
<b>Parámetro</b>	<b>Ratón</b>	<b>Conejillo de indias</b>	<b>Conejo</b>	<b>Primates</b>
<b>Respuesta inducida tras la vacunación con BCG</b>	Sí	Sí	Sí	Sí
<b>Patología</b>				
<b>Granulomas</b>	Poco organizados	Bien estructurado	Bien estructurado	Bien estructurado
<b>Necrosis</b>	Mínima, puede depender del estado inmunológico	Sí	Sí	Sí
<b>Caseación</b>	Usualmente no o muy pobre	Sí	Sí	Sí
<b>Cavidades pulmonares</b>	No	Poco frecuente	Sí	Sí
<b>Lesiones diseminadas</b>	Granulomas confluentes causando finalmente la muerte	Diseminación hematógena; pulmones destruidos por continuar necrosis caseosa	La enfermedad se cura, con excepción de la formación de cavidades y la difusión bronquial	Diseminación hematógena; pulmones destruidos por continuar necrosis caseosa
<b>Susceptibilidad relativa a <i>M. tuberculosis</i></b>	Baja	Muy alta	Muy baja a <i>M. tb</i> , Utiliza típicamente <i>M. bovis</i> para evaluar susceptibilidad	Alta
<b>Inmunidad mediada por células</b>	Buena	Pobre	Buena	Pobre
<b>Presenta una infección latente a TB como en humanos</b>	No Se utilizan diversos modelos modificados para ello	No	No	Sí
<b>Experimentación</b>				
<b>Usos experimentales más comunes</b>	Inmunología de la TB, efectividad de fármacos	Efectividad de vacunas; transmisión por vía aérea	Patogénesis de la enfermedad	Patogénesis de la TB por transmisión aérea; inmunodeficiencia retroviral y TB
<b>Rutas de infección</b>	Aerosol Intravenosa Intratraqueal Intranasal Intraperitonea Subcutánea	Aerosol Intravenosa Subcutánea Intrapleural	Aerosol	Aerosol Intravenosa Intratraqueal Vía broncoscópico
<b>Uso extendido para evaluar vacunas</b>	Modelo de rutina	Modelo de rutina, ventana para BCG	No	Uso limitado a etapas finales de la fase preclínica
<b>Requerimientos</b>				
<b>Reactivos inmunológicos disponibles</b>	Amplia	Relativamente baja	Moderada	Amplia
<b>Espacio en el laboratorio y costos</b>	Relativamente pequeños	Moderados	Relativamente Grandes	Grandes
<b>Bases genéticas disponibles</b>	Sí	ND	ND	Sí

<b>Diferentes mutantes disponibles</b>	Sí	No	No	No
<b>Cepas o especies disponibles bien caracterizadas</b>	Resistentes: A/Sn, Balb/c, C57BL/10, C57BL/6 Susceptibles: 129/Sv, A/J, C3H (C3H/HeJ, C3H/SnJ, C3H/HeOuJ, C3HeB/FeJ, C3H-SW-H2b), CBA, DBA/2, I/St	ND	ND	Macaco Rhesus Macaco Cynomolgus

Fuente: Dharmadhikari y Nardell, 2008; Gupta y Katoch, 2005; Kramnik y Beamer, 2016; Young, 2009.

Tabla 2. Comparación entre humanos y modelos primates

<b>Parámetro</b>	<b>Humanos</b>	<b>Macacos Rhesus</b>	<b>Macacos Cynomolgus</b>
<b>Respuesta inducida tras la vacunación con BCG</b>	Sí Eficacia variable	Sí Eficacia variable	Sí Eficacia variable
<b>Patología</b>			
<b>Presencia tanto de manifestaciones pulmonares como extrapulmonares</b>	Sí	Sí	Sí
<b>Granulomas caseosos</b>	Sí	Sí	Sí
<b>Calcificación</b>	Variable	Variable	Variable
<b>Cápsula fibrosa</b>	Variable	Variable	Variable
<b>Cavidades pulmonares</b>	Sí	Sí	Sí
<b>Lesiones diseminadas</b>	Variable	Variable	Variable
<b>Manifestaciones clínicas</b>			
<b>Formas de la progresión de la enfermedad</b>			
<b>Aguda</b>	10%	90%	60%
<b>Latente</b>	90%	10%	40%
<b>Reactivación de las formas latentes</b>	Sí	Sí	Sí
<b>Presencia de síntomas de la infección activa/crónica</b>			
<b>Tos</b>	Sí	Sí	Sí
<b>Espujo con sangre</b>	Sí	Sí	Sí
<b>Incremento de la temperatura corporal</b>	Sí	Sí	Sí
<b>Pérdida de peso</b>	Sí	Sí	Sí
<b>Presencia de síntomas de la infección latente</b>			
<b>Ausencia de signos clínicos</b>	Sí	Sí	Sí
<b>TB activa por coinfección (VIH/SIDA)</b>	Sí	Sí	Sí
<b>Susceptibilidad dentro de una misma especie</b>	Variable	Variable	Variable

Adaptación de: Peña & Ho, 2015

## REFERENCIAS

- 1 Gerdts, V. *et al.* Large Animal Models for Vaccine Development and Testing. *Ilar J* **56**, 53-62, doi:10.1093/ilar/ilv009 (2015).
- 2 Orme, I. M. Mouse and guinea pig models for testing new tuberculosis vaccines. *Tuberculosis* **85**, 13-17, doi:10.1016/j.tube.2004.08.001 (2005).
- 3 Zhan, L. J. *et al.* Prophylactic Use of Ganoderma lucidum Extract May Inhibit Mycobacterium tuberculosis Replication in a New Mouse Model of Spontaneous Latent Tuberculosis Infection. *Front Microbiol* **6**, doi:ARTN 1490 10.3389/fmicb.2015.01490 (2016).
- 4 Gerdts, V., Littel-van den Hurk, S. V., Griebel, P. J. & Babiuk, L. A. Use of animal models in the development of human vaccines. *Future Microbiology* **2**, 667-675, doi:10.2217/17460913.2.6.667 (2007).
- 5 McShane, H. & Williams, A. A review of preclinical animal models utilised for TB vaccine evaluation in the context of recent human efficacy data. *Tuberculosis (Edinb)* **94**, 105-110, doi:10.1016/j.tube.2013.11.003 (2014).
- 6 Gupta, U. D. & Katoch, V. Animal models of tuberculosis. *Tuberculosis* **85**, 277-293, doi:10.1016/j.tube.2005.08.008 (2005).
- 7 Kramnik, I. & Beamer, G. Mouse models of human TB pathology: roles in the analysis of necrosis and the development of host-directed therapies. *Semin Immunopathol* **38**, 221-237, doi:10.1007/s00281-015-0538-9 (2016).
- 8 Chackerian, A. A. & Behar, S. M. Susceptibility to Mycobacterium tuberculosis: lessons from inbred strains of mice. *Tuberculosis (Edinb)* **83**, 279-285 (2003).
- 9 Forget, A., Skamene, E., Gros, P., Mialhe, A. C. & Turcotte, R. Differences in response among inbred mouse strains to infection with small doses of Mycobacterium bovis BCG. *Infect Immun* **32**, 42-47 (1981).
- 10 Turner, J. *et al.* Immunological basis for reactivation of tuberculosis in mice. *Infect Immun* **69**, 3264-3270, doi:10.1128/IAI.69.5.3264-3270.2001 (2001).
- 11 Medina, E. & North, R. J. Genetically susceptible mice remain proportionally more susceptible to tuberculosis after vaccination. *Immunology* **96**, 16-21 (1999).
- 12 Calderon, V. E. *et al.* A humanized mouse model of tuberculosis. *PLoS One* **8**, e63331, doi:10.1371/journal.pone.0063331 (2013).
- 13 McMurray, D. N. Disease model: pulmonary tuberculosis. *Trends Mol Med* **7**, 135-137 (2001).
- 14 Dharmadhikari, A. S. & Nardell, E. A. What animal models teach humans about tuberculosis. *Am J Respir Cell Mol Biol* **39**, 503-508, doi:10.1165/rcmb.2008-0154TR (2008).
- 15 Grover, A. *et al.* Assessment of vaccine testing at three laboratories using the guinea pig model of tuberculosis. *Tuberculosis (Edinb)* **92**, 105-111, doi:10.1016/j.tube.2011.09.003 (2012).
- 16 Orme, I. A. I. in *Tuberculosis and the tubercle bacillus* (ed W. R. Jacobs Jr, Jr.) Ch. Tuberculosis vaccine preclinical screening and development., 561-571 (ASM Press, 2005).
- 17 Flynn J.L., C. A. M., Bishai W. in *Tuberculosis and the tubercle bacillus* (ed Eisenach K.D. Cole S.T., McMurrat D.N., Jacobs Jr, W.R.) Ch. Animal models of tuberculosis. , 547-560 (ASM Press, 2005).
- 18 Orme, I. M. Immunology and vaccinology of tuberculosis: can lessons from the mouse be applied to the cow? *Tuberculosis* **81**, 109-113, doi:10.1054/tube.2000.0257 (2001).
- 19 Gupta, U. D. & Katoch, V. M. Animal models of tuberculosis for vaccine development. *Indian J Med Res* **129**, 11-18 (2009).
- 20 Young, D. Animal models of tuberculosis. *Eur J Immunol* **39**, 2011-2014, doi:10.1002/eji.200939542 (2009).
- 21 Capuano, S. V., 3rd *et al.* Experimental Mycobacterium tuberculosis infection of cynomolgus macaques closely resembles the various manifestations of human M. tuberculosis infection. *Infect Immun* **71**, 5831-5844 (2003).
- 22 Pena, J. C. & Ho, W. Z. Monkey models of tuberculosis: lessons learned. *Infect Immun* **83**, 852-862, doi:10.1128/IAI.02850-14 (2015).
- 23 McMurray, D. N. A nonhuman primate model for preclinical testing of new tuberculosis vaccines. *Clin Infect Dis* **30 Suppl 3**, S210-212, doi:10.1086/313885 (2000).

- 24 Langermans, J. A. *et al.* Protection of macaques against *Mycobacterium tuberculosis* infection by a subunit vaccine based on a fusion protein of antigen 85B and ESAT-6. *Vaccine* **23**, 2740-2750, doi:10.1016/j.vaccine.2004.11.051 (2005).

## **ENSAYOS PRECLÍNICOS DE INMUNOTOXINAS PARA LA TERAPIA DE CÁNCER DE MAMA**

*Sandeep Panikar, Elia Reza, Adriana Vallejo, Tanya Camacho*

### **Introducción**

Las inmunotoxinas son proteínas que están formadas por un anticuerpo que se encuentra unido a una toxina, y pueden ser empleadas para el tratamiento del cáncer. La unión de la toxina es específica al anticuerpo, el cual tiene la capacidad de reconocer receptores que pueden estar sobreexpresados en las células cancerígenas. Las toxinas que generalmente se emplean provienen de microorganismos, plantas, insectos y vertebrados.

Las inmunotoxinas tienen un dominio de reconocimiento, logrando que se unan a células específicas, lo cual causa la activación de dominios de translocación permitiendo que las toxinas ingresen a las células e inactiven funciones celulares vitales, lo cual ocasiona la muerte de la célula cancerígena. Los avances en los campos de la proteómica y la bioquímica han acelerado el desarrollo de las inmunotoxinas, las cuales pueden hacerse con la unión de un fragmento de anticuerpo específico a una toxina por enlaces disulfuro. Adicionalmente, el refinamiento del conocimiento en la ingeniería de proteínas, ha permitido la producción de inmunotoxinas recombinantes [Lv et al., 2016], además que es posible diseñar inmunotoxinas individuales para los tipos de cáncer [Bornstein, 2015]. Aunado a los diversos formatos de anticuerpos que pueden ser generados y unidos a las toxinas [Ahmad et al., 2012; Lv et al., 2016] y los avances en la humanización de los monoclonales [Zhang et al., 2016] ha permitido lograr casos de éxito que se encuentran en fases clínicas.

Al día de hoy, se ha tenido éxito en el tratamiento de tumores hemáticos. En el caso de tumores sólidos, los retos se encuentran en la penetración dentro de la masa del tumor y el número de administraciones que pueden realizarse [Pastan et al., 2007]. La sobreexpresión de proteínas tipo HER2 and Bcl-x que se sobreexpresan en el cáncer de mama en humanos, puede ser usado como blanco de inmunotoxinas [Olopade et al., 1997]. La densidad del tumor puede ser un obstáculo para un tratamiento efectivo empleando inmunotoxinas, sin embargo, la angiogénesis asociada al crecimiento del tumor puede incrementar de forma paralela la penetrabilidad de la inmunotoxina y por lo tanto podría interactuar con las células tumorales, sin embargo, deben realizarse más experimentos que apoyen esta hipótesis.

Las células del cáncer de mama difieren de células sanas debido a ciertos biomarcadores de superficie. El número de marcadores de tumor que pueden ser detectados en el suero de pacientes con cáncer de mama y que son probados con propósitos de diagnóstico, incluyen el antígeno de carcinoma embrionario (CEA), el antígeno polipeptídico específico de tejido (CASA), el antígeno mamario en suero (MSA), el antígeno mucino carcinoma (MCA), CA-15-3, CA-M15, CA-M18 and CA-M438, entre otros [Schwartz, 1997, Seregni et al., 1997].

El proto-oncogene HER2/neu (también llamado C-erb B2) codifica para un receptor del factor de crecimiento de superficie (p185) que es homólogo al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR). Ambas respuestas a HER-2/neu han sido detectadas en aproximadamente la mitad de los pacientes que presentan tumores p185 positivos [Pupa et

al., 1993, Disis et al., 1997]. Líneas transfectadas que expresan HER-2/neu han mostrado un inmunógeno efectivo para cáncer de mama inflamatorio (CMI) y para la inmunidad humoral en cobayos [Fendly, 1990]. El anticuerpo MDX-210, es un dímero con capacidad de reconocimiento del receptor FcγR y se une a la región Fc de células positivas como los granulocitos y el tumor para promover la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) [Carter, 1994]. Con este anticuerpo MDX-121 y añadiendo el factor estimulante de colonia (CSF) se incrementa por parte de los granulocitos la capacidad de fagocitosis de células HER-2/neu positivas [Stockmeyer, 1997]. Estos resultados obtenidos en modelos preclínicos han abierto la posibilidad del uso de las inmunotoxinas en humanos. Debemos considerar que se han realizado investigaciones en este campo desde los años noventa las cuales incluyen ensayos preclínicos y clínicos fase I y II. Por lo tanto, las inmunotoxinas se clasifican en tres generaciones: la primera generación se preparaba por unión química de la toxina completa al anticuerpo, la segunda generación se prepara por conjugación química, pero con toxinas modificadas donde se removía el sitio de unión de la toxina a la célula, la tercera generación, donde se obtienen por tecnología recombinante [Brinkmann et al., 2001; Jaramillo-Quintero et al., 2015]. En la Tabla I, se mencionan algunas inmunotoxinas que se han desarrollado para el tratamiento de cáncer de mama.

Nombre de la Inmunotoxina	Toxina	Antígeno	Referencia
<b>260F9-rRTA</b>	Ricina	55kDa	Gould et al.,1989-Weiner et al., 1989
<b>Erb-38</b>	PE38	erbB2	Pai-Scherf et al., 1999
<b>scfv (FRP5)- ETA</b>	PE40	erbB2	Azemar et al.,2003-von Minckwitz et al., 2005
<b>8H9(Fv)-PE38</b>	PE38	8H9	Onda et al., 2004
<b>TAB-250 and BACH-250</b>	Gelonina (rGel)	HER2/neu	Rosenblum et al., 1999
<b>MC-C225 and E7.6.3.</b>	(anticuerpo monoclonal quimérico/humano)	EGFRvIII	Kuan et al., 2001
<b>LMB-7</b>	PE38	Antígeno B3	Pastan et al., 1996
<b>317G5-rRTA,</b>	Ricina	42kDa	Yu et al., 1990
<b>741F8-rRTA</b>	Ricina	55kDa	Yu et al., 1990
<b>scFv54-sTRAIL</b>	sTRAIL	Anti-EGP2 scFv	Bremer et al., 2004
<b>H59-RTA</b>	Ricina	Antígeno Thy 1.2	Krolick et al., 1981

**Tabla I.** Inmunotoxinas de primera generación usada para el tratamiento de cáncer de mama.

### **Ensayos preclínicos para determinar la seguridad de las inmunotoxinas**

En general, una de las principales preocupaciones al proponer el uso de inmunotoxinas se refiere a la seguridad que conlleva esta opción de terapia. Por lo tanto, se realizan análisis

de citotoxicidad y de toxicología *in vitro* e *in vivo*, con el principal objetivo de demostrar la seguridad y eficiencia para garantizar que las inmunotoxinas serán específicas para células cancerígenas evitando la unión a células sanas.

Los estudios *in vivo* deben emplear un modelo tumoral animal bien establecido y representativo del tipo de cáncer a tratar. Los organismos deben ser examinados con el fin de medir la regresión del tamaño del tumor. El nivel de toxicidad de las inmunotoxinas se debe medir en diferentes órganos como los pulmones, el hígado, el riñón, entre otros, con la finalidad de comprender la absorción no específica, la reacción inmune y la toxicidad para el cuerpo, lo cual está relacionado con la farmacología, farmacocinética y toxicología de la inmunotoxina. A continuación, se detallan los criterios básicos que deben ser considerados para realizar estos ensayos tanto *in vitro* como *in vivo*.

**Ensayos *in vitro*.** Los anticuerpos monoclonales específicos para cierto biomarcador sobreexpresado en cáncer de mama, se pueden conjugar con la toxina como la ricina. La actividad antitumoral de varias inmunotoxinas, incluyendo los construidos con cadena de ricina A, depende de (a) la unión específica del conjugado al antígeno diana, (b) la internalización de la inmunotoxina y (c) la translocación del resto tóxico en el citoplasma, donde los ribosomas se inactivan catalíticamente [Olsner y Phil, 1993; Weigel et al., 2015]. Este tipo de inmunotoxinas se puede conjugar con una molécula fluorescente con el fin de lograr la comprobación por medio de microscopía de la unión específica de las inmunotoxinas. Además, de poder monitorear el proceso de internalización e inhibir el crecimiento de la línea celular de cáncer de mama. Esta sección describe algunas técnicas que se pueden aplicar con el fin de comprobar la eficacia de inmunotoxinas en los estudios *in vitro*.

**Inmunotoxinas radiomarcadas.** Los inmunoconjugados anticuerpo-toxina pueden ser marcados con Na<sup>125</sup>I utilizando el método llamado Iodogen. Este método fue descrito por Fraker y Speck en 1978 y consiste en la interacción de un reactivo de oxidación en fase sólida para el radiomarcaje con yodo de proteínas y membranas celulares [Masuho et al., 1984]. En resumen, 50 µl de tampón fosfato (0.5 M, pH 7.4) se añade a un tubo de borosilicato de 15 x 75 mm que este recubierto con 10 µg de Iodogen. Las inmunotoxinas (50 a 100 µg en PBS), se añaden en un volumen de 90 µl. La radio-iodación se inicia por la adición de 1 mCi de Na<sup>125</sup>I (10 µl) y la mezcla se incuba durante 30 min en hielo. El yodo unido a la proteína se separa por filtración en gel en una columna PD- 10 (Farmacia, Pleasant Hill, CA) previamente equilibrada con PBS (amortiguador fosfato salino) [Yu et al., 1990; Kameswarana et al., 2015]. Una muestra de 2 µl de cada fracción se analiza en un contador gamma para medir la radiactividad unida a proteínas. La eficiencia de radio-iodación se calcula por la siguiente fórmula:

$$\text{Eficiencia de radioiodación} = \frac{\text{proteína unida cpm} \times 100}{\text{cpm total}}$$

La eficiencia de la radiomarcaje que generalmente se obtiene entre 50 y 80%. Los conjugados yodados se pueden separar en electroforesis en poliacrilamida en condiciones desnaturizantes SDS-PAGE [Laemmli, 1970]. Los geles se secan para poder realizar una autorradiografía confirmatoria donde se determina que los conjugados se han marcado. Este tipo de etiquetado permitiría una fácil visualización de inmunotoxinas en estudios *in vitro* e *in vivo*. La fácil localización e interacción de inmunotoxinas con las células del cáncer de mama puede ser posible con un autorradiografía y otras técnicas, además se ha

demostrado que el radiomarcaje no afecta la farmacocinética y farmacodinamia [Chen et al., 2014]. Sin embargo, emplear radioactividad tiene como desventajas que el laboratorio debe tener los permisos pertinentes, las condiciones de seguridad adecuadas y contar con el correcto manejo y eliminación de todos los residuos radioactivos. Se deben incluir controles donde no se aplique la inmunotoxina y por lo tanto las células deben tener un crecimiento normal, y controles en los cuales se encuentre la toxina soluble sin estar unida al anticuerpo, para verificar que existe ventaja de especificidad. Adicionalmente, puede ser necesario determinar por medio de diluciones seriadas la cantidad de inmunotoxina que tiene el efecto al 50% en la línea celular específica que se esté analizando.

**Internalización de inmunotoxinas.** Se pueden analizar *in vitro* en células de cáncer de mama, crecidas a una razón de  $(5 \times 10^5)$  a  $4^\circ\text{C}$  por 1 hora iniciando con concentraciones conocidas de inmunotoxina (1mg/mL). La inmunotoxina no unida a las células se elimina por lavados de medio de cultivo conteniendo BSA (Albúmina de Suero Bovino). Las células se incuban a  $37^\circ\text{C}$  o  $4^\circ\text{C}$  por 1 a 6 h, dependiendo de la velocidad de crecimiento específico de la línea celular y de la función de la toxina que se está empleando, es decir, si tiene acción sobre la mitosis, sobre la membrana celular, entre otros. Para distinguir entre la inmunotoxina internalizada y de la que solo se une a la superficie de las células tumorales, se trata con proteinasa K (100  $\mu\text{l}$  de 2.5 mg/ml de solución) durante 1 hora a  $37^\circ\text{C}$  con agitación suave. Se lavan las células para eliminar la enzima empleando medio frío suplementado con 1% de BSA y 0.1% de  $\text{NaN}_3$  [Yu et al., 1990; Gadadhar et al., 2013; Bortolotti et al., 2016]. La reactividad se puede medir usando técnicas de detección como el contador Gamma. Se deben incluir controles donde no se apliquen inmunotoxina y controles en los cuales se encuentre la toxina soluble sin estar unida al anticuerpo, para verificar que existe ventaja de especificidad. Se están realizando esfuerzos con tecnología 2D y 3D para determinar la penetración e internalización de las inmunotoxinas, con el objetivo de simular el órgano blanco [Poenick et al., 2014].

**Ensayo clonogénico.** Este tipo de ensayo permite medir el efecto de las inmunotoxinas, evaluando la supervivencia y proliferación en células diana. Debe su nombre a que después de poner en contacto las células cancerígenas con las inmunotoxinas, se diluyen e incuban hasta determinar cuántos clones se pueden determinar. Además, puede ser usado como método de control de calidad y permite dar seguridad dado que cuantifica la funcionalidad *in vitro* de la inmunotoxina. El ensayo consiste de colocar células tumorales ( $1 \times 10^6/\text{mL}$ ) tratadas con diferentes diluciones de las inmunotoxinas (las cuales pueden iniciar de 0.01 a 10 mg/ml) durante 3 horas a  $37^\circ\text{C}$ , en una plataforma oscilante con atmósfera humidificada (5% de  $\text{CO}_2$  y 95% de aire). Después del tratamiento, las células se lavan dos veces con medio de cultivo y se diluyen en serie -5 veces. De cada dilución, una muestra de 100  $\mu\text{l}$  se pipetea en 6 pocillos de una placa de 96 pozos y se añaden 100  $\mu\text{l}$  de medio de cultivo. Las placas se incuban durante un período de 14 días aproximadamente. El crecimiento clonogénico de las células tumorales supervivientes, se puede evaluar con el microscopio invertido, lo cual puede resultar tedioso. La cuantificación del número de clones, se obtiene por el número de pozos con al menos 1 colonia que contiene más de 30 células. Lo obtenido da como resultado el número de unidad clonogénico residual, que se calcula por el método desarrollado por Lanceros y Karber [Hubert, 1980; Johnson & Brown, 1961]. En todos los ensayos, se utiliza como control pocillos con células no tratadas para determinar la eficiencia de clonación [Yu et al., 1990; Polito et al., 2004].

**Ensayos de citotoxicidad.** El efecto citotóxico de las inmunotoxinas en el cáncer de mama es un fenómeno importante que permite entender la respuesta celular producida después del tratamiento. Como ejemplo, usaremos los ensayos reportados por Ira Pastan y colaboradores en el 2004 [Onda et al., 2004], que fueron realizados con la inmunotoxina 8H9(dsFv)-PE38, que tiene como base un anticuerpo monoclonal recombinante scFv con capacidad de reconocimiento de una glucoproteína de superficie y que fue llamado 8H9(dsFv). Este anticuerpo mantiene sus regiones variables unidas por un enlace disulfuro, que reemplaza a la región de unión que suele encontrarse en los scFv. El anticuerpo 8H9(dsFv) se unió a la exotoxina de 38 kDa de *Pseudomonas exotoxin* (PE38), resultando en la inmunotoxina 8H9(dsFv)-PE38 que demostró en ensayos *in vitro* un efecto dosis dependiente en células de cáncer de mama, de osteosarcoma, y de neuroblastoma. El desarrollo de ésta inmunotoxina 8H9(dsFv)-PE38- y su no reactividad con las células sanas hace que sea un buen agente para continuar en ensayos preclínicos.

En este caso, la citotoxicidad de la inmunotoxina se evaluó considerando la acción de la exotoxina 38, que impide la elongación de las cadenas polipeptídicas al afectar al factor 2 de elongación en células eucariotas (EEF2). La síntesis de proteínas se puede medir como la incorporación celular de leucina [<sup>3</sup>H] [Brinkmann et al., 1991, Onda et al., 1999; Safari et al., 2014]. Para lo cual las células cancerígenas, se siembran en un promedio de  $1.6 \times 10^4$  células/pocillo en placas de 96 pozos. Se incuban durante la noche, al otro día la inmunotoxina se diluye en PBS/BSA al 0.2% a concentraciones deseadas y se añade a las células, por triplicado. A continuación, las células se incuban por lo menos 20 horas a 37 °C antes de la adición de 2 µ Ci [<sup>3</sup>H] leucina/pozo y se incuban adicionalmente durante 2 horas a 37 °C en atmósfera húmeda. La radiactividad asociada con las células se determina en un contador de centelleo automatizado.

**Ensayo MTT.** La viabilidad celular se puede evaluar mediante el análisis de la reducción del reactivo MTT bromuro de (3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5- difeniltetrazol por acción de la enzima succinato deshidrogenasa de la mitocondria de células metabólicamente activas [Parihar et al., 2012]. El ensayo de MTT es ampliamente utilizado pues proporciona información sobre el porcentaje de viabilidad celular después de tratar a las células con inmunotoxinas. Como base de este ensayo se pueden crecer las líneas celulares de cáncer de mama en placas de microcultivo de 96 pozos (a densidades de  $10^4$  células/200 µl/pozo) durante 24 horas en condiciones adecuadas de temperatura y humedad [Chauhan et al., 2016]. La solución inicial de inmunotoxinas se utiliza para hacer diluciones seriadas con el medio de cultivo celular adecuado. El cultivo con las diluciones de las inmunotoxinas, dependiendo de la velocidad de crecimiento de las líneas celulares analizadas, se incuba por lo general 24 horas con condiciones favorables para el crecimiento del cultivo celular. Posteriormente se agrega el reactivo MTT a los pozos dependiendo de las concentraciones prescritos por el proveedor y nuevamente se incuba por 4 horas. Finalmente, se extraen con cuidado los cristales de formazán que se hayan formado y se disuelven mediante la adición de DMSO [Zhou et al., 2010; Lv et al., 2015]. La absorbancia se registra a 540 nm y se realiza el análisis de datos considerando que el incremento en la cantidad de formazán producido en el sobrenadante se correlaciona directamente con el número de células muertas.

**Evaluación de la apoptosis empleando citometría de flujo.** Con el fin de evaluar el efecto de las inmunotoxinas en las células de cáncer de mama se puede emplear la citometría de flujo. De forma general, las células cancerígenas ( $1 \times 10^6$ ) se siembran en placas de 6 pocillos y se incuban durante toda la noche en condiciones adecuadas de temperatura y humedad. El medio de cultivo se sustituye por medio fresco y las células se exponen a la concentración deseada de inmunotoxina. Después de 24 horas de estar en contacto, las células adherentes en monocapa se recogen por tripsinización y se lavan con PBS a 300g [Chauhan et al., 2016]. Las células ( $1 \times 10^5$ ) pueden ser teñidas usando un kit de detección de apoptosis que se basa en anexina V-FITC y el marcador catiónico yoduro de propidio (IP). Después de la tinción la muestra es analizada por citometría de flujo. La combinación de estos reactivos permite la diferenciación entre células 1) no apoptóticas (anexina V-FICT negativa/IP Negativo), 2) células en apoptosis temprana (anexina V-FICT positivo /IP negativo y 3) células necróticas (anexina V-FICT positivo /IP positivo).

**Análisis de especies reactivas de oxígeno (ROS).** Es bien conocida la importancia del oxígeno tanto para el proceso respiratorio de los organismos aerobios, pero también es de suma importancia para el metabolismo celular, dado que bajo ciertas condiciones y concentraciones llega a ser tóxico debido a la formación de las especies reactivas de oxígeno (ERO). Esto se debe a que las ERO son más reactivas que el oxígeno y pueden ocasionar daños: 1) a nivel del ADN al reaccionar con las bases nitrogenadas y la desoxirribosa, 2) en los lípidos debido al proceso de lipoperoxidación, que puede afectar las membranas celulares, 3) sobre las proteínas causando la pérdida de la actividad enzimática, daños en proteínas estructurales o en las proteínas esenciales para vías metabólicas. Debido a los diversos efectos que tienen las ERO es posible realizar su detección empleando una gama de ensayos como citometría de flujo, fluorescencia, microscopía, entre otras.

Para realizar el análisis usando citometría de flujo, se puede usar el siguiente protocolo general, donde se cultiva la línea celular de cáncer de mama y se tratan con la concentración deseada de inmunotoxinas por un periodo de incubación de al menos 24 horas. Posteriormente, se tiñen con el reactivo 2', 7'-diacetato diclorofluoresceína (DCFDA) que es permeable a la membrana celular y que permite determinar en grado general de estrés oxidativo dentro de las células. Finalmente, se analizan las muestras por citometría de flujo. Empleando  $H_2O_2$  (30  $\mu M$ ) como control positivo para la generación de ERO's en las células después de 2 horas de aplicación antes de iniciar el análisis [Andersson et al., 2006; Chauhan et al., 2016].

#### Ensayos *in vivo*

**Ensayo anti-tumoral.** Una vez determinando *in vitro* que las inmunotoxinas diseñadas tienen la capacidad de eliminar de forma específica las células de cáncer de mama, es posible continuar con los ensayos *in vivo* para definir su comportamiento en un organismo completo.

Para este fin, se pueden emplear ratones homocigotos con el sistema inmune comprometido, los cuales carecen de linfocitos B y/o T maduros y funcionales, debido a esto, son susceptibles a infecciones lo cual favorece el establecimiento de tumores sólidos y/o metastásicos. Como ejemplos se encuentran: 1) los ratones con Síndrome de inmunodeficiencia severa combinada (SCID) que carecen de linfocitos T y B, por lo cual

puede ser empleado en ensayos de infección con patógenos, 2) ratones desnudos que carecen de un timo funcional y por lo tanto pueden ser empleados en ensayos de hipersensibilidad y en el análisis de tumores humanos injertados, 3) ratones Xid los cuales tienen mutaciones ligadas al cromosoma X y pueden ser empleados para análisis de infecciones, y 4) ratones beige, los cuales tienen defectos en los granulocitos y macrófagos maduros y se emplean en la evolución de la respuesta de las células NK ante infecciones.

A continuación, se menciona un protocolo general para realizar el ensayo *in vivo* empleando inmunotoxinas. Se debe establecer un tumor en los ratones, para lo cual se pueden inyectar las células cancerígenas en la cola del ratón y esperar a que el tumor mamario se establezca o se puede inyectar las células cancerígenas directamente en el epitelio de la mama. Pastan y colaboradores (mencionado por Onda et al., 2004), emplearon ratones SCID a los cuales les inyectaron células MCF-7 ( $2 \times 10^6$  células) por vía subcutánea. Los tumores se desarrollaron en los ratones con un tamaño de  $0.05 \text{ cm}^3$  después de 4 días de la implantación. A partir del 4 día, los animales recibieron la administración de la inmunotoxina recombinante (RITs) denominada 8H9(Fv)-PE38, en solución de PBS y albumina de suero humano (HSA) al 0.2%, a diferentes concentraciones por vía intravenosa. La administración de la inmunotoxina fue en los días 4, 6 y 8 después de establecido el tumor. Los grupos fueron de 5 a 10 animales. Los tumores se midieron cada 2 ó 3 días durante el tratamiento y el volumen tumoral se calculó usando la fórmula:

$$\text{Volumen del tumor (cm}^3\text{)} = \text{Largo} \times (\text{Ancho})^2 \times 0.4$$

Debido a que las células MCF-7 son dependientes de estrógenos, se debe administrar por vía subcutánea un pellet de  $17\beta$ -estradiol (de 0.72 mg con liberación de 60 días). Se recomienda un análisis detallado de la bibliografía científica para la planeación de los ensayos *in vivo* [Xu et al., 2000; Phillips et al., 2008; Oh et al., 2009].

Adicionalmente, se puede emplear un sistema donde se realicen xenotransplantes fluorescentes de tumores de pacientes, lo cual sienta las bases para avanzar en la aplicación de la medicina personalizada [Alewine et al., 2014; Knutson et al., 2016]. En CIATEJ contamos con un equipo con estas capacidades que se encuentra a cargo del Dr. Rodolfo Hernández Gutiérrez (rhgutierrez@ciatej.mx).

Análisis de la toxicidad empleando modelos animales.

Los modelos animales como ratones y monos se utilizan para comprobar el nivel de toxicidad que puede ocasionar la inmunotoxina [Mazor et al., 2016]. Estos ensayos deben incluir de forma general 1) análisis toxicológico donde se determina la histología de diversos órganos entre los cuales se pueden incluir corazón, ganglios linfáticos, hígado, páncreas, mama, cerebro entre otros, 2) determinación de la farmacocinética, en el cual miden los niveles de la inmunotoxina en sangre, esto se puede realizar por ensayos ligados a enzima (ELISA), 3) para determinar la citotoxicidad se puede emplear el plasma obtenido de los organismos tratados en líneas celulares de cáncer y en células Jurkat. 4) detección de anticuerpos-anti-inmunotoxina, para lo cual se debe analizar la producción de IgG totales y diversos isotipos de IgG que sean específicos contra la inmunotoxina, 5) registro detallado de los eventos adversos que se observen en los organismos, los cuales pueden incluir leucopenia, linfopenia, neutropenia, pérdida de peso, elevación en la creatinina, disminución en la hemoglobina, entre otras [Onda et al., 2001, ICH S7A, 2005, Woo et al., 2008].

Para realizar estos experimentos, es necesario contar con la aprobación de Comités para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio para asegurar que los análisis se lleven a cabo de manera apropiada y humanitaria, con base en las normas vigentes en nuestro país como la NOM-062-ZOO-1999.

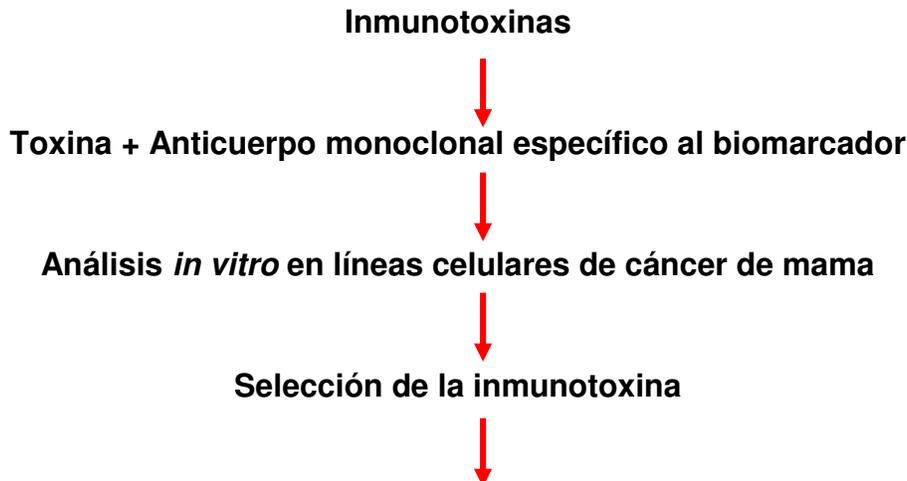
	Documento	Reference
Libro	Cavagnaro JA: Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals, Hoboken, NJ: Wiley	Cavagnaro et al., 2008
Capítulo de Libro	Teicher BA, Andrews PA, Anticancer Drug Development Guide, Preclinical Screening, Clinical Trails and Approval, 2 <sup>nd</sup> ed. Humana Press, Part III, pages 287-335	Teicher et al., 2004
<b><u>Documentos Guía: Internacionales</u></b>		
ICH S6	Preclinical evaluation of biotechnology-derived Pharmaceuticals (ISH S6)	ICH S6, 1997
ICH M3	Non-Clinical Safety for The Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals	ICH M3, 2009
ICH S3A	Toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies (ISH S3A)	ICH S3A, 2004
ICH S4	Duration of chronic toxicity testing in animals (Rodent and Non-Rodent Toxicity Testing) (ICH S4)	ICH S4, 1998
ICH S7A	Safety pharmacology studies for human Pharmaceuticals (ICH S7A)	ICH S7A, 2005
ICH S7B	The Non-Clinical Evaluation of the Potential for delayed Ventricular Repolarization (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals (ICH S7B)	ICH S7B, 2000
ICH M4	Organization of The Common Technical Document for Registration of Pharmaceuticals for Human Use	ICH M4, 1999
<b><u>Documentos Guía: Estados Unidos</u></b>		
FDA PTC	Points to consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use	FDA PTC, 1997
CFR	21CFR58: Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies	21CFR58, 2016
Guía de la FDA para la Industria	Estimating the maximum safe starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers	FDA, 2005
<b><u>Documentos Guía: Europa</u></b>		
EMA Guideline	Strategies to identify and mitigate risks for First-in-Human Trails for with investigational medicinal products	EMA, 2007
Position paper		EMA, 2003

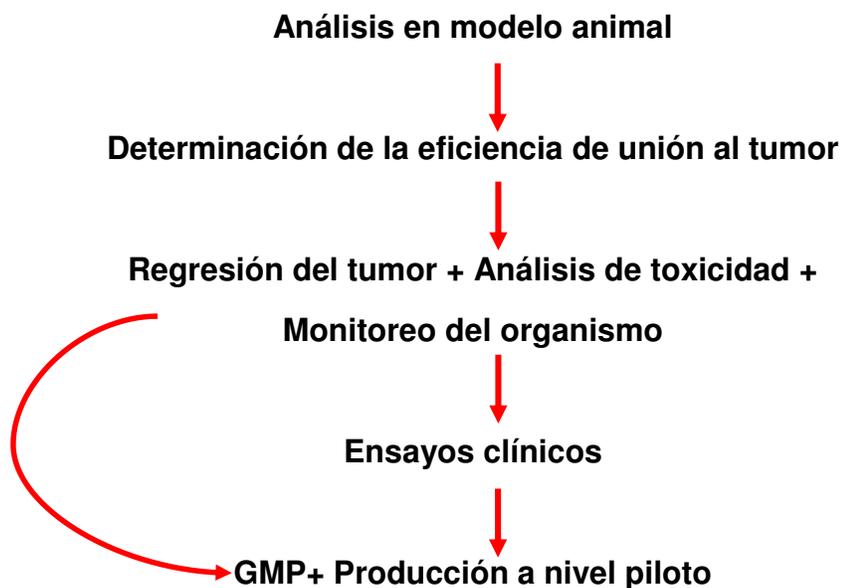
**Tabla II.** Guía de documentos para determinar la seguridad pre-clínica de anticuerpos monoclonales e inmunotoxinas.

**Buenas prácticas de manufactura (GMP).** La producción de las inmunotoxinas para estudios de cáncer necesita contar con una metodología seleccionada de manera adecuada y que permita determinar la seguridad de su uso en organismos vivos [ICH S7B, 2000, ICH S7A, 2005]. Los documentos que contienen información útil para la planificación y ejecución de estudios de seguridad preclínica son proporcionados por diversas agencias reguladoras [Tabla II].

En 1997, la FDA de los Estados Unidos publicó una versión revisada de “*Points to Consider (PTC) in the manufacturing and testing of monoclonal antibody products for human use*” [FDA PTC, 1997]. Este documento proporciona información detallada sobre la fabricación de pruebas preclínicas y pruebas clínicas que deben realizarse a los anticuerpos monoclonales. Esta información debe ser considerada cuando se realice el diseño de un programa de evaluación pre-clínica de inmunotoxinas o anticuerpos monoclonales. Dos documentos describen GLP (Good Laboratory Practice) para la realización de estudios de seguridad pre-clínica: un documento emitido por la FDA en el Código de Regulaciones Federales, Título 21, Parte 58 (21CFR58) y un documento emitido por la Organización para la Cooperación y el Desarrollo (OCDE) [21CFR58, 2016, OECD, 2016].

Estos datos proporcionados por la FDA promueven las prácticas para asegurar la calidad e integridad de los resultados de seguridad pre-clínica presentados en apoyo para iniciar los ensayos clínicos en humanos. El proceso de realización, monitoreo, registro, archivo y presentación de informes de los estudios se describen a fondo en ambos documentos. Aunque el ICH S8 “*Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals*” ofrece recomendaciones sobre las pruebas clínicas para la inmunosupresión inducida por fármacos de bajo peso molecular, esta información es aplicable a los ensayos de inmunotoxicidad de los anticuerpos monoclonales [ICH S8, 2005]. Otros dos documentos importantes emitidos por las agencias reguladoras para el diseño de los ensayos piloto en voluntarios humanos sanos incluyen la “*Stimating the maximum safe starting dose in initial clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers*” emitido por la FDA [FDA, 2005] y el emitido por la EMEA “*Strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products*” [EMA, 2007].





**Figura 1.** Proceso general de selección y validación de inmunotoxinas.

### **Discusiones y conclusión**

El desarrollo de inmunotoxinas para tratamiento del cáncer de mama ha abierto la posibilidad de un nuevo concepto para el tratamiento efectivo del cáncer. Varios ensayos preclínicos y clínicos se han llevado a cabo validar el desarrollo de diversas inmunotoxinas que han demostrado ser más específicas para biomarcadores específicos del cáncer de mama demostrando que tienen capacidad de ingresar al tumor.

Comparar las inmunotoxinas desarrolladas con tecnologías tradicionales por ejemplo fármacos solubles, ha proporcionado una mejor comprensión de la aplicación y desventajas asociadas con el tratamiento basado en inmunotoxinas. Los análisis realizados a nivel *in vitro* e *in vivo* en diversos modelos como los mencionados previamente, permiten realizar cambios que favorezcan el paso a ensayos clínicos en humanos. Sin embargo, mejorar y ampliar los análisis para la detección de la toxicidad podría coadyuvar a desarrollar mejores versiones de inmunotoxinas, por ejemplo, con mayor afinidad, especificidad y menor toxicidad empleando aproximaciones como la bioinformática.

Tener en cuenta el diseño racional de las inmunotoxinas y las normas de Buenas Practicas de Laboratorio y de Manufactura establecidas por las diversas agencias gubernamentales internacionales como la FDA y la EMEA y las nacionales COFEPRIS, permitirá determinar cuáles son las inmunotoxinas con mejores características ampliando la esperanza de desarrollar un tratamiento contra el cáncer de mama. Sin embargo, algunas de estas Guías deben ser actualizadas acorde a las nuevas tecnologías e innovaciones que se generan.

El progreso en el desarrollo de inmunotoxinas dependerá de la identificación de nuevas dianas antigénicas específicas de los tumores y de inmunotoxinas menos inmunogénicas que los pacientes puedan recibir en ciclos repetidos de tratamiento. Actualmente, se están empleando las tecnologías de cultivo en dos y tres dimensiones (2D y 3D) para la validación de inmunotoxinas empleando técnicas como impedancia, lo cual evita el uso de

radioactividad y presenta la ventaja de monitorear en tiempo real y comparar la eficiencia de penetración.

Las inmunotoxinas recombinantes prometen ser una opción para el tratamiento de padecimientos como el cáncer, pero también podrían ser consideradas en enfermedades autoinmunes. Además, los avances y el diseño racional de inmunotoxinas abren la posibilidad de generar terapias personalizadas, razones por las cuales se espera un incremento en la investigación relacionada con estas moléculas.

## REFERENCIAS

1. Lv, X. *et al.* Gigantoxin-4-4D5 scFv is a novel recombinant immunotoxin with specific toxicity against HER2/neu-positive ovarian carcinoma cells. *Appl Microbiol Biotechnol.* **100**, 6403–13 (2016).
2. Bornstein, G.G. Antibody Drug Conjugates: preclinical considerations. *AAPS J.* **17**,525–34 (2015).
3. Ahmad, Z.A., Yeap, S.K., Ali, A.M., Ho, W.Y., Alitheen, N.B., Hamid, M. scFv antibody: principles and clinical application. *Clin Dev Immunol.* **2012**, 1–15 (2012).
4. Zhang Y.F., & Ho M. Humanization of high-affinity antibodies targeting glypican-3 in hepatocellular carcinoma. *Sci Rep.* **6**:33878 (2016).
5. Pastan, I., Hassan, R., FitzGerald, D. J., Kreitman, R. J. Immunotoxin Treatment of Cancer. *Annu. Rev. Med.* **58**, 221–237 (2007).
6. Olopade, O. I. *et al.* Overexpression of BCL-x protein in primary breast cancer is associated with high tumor grade and nodal metastases. *Cancer J. Sci. Am.* **3**, 230–237 (1997).
7. Schwartz, M.K. Circulating and tissue markers in the longitudinal management of breast cancer patients. *Adv Exp Med Biol.* **353**, 47–53 (1994).
8. Seregini, E., Botti, C., Massaron, S., Martinetti, A, Ferrari, L., Molteni, S.N., Bombardieri, E. Mucinous markers in breast cancer. *Tumori*, **83**, 550–551 (1997).
9. Pupa, S.M., Ménard, S., Andreola, S., Colnaghi, M.I. Antibody response against the c-erbB-2 oncoprotein in breast carcinoma patients. *Cancer Res* **53**, 5864–6 (1993).
10. Disis, M.L., Calenoff, E., McLaughlin, G., Murphy, A.E., Chen, W., Groner, B., Jeschke, M., Lydon, N., McGlynn, E., Livingston, R.B., *et al.* Existent T-cell and antibody immunity to HER-2/neu protein in patients with breast cancer. *Cancer Res.* **54**, 16 LP–20 (1994).
11. Fendly, B.M., Kotts, C., Vetterlein, D., Lewis, G.D., Winget, M., Carver, M.E., Watson, S.R., Sarup, J., Saks, S., Ullrich, A., *et al.* The extracellular domain of HER2/neu is a potential immunogen for active specific immunotherapy of breast cancer. *J. Immunother.* **9**, 449–55 (1990).
12. Carter, P., Rodrigues, M. L., Lewis, G. D., Figari, I., Shalaby, M. R. Towards an immunotherapy for p185 HER2 overexpressing tumors. antigen and antibody molecular engineering in breast cancer diagnosis and treatment. *Adv Exp Med Biol.* **353**:83–94 (1994).
13. Stockmeyer, B., Valerius, T., Repp R., Heijnen I.A.F.M., Bühring J-H, Deo Y.M., Kalden J.R., Gramatzki, M., van de Winkel J.G.J. Preclinical studies with FcγR bispecific antibodies and granulocyte colony-stimulating factor-primed neutrophils as effector cells against HER-2/neu overexpressing breast cancer. *Cancer Res.* **57**, 696–701 (1997).
14. Brinkmann, U., Keppler-Hafkemeyer, A., Hafkemeyer, P. Recombinant immunotoxins for cancer therapy. *Expert Opin Biol Ther.* **1**, 693–702 (2001).
15. Jaramillo-Quintero, L.P., *et al.* Cytotoxic effect of the immunotoxin constructed of the ribosome-inactivating protein curcin and the monoclonal antibody against Her2 receptor on tumor cells. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry.* **79**, 896–906 (2015).
16. Gould, B.J., Contis Montes de Oca A., Romero Rojas A., Rojas-Hernández S., Campos-Rodríguez R., Martínez-Ayala A.L. Phase I study of an antibreast cancer immunotoxin by continuous infusion: report of a targeted toxic effect not predicted by animal studies. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 775–81 (1989).
17. Weiner, L. M., O'Dwyer, J., Kitson, J., Comis, R.L., Frankel, A.E., Bauer, R.J., Konrad, M.S., Groves, E.S. Phase I evaluation of an antibreast carcinoma monoclonal antibody 260F9-recombinant ricin A chain immunoconjugate. *Cancer Res.* **49**, 4062–67 (1989).
18. Pai-Scherf, L. H. *et al.* Hepatotoxicity in cancer patients receiving erb-38, a recombinant immunotoxin that targets the erbB2 receptor. *Clin. Cancer Res.* **5**, 2311–15 (1999).
19. Azemar, M. *et al.* Regression of cutaneous tumor lesions in patients intratumorally injected with a recombinant single-chain antibody-toxin targeted to ErbB2/HER2. *Breast Cancer Res. Treat.* **82**,155–64 (2003).
20. von Minckwitz, G. *et al.* Phase I clinical study of the recombinant antibody toxin scFv(FRP5)-ETA specific for the ErbB2/HER2 receptor in patients with advanced solid malignomas. *Breast Cancer Res.* **7**, 617–26 (2005).

21. Onda, M., Wang, Q. C., Guo, H. F., Cheung, N. K. V., Pastan, I. In Vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9(Fv)- PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. *Cancer Res.* **64**, 1419–1424 (2004).
22. Rosenblum, *et al.* Recombinant immunotoxins directed against the c-erb-2/HER2/neu oncogene product: in vitro cytotoxicity, pharmacokinetics, and in vivo efficacy studies in xenograft models. *Clin. cancer Res.* **5**, 865–874 (1999).
23. Kuan, C.T., Wikstrand, C. J., Bigner, D. D. EGF mutant receptor VIII as a molecular target in cancer therapy. *Endocrine-Related Cancer.* **8**, 83–96 (2001).
24. Pastan, I., Pai, L. H., Brinkmann, U., & FitzGerald, D. Recombinant immunotoxins. *Breast Cancer Res Tr.* **38**, 3–9 (1996).
25. Yu, Y. H. *et al.* Use of immunotoxins in combination to inhibit clonogenic growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* **50**, 3231–3238 (1990).
26. Bremer, E., Kuijlen, J., Samplonius, D., Walczak, H., De Leij, L., Helfrich, W. Target cell-restricted and -enhanced apoptosis induction by an scFv:sTRAIL fusion protein with specificity for the pancarcinoma associated antigen EGP2. *Intl J Cancer.* **109**, 281–90 (2004).
27. Krolick, K.A., Yuan, D., Vitetta, E. S. Specific killing of a human breast carcinoma cell line by a monoclonal antibody coupled to the A-chain of ricin. *Cancer Immunol. Immunother.* **12**, 39–41 (1981).
28. Olsner, S., & Pihl, A. Different biological properties of the two constituent peptide chains of ricin, a toxic protein inhibiting protein synthesis. *Biochemistry.* **12**, 3121–3126 (1973).
29. Weigel K.J., Shen L., Thomas C.L., Aber D., Drapalik L., Schafer Z., & Lee S. Design and evaluation of a peptide-based immunotoxin for breast cancer therapeutics. *FEBS Open Bio.* **5**, 202–208 (2015).
30. Masuho, Y., Zalutsky. M., Knapp. R. C., & Bast, R. C. Interaction of monoclonal antibodies with cell surface antigens of human ovarian carcinomas. *Cancer Res.* **44**, 2813–2819 (1984).
31. Yu, Y. H. *et al.* Use of immunotoxins in combination to inhibit clonogenic growth of human breast carcinoma cells. *Cancer Res.* **50**, 3231–3238 (1990).
32. Kameswarana M., *et al.* 131I-Nimotuzumab—a potential radioimmunotherapeutic agent in treatment of tumors expressing EGFR. *Applied Radiation and Isotopes.* **102**, 98–102 (2015).
33. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature.* **227**, 680–685 (1970).
34. Chen, J., *et al.* Comparison of succinimidyl [(125)I]iodobenzoate with iodogen iodination methods to study pharmacokinetics and ADME of biotherapeutics. *Pharm Res.* **31**, 2810–21 (2014).
35. Gadadhar, S., Karande A.A. Abrin immunotoxin: targeted cytotoxicity and intracellular trafficking pathway. *PLoS One.* **8**, e58304 (2013).
36. Bortolotti, M., Bolognesi A., Battelli M.G., Polito L. High in vitro anti-tumor efficacy of dimeric rituximab/saporin-S6 immunotoxin. *Toxins (Basel).* **8**, E192 (2016).
37. Poenick, S., *et al.* Comparative label-free monitoring of immunotoxin efficacy in 2D and 3D mamma carcinoma in vitro models by impedance spectroscopy. *Biosens Bioelectron.* **15**, 370–6. (2014).
38. Hubert, J. J. *Bioassay.* Dubuque. IA: Kendall/Hunt Publishing Co. 93–95 (1980).
39. Johnson, E. A., & Brown, B. W. The Spearman estimator for serial dilution assays. *Biometrics.* **27**, 79–88 (1961).
40. Polito, L., *et al.*, Stirpe F. The conjugate Rituximab/saporin-S6 completely inhibits clonogenic growth of CD20-expressing cells and produces a synergistic toxic effect with Fludarabine. *Leukemia.* **18**, 1215–22 (2004).
41. Onda, M., Wang, Q. C., Guo, H. F., Cheung, N. K. V., Pastan, I. In vitro and in vivo cytotoxic activities of recombinant immunotoxin 8H9 (Fv)-PE38 against breast cancer, osteosarcoma, and neuroblastoma. *Cancer Res.* **64**, 1419–1424 (2004).
42. Brinkmann, U., Pai, L. H., FitzGerald, D. J., Willingham, M., Pastan, I. B3(Fv)-PE38KDEL, a single-chain immunotoxin that causes complete regression of a humancarcinoma in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 8616–8620 (1991).
43. Onda, M., Kreitman, R.J., Vasmatzis, G., Lee, B., & Pastan, I. Reduction of the nonspecific animal toxicity of anti-Tac(Fv)-PE38 by mutations in the framework regions of the Fv which lower the isoelectric point. *J. Immunol.* **163**, 6072–6077 (1999).

44. Safari E., *et al.* Cytotoxic effect of immunotoxin containing the truncated form of pseudomonas exotoxin a and anti-VEGFR2 on HUVEC and MCF-7 cell lines. *Cell Journal*. **16**, 203–210 (2014).
45. Parihar, S. *et al.* Gallic acid based steroidal phenstatin analogues for selective targeting of breast cancer cells through inhibiting tubulin polymerization. *Steroids* **77**, 878–886 (2012).
46. Chauhan, K. *et al.* Bivalent approach for homodimeric estradiol based ligand: synthesis and evaluation for targeted theranosis of ER(+) breast carcinomas. *Bioconjugate Chem.* **27**, 961–972 (2016).
47. Zhou, X.X., Ji F., Zhao J.L., Cheng L.F., Xu C.F. Anti-cancer activity of anti-p185HER-2 ricin A chain immunotoxin on gastric cancer cells. *J Gastroenterol Hepatol.* **25**, 1266–75 (2010).
48. Lv, M., *et al.* Construction, expression, and characterization of a recombinant immunotoxin targeting EpCAM. *Mediators Inflamm.* **2015**:460264 (2015).
49. Andersson, Y., Le H., Juell S., & Fodstad Ø. AMP-activated protein kinase protects against anti-epidermal growth factor receptor-Pseudomonas exotoxin A immunotoxin-induced MA11 breast cancer cell death. *Mol Cancer Ther.* **5**, 1050–9 (2006).
50. Xu, F., *et al.* Synergistic interaction between anti-p185HER-2 ricin A chain immunotoxins and radionuclide conjugates for inhibiting growth of ovarian and breast cancer cells that overexpress HER-2. *Clin Cancer Res.* **6**, 3334–41 (2000).
51. Phillips, G. D. L., *et al.* Targeting HER2-positive breast cancer with trastuzumab-DM1, an antibody–cytotoxic drug conjugate. *Cancer Res.* **68**, 9280–90 (2008).
52. Oh, S., *et al.* A novel reduced immunogenicity bispecific targeted toxin simultaneously recognizing human epidermal growth factor and interleukin-4 receptors in a mouse model of metastatic breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* **15**, 6137–47 (2009).
53. Alewine, C., *et al.* Efficacy of RG7787, a next-generation mesothelin-targeted immunotoxin, against triple-negative breast and gastric cancers. *Mol Cancer Ther.* **13**, 2653–61 (2014).
54. Knutson, S., *et al.* Development and evaluation of a fluorescent antibody-drug conjugate for molecular imaging and targeted therapy of pancreatic cancer. *PLoS One.* **11**, e0157762 (2016).
55. Onda, M. *et al.* Lowering the isoelectric point of the Fv portion of recombinant immunotoxins leads to decreased nonspecific animal toxicity without affecting anti- tumor activity. *Cancer Res.* **61**, 5070–5077 (2001).
56. ICH S7A. Guideline. Safety pharmacology studies for human pharmaceuticals (2005). [www.ich.org/LOB/media/MEDIA504.pdf](http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA504.pdf).
57. Woo, J.H. *et al.* Preclinical studies in rats and squirrel monkeys for safety evaluation of the bivalent anti-human T cell immunotoxin, A-dmDT390-bisFv(UCHT1). *Cancer Immunol Immunother* **57**, 1225-1239. (2008)
58. ICH S7B. Guideline. The Non-clinical Evaluation of the Potential for delayed Ventricular Repolarisation (QT Interval Prolongation) by Human Pharmaceuticals (2000). [www.ich.org/LOB/media/MEDIA2192.pdf](http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA2192.pdf).
59. FDA PTC. Points to Consider in the Manufacture and Testing of Monoclonal Antibody Products for Human Use (1997). [www.fda.gov/CBER/gdlns/ptc\\_mab.pdf](http://www.fda.gov/CBER/gdlns/ptc_mab.pdf).
60. 21CFR58. Good Laboratory Practice for Nonclinical Laboratory Studies (2016). [www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx\\_03/21cfr58\\_03.html](http://www.access.gpo.gov/nara/cfr/waisidx_03/21cfr58_03.html).
61. OECD GLP. Good Laboratory Practice (2016). [www.oecd.org/department/0,3355,en\\_2649\\_3438\\_1\\_1\\_1\\_1\\_1,00.html](http://www.oecd.org/department/0,3355,en_2649_3438_1_1_1_1_1,00.html).
62. ICH S8. Guideline. Immunotoxicity Studies for Human Pharmaceuticals (2005). [www.fda.gov/CBER/gdlns/ichs8immuno.htm](http://www.fda.gov/CBER/gdlns/ichs8immuno.htm).
63. FDA. Guidance for Industry. Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers (2005). [www.fda.gov/Cder/Guidance/5541fnl.pdf](http://www.fda.gov/Cder/Guidance/5541fnl.pdf).
64. EMEA. Guideline. Strategies to identify and mitigate risks for first-in-human clinical trials with investigational medicinal products (2007). <http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/2836707enfin.pdf>.
65. Cavagnaro, J. A. Preclinical safety evaluation of biopharmaceuticals: A science-based approach to facilitate clinical trials. *Hoboken, NJ: Wiley & Sons.*1033 (2008).

66. Teicher, B. A., & Andrews, P. A. Anticancer Drug Development Guide: Preclinical Screening, Clinical Trials, and Approval. Springer Science & Business Media. (2004).
67. ICH S6. Guideline. Preclinical evaluation of biotechnology-derived Pharmaceuticals (1997). [www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Safety/S6\\_R1/Step4/S6\\_R1\\_Guideline.pdf](http://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Safety/S6_R1/Step4/S6_R1_Guideline.pdf)
68. ICH M3. Guideline. Nonclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals (2009). [www.fda.gov/cder/Guidance/1859fnl.pdf](http://www.fda.gov/cder/Guidance/1859fnl.pdf).
69. ICH S3A. Guideline. Toxicokinetics: the assessment of systemic exposure in toxicity studies (1994). [www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/ichs3a.pdf](http://www.fda.gov/CDER/GUIDANCE/ichs3a.pdf).
70. ICH S4. Guideline. Duration of Chronic Toxicity Testing in Animals (Rodent and Non-Rodent Toxicity Testing (1998). [www.ich.org/LOB/media/MEDIA497.pdf](http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA497.pdf).
71. ICH M4. Guideline. Organisation of The Common Technical Document for The Registration of Pharmaceuticals for Human Use (1999). [www.ich.org/LOB/media/MEDIA554.pdf](http://www.ich.org/LOB/media/MEDIA554.pdf).
72. EMEA. Guideline. Position Paper on the non-clinical safety studies to support clinical trials with a single micro dose (2003). [www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/259902en.pdf](http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/259902en.pdf).

## **Análisis de Biopsias de Mama Cancerígenas Mediante la Técnica SERS**

*Julia Nava Vargas, Claudio Frausto Reyes, Antonio Ocegüera Villanueva, María de la Luz Miranda Beltrán y Rodolfo Hernández Gutiérrez*

### **Introducción**

En el mundo, más de 11 millones de personas son diagnosticadas con cáncer cada año y se estima que habrá 16 millones de casos por año en el 2020. De un total de 58 millones de muertes en el mundo ocurridas en el 2005, 7.6 millones (13%) fueron debidas al cáncer. Se prevé que las muertes por cáncer seguirán en aumento y se estima que 9 millones de personas morirán de cáncer en el 2015 y 11.4 millones en el 2030 (1). Dentro de las diferentes tipos de neoplasias, el cáncer de mama ocupa el primer lugar de ocurrencia y de mortalidad en las mujeres a nivel mundial (2). Estimaciones basadas en los niveles de incidencia, señalan que una mujer de cada 10 desarrollará cáncer de mama en algún momento de su vida (2). En los Estados Unidos de América, el cáncer de mama constituye la primera causa de muerte en mujeres de 40 a 55 años de edad, en el año 2002 se reportaron cerca de 180 mil casos y en el año 2010 esta cifra se elevó a aproximadamente 200 mil casos de CM de mama con una mortalidad de alrededor de 40 mil (1), y en la Unión Europea aproximadamente 130,000 mujeres mueren anualmente por este tipo de cáncer (1).

Se ha establecido que el cáncer de mama involucra la acumulación de un gran número de alteraciones genéticas y de señalización en el control del sistema celular, así como de las células que la rodean. La función normal y fisiológica en una célula es iniciada y controlada por proteínas específicas, incluyendo factores de crecimiento, hormonas, receptores, reguladores del ciclo celular, moléculas de adhesión y otras proteínas de señalización celular. Un proceso canceroso involucra la alteración de varias proteínas induciendo la malignidad celular [1].

Varios estudios han estimado que aproximadamente el 50% de la incidencia de cáncer de mama puede ser atribuida a factores de riesgo tanto genéticos como fisiológicos. Los factores de riesgo genéticos representan del 5 al 10 % de los casos de cáncer de mama, entre ellos están los factores de riesgo ya establecidos como el comportamiento y los fisiológicos que influyen en un primer grado para tener cáncer de mama, además existen los factores reproductivos como los asociados a una exposición prolongada a estrógenos endógenos, una menarquia precoz, una menopausia tardía, una edad madura y el primer parto figuran entre los factores de riesgo más importantes que contribuyen al cáncer de mama [2,3]. Otro tipo de factores como son el fumar, el alcohol, la nutrición (comida y consumo de grasa), la actividad física y el estrés psicológicos contribuyen a un aumento a contraer cáncer de mama. La incidencia del cáncer se relaciona directamente con la edad, ya que las personas están más tiempo expuestas a factores causales relacionados con esta enfermedad. De acuerdo con la OMS, el cáncer podría disminuir casi en una tercera parte del total de casos, si la detección y el tratamiento fueran oportunos [4]. Los cánceres más comunes a nivel mundial por género son: para el caso de los hombres en orden de incidencia, pulmón, próstata, colorectal estómago e hígado, y para el caso de la mujeres; Mama, Colorectal, pulmón, cáncer cérvico-uterino y estómago.

El cáncer de mama es el que presenta mayor incidencia y mortalidad en las mujeres de todo el mundo, pues representa el 19% de todos los cánceres femeninos. Se estimó que en 2012 murieron 521,907 mujeres por cáncer de mama y, aunque este cáncer está considerado como una enfermedad del mundo desarrollado, la mayoría (69%) de las defunciones por esa causa se registran en los países en desarrollo [5].

La incidencia varía mucho en todo el mundo, con tasas normalizadas por edad de hasta 99.4 por 100 000 en América del Norte. Europa oriental, América del Sur, África austral y Asia occidental presentan incidencias moderadas, pero en aumento. La incidencia más baja se da en la mayoría de los países africanos, pero también en ellos se observa un incremento de la incidencia de cáncer de mama.

Las tasas de supervivencia del cáncer mamario varían mucho en todo el mundo, desde el 80% o más en América del Norte, Suecia y Japón, pasando por un 60% aproximadamente en los países de ingresos medios, hasta cifras inferiores al 40% en los países de ingresos bajos [7]. Las bajas tasas de supervivencia observadas en los países poco desarrollados pueden explicarse principalmente por la falta de programas de detección precoz, que hace que un alto porcentaje de mujeres acudan al médico con la enfermedad ya muy avanzada, pero también por la falta de servicios adecuados de diagnóstico y tratamiento [5].

Danaei y colaboradores en un estudio realizado han calculado la contribución de diversos factores de riesgo modificables, exceptuando los factores reproductivos, a la carga global de cáncer de mama. Los autores concluyen que el 21% de todas las muertes por cáncer de mama registradas en el mundo son atribuibles al consumo de alcohol, el sobrepeso, la obesidad, y la falta de actividad física [8].

En nuestro país, en los últimos 15 años, el número de casos de cáncer de mama se ha incrementado año con año, pero al realizar un análisis de los datos, en total, observamos que del año 2001 (3,391 casos) al año 2015 (11,490 casos) el número de casos se incrementó prácticamente en un 300 %, niveles extremadamente altos, si comparamos este porcentaje de incremento con los datos estimados y reportados por la OMS, encontramos que el número de casos de cáncer de mama en nuestro país se incrementaron en casi el triple de las estimaciones hechas a nivel mundial pero para todos los tipos de cáncer. En el año 2012 el secretario de salud reportó que el año 2012 ocurrieron 10,357 decesos por esta neoplasia, lo que significa que en México, cada minuto muere un poco más de una mujer debido al cáncer de mama [6, 9].

En los países subdesarrollados como el nuestro el cáncer de mama es también un problema de salud grave, en México el cáncer de mama representa la segunda neoplasia más frecuente en la mujer, con una incidencia de 18.5 por 100 mil habitantes, y constituye la primera causa de muerte en mujeres de 29 y 60 años de edad. Lo anterior, permite formarnos una idea de la magnitud y gravedad del problema. La mayoría de las mujeres que mueren por causa de esta enfermedad, pierden cerca de dos décadas de su vida, de esta forma, se estima que aproximadamente dos millones de años vida-mujer productiva son perdidos anualmente por cáncer de mama en Estados Unidos y Europa. A pesar de que cerca del 87% de todos los casos sobreviven aproximadamente 5 años, cerca de la mitad de todas las mujeres mueren por causa de cáncer de mama, en la primera década después del diagnóstico [6].

De acuerdo al estudio realizado por la OMS en 2005, es posible prevenir el 30% de los casos de cáncer a través de la disminución de factores de riesgo. Por ello, como resultado de las recomendaciones internacionales, en México se llevan a cabo programas

encaminados a prevenir los principales tipos de cáncer, a través de estrategias de prevención y detección oportuna, dos ejes que son fundamentales para disminuir la morbilidad y mortalidad por dicho padecimiento [6,10,11].

La detección temprana del cáncer de mama es de vital importancia. El uso de la mamografía ha demostrado su eficacia puesto que se ha observado una reducción de la mortalidad desde su implementación entre un 20 y 35% en mujeres con edades entre 40 y 69 años. Sin embargo, el valor predictivo de la mamografía disminuye cuando los pacientes presentan tejido mamario denso y lesiones pequeñas, así como en mujeres premenopausicas y menores de 40 años. La detección del cáncer de mama en etapas tempranas es de gran importancia, en las mujeres con cáncer de mama temprano (estadios I-IIIa) toda la enfermedad se limita a la mama y a los ganglios linfáticos regionales y el proceso resulta potencialmente curable con cirugía (C) ± radioterapia (RT). Pero, por supuesto que el incremento en la efectividad del tratamiento en etapas tempranas depende del diagnóstico temprano, por lo que se han encaminado los esfuerzos en la búsqueda de biomarcadores para el diagnóstico

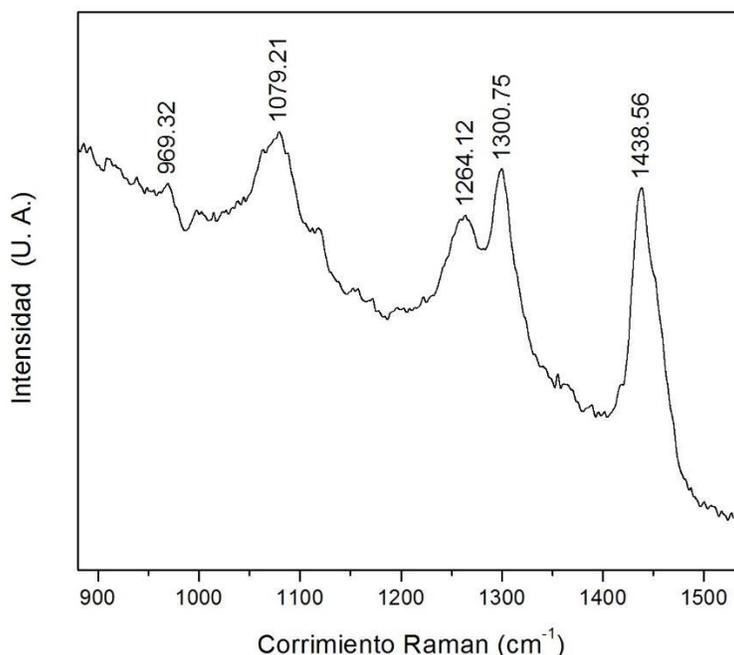
Los datos anteriores han motivado a investigadores a explorar otras técnicas con la finalidad de mejorar el diagnóstico del cáncer de mama, reducir el número de biopsias junto con el trauma del paciente y los altos costos médicos. Las técnicas espectroscópicas se caracterizan por ser no invasivas y no destructivas además que requieran una mínima cantidad de muestras para el análisis. Dentro de estas técnicas, la espectroscopia Raman proporciona información de la composición del tejido a nivel molecular [12-19]. La espectroscopia Raman de superficie amplificada (siglas en inglés SERS) es una técnica novedosa que se emplea para analizar muestras a bajas concentraciones. Esta técnica se basa en el uso de sustratos (nanoestructurados) o coloides de nanopartículas de oro y plata. Con ayuda de estas nanopartículas, se ha sido capaz de detectar moléculas aisladas implicando un aumento tanto de la sensibilidad como de la selectividad, lo que hace del SERS una técnica de gran potencial con prometedoras aplicaciones analíticas [20,21]. Esta técnica permite amplificar la señal, proporcionando nueva información sobre el espectro de la muestra analizada; mientras que el espectro Raman convencional muestra solamente el análisis de la estructura molecular, proveniente de la excitación de las moléculas de la muestra.

El objetivo de este capítulo es mostrar una nueva metodología, al implementar la técnica SERS con ayuda del análisis de componentes principales, para el análisis de biopsias de cáncer de mama. Este análisis podría ayudar no solo a identificar si no también a clasificar las biopsias, lo cual a su vez, permitirá comparar o en su caso complementar con lo reportado por el patólogo en dichas muestras.

### **Espectroscopia Raman**

Rayleigh afirmaba que el color azul del mar no es más que el azul del cielo visto en reflexión. En 1922 el físico indio Chandrasekhara Venkata Raman consideró que el esparcimiento de la luz en las moléculas de agua podría explicar el color del mar, exactamente como el esparcimiento de la luz en las moléculas de aire podría explicar el color del cielo [22]. En 1923 uno de sus alumnos observó un cambio de color en un rayo de luz solar mientras estudiaba la dispersión de la luz en el agua y en alcoholes purificados. Después de realizar varias pruebas de purificación de la muestra, Chandrasekhara Venkata Raman y su equipo no fueron capaces de eliminar este efecto y por tanto sospecharon que el fenómeno era una propiedad característica de la sustancia. En 1930 gracias a la descripción del fenómeno Raman obtiene el premio Nobel de física [22,23].

La espectroscopia Raman es una técnica analítica que proporciona en pocos segundos información química y estructural de casi cualquier material o compuesto orgánico e inorgánico, lo cual permite su identificación. Esta se basa en la interacción inelástica de la luz láser con la materia. Una pequeña porción de la luz es dispersada inelásticamente experimentando ligeros cambios de frecuencia que son característicos del material analizado e independiente de la frecuencia de la radiación incidente. Se trata de una técnica espectroscópica, en donde un haz laser, de frecuencia  $\nu_0$ , se concentra y se hace incidir sobre el material a analizar sin necesidad de ninguna o mínima preparación previa y que no conlleva ninguna alteración de la superficie sobre la que se realiza el análisis, es decir, es no-destruictiva [24,25]. De la señal dispersada la que mantiene la misma frecuencia  $\nu_0$  que la luz incidente se conoce como dispersión Rayleigh. Esta no aporta ninguna información sobre la composición de la muestra analizada. La luz dispersada que presenta frecuencias distintas a la de la radiación incidente, es la que proporciona información sobre la composición molecular de la muestra y es la que se conoce como dispersión Raman [23]. Las nuevas frecuencias,  $+\nu_s$  y  $-\nu_s$ , son las frecuencias Raman, características de la naturaleza química y el estado físico de la muestra e independientes de la radiación incidente. Las variaciones de frecuencia observadas en el fenómeno de dispersión Raman, son equivalentes a variaciones de energía [23]. Los iones y átomos enlazados químicamente para formar moléculas y redes cristalinas, están sometidos a constantes movimientos vibracionales y rotacionales; estas oscilaciones se realizan a frecuencias bien determinadas en función de la masa de las partículas que intervienen y del comportamiento dinámico de los enlaces existentes. A cada uno de los movimientos vibracionales y rotacionales de la molécula le corresponderá un valor determinado de la energía molecular [23]. En un espectro Raman la posición de un pico se relaciona con el valor de energía involucrado en la vibración (ver figura 1).



**Figura 1.** Espectros Raman de una muestra de biopsia de mama cancerígena homogenizada.

Las aplicaciones médicas de la espectroscopía Raman han sido reportados por varios autores [24-29], por ejemplo se uso en el análisis histoquímico cuantitativo para el diagnóstico de tejidos [30,31], se investigo tejidos normales y cancerosos de mama al usar

un láser de 1064 nm y se encontraron diferencias en los modos vibracionales de la amida [16], esta técnica ha sido capaz de distinguir lesiones benignas de malignas [14]. Alfano y col. en 1991 fueron los primeros en obtener espectros Raman de tejido de seno usando una excitación de 1064 nm. Ellos encontraron que las intensidades relativas de los picos de 1445 y 1651  $\text{cm}^{-1}$  pueden estar correlacionadas con la clasificación de la enfermedad, pero no pudieron asociar estas diferencias espectrales con los cambios bioquímicos en el tejido [16]. Frank y col. 1995; usaron una excitación de 784 nm para obtener espectros de tejido normal, tejido benigno (enfermedad fibroquística), y tejido maligno (carcinoma ductal infiltrante). Ellos encontraron un corrimiento del pico de 1439  $\text{cm}^{-1}$ , en un tejido normal, a 1450  $\text{cm}^{-1}$  en el carcinoma ductal infiltrante. Ellos atribuyen estos cambios al incremento de las concentraciones de proteínas en muestras malignas. Además, mediante la razón de áreas de 1654/ 1439 $\text{cm}^{-1}$  ellos fueron capaces de diferenciar fácilmente un tejido normal de un carcinoma ductal infiltrante; sin embargo, no demostraron estadísticamente diferencias significativas entre el carcinoma ductal infiltrante y el cambio fibroquístico [32].

### **Espectroscopia SERS**

En 1977, Van Duyne y Jeanmaire confirmaron las investigaciones de Albrecht y Creighton realizadas en 1974 sobre la amplificación de la señal Raman. El experimento que realizaron fue el análisis de piridina sobre un electrodo de plata, concluyendo que la señal Raman fue mayor que la Raman convencional y era verdaderamente eficiente [33]. Es por ello, que la espectroscopia Raman de superficie amplificada (siglas en inglés SERS) se define como una técnica que permite el aumento de la intensidad Raman, debido a la absorción de la luz por nanopartículas. Esta técnica está estrechamente ligada a las propiedades morfológicas y superficiales de las nanopartículas.

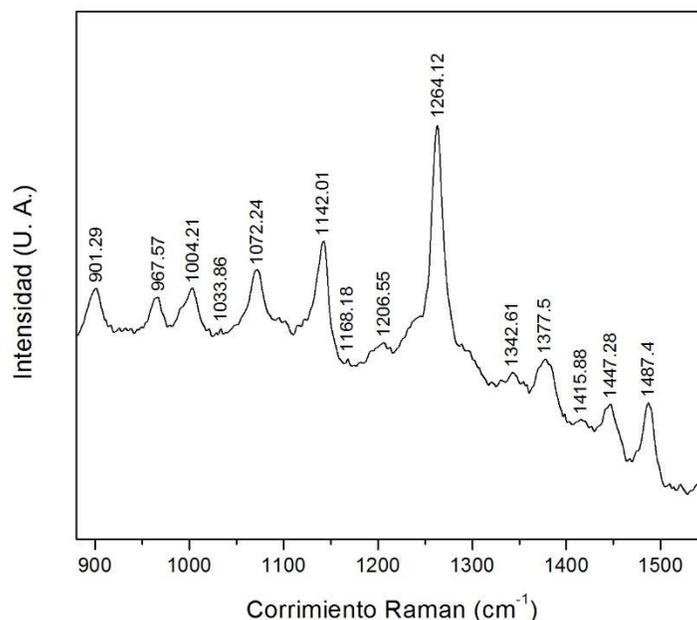
Manliang Feng y Hidrayasu Tachikawa en el 2008 reportaron que para lograr la técnica SERS los coloides o nanopartículas de la muestra deberán ser metales nobles Au, Ag y Cu debido a sus propiedades y a su capacidad de apoyo a la resonancia de plasmones en longitudes de onda visible [20]. Las formas de introducir las nanopartículas puede ser: por *absorción* de manera espontánea sobre la muestra, por *mecanismos físicos* (fisisorción) o mediante la *formación de un enlace covalente* (quimisorción) [20,34].

### **Diferencia de espectros Raman y SERS**

Al comparar los espectros Raman y SERS de una misma muestra se encuentran las siguientes diferencias:

*Raman*: El espectro muestra el análisis de la estructura molecular de la muestra a través de espectros, esto se debe a la excitación de las moléculas de la muestra.

*SERS*: Implica una amplificación de la señal; tanto de la sensibilidad como de la selectividad de este mismo espectro. Dando nueva información sobre el espectro de la muestra analizada, como lo demostró Sanesson S y col. en el 2003 [21,35]. Esto último se corrobora en este capítulo ya que si se compara el espectro Raman de una muestra de biopsia de mama cancerígena homogenizada (ver Figura 1) con el espectro SERS de la misma muestra (ver Figura 2), se pueden observar picos adicionales a la señal Raman convencional.



**Figura 2.** Espectro SERS de una muestra de biopsia de mama cancerígena homogenizada.

Las aplicaciones de la técnica SERS han sido muy importantes, ya que se han encontrado compuestos importantes para la identificación molecular de células cancerígenas cervicouterinas como sulfuros alquilo, ciclopropano, n-alkanos y nitroalkanos entre otros [36]. Además, el análisis mostró uno de los picos más importantes en el espectro: 1620–1670  $\text{cm}^{-1}$ , que corresponde a una Amida I (C=O modo de estiramiento de la proteínas, conformación  $\alpha$ -hélice)/ C=C estiramiento de lípidos); indicando de esta forma el nivel vibracional molecular de estas células. Se ha reportado que las partículas de oro coloidal de aproximadamente 3 y 17 nm son estables durante largos períodos de tiempo, ya que presentan una gran afinidad citoquímica; en especial cuando la solución coloidal se une a las proteínas IgG y A [37]. En el trabajo que se reporta en este capítulo se emplearon nanopartículas de oro de 5 nm de diámetro para el análisis de biopsias de cáncer de mama y con ello ver la viabilidad de elucidar el estadio o grado del cáncer mediante los espectros SERS.

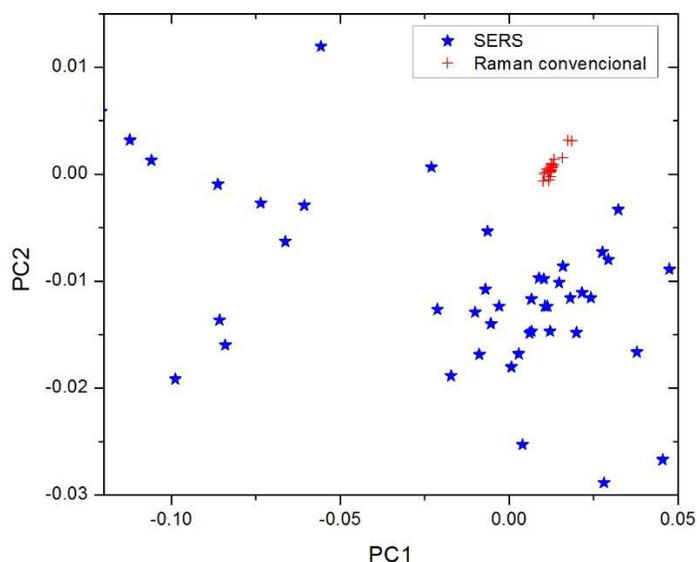
### **Análisis de Componentes Principales**

El análisis de componentes principales (siglas en inglés PCA) es un método estadístico el cual se encarga de la síntesis de la información o reducción de dimensión (número de variables) [38,39]. Los objetivos del PCA se basan en: reducir a un menor número de datos perdiendo la menor cantidad de información posible, evaluar la semejanza del banco de datos y evaluar la relación existente entre las características consideradas.

El PCA tiene sentido si existe alta correlación entre las variables, ya que esto es indicativo de que existe información redundante y, por tanto, pocos factores explicarán gran parte de la variabilidad total. La elección de los factores se realiza de tal forma que el primero recoja la mayor proporción posible de la variabilidad original; el segundo factor debe recoger la máxima variabilidad posible no recogida por el primero, y así sucesivamente. Del total de factores se elegirán aquellos que recojan el porcentaje de variabilidad que se considere suficiente. A éstos se les denominará componentes principales (PC) [38].

El PCA ha sido ampliamente utilizado en diferentes áreas científicas y con diferentes propósitos. La versatilidad y las posibilidades de este método para el análisis de datos

permiten explorar sus aplicaciones en diferentes áreas del conocimiento. Aun cuando los principios y métodos del PCA son los mismos, las estrategias empleadas para aclarar la información de un conjunto de datos específicos dependen principalmente de la experiencia y necesidades de cada investigador. El PCA es muy útil cuando se analizan espectros de muestras biológicas ya que estos presentan pequeñas variaciones en el perfil de intensidades, debido a múltiples factores, que solo se pueden apreciar mediante este método. Además, las graficas que nos proporciona ayudan a dilucidar tendencias en el comportamiento de las muestras en estudio.



**Figura 3.** Clasificación de una serie de espectros Raman de una biopsia de mama cancerígena homogenizada mediante el método PCA.

En este capítulo el PCA nos fue de utilidad para observar tendencias de los espectros entre las diferentes muestras de un mismo grado II, al analizar las biopsias mediante la técnica SERS. En la Figura 3 se puede apreciar como mediante la ayuda del PCA se pudieron clasificar en diferentes grupos los espectros Raman y SERS de biopsias de mama cancerígenas. Esta clasificación de grupos nos indica que el espectro SERS proporciona nueva información, a la obtenida mediante el espectro Raman convencional, corroborando así el objetivo del capítulo.

## Diseño Experimental

### Obtención y preparación de las muestras

#### *Diseño del estudio:*

Transversal analítico.

#### *Criterios del estudio:*

##### *Características de las pacientes*

- Mujeres de Rango de edad: 18 años y mayores.
- Estado general ECOG 2-4.
- Niveles normales de leucocitos, eritrocitos y plaquetas.
- Bilirrubina no mayor a 1.5 mg/dl; SGOT no mayor a 3 veces el límite normal (en el caso de pacientes con carcinoma invasor).

-Creatinina no mayor a 1.5 mg/dl (Ver anexo I)

*Criterios de no inclusión:*

- Embarazo o lactancia.
- Quimioterapia y radioterapia previa.
- Cáncer previo.
- Procesos infecciosos activos.
- Positividad a anticuerpos contra VIH.
- Farmacodependencia.

*Criterios de exclusión:*

- Diagnóstico o clasificación dudosa o no documentada.
- Resultados de laboratorio o clínicos incompletos.
- Insuficiente cantidad de muestra.

*Tamaño de la muestra:*

Se analizaron un total de 12 muestras con diagnóstico positivo de cáncer de mama.

*Obtención de las muestras:*

Las muestras se obtuvieron de biopsias con autorización previa de pacientes que acuden al Instituto Jalisciense de Cancerología del Hospital Civil de Guadalajara Fray Antonio Alcalde con apego estricto al Comité de Ética del propio Instituto y a lo informado en la declaración de Helsinsky. Las biopsias obtenidas provinieron de pacientes con diferente grado de malignidad el cual será diagnosticado por un patólogo experto en el área, el cual realizó el diagnóstico de acuerdo a la escala Scarff-Bloom Richardson. Una vez obtenidas se recibieron e inmediatamente fueron congeladas para ser procesadas mediante la técnica SERS.

*Preparación de las muestras:*

Las muestras, se pesaron (36 mg y 50 mg de tejido), y se tomo la parte central evitando la zona de la grasa y se homogenizo con un sistema politrón (T8.10 ULTRA TURRAX, DE IKA) en presencia de cloruro de sodio (1 ml). Hasta lograr una suspensión homogénea. De esta solución se tomaron 25 µl y se les agrego 75 µl cloruro de sodio. De esta solución se tomaron 50 µl y se le añadió 20 µl de coloide (Au, 5nm de diámetro). Las muestras se agitaron vigorosamente en el vortex por aproximadamente 1min con el fin de que las nanopartículas se dispersarán y se unieran al tejido lo mejor posible. El coloide fue obtenido del fabricante Sigma-Aldrich Química, S.A. de C.V. [40].

## **Equipo Raman**

Para el estudio se utilizó un sistema NIR-Raman comercial marca (Renishaw) modelo 1000B, el cual tiene como fuente de excitación un diodo láser que emite en la región del cercano infrarrojo de 830 nm (ver Figura 4).



**Figura 4.** Equipo microRaman.

Los espectros Raman se obtuvieron mediante un barrido de la muestra con un microscopio Leica, DMLM (objetivo 50X). De cada muestra se tomaron alrededor de 25 espectros con una potencia de laser tal que no provocara daño alguno.

### **Procesamiento de datos**

Cada uno de los espectros SERS fueron suavizados, para eliminar el ruido del sistema, con la herramienta Savitzqui-Golay del software Origin 8. Se tomo en cuenta que el perfil de intensidades de los espectros permaneciera invariante. También, cada espectro fue normalizado a la intensidad del pico Raman del coloide ( $660\text{ cm}^{-1}$ ). Posteriormente a cada espectro se le resto el espectro estándar del coloide, para reducir la información de este. El valor de la intensidad de cada uno de los espectros se utilizo para llenar las columnas de una matriz la cual contuvo la información de todas las muestras. Esta matriz es la que se considero para el procesado del análisis estadístico PCA. El procesado PCA se realizo mediante el software Matlab R-2009.

### **Resultados**

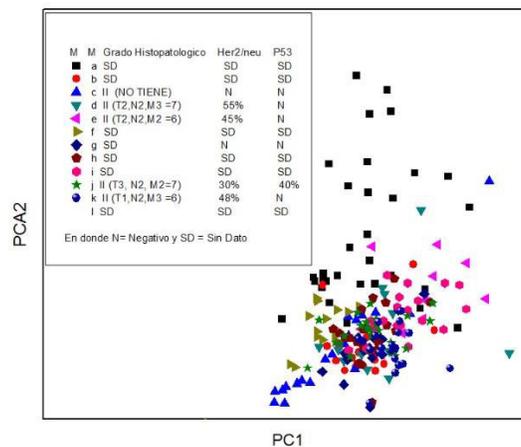
**SERS biopsias.** La posición de los picos Raman, encontrados en los espectros SERS de las 12 biopsias mencionadas en la metodología, se reporta en la Tabla 1. A dichas muestras, se les realizo el procedimiento ya mencionado en la sección de diseño experimental, tomándose alrededor de 25 espectros para cada muestra y posteriormente de estos su espectro promedio. A pesar de que la mayoría de las muestras tienen grado II (de acuerdo a lo reportado por el patólogo), es importante resaltar que cada muestra presenta espectros SERS diferentes, posiblemente debido a la gran cantidad de variables involucradas, y en algunos casos con intensidad y posición de picos Raman en común. En los espectros SERS de la muestras a, e, g y l se observan en común los picos  $486$  y  $562\text{ cm}^{-1}$ . Mientras que en los espectros de las muestras a, b, y j se observan los picos  $1253$  y  $1272\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros de las muestras c, e, y h muestran picos  $640$  y  $750\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras a, b y k presentan un pico en  $1443\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras d, g y k presentan picos en  $1041\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros de las muestras b y e presentan picos en  $1454$  y  $1498\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros de la muestras d y g presentan un pico en  $835\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros de las muestras a y b presentan un pico en  $545\text{ cm}^{-1}$ . Los espectros de las muestras e y f presentan dos picos en  $1223$  y en  $1252\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras g y k presentas picos en  $1182$  y en  $1188\text{ cm}^{-1}$ , mientras que las muestras c y h presentan picos en  $843$  y  $830\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras a y b, presentan picos en  $591$  y  $1140\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras d y e presentan un pico en  $1219\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras e y f presentan pico en  $990\text{ cm}^{-1}$ . Las muestras j y l presentan un pico en  $664\text{ cm}^{-1}$ . Los picos mencionados pudieran corresponder a aminoácidos, proteínas, lípidos, carbohidratos y ácidos nucleicos [2,41,42].

**Tabla 1.** Posición e intensidad de los picos en los espectros SERS promedio correspondientes a las 12 biopsias.

Muestra	Posición de Picos Raman (cm <sup>-1</sup> )
<b>a</b>	540 cm <sup>-1</sup> (d), 591 cm <sup>-1</sup> (d), 870 cm <sup>-1</sup> (md), 1140 cm <sup>-1</sup> (m), 1443 cm <sup>-1</sup> (d)
<b>b</b>	540 cm <sup>-1</sup> (d), 591 cm <sup>-1</sup> (d), 1140 cm <sup>-1</sup> (m), 1259 cm <sup>-1</sup> (i), 1443 cm <sup>-1</sup> (d), 1484 cm <sup>-1</sup> (d)
<b>c</b>	664 cm <sup>-1</sup> (m), 835 cm <sup>-1</sup> (md), 943 cm <sup>-1</sup> (d), 1173 cm <sup>-1</sup> (d), 1363 cm <sup>-1</sup> (d)
<b>d</b>	658 cm <sup>-1</sup> (d), 835 cm <sup>-1</sup> (d), 1041 cm <sup>-1</sup> (mi), 1069 cm <sup>-1</sup> (m), 1196 cm <sup>-1</sup> (m), 1219 cm <sup>-1</sup> (m), 1448 cm <sup>-1</sup> (d), 1643 cm <sup>-1</sup> (m)
<b>e</b>	490 cm <sup>-1</sup> (d), 540 cm <sup>-1</sup> (d), 665 cm <sup>-1</sup> (m), 896 cm <sup>-1</sup> (m), 990 cm <sup>-1</sup> (d), 1219 cm <sup>-1</sup> (d), 1241 cm <sup>-1</sup> (d), 1478 cm <sup>-1</sup> (d)
<b>f</b>	438 cm <sup>-1</sup> (m), 800 cm <sup>-1</sup> (m), 990 cm <sup>-1</sup> (m), 1127 cm <sup>-1</sup> (md), 1230 cm <sup>-1</sup> (d), 1309 cm <sup>-1</sup> (d), 1447 cm <sup>-1</sup> (m)
<b>g</b>	488 cm <sup>-1</sup> (m), 836 cm <sup>-1</sup> (d), 1040 cm <sup>-1</sup> (mi), 1076 cm <sup>-1</sup> (m), 1192 cm <sup>-1</sup> (md), 1663 cm <sup>-1</sup> (d),
<b>h</b>	664 cm <sup>-1</sup> (i), 843 cm <sup>-1</sup> (md), 887 cm <sup>-1</sup> (md), 1070 cm <sup>-1</sup> (d), 1127 cm <sup>-1</sup> (d), 1207 cm <sup>-1</sup> (d), 1437 cm <sup>-1</sup> (m)
<b>l</b>	521 cm <sup>-1</sup> (d), 820 cm <sup>-1</sup> (d), 1156 cm <sup>-1</sup> (d), 1344 cm <sup>-1</sup> (m), 1444 cm <sup>-1</sup> (m)
<b>j</b>	629 cm <sup>-1</sup> (md), 664 cm <sup>-1</sup> (m), 1150 cm <sup>-1</sup> (md), 1273 cm <sup>-1</sup> (d)
<b>K</b>	618 cm <sup>-1</sup> (m), 670 cm <sup>-1</sup> (m), 842 cm <sup>-1</sup> (d), 1043 cm <sup>-1</sup> (d), 1146 cm <sup>-1</sup> (d), 1191 cm <sup>-1</sup> (d), 1441 cm <sup>-1</sup> (m), 1593 cm <sup>-1</sup> (d)
<b>l</b>	455 cm <sup>-1</sup> (md), 490 cm <sup>-1</sup> (md), 661 cm <sup>-1</sup> (i), 853 cm <sup>-1</sup> (md), 1212 cm <sup>-1</sup> (md)
<b>Notación: (mi) muy intenso; (i) intenso; (m) medio; (d) débil; (md) muy débil.</b>	

**PCA biopsias.** Como se había mencionado existe una gran cantidad de variables involucradas por lo tanto fue necesario procesar, mediante el PCA, los grupos de espectros SERS de las 12 muestras con el fin de visualizar mejor las características de dichos espectros (ver Figura 5). En esta grafica no se observa una gran separación de los grupos de datos ya que posiblemente las doce muestras corresponden al grado histológico II; pero si se observa, considerando el eje PC2, que los datos correspondientes a la muestra c y g están de lado opuesto a los datos correspondientes a la muestra d y e. Es importante resaltar que las proteínas Her/neu se encuentran en gran porcentaje en las muestras analizadas, lo que quizá explicaría esta separación.

Aunque se necesita un número de muestras más grande para tener un estudio completo, estos datos demuestran que es posible emplear la técnica SERS con ayuda del PCA para complementar los estudios reportados por el patólogo.



**Figura 5.** PCA correspondientes a las 12 biopsias de mama cancerígenas homogenizadas.

## **Conclusiones**

Se desarrollo e implementó una nueva metodología para el análisis de biopsias de mama a través de la técnica SERS con el fin de ser utilizada como técnica complementaria en los estudios histopatológicos de pacientes de cáncer de mama. A pesar de que la repetitividad del espectro fue mínima se lograron encontrar picos en común entre las diferentes muestras. Las diferencias encontradas en los espectros SERS pudiera deberse a la variación de la composición química de las diferentes características o variables de un carcinoma invasor. El PCA posiblemente podría inferir el grado histológico aun cuando no se tenga el reporte histopatológico de la mayoría de las muestras. Con este trabajo es posible iniciar la creación de una librería SERS de los diferentes grados histológicos en biopsia de mama.

## Referencias

1. B. G. Wren, AM, MD, MHPEd, FRANZCOG, FRCOG, "The origin of breast cancer", *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society*, Vol. 14, 6, 2007, pp. 1060-1068.
2. International Agency for Research on Cancer (IARC), "World cancer report 2008", Lyon, 2008, documento revisado el 16 de febrero de 2012 de: <http://www.iarc.fr/en/publications/pdfs-online/wcr/2008/>
3. J. V. Lacey, A. R. Kreimer, S. S. Buys, P. M. Marcus, Shih-Chen Chang, M. F. Leitzmann, R. N. Hoover, P. C. Prorok, C. D. Berg, P. Hartge, the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Project Team, "Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort", *BMC Cancer*, Vol. 9, 84, 2009, pp.1-8.
4. L. Antonova, K. Aronson, C. R. Mueller. "Stress and breast cancer: from epidemiology to molecular biology", *Breast Cancer Research*, Vol. 13, 208, 2011.
5. Organización Mundial de la Salud (OMS), "Cáncer de mama: prevención y control", documento revisado el 16 de febrero de 2012 de: <http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index.html>
6. Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI), "Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer datos nacionales", documento revisado el 16 de febrero de 2012 de: <http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/prensa/contenidos/estadisticas/2011/cancer11.asp?s=inegi&c=2781&ep=51>. Boletín de epidemiología 2001-2016.
7. M. P. Coleman, M. Quaresma, F. Berrino, J. M. Lutz, R. De Angelis, R. Capocaccia, P. Baili, B. Rachet, G. Gatta, T. Hakulinen, A. Micheli, M. Sant, H. K. Weir, J. M. Elwood, H. Tsukuma, S. Koifman, G. A. E Silva, S. Francisci, M. Santaquilani, A. Verdecchia, H. H. Storm, J. L. Young; CONCORD Working Group, "Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD)", *Lancet Oncol.*, Vol. 9, 8, 2008, pp. 730–56.
8. Danaei, S. Vander Hoorn, A. D. Lopez, C. J. Murray, M. Ezzati, "Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors", *Lancet*, Vol. 366, 9499, 2005, pp. 1784–1793.
9. Secretaría de Salud (SSA), "Programa de Acción específico 2007-2012 Cáncer de mama", cáncer de mama, documento revisado el 16 de febrero de 2012 de: <http://www.spps.gob.mx/programas-y-proyectos.html>
10. Organización Mundial de la Salud (OMS), "Cáncer", Nota descriptiva No. 297, documento revisado el 16 de Febrero de 2012 de: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/es/index.html>
11. Organización Mundial de la Salud [OMS], Unión Internacional Contra el Cáncer, "Acción Mundial contra el Cáncer", versión revisada 2005, documento revisado el 16 de febrero de 2012 de: <http://www.who.int/cancer/media/AccionMundialCancerfull.pdf>
12. S. Haka, Z. Volynskaya, J. A. Gardecki, J. Nazemi, R. Shenk, N. Wang, R. R. Dasari, M. Fitzmaurice, M. S. Feld, "Diagnosing breast cancer using Raman spectroscopy: prospective analysis", *J. Biomed. Opt.*, Vol. 14, 5, 054023, 2009, pp. 1-8.

13. Murali Krishna, J. Kurien, M. Stanley, R. Lakshmi, K. Maheedhar, K. Kalyan Kumar, M. V. P. Chowdary, "Raman spectroscopy of breast tissues", *Expert Review of Molecular Diagnostics*, Vol. 8, 2, 2008, pp. 149-166.
14. V. P. Chowdary, K. Kalyan Kumar, Jacob Kurien, Stanley Mathew, C. Murali Krishna, "Discrimination of Normal, Benign, and Malignant Breast Tissues by Raman Spectroscopy", *Biopolymers*, Vol. 83, 5, 2006, pp. 556-569.
15. R. Andrade Bitar, H. da Silva Martinho, C. J. Tierra-Criollo, L. N. Zambelli Ramalho, M. Mourão Netto, A. Abrahão Martin, "Biochemical analysis of human breast tissues using Fourier-transform Raman spectroscopy", *J. Biomed. Opt.*, Vol. 11, 5, 054001, 2006, pp.1-8.
16. R. R. Alfano, C. H. Liu, W. L. Sha, H. R. Zhu, D. L. Akins, J. Cleary, R. Prudente, E. Clemer, "Human breast tissues studied by IR Fourier transform Raman spectroscopy", *Lasers in the Life Sci.* Vol. 4, 1, 1991, pp. 23-28.
17. Medina-Gutierrez, C. Frausto-Reyes, J. L. Quintanar-Stephano, R. Sato-Berru, "[Amino acid contents along the visual and equatorial axes of a pig lens by Raman spectroscopy](#)", *Spectrochim. Acta A*, Vol. 60, 10, 2004, pp. 2269-2274
18. Medina-Gutierrez, C. Frausto-Reyes, J. L. Quintanar-Stephano, R. Sato-Berru, O. Barbosa-Garcia, "[Study of the protein distribution in the pig lens cross section by Raman spectroscopy](#)", *Spectrochim. Acta A*, Vol. 60, 7, 2004, pp. 1573-1577.
19. C. Medina-Gutiérrez, J. L. Quintanar-Stephano, C. Frausto-Reyes, R. Sato-Berru, "[The application of NIR Raman spectroscopy in the assessment of serum thyroid-stimulating hormone in rats](#)", *Spectrochim. Acta A*, Vol. 61, 1-2, 2005, pp. 87-91.
20. Manliang, T. Hidrayasu, "Surface-Enhanced Resonance Raman Spectroscopic Characterization of the protein native structure". *J. Am. Chem. Soc.*, Vol. 130, 23, 2008, pp. 7443-7448.
21. L. A. Lyon, C. D. Keating, A. P. Fox, B. E. Baker, L. He, R. Nicewarner, S. P. Mulvaney, M. Natan, "Raman spectroscopy", *Anal. Chem.*, Vol. 70, 12, 1998, pp. 341-362.
22. R. Singh, "C. V. Raman and the Discovery of the Raman Effect", *Phys. perspect.* Vol. 4, 4, 2002, pp. 399-420.
23. J. R. Ferraro, K. Nakamoto, "*Introductory Raman Spectroscopy*", (Academic Press, San Diego, 1994), Chapter 1, pp. 1-94.
24. M. Diem, P. R. Griffiths, J. M. Chalmers, "Vibrational Spectroscopy for Medical Diagnosis", Wiley, New York, 2008.
25. B. Schrader, B. Dippel, S. Fendel, S. Keller, T. Lochte, M. Riedl, R. Schulte, E. Tatsch, "NIR FT Raman spectroscopy—a new tool in medical diagnostics", *J. Mol. Struct.*, Vol. 408-409, 1, 1997, pp. 23-31.
26. Y. Ozaki, "Medical application of Raman spectroscopy", *Appl. Spectrosc. Rev.*, Vol. 24, 3-4, 1988, pp. 259-312.
27. S. M. Nie, K. L. Bergbauer, J. F. R. Kuck, N. T. Yu, "Near-infrared Fourier-transform Raman-spectroscopy in human lens research", *Exp. Eye Res.*, Vol. 51, 5, 1990, pp. 619-623.
28. Mahadevan-Jensen, R. Richards-Kortum, "Raman spectroscopy for the detection of cancers and precancers", *J. Biomed. Opt.*, Vol. 1, 1, 1996, pp. 31-70.
29. E. Lawson, B. W. Barry, A. C. Williams, H. G. Edwards, "Biomedical applications of Raman spectroscopy", *J. Raman Spectrosc.* Vol. 28, 2-3, 1997, pp. 111-117.
30. R. Manoharan, Y. Wang, M. S. Feld, "Review: histochemical analysis of biological tissues using Raman spectroscopy", *Spectrochim. Acta A*, Vol. 52, 2, 1996, pp. 215-249.

31. R. Richards-Kortum, E. Sevick-Muraca, "Quantitative optical spectroscopy for tissue diagnosis", *Annu. Rev. Phys. Chem.*, Vol. 47, 1996, pp. 455–606.
32. J. Frank, R. L. McCreery, D. C. B. Redd, "Raman spectroscopy of normal and diseased human breast tissues", *Anal. Chem.*, Vol. 67, 5, 1995, pp. 777–783.
33. K. Kneipp, H. Kneipp, J. Kneipp, "Surface-Enhanced Raman Scattering in Local Optical Fields of Silver and Gold Nanoaggregates From Single-Molecule Raman Spectroscopy to Ultrasensitive Probing in Live Cells" *Accounts of chemical research*, Vol. 39, 7, 2006, pp. 443-450.
34. J. F. Arenas, D. Peláez, M. R. López Ramírez, J. L. Castro, J. C. Otero, "Mecanismo químico en SERS", "Chemical enhancement mechanism in SERS", *Opt. Pur. y Apl.*, Vol. 37, 2, 2004, pp. 23-32.
35. S. Santesson, J. Johansson, S. Lynne, la Levander, S. Fox, M. Sepaniak, S. Nilsson, "Airborne Chemistry Copled to Raman Spectroscopy", *Anal. Chem.*, 75, 9, 2003, pp. 2177-2180.
36. S. Lee, S. Kim, J. Choo, S. Young Shin, Y. Han Lee, H. Young Choi, S. Ha, K. Kang, Chil Hwan Oh, "Biological Imaging of HEK293 Cell Espressing PLCy1 using Surface-Enhanced Raman Microscopy", *Anal. Chem.*, Vol. 79, 3, 2007, pp. 916–922.
37. M. T. Toral, "*Fisicoquímica de Superficies y Sistemas Dispersos*", URMO, Bilbao. 1973, pp. 127.
38. K. H. Esbensen, "*Multivariate Data Analysis - in practice: an introduction to multivariate data analysis and experimental design*", CAMO, 5th Ed., 2004, PP. 19.
39. N. Stone, C. Kendall, N. Shepherd, P. Crow, H. Barr, "Near-infrared Raman spectroscopy for the classification of epithelial pre-cancers and cancers", *J. Raman Spectrosc.*, Vol. 33, 7, 2002, pp. 564–573.
40. P. Hiemenz, "*Principles of Colloid and Surface Chemistry*", Second Ed. Marcel Dekker Inc. New York, 1986.
41. B. B. Lowitz, D. A. Casciato, "Principios, definiciones y datos estadísticos" En D. A. Casciato, M. C. Territo, Manual de Oncología Clínica. Ed.(Wolters Kluwer Health España, S.A. ISBN 978-84-96921-34-4, 2009,) pp. 4-5.
42. J. L. Castro, M. R. López Ramírez, J. F. Arenas, J. C Otero, "SERS de ácidos aromáticos y  $\alpha$ -aminoácidos relacionados;" SERS of aromatic acids and related  $\alpha$ -aminoacids", *Opt. Pur. y Apl.*, Vol. 37, 2, 2004, pp. 77-85.

## Capítulo XIV

### **Nanomateriales manufacturados (NMM) en los alimentos: Implicaciones en la Seguridad Alimentaria y la salud del consumidor.**

Alejandro Rodríguez Ávila, Oscar Miguel Bermejo Gallardo, Armando Jiménez Ávalos, Hugo Espinosa Andrews, Marisela Gonzalez Ávila, Alberto Gutiérrez Becerra, Inocencio Higuera Ciapara, Zaira Yunuen García Carvajal

**Introducción.** Nanomateriales manufacturados (NMM) y sus aplicaciones en la industria alimentaria.

Hoy en día, el competitivo mercado tiene presente que la tecnología es esencial para mantener el liderazgo en las distintas industrias como la farmacéutica y en la alimentaria. Los consumidores demandan nuevos productos, que sean frescos, innovadores, de larga duración y lo más importante saludables. La nanotecnología es la comprensión y control de estructuras de distintos materiales en los procesos a escala nanométrica, típicamente pero no exclusivamente, por debajo de 100 nanómetros en una o más dimensiones, donde el fenómeno dependiente de tamaño generalmente permite aplicaciones novedosas. Dentro de los nanomateriales manufacturados (NMM) podemos encontrar nanopartículas (NP's), nanotubos, nanofibras, liposomas, etc., éstos presentan propiedades específicas relacionadas directamente con su composición, estructura y tamaño, y son completamente diferentes a las de sus homólogos a escala macro <sup>1,2</sup>.

La investigación de esta disciplina se disparó en la última década, y ahora numerosas compañías se especializan en la creación de nuevas formas nanométricas con aplicaciones específicas para los diferentes sectores. En 2008 la nanotecnología exigió más de 15 billones de dólares en investigación y desarrollo, y necesito más de 400 000 investigadores alrededor del mundo, se estima que para 2020 la nanotecnología tendrá un impacto de 3 trillones de dólares alrededor del mundo y requería más de 6 millones de trabajadores <sup>3</sup>.

La investigación prospectiva de la nanotecnología alimentaria y su incorporación en la industria tiene la capacidad de reinventar el mundo de la alimentación. Del mismo modo las regulaciones sanitarias aplicadas a este sector para la comercialización de los nanoproductos deben quedar claras para asegurar su eficacia e inocuidad <sup>4-5</sup>.

La nanotecnología está invadiendo la industria alimentaria estableciendo grandes aplicaciones y por ende ofreciendo un sin fin de innovaciones para esta industria. La aplicación de la nanotecnología en el sector alimentario puede definirse en 5 principales campos: I) el procesamiento y mejoramiento de productos funcionales; II) encapsulación y

suministro controlado y dirigido de componentes bioactivos y/o nutracéuticos en los lugares elegidos, con la finalidad de cambiar color, sabor, características organolépticas, III) introducción de nanomateriales capaces de eliminar sustancias químicas o agentes patógenos de los alimentos (detección de patógenos y contaminación), IV) desarrollo de sistemas de empackado que podrían afectar de manera positiva la calidad del producto y el tiempo de vida del mismo y, V) Seguimiento, rastreo y protección de marcas, entre otras (ver Tabla 1) <sup>4-9</sup>.

Los alimentos por si mismos contienen materiales nanoestructurados. Este es un punto relevante para poder definir entre nanomateriales naturales y manufacturados. Los alimentos se componen de varios ingredientes, incluyendo biopolímeros como proteínas, carbohidratos complejos y grasas, estos pueden comprender tamaños variados extendiéndose hasta por debajo de las escalas nanométricas. Es importante diferenciar estos dos tipos de nanomateriales para poder establecer las consideraciones regulatorias requeridas y las definiciones pertinentes para su uso.

Muchos de los suplementos nutricionales en combinación con la nanotecnología están disponibles comercialmente ofreciendo ventajas en la eficiencia, pero sin estudios rigurosos de su impacto en la salud.

En el caso de los alimentos conteniendo NNM, su empleo causa ciertos conflictos en el pensar de los consumidores. Existen muchas razones por las cuales surgen estos criterios; el principal motivo es la poca información que existe para el uso de la nanotecnología y sus aplicaciones en los productos alimenticios <sup>2</sup>. A pesar del gran potencial que tiene los NNM en la industria alimentaria, su uso es muy limitado. El poco conocimiento de estos materiales y las interacciones con los alimentos, fluidos gastrointestinales y células y microorganismos presentes en el tracto gastrointestinal no permite el desarrollo de esta tecnología en este sector <sup>3</sup>.

Area de la aplicación	Descripción	Aplicación	Ejemplos	Referencia
<b>Agricultura (materia prima)</b>	Nano-modificación de las semillas, fertilizantes y uso de NP's para remediación de suelos.	Ingeniería genética específica	-Tomate ( <i>Lycopersicon esculentum</i> ) mejorado con NP's de SiO <sub>2</sub> .	<sup>6</sup>
		Preservación	-Portadores nanométricos de fertilizantes, pesticidas, herbicidas y reguladores de crecimiento para plantas para el mejoramiento de cultivos.	<sup>5</sup>
		Liberación controlada de agroquímicos		<sup>7</sup>
		Sensores para monitoreo de tierras		<sup>8</sup>
		Remoción de metales pesados en aguas y tierras.		
<b>Procesamiento de alimentos</b>	Uso de NP's como ingredientes en distintos alimentos, o para la mejora de productos finales, sea directamente con el producto o la maquinaria para su obtención.	Nanoencapsulación de sabores y aromas	-Nanosilica como transportador de aromas y sabores en los alimentos	
		Nanoemulsiones	-NP's orgánicas para liberación controlada de sabores.	
		Agentes anti-apelmazantes		
		Superficies auto-limpiables en las instalaciones de procesamiento.		
		Procesos de producción más higiénicos.		
<b>Nutrición</b>	Mejoramiento y fortificación de los alimentos.	Nutraceuticos	-Uso de polvos en tamaño nano para mejorar la absorción de nutrientes.	
		Liberación de nutrientes		
		Fortificación con minerales y vitaminas.	-Técnicas de encapsulación de probióticos.	
		Mejora la purificación de agua.		
<b>Protección de alimentos</b>	La detección de contaminantes en los alimentos, la seguridad de los mismos para evitar ingredientes falsos.	Nanocompositos	-Nanoreforzamientos para impedir el paso de gases que afecten los alimentos.	
<b>Empaque de alimentos</b>	Innovación, reforzamiento y seguridad de los empaques para incorporar propiedades antimicrobiales y extender el tiempo de vida de los alimentos.	Nanosensores para empaques	-Nanocompositos de óxido de Zinc y óxido de Titanio para la detección de compuestos orgánicos volátiles.  -Para la impresión del etiquetado y la seguridad del alimento.	
		Propiedades antimicrobiales		

Tabla 1. Aplicaciones de la Nanotecnología en el sector alimentario.

El potencial de la nanotecnología en la industria alimentaria y sus beneficios, como el enriquecimiento del valor nutricional, calidad del embalaje, detección inteligente han de ser tomados en cuenta y se deberán implementar metodologías y técnicas para evaluar su seguridad y eficacia. En este sentido, el desarrollo de redes científicas y el fortalecimiento de la cooperación con socios institucionales nacionales e internacionales se encuentran entre las principales recomendaciones formuladas por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT). De acuerdo con la estrategia de la Red Científica para la evaluación de riesgos de la nanotecnología- “**SINANOTOX**” (Sistema Nacional para la

Evaluación de la Nanotoxicidad)-, para la cooperación y trabajo transdisciplinario de los miembros, la Red Científica tiene como visión proporcionar un foro para el diálogo entre los participantes; fomentar el entendimiento mutuo de los principios de evaluación de riesgos; mejorar el conocimiento y la confianza en las evaluaciones científicas realizadas en el país; y para proporcionar una mayor transparencia en el proceso actual entre los sectores productivos, academia y la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) sobre la nanotecnología. Todo esto con el objetivo de elevar el nivel de armonización de las evaluaciones de riesgos desarrollados en nuestro país sobre la nanotecnología.

La Red está integrada por representantes de 7 instituciones dedicadas a la investigación científica y tecnológica: Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Centro de Investigación y de Estudios Avanzados (CINVESTAV), Universidad Autónoma de San Luis Potosí (UASLP), Universidad del Valle de México (UVM), Universidad de Guanajuato (UG), Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey (ITESM) y el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ).

CIATEJ ha dado seguimiento a las aplicaciones de nanomateriales en áreas prioritarias como lo son los sectores alimentario y farmacéutico; sobre todo en nanomateriales que están presentes en la cadena de alimentos y piensos. La participación de CIATEJ en esta Red Científica se enfocará en generar resultados de investigación pertinentes para la evaluación de la posible toxicidad tras la exposición por vía oral de nanomateriales presentes en alimentos y piensos.

A pesar de las ventajas que tienen los nanomateriales en productos de alimentación, una gran desventaja es que los consumidores todavía se plantean el ingerir alimentos y bebidas conteniendo este tipo de materiales, debido a que su principal preocupación es saber si la su ingestión podría ocasionarles un riesgo en su salud. En este sentido, la toxicidad de los nanomateriales depende totalmente de las propiedades fisicoquímicas de éstos que condicionará el comportamiento que estos presenten, durante su paso por el tracto GI <sup>2</sup>. Una de las principales complicaciones que podemos tener como resultado de su ingesta es la posibilidad de una alta absorción y por ende afectaciones en el metabolismo. La absorción y distribución de estos materiales pueden ser afectados por su composición, tamaño, capa superficial, carga superficial, forma (relación de aspecto), etc.<sup>4</sup>.

Por otro lado, es bien sabido que los nanomateriales tienen alta reactividad, lo que les proporciona propiedades específicas; esto puede influenciar procesos celulares tales como: la proliferación, metabolismo y muerte celular. Individualmente los nanomateriales pueden tener más de un efecto tóxico, lo que ocasionaría disfunciones en procesos básicos de las células. En los recientes años, los estudios *in vitro* han tomado gran importancia, ya que gracias a su ayuda se han evaluado los efectos nocivos de los nanomateriales para la salud (efectos adversos en tejidos y órganos del sistema respiratorio, cardiovascular, nervioso, etc.)<sup>9</sup>.

La percepción del público de las múltiples aplicaciones de esta ciencia es uno de los factores más importantes; ya que este está relacionado directamente con el éxito comercial de cualquier área donde sea aplicada. Las actitudes de los consumidores son sumamente sensibles cuando se trata de alimentos o bebidas que van a ser ingeridas. Si los beneficios son mayores a los riesgos que puede implicar el uso de la nanotecnología en la industria alimentaria, se toman opiniones de los consumidores para determinar si el producto puede salir al mercado. Estudios de mercado realizados en Europa han demostrado que los europeos tienen menos confianza en la nanotecnología en comparación a Estados Unidos<sup>2</sup>.

Actualmente no existen legislaciones especiales para la aplicación o utilización de la nanotecnología en los alimentos en Estados Unidos (EE. UU.), Europa, México. Sin embargo, Europa y Estados Unidos mediante sus organismos reguladores han emitido documentos donde se ponen de manifiesto recomendaciones para evaluar la seguridad y eficacia de nanomateriales en la cadena alimentaria. La Comunidad Europea mediante la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA, European Food Safety Agency) emitió un documento con puntos clave para evaluar la digestibilidad *in vitro* de alimentos conteniendo nanomateriales. Por su parte, EE. UU. por medio de la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, Food and Drug Administration) dice que "el tamaño de partícula no es el tema principal", subrayando que los nuevos materiales, sin importar la tecnología usada para su elaboración, estarán sujetos a una serie de pruebas estándar de seguridad ya establecidas.

En contraste con la opinión de la FDA sobre tamaño de partícula, un informe reciente por el Instituto de Ciencia de los Alimentos y Tecnología (IFST, Institute of Food Science & Technology), del Reino Unido indica que el tamaño importa y recomienda que los nanomateriales deben tratarse como nuevos materiales potencialmente nocivos hasta que

pruebas de seguridad demuestren que no son tóxicos. No obstante, la EFSA reconoce que se deberán modificar estas recomendaciones conforme la comunidad científica evalué los riesgos de los mismos y se susciten nuevos retos a solucionar.

Las recomendaciones de la Real Sociedad de Química y de la real Academia de Ingeniería de Reino Unido hacen una llamada para la identificación y etiquetado del uso de nanomateriales en las etiquetas de los productos a comercializar. El gobierno del Reino Unido acordó que esto era necesario para que los consumidores pudieran tomar decisiones informadas y las modificaciones en el etiquetado son necesarias.<sup>10</sup>

El desarrollo científico de esta tecnología necesita continuar con las investigaciones para asegurar las aplicaciones de la nanotecnología en los alimentos y además necesita crear regulaciones para que el uso de la nanotecnología ya no sea problema en los cuestionamientos de los consumidores y tenga un buen desarrollo en el sector alimentario.

Estas investigaciones garantizarán la confianza de los consumidores en la producción y aplicación de productos mejorados por la nanotecnología.

### **Implicaciones a la salud por ingestión de NMM**

Debido a la producción industrial masiva que han tenido los NMM en los últimos años, y que según estimaciones aumentará en el futuro próximo, estos materiales pueden encontrarse en diversos escenarios, lo que genera la posibilidad potencial de riesgo a la salud tanto en humanos como en animales. Los NMM han tenido una evolución rápida, al pasar de la fase de investigación a las aplicaciones industriales en productos de consumo, su empleo en sistemas biológicos es un tema muy complejo debido a que no se tienen bien caracterizados y dilucidados los posibles riesgos que estos representan, no obstante, se deben considerar ciertos eventos como la captación de NMM por sistemas biológicos, aglomeración y/o agregación, degradación, disgregación y alteración de la morfología; que pudieran influir o favorecer un efecto perturbador a la salud, ya que se ha visto que la toxicidad de NMM dependerá de la dosis, tamaño y naturaleza del material<sup>15</sup>.

Los posibles efectos tóxicos para la salud de estos NMM asociados con la exposición humana son desconocidos. Muchos de estos NMM son partículas ultrafinas generalmente consideradas como "polvos molestos", que puede ser transportado a sitios distantes y podría inducir efectos adversos para la salud ya que pueden estar expuestos de manera

intencionada (ingestión de medicamentos y alimentos) y accidental (ingestión de productos cosméticos, cuidado personal, plaguicidas, empaques, etc.)<sup>11</sup>.

### **Toxicidad de NMM en el tracto gastrointestinal**

La importancia de conocer los posibles efectos negativos de los NMM a su paso por el sistema GI y sus interacciones con el mismo es más que evidente. Por lo tanto, es necesario evaluar los productos que contienen NMM antes de ser comercializados en el mercado, mediante pruebas predictivas del comportamiento de los mismos en el sistema GI. Existen reportes de la toxicidad GI de NMM a distintos niveles y en diferentes modelos (ver tabla 2).

El tracto GI (gastrointestinal), es referido como un tubo digestivo que está dividido en secciones con funciones especializadas que están relacionadas con el tipo celular que en ellas se encuentra, lo que le permite llevar a cabo una gran variedad de funciones que mantienen la homeostasis intestinal, incluyendo funciones de formación y mantenimiento de una barrera, - al estar cubierto por una capa mucosa-, digestión y absorción de nutrientes, modulación de la microbiota y una participación activa en mantener y desarrollar respuestas inmunológicas. Esta barrera selectiva posee un área superficial de alrededor de 200 m<sup>2</sup> en un humano adulto, lo que representa una interacción potencial y considerable con NMM, que al ser ingeridos, se ven involucrados en una gran cantidad de eventos relacionados con la digestión, un proceso complejo que comprende la degradación de los alimentos mediante procesos físicos, químicos, enzimáticos y microbiológicos por su tránsito a lo largo de los diferentes compartimentos del tracto GI que tienen características anatómicas y fisiológicas especializadas como la cavidad bucal, el estómago, el intestino delgado y el intestino grueso. Durante el trayecto, se generan interacciones con el medio ambiente luminal, fluidos gastrointestinales (influyendo el pH, temperatura, fuerza iónica, la bilis, enzimas digestivas, etc.)<sup>12</sup>, alimentos (composición de la matriz alimenticia), tiempo de tránsito y la microbiota intestinal, que a su vez depende de los cambios fisiológicos y de las condiciones según las secciones del tracto GI por las cuales transiten; lo cual impacta directamente en las propiedades fisicoquímicas de los NMM y por ende afectan notablemente su comportamiento en sistemas biológicos<sup>13</sup>.

Tabla 2. Toxicidad de Nanomateriales en el Sistema Gastrointestinal (GI)

Clase de NMM y tamaño	Efecto	Dosis	Modelo empleado	Referencia
CNT (varios tamaños)	Efecto antimicrobiano	20-100 µg/mL	Cepas bacterianas intestinales	<sup>16</sup>
AgNP (55 nm)	Alteraciones en las proporciones de bacterias firmicutes y bacteroidetes.		Ratones hembra C57BL/6	<sup>17</sup>
ZnO (90 nm)	Estrés oxidativo	100-200 µ/mL	Células Caco-2	<sup>18</sup>
AgNP (56 nm)	Acumulación de NMM en órganos		Ratas F34	<sup>19</sup>
AgNP (15 y 80 nm)	Inflamación	0.1 mg/mL	Co-cultivo 3D	<sup>20</sup>
TiO <sub>2</sub> (66 y 260 nm)	Inflamación	100 mg/Kg de peso	Ratones macho BI 57/6	<sup>21</sup>
AgNP (10, 75 y 110 nm)	Dominancia de bacterias Gram negativas	9, 18 and 36 mg/kg de peso	Ratas Sprague-Dawley	<sup>22</sup>

### Cambios fisicoquímicos y estructurales de NMM en el tracto GI

La evidencia directa e indirecta confirma que la concentración de sal, pH, los procesos bioquímicos llevados a cabo en los fluidos luminales, fuerzas físicas, enzimas digestivas, microbiota, etc. son clave en la determinación de la integridad, agregación y propiedades de superficie de los NMM ingeridos en los alimentos, y por lo tanto importante en la determinación de su absorción y su presencia en la circulación sistémica. Aunado a esto, la complejidad química de las matrices en las cuales se ven envueltos los NMM, pueden alterar y modificar significativamente la estructura y propiedades fisicoquímicas de los NMM antes de ser ingeridos, pudiendo afectar notablemente el tamaño de partícula, área superficial y forma, lo que influye en el efecto que se presente sobre el tracto GI de estos NMM al modificarse las interacciones con sistemas biológicos.

El tamaño es una característica clave de la biodisponibilidad de los NMM durante su paso por el tracto GI. Las propiedades fisicoquímicas de la superficie de los NMM también afectan a la estabilidad, la aglomeración, a las interacciones con mucus intestinal, membrana celular apical, absorción y excreción. Es importante saber qué parámetros son esenciales para evaluar la digestibilidad *in vitro* <sup>13,14</sup>.

A continuación se enlistan una serie de parámetros que se sugieren tomar en cuenta:

***Ecosistema Gastrointestinal:*** Fuerzas físicas, concentración osmótica, pH, enzimas digestivas, otras sustancias bioquímicas, microbiota intestinal, fluidos luminales, células presentes en el tracto GI, etc.

**Matriz alimentaria y NMM:** Tamaño, forma, propiedades de la superficie, composición química, forma iónica, solubilidad, etc.

- 1) Tamaño de partícula. Esta característica es clave en la toxicidad de los NMM, encontrando una relación inversa en la mayoría de los casos, donde a menor tamaño de partícula, mayores son los efectos tóxicos manifestados; así como en la biodisponibilidad, ya que se ha reportado que a menor tamaño de partícula, existe una mayor probabilidad de que penetren el epitelio intestinal y de esta manera, afectar potencialmente tanto al tejido circundante, como alcanzar la circulación sistémica y distribuirse por el organismo, pudiendo generar efectos negativos en otras regiones anatómicas por acumulación en ciertos órganos en el caso de que no se metabolicen ni se excreten de manera eficiente. De acuerdo a la Agencia de Protección al Medio Ambiente de los Estados Unidos (US EPA), ese mismo tamaño de partícula puede ocasionar fenómenos de aglomeración y/o agregación, aumentando el tamaño del NMM, lo que hace más complicado que penetre las barreras del tracto gastrointestinal al convertirse en una partícula de tamaño convencional. En contraste, se puede suscitar un fenómeno inverso en el cual se puede disminuir el tamaño por degradación o disgregación por el proceso mismo de la digestión en el tracto gastrointestinal, aumentando de esta manera su potencial de bioaccesibilidad y biodisponibilidad, en relación al NMM previo a la ingestión.
- 2) Área superficial. Debido a la elevada área superficial que poseen los NMM, pueden ser más reactivos con otros compuestos químicos que los materiales convencionales a escala macrométrica, al poseer mayor área para que ocurran reacciones químicas.
- 3) Forma. Se han creado y diseñado NMM con formas innovadoras, que generalmente van encaminadas a cambiar las propiedades fisicoquímicas para darles nuevas y potenciales aplicaciones, con la finalidad también de mitigar sus capacidades de toxicidad. Sin embargo, la forma del NMM puede estar conectada en cierto grado con el tipo de riesgo a la salud que pueda poseer. Por ejemplo, algunos NMM como los nanotubos de carbono, se asemejan en la forma a las fibras de asbesto, que están relacionados con cáncer principalmente a nivel pulmonar.

## **Regulaciones y ética del uso de NMM**

El uso de los NMM (con una dimensión de tamaño de entre 1 y 100 nanómetros) contenidos o implicados en la fabricación de diversos tipos de productos como son alimentos, productos médicos y cosméticos puede presentar efectos biológicos diferentes en comparación a sus homólogos compuestos por macro partículas.

Existe un gran debate sobre el uso de la nanotecnología en la industria alimentaria, ya que no existe un estudio sobre los efectos que puedan tener dentro del cuerpo al estar en contacto con este tipo de nanomateriales, teniendo la incertidumbre sobre el riesgo o beneficio que pueda provocar al emplearse en este tipo de productos. Pueden encontrarse iniciativas en Centros de Investigación; así como en Instituciones de gobierno a nivel mundial las cuales están trabajando en la evaluación y desarrollo de metodologías y técnicas para evaluar los riesgos de los NMM en la salud humana y animal<sup>23</sup>. Es importante considerar métodos alternos para el estudio de NMM en sistemas *in vitro* que simulen las condiciones fisiológicas del ser humano, dando un mayor panorama de los cambios que puedan ocurrir, tomando en cuenta las principales rutas de exposición <sup>24</sup>.

A pesar de los grandes esfuerzos y logros que se han hecho en materia de Nanotecnología en México nuestro país no cuenta con Lineamientos sobre la seguridad alimentaria de los Nanoproductos. Según expertos de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) las regulaciones y leyes actuales son lo suficientemente buenos para cubrir productos de la nanotecnología para el sector alimenticio. Existen guías orientativas sobre los riesgos potenciales de la nanotecnología en este sector pero siempre están en continua revisión y modificación. Esto pone en duda si la efectividad de estas guías van a ser adecuadas en el futuro para los diferentes nanoproductos. Aunado a esto, los criterios de las decisiones tomadas por los expertos de los organismos regulatorios, pueden variar o ser percibidos de diferente manera, lo que es un riesgo adicional para la uniformidad de la toma de decisiones.

En las guías de EE.UU. (Food Drug Administration, FDA), se está determinando el uso de los NMM y su implicación en productos de la cadena alimentaria (alimentos para humanos y animales). Existen guías orientativas en las cuales se describen recomendaciones para la evaluación de la seguridad y eficacia de los NMM. Aún no se tienen establecidas regulaciones para el uso de NMM por parte de la FDA, por lo que se considera de gran importancia tener conocimiento sobre la situación reglamentaria y no comercializar

productos sin tener estudios sobre el comportamiento de los NMM en diferentes sistemas, incluyendo parámetros fisicoquímicos (forma, tamaño, distribución del tamaño, propiedades e incluso la formación de agregados de estas partículas con nanoescala, etc. ver <http://www.fda.gov/downloads/AnimalVeterinary/GuidanceComplianceEnforcement/GuidanceforIndustry/UCM401508.pdf> )

En las guías de FDA se recomienda también el uso de modelos de digestión in-vitro, y para la Toxicidad in vitro, existe una controversia al respecto; mientras que la prueba de Mutación Inversa Bacteriana (AMES Bacterial Reverse Mutation) es recomendada para nuevas moléculas, cosméticos con nanomateriales y alimentos. Expertos en toxicología de la FDA han encontrado que algunas veces el ensayo AMES es negativo, pero para el ensayo cometa y de micronúcleos es positivo. Por lo que recomiendan asesorarse con la División de Toxicología de la FDA para cada caso específico <sup>25,26</sup>.

Las Guías Orientativas Europeas publicadas en temas de nanomateriales por medio de la EFSA (European Food Safety) funcionan como guía para la investigación de los riesgos e implicaciones del uso de los NMM en productos y aditivos alimentarios humanos y animales. Es importante destacar que estas Guías Orientativas Europeas, sobre la presencia de nanomateriales en productos de alimentación consideran la absorción y estabilidad de los mismos a través del tracto gastrointestinal y proponen hacer estudios de digestibilidad *in vitro* para demostrar disolución/degradación (cambios morfológicos, físicos, químicos) de los mismos. Los ensayos In vitro de Toxicidad (ensayo de inducción de mutación de genes en células de mamíferos y ensayo de micronúcleos).

Como principio general es necesario identificar qué tipo de NMM se trabaja, su uso y las posibles rutas de exposición que se tendrán. Siguiendo las consideraciones estipuladas por la guía para evaluar y caracterizar de los riesgos. La búsqueda de alternativas a pruebas *in vivo* presenta un gran avance, teniendo nuevas metodologías de estudio más económicas, rápidas y precisas en la obtención de información en relación a la seguridad de los NMM. Es necesario tener información del estudio que se realizará, la validez de las pruebas y la cantidad de datos que ésta nos generara y definiendo si esto será suficiente o no para obtener datos precisos y robustos (ver <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/2140>) <sup>27</sup>.

La validación de métodos para la determinación y caracterización de efectos de NMM en aplicaciones para la salud serán necesarias, tomando como base guías orientativas y

actualizando con nueva información adquirida para el desarrollo seguro de futuras investigaciones. En la Fig 1 se muestra un Diagrama de Flujo Orientativo de pruebas de riesgo y evaluación de NMM.

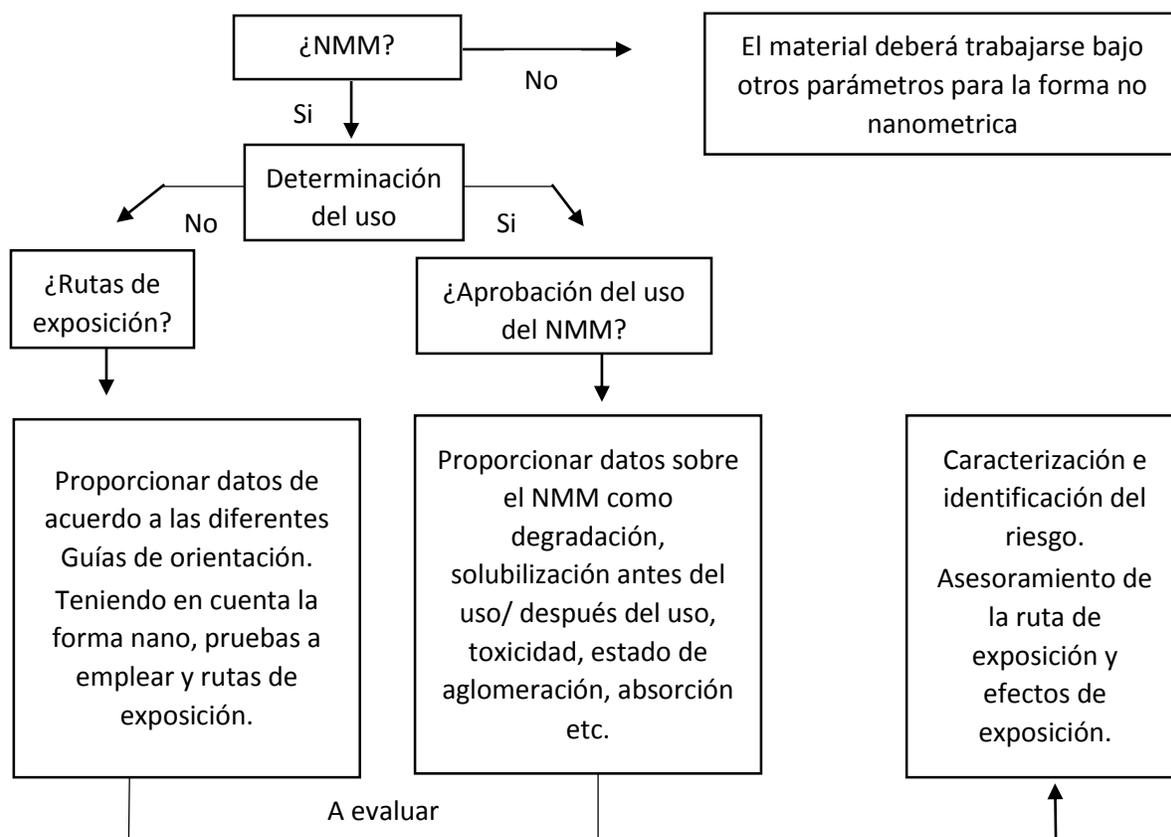


Figura 1. Diagrama de flujo de pruebas de riesgo y evaluación de NMM<sup>27</sup>.

### Protocolos pre-clínicos para la evaluación de la digestibilidad

Se necesitan investigaciones adicionales para llenar los vacíos de datos sobre la cinética y la absorción de los NMM y de los mecanismos de los procesos bioquímicos potencialmente relevantes durante la digestibilidad. Mejorar nuestra comprensión de la relación de los aspectos físico-químicos/mecanismos de los procesos bioquímicos con el ecosistema gastrointestinal, ayudará a proporcionar datos útiles para la evaluación de riesgos. Además, estudios de validación entre laboratorios pueden prestar fuerza para el desarrollo de métodos y resultados. El desarrollo de metodologías para facilitar la detección de la gama completa de los NMM-alimentarias es de interés para facilitar la gestión del riesgo y dar pautas científicas para que se generen políticas públicas al respecto.

De acuerdo a las recomendaciones de la Red, el diseño, desarrollo, adecuación, estandarización y validación métodos de ensayo tanto *in vivo* como *in vitro* para la evaluación de la seguridad de nanoproductos ingeridos es necesario; así como la adecuación de los ya existentes y la pertinencia de desarrollar pruebas de digestibilidad *in vitro* que simulen su paso por el tracto Gastrointestinal (GI).

Por otro lado, CIATEJ ha desarrollado un simulador del tracto digestivo humano validado con microbiota humana (mexicanos), el cual es ampliamente utilizado para la evaluación de diferentes productos funcionales de la industria mexicana como nutracéuticos, fármacos, nutrientes, aditivos alimenticios, etc. (patentes mexicanas Mx / a / 2012/005418, MX/a/2015/014524, MX/a/2015/013850); todos estas evaluaciones han sido en escala macrométrica.

Aunado a esto, la literatura existente ha evaluado la evidencia de toxicidad en base a estas consideraciones y ha empelado nanomateriales como los nanometales, óxidos metálicos, NPs basadas en carbono, polímeros y dendrímeros con énfasis en aquellas partículas de mayor relevancia para las exposiciones gastrointestinales. De estas categorías, las NPs metálicas, tienen el mayor potencial para la ingestión por los segmentos más grandes de las poblaciones humanas, debido a su creciente inclusión en los suplementos dietéticos y los materiales de envasado de alimentos.

En consecuencia, CIATEJ ha desarrollado estrategias para la evaluación de la Nanotoxicidad proponiendo Métodos de ensayo de digestibilidad de nanometales *in vitro* basado en un protocolo de dos componentes: 1) kit de fluidos simulados gastrointestinales y 2) proceso simulado de digestión humana empleando un simulador robotizado para la evaluación del estado de aglomeración, forma y tamaño de los nanometales ingeridos.

A continuación se propone un documento base del protocolo propuesto:

<b>Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco A.C.</b>				
<b>Determinación del cambio morfológico de nanopartículas metálicas en diferentes fluidos gastrointestinales simulados</b>				
<b>Elaborado por:</b>	<b>Revisado por:</b>	<b>Aprobado por:</b>	<b>Versión:</b>	<b>Firmas:</b>
<b>Fecha:</b>	<b>Fecha:</b>	<b>Fecha:</b>		

## Índice

1. Objetivo
2. Responsabilidad de aplicación y alcance
3. Definiciones

4. Descripción
  - 4.1 Formula patrón 1
  - 4.2 Formula patrón 2
  - 4.3 Material y equipo
  - 4.4 Formulaciones a emplear
  - 4.5 Entorno
  - 4.6 Método patrón
  - 4.7 Coloración
  - 4.8 Tamaño y forma por microscopia
5. Registros

## 1. OBJETIVO

Definir el cambio de tamaño y forma de nanopartículas metálicas en diferentes Fluidos Gastrointestinales Simulados (FGS).

## 2. RESPONSABILIDAD DE APLICACIÓN Y ALCANCE

En este procedimiento recae sobre todo el personal (técnico y/o auxiliar) que proceda a la elaboración del procedimiento de los distintos FGS que puedan utilizarse como evaluación de los efectos que tengan sobre las nanopartículas metálicas para aplicaciones en el área alimentaria.

## 3. DEFINICIONES

Nanomateriales manufacturados: Productos principales de la nanotecnología como, partículas, tubos o fibras. Generalmente tienen un tamaño dentro de 1-100 nanómetros en al menos una de sus dimensiones.

FEUM: Farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos.

USP: Farmacopea de los Estados Unidos de América.

Fluidos Gastrointestinales Simulados: Soluciones acuosas compuestas por enzimas, sales, ácidos y pH definidos.

TEM: Microscopio Electrónico de Transmisión.

UV-Vis: Ultravioleta Visible.

## 4. DESCRIPCIÓN

### 4.1 Formula patrón 1

Concentración 1:1

En general se ajusta a:

Nanopartículas metálicas 50%

Fluido gastrointestinal simulado requerido 50%

### 4.2 Formula patrón 2

Concentración 1:5

En general se ajusta a:

Nanopartículas metálicas 20%

Fluido gastrointestinal simulado requerido 80%

En función de las formulaciones otros componentes que pueden formar parte son: enzimas, pH.

### 4.3 Material y equipo

Sistema de medida de pH.  
Agua destilada o desionizada.  
Agitador magnético y parrilla magnética.  
Espectrofotómetro de UV-Vis.  
Microscopio Electrónico de Transmisión.

### 4.4 Formulaciones a emplear

Medio Estomago FEUM: El establecido por la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, (PONER LA SECCION O NUMERO DE PAGINA DE LA FARMACOPEA)

Medio Intestino delgado FEUM: El establecido por la farmacopea de los Estados Unidos Mexicanos, (PONER LA SECCION O NUMERO DE PAGINA DE LA FARMACOPEA)

Medio Estomago USP: El establecido por la farmacopea de los Estados Unidos de América, (PONER LA SECCION O NUMERO DE PAGINA DE LA FARMACOPEA)

Medio Duodeno USP: El establecido por la farmacopea de los Estados Unidos de América, (PONER LA SECCION O NUMERO DE PAGINA DE LA FARMACOPEA)

Medio Intestino delgado USP: El establecido por la farmacopea de los Estados Unidos de América, (PONER LA SECCION O NUMERO DE PAGINA DE LA FARMACOPEA)

Medio Estomago ARIS: El establecido por la patente ARIS (NUMERO DE PATENTE)

Medio Intestino Delgado ARIS: El establecido por la patente ARIS (NUMERO DE PATENTE).

Medio Intestino Grueso ARIS:

- Colon Ascendente.
- Colon Descendente.
- Colon Transverso.

### 4.5 Entorno

Humedad relativa: la que está en el Laboratorio de digestión ex vivo y Laboratorio de materiales.

Temperatura de laboratorio: 24 +/- 5°C.

Temperatura de las mezclas: 25 °C a 37 °C.

### 4.6 Método patrón

- Pesar todos los componentes de la fórmula usar de acuerdo a la FEUM, USP y patente ARIS.
- Añadir lentamente, las enzimas. Agitar hasta ser homogénea.
- Atemperar la solución de 25 °C a 37 °C, de acuerdo a las establecidas por la FEUM, USP y patente ARIS.
- Medir el pH de los fluidos en solo.
- Agregar el componente (nanopartículas metálicas) bajo agitación, el nivel de agitación será de acuerdo a los establecidos por la FEUM, USP y patente ARIS.
- Medir el pH de la mezcla en conjunto.
- Proceder a la limpieza del material y equipo según se especifique en los procedimientos de limpieza correspondientes.

### 4.7 Coloración

Determinar el tamaño del preparado, si la disolución es a concentración 1:1 o 1:5.

Si la solución cambio de color a un tono más oscuro, cambio a un mayor tamaño.

Si la solución se mantuvo de color o cambio a un tono más rojo, cambio a menor tamaño.

#### 4.8 Tamaño y Forma por microscopia

La determinación del cambio de tamaño y forma de nanopartículas metálicas del preparado. En una rejilla para TEM se coloca una pequeña gota, sin agitar y se deja secar en un ambiente limpio. Se analizará por TEM y UV-Vis.

#### 5. REGISTRO

Formulación	Nanopartícula	FGS	Especificaciones	Observaciones e Imágenes	Fecha y hora	Realizo	Reviso
1:1	AgNPs	Estomago ARIS	Volumen Fluido: pH: Agitación: Temperatura: Apariencia: Caracterización:			Persona	Persona
1:5	AuNPs	Duodeno USP	Volumen Fluido: Volumen NMM: pH: Agitación: Temperatura: Apariencia: Caracterización:				

Agradecimientos: Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (CONACyT). Red Científica para la evaluación de riesgos de la nanotecnología- “**SINANOTOX**” (Sistema Nacional para la Evaluación de la Nanotoxicidad).

## REFERENCIAS

1. ISO, Vol. 2016 (2005).
2. Senturk, A. Nanotechnology As A Food Perspective. *Journal of Nanomaterials & Molecular Nanotechnology* 02 (2013).
3. S. Jonh, W., Praveen, R., A. AllwynSundar, R. & Tiroutchelvamae, D. <aplicaciones de la nanotecnologia en empaques de alimento y salud.pdf>. *International Journal of Engineering Research* 3, 1-7 (2014).
4. Tang, S. et al. Health implications of engineered nanoparticles in infants and children. *World journal of pediatrics : WJP* 11, 197-206 (2015).
5. He, X. & Hwang, H.-M. Nanotechnology in food science: Functionality, applicability, and safety assessment. *Journal of Food and Drug Analysis* (2016).
6. Dasgupta, N. et al. Nanotechnology in agro-food: From field to plate. *Food Research International* 69, 381-400 (2015).
7. Handford, C.E. et al. Awareness and attitudes towards the emerging use of nanotechnology in the agri-food sector. *Food Control* 57, 24-34 (2015).
8. Chellaram, C. et al. Significance of Nanotechnology in Food Industry. *APCBEE Procedia* 8, 109-113 (2014).
9. Martirosyan, A. & Schneider, Y.J. Engineered nanomaterials in food: implications for food safety and consumer health. *International journal of environmental research and public health* 11, 5720-5750 (2014).
10. Weiss, J., Takhistov, P. & McClements, D.J. Functional Materials in Food Nanotechnology. *Journal of Food Science* 71, R107-R116 (2006).
11. EPA, Vol. 2016 (2016).
12. McClements, D.J. Edible lipid nanoparticles: digestion, absorption, and potential toxicity. *Progress in lipid research* 52, 409-423 (2013).
13. El Badawy, A.M. et al. Impact of environmental conditions (pH, ionic strength, and electrolyte type) on the surface charge and aggregation of silver nanoparticles suspensions. *Environmental science & technology* 44, 1260-1266 (2010).
14. Mwilu, S.K. et al. Changes in silver nanoparticles exposed to human synthetic stomach fluid: effects of particle size and surface chemistry. *The Science of the total environment* 447, 90-98 (2013).
15. El Badawy, A.M. et al. Surface charge-dependent toxicity of silver nanoparticles. *Environmental science & technology* 45, 283-287 (2011).
16. Chen, H. et al. Broad-spectrum antibacterial activity of carbon nanotubes to human gut bacteria. *Small (Weinheim an der Bergstrasse, Germany)* 9, 2735-2746 (2013).
17. van den Brule, S. et al. Dietary silver nanoparticles can disturb the gut microbiota in mice. *Particle and fibre toxicology* 13, 38 (2016).

18. Song, Y. et al. In vitro cytotoxicity of silver nanoparticles and zinc oxide nanoparticles to human epithelial colorectal adenocarcinoma (Caco-2) cells. *Mutation research* 769, 113-118 (2014).
19. Kim, Y.S. et al. Subchronic oral toxicity of silver nanoparticles. *Particle and fibre toxicology* 7, 20 (2010).
20. Sussewind, J. et al. A 3D co-culture of three human cell lines to model the inflamed intestinal mucosa for safety testing of nanomaterials. *Nanotoxicology* 10, 53-62 (2016).
21. Nogueira, C.M. et al. Titanium dioxide induced inflammation in the small intestine. *World journal of gastroenterology* 18, 4729-4735 (2012).
22. Williams, K. et al. Effects of subchronic exposure of silver nanoparticles on intestinal microbiota and gut-associated immune responses in the ileum of Sprague-Dawley rats. *Nanotoxicology* 9, 279-289 (2015).
23. WHO, R.o.t. (WHO Regional Office for Europe, 2013, Copenhagen; December 2012 ).
24. Chau, C.-F., Wu, S.-H. & Yen, G.-C. The development of regulations for food nanotechnology. *Trends in Food Science & Technology* 18, 269-280 (2007).
25. FDA. (ed. U.S.D.o.H.a.H. Services) (June 2014 ).
26. Kunzmann, A. et al. Toxicology of engineered nanomaterials: Focus on biocompatibility, biodistribution and biodegradation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 1810, 361-373 (2011).
27. Committee, E.S. Guidance on the risk assessment of the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain. *EFSA Journal* 9, n/a-n/a (2011).

## CAPITULO XV

### **Implementación de un modelo metodológico para la evaluación de células beta pancreática diferenciadas a partir de células troncales.**

*Flores Hernández Flor Yohana, Marino Marmolejo Erika Nahomy, Díaz Emmanuel, Bravo Madrigal Jorge, Gaona Bernal Jorge.*

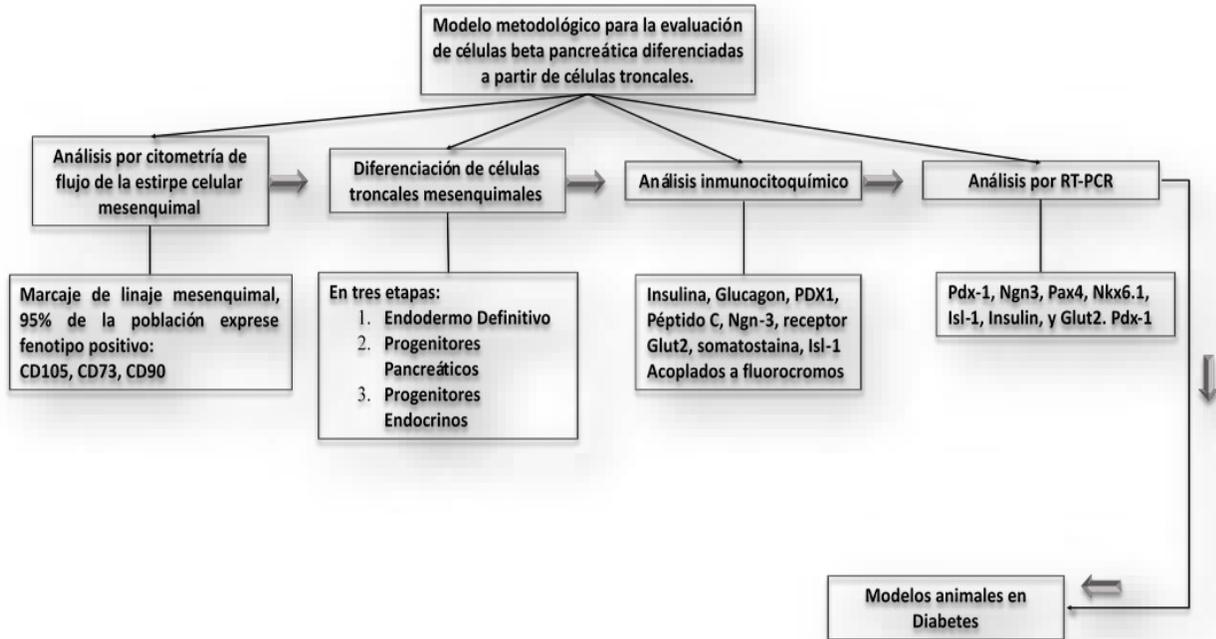
#### **INTRODUCCIÓN**

La diabetes mellitus es una enfermedad de alto impacto a nivel mundial, reconocido por la OMS (Organización Mundial de la Salud) como uno de los retos más importantes de salud pública, la Federación Internacional de Diabetes menciona un incremento de 592 millones de personas con este padecimiento para el año 2035. Está caracterizada por un control pobre o nulo sobre la concentración de glucosa en sangre que lleva a un estado de hiperglucemia, uno de los factores que provocan esto es la producción o secreción de insulina deficiente por parte de las células  $\beta$  pancreáticas que impide a la insulina realizar su efecto sobre el metabolismo causando daño sistémico<sup>1</sup>.

Uno de los principales tratamientos consiste en suministrar insulina para intentar regular el metabolismo, sin embargo, la inyección de esta hormona no puede imitar la función de regulación que realiza la célula  $\beta$ , es decir, secretar la cantidad adecuada de hormona en el momento justo. [2] Es por esto que en la investigación se ha llevado a cabo una búsqueda de nuevas terapias, como la terapia celular basada en substitutos de células  $\beta$  productoras de insulina y una opción que parece tener buen panorama a futuro son las obtenidas a partir de la diferenciación de células troncales mesenquimales<sup>2,3</sup>.

- i) **Objetivos de estudio.** Contar con un modelo metodológico que permita llevar a cabo la evaluación de la funcionalidad de células  $\beta$ -pancreáticas obtenidas a partir de la diferenciación de células troncales mesenquimales.
- ii) **Elección del modelo.** En este capítulo se considera un compilado de diversas técnicas básicas utilizadas para analizar y respaldar el proceso de obtención de células  $\beta$  pancreáticas a partir de células troncales. Este inicia con la evaluación y seguimiento in vitro al fenotípico de la estirpe celular mesenquimal humana (hMSC) a través de citometría de flujo para confirmar las poblaciones celulares mesenquimales para posteriormente aplicarles factores que induzcan la diferenciación, para verificar este logro una de las técnicas mayormente utilizadas es la inmunocitoquímica así como técnicas de biología celular como la RT-PCR son herramientas básicas para el análisis confirmatorio de la obtención de poblaciones de células  $\beta$ -pancreáticas, una vez confirmado esto un modelo in vivo es útil para verificar la funcionalidad de las células obtenidas del proceso de diferenciación. En este Capítulo se plasman las técnicas más socorridas sin embargo cabe mencionar que existen diversas técnicas utilizadas que fortalecen investigaciones de este tipo.

### iii) Desarrollo del estudio



### iv) Métodos

#### Análisis por citometría de flujo de la estirpe celular mesenquimal

Las células madre mesenquimales humanas (hMSC) son de gran relevancia en el campo de la medicina regenerativa<sup>4</sup>, por lo que verificar y validar la calidad de la estirpe celular es fundamental. El fenotipo para la identificación de esta estirpe celular requiere la expresión de CD73, CD90, CD105 y no expresar: CD11b, CD14, CD19, CD45 y los antígenos HLA-DR<sup>5,6</sup>. En este punto la citometría de flujo juega un papel muy importante en la identificación, caracterización y seguimiento de la estirpe celular, esta metodología además permite evaluar el grado de diferenciación y/o senescencia de las células. La citometría de flujo es, en la actualidad una herramienta esencial y ampliamente utilizada en muchos ensayo para la determinación de la expresión de antígenos<sup>7,8</sup>. El método descrito aquí, permite evaluar de forma simultanea 3 marcadores específicos de hMSC: CD73, CD90 y CD105, así como descartar la presencia de los marcadores: CD11b, CD14, CD19, CD45 y HLA-DR.

Tabla 1. Reactivos y materiales	
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células troncales</li> <li>• Medio de cultivo</li> <li>• Paraformaldehido 4%</li> <li>• Kit de anticuerpos para multi-tinción de marcadores específicos de hMSC</li> <li>• PBSA 0.1%</li> <li>• Agua bidestilada filtrada</li> <li>• Pipeteadores automáticos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubos cónicos de 15mL</li> <li>• Tubos cónicos 1mL</li> <li>• Micropipetas</li> <li>• Puntas azules para 1mL</li> <li>• Puntas amarillas para 0.2mL</li> <li>• Centrifuga refrigerada</li> <li>• Citómetro de flujo</li> <li>• Cámara de Neubauer</li> <li>• Microscopio</li> </ul>

Tabla 2. Tinción de las muestras para su adquisición y análisis		
Tubo	Tinción	Marcadores
1	Sin marca	Tamaño y granularidad
2	Control de isotipo 1	Inespecífico
3	Marcaje de linaje mesenquimal	CD105, CD73, CD90
4	Control de isotipo 2	Inespecífico
5	Marcaje de linaje hematopoyético (Control negativo)	CD45, CD34, CD11b, CD19 y HLA-DR

### Procedimiento:

**Nota:** 24 horas antes del adquisición y análisis por citometría de flujo, verificar que la confluencia de las células este al 60%.

1. Despegar y contar las células mesenquimales para tomar  $3 \times 10^6$  células y colocarlas en un tubo cónico de 15mL.
2. Adicionar solución salina amortiguada por fosfatos con albumina 0.1% (PBSA) frío hasta completar 10mL.
3. Centrifugar a 2000rpm, 4°C por 5 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender con 1mL de paraformaldehido 4%, frío e incubar por 20 minutos en agitación constante a temperatura ambiente.
4. Adicionar 5mL de PBSA y centrifugar a 2000rpm, 4°C por 5 minutos, retirar el sobrenadante y resuspender con 2mL de PBSA frío.
5. Dividir y colocar  $5 \times 10^5$  células en un volumen máximo de 0.2mL en 5 tubos cónicos de 1.6mL etiquetarlos de acuerdo a la tabla 2
6. La tinción se realizará de acuerdo a las instrucciones del fabricante y a la tabla 2. En resumen: Adicionar los anticuerpos a los diferentes tubos e incubar a temperatura ambiente, protegido de la luz y en agitación constante por 1 hora.
7. Después del tiempo de tinción adicionar 0.8mL de PBSA y centrifugar a 2000rpm a 4°C.
8. Resuspender el botón celular en 0.3mL de PBSA y adquirir las muestras en el citómetro de flujo.
9. Análisis de los resultados.

### Análisis de resultados

El análisis de los resultados se puede realizar con el programa del mismo citómetro de flujo o exportar los datos con la extensión \*.fcs el cual permite abrir y analizar los datos en otros programas tales como: WinMDI o FlowJo. Un ejemplo del análisis se ilustra en la figura 1.

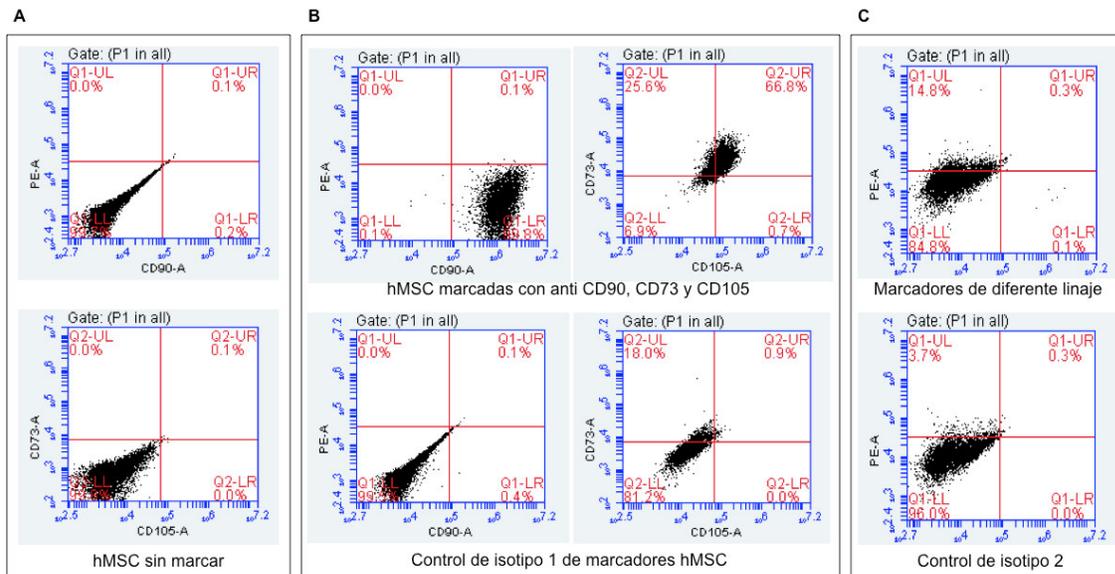


Figura 1. Expresión de receptores específicos de hMSC determinados por citometría de flujo. A) Células hMSC sin marcar. B) Expresión de receptores CD90, CD73 y CD105 en células hMSC y control de isotipo. C) Expresión de receptores de linaje diferente al mesenquimal y control de isotipo.

## Diferenciación de células troncales mesenquimales

Una célula troncal está caracterizada por ser inmadura e indiferenciada y poder dividirse por un periodo extendido de tiempo, además de replicarse y diferenciarse en una diversidad de tipos celulares y tejidos según el tipo de estímulo al que se sometan, respecto a su origen se catalogan en totipotentes, pluripotentes y multipotentes, estas últimas también llamadas adultas o mesenquimales han sido las de mayor investigación ya que no se atienen a debates ideológicos ni ético y en los últimos años se han explorado nuevas fuentes<sup>9</sup>.

## Organogénesis pancreática y factores de diferenciación

La organogénesis pancreática se realiza a partir del endodermo, las fases básicas del proceso se dan con la aparición del endodermo durante la granulación, para dar lugar a la formación del tubo primitivo, la aparición de yemas específicas de cada órgano endodérmico y diferenciación de tipos celulares específicos en dichas yemas por medio de señales liberadas por el mesénquima que rodea las yemas pancreáticas, esto es importantes durante el desarrollo pancreático ya que participan en la determinación hacia páncreas endocrino y exocrino<sup>10,11</sup>.

Los métodos in vitro de diferenciación consisten en el uso de medios de cultivo que intentan reproducir las condiciones de diferenciación y subsistencia más favorables para las células  $\beta$  diferenciadas in vitro, el uso de diversos factores de crecimiento u hormonas utilizados tiene gran repercusión en la biomasa de células obtenidas, los tiempos de sometimiento de la mezcla de factores es variable el promedio es de una semana a quince días y en general el proceso total va de 15 días a un mes, por ello la búsqueda de métodos adecuadamente estandarizados son un desafío sobre todo encontrar la combinación, concentración y los tiempo más adecuados (Tabla 3)<sup>2</sup>.

La diferenciación de células productoras de insulina vía endodérmica y ectodérmica requiere de factores como: Activina A, EGF (factor de crecimiento epidérmico); bFGF (factor de crecimiento de fibroblastos básico); IGF-II, ILII (factor de insulina-like); GLP-1 (péptido similar al glucagón); ITS (insulina+transferrina+selenio) solo por mencionar los más

utilizados<sup>12,13</sup>. La identificación de estos factores es un área necesaria para identificar los factores adecuados que permitan controlar el proceso durante la diferenciación in vitro.<sup>14</sup> En la literatura la diferenciación de células mesenquimales a  $\beta$  pancreáticas básicamente se da en tres etapas que se muestran en la siguiente tabla, así mismo se observa la gran variabilidad de factores a utilizar, se plasman los factores mayormente utilizados:

**Tabla 3.** Etapas de diferenciación y ejemplos de factores de crecimiento utilizados en cada una.

ENDODERMO DEFINITIVO	PROGENITORES PANCREATICOS	PROGENITORES ENDOCRINOS
<ul style="list-style-type: none"> <li>-Activina A</li> <li>-Butirato de sodio</li> <li>-Antagonistas de la vía P13K</li> <li>-BMP4</li> <li>-Wnt3A</li> <li>-CHIR99021</li> <li>-GDF8</li> <li>- IDE1 o IDE2</li> <li>-Noggin</li> <li>-FGF</li> <li>-BSA</li> <li>-ITS</li> <li>-2-mercaptoetanol</li> <li>-FBS</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-FGF</li> <li>-DAPT</li> <li>-Ácido retinoico</li> <li>-Dorsomorfina</li> <li>-EGF</li> <li>-Indolactam V</li> <li>-SB431542</li> <li>- TBZ</li> <li>-Glucosa</li> <li>-FCS</li> <li>-Nicotinamida</li> <li>-2-mercaptoetanol</li> <li>-BSA</li> <li>-Taurina</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fosfocolina</li> <li>-Dexametazona</li> <li>-HGF</li> <li>-IGF-1</li> <li>-GLP1</li> <li>-Nicotinamida</li> <li>-Exedin-4</li> <li>-HGF</li> <li>-Pentagastrin</li> <li>-B-27</li> <li>-N-2</li> <li>-Glucosa</li> <li>-BSA</li> <li>-ITS</li> <li>-NEAA</li> </ul>

### **Análisis inmunocitoquímico.**

La inmunocitoquímica es una herramienta que utiliza anticuerpos para determinar el fenotipo de células aisladas o dentro de pertenecientes a un tejido. Lo relevante del uso de esta técnica es poder observar la distribución espacial, organización y posible asociación entre las células de interés. La aplicación de esta técnica es muy amplia dada la gran cantidad de fenotipos que podemos encontrar en las células en un tejido determinado, y aunque los pasos o etapas requeridos para llevar a cabo esta técnica podrían ser similares, existen cuidados y medidas particulares para cada tipo de tejido o células, por lo que en este escrito revisaremos las etapas más importantes de protocolos, enfocados tanto a la detección de células troncales como pancreáticas, lo cual reviste importancia en el tema de la regeneración celular.

### **Anticuerpos y estrategias de detección.**

En las técnicas inmunocitoquímicas aplicadas a la caracterización de células pancreáticas se suelen utilizar frecuentemente anticuerpos primarios capaces de detectar marcadores de la diferenciación celular tales como: Insulina, Glucagon, PDX1, Péptido C, Ngn-3, el receptor Glut2, somatostatina, Isl-1<sup>15,16,17</sup>, por otra parte para la caracterización de células troncales se utilizan frecuentemente anticuerpos capaces de detectar proteínas como: Oct4, Nanog, Nestina, Sox2, Ki-67 entre otros<sup>18,17</sup>. Dado que las estrategias de caracterización usualmente involucran la detección de 2 señales simultáneas, es conveniente el uso de 2 anticuerpos secundarios, que tengan acoplados fluorocromos o enzimas cuyo color pueda distinguirse con suficiente resolución, en la el cuadro A se presentan algunos fluorocromos ampliamente usados, así como los recursos necesarios para poder visualizarlos en el microscopio. Es muy importante considerar algunos criterios para elegir el anticuerpo, tales

como: 1.- Usar anticuerpos probados y/o validados para inmunocitoquímica; 2.- Que previamente sean recomendados en publicaciones; 3.- Que cuenten con alta especificidad por el antígeno buscado; 4.-Que su origen sea compatible con los demás anticuerpos y con la especie a la que pertenecen las células o tejidos sometidos al estudio; 5.-Así mismo que pueda ser reconocido por el anticuerpo secundario con alta especificidad; 6.- No es recomendable el uso de fluorocromos para citometría de flujo tales como: Texas Red, Cy5PE, Cy5.5PE, PKH62 y PKH67<sup>38</sup>.

### Etapas del proceso Inmunocitoquímico en la detección de marcadores de células troncales y células pancreáticas

Las células en donde se buscan los marcadores de maduración pancreática o de proliferación pueden encontrarse en cultivos celulares o en el páncreas, dado que el objetivo de la inmunocitoquímica es la caracterización y ubicación espacial de las células, es conveniente lograr tener un plano representativo de las células. Por tanto en cultivos celulares se podrá trabajar con una monocapa celular crecida sobre cubreobjetos dentro de pozos de microplacas, por otra parte en el estudio de células de tejido pancreático, se tendrá que obtener un corte representativo donde se observe la orientación y asociación de las células de interés con respecto de otras células. Para tal propósito es fundamental asegurar la integridad de las células, la adecuada permeabilización de las mismas para poder detectar los marcadores, así como el uso de estrategias que eviten la unión inespecífica de los anticuerpos. A continuación mencionaremos algunas estrategias importantes, así mismo estas se resumen en el diagrama de flujo observado en la figura A.

**Cuadro A.** Tipos de cromógenos y fluorocromos frecuentemente usados para inmunocitoquímica

Tipo de Microscopia	Fuente de emisión de radiación	Cromogeno o fluorocromo	Longitud de onda	
			excitación	emisión
Fluorescente	Arco Mercurio / Arco de Xenón/ Laser de ión argón (filtro violeta)	Alexa405	401	421
		Hoechst 33342	350	461
		DAPI	358	461
	Arco Mercurio / Arco de Xenón/ Laser de ión argón (filtro azul)	FITC	493	519
		Alexa488	490	525
	Arco Mercurio / Arco de Xenón / Laser de Helio-Neón (filtro verde)	Rodamina	540	565
		Cy3	550	570
		Alexa546	556	573
		TRITC	557	576
	Arco Mercurio/Laser de Kriptón-Argón (filtro amarillo)	Alexa555	555	580
		Alexa568	578	603
	Laser de Helio-Neón (filtro naranja)	Alexa594	590	617
	Laser Kriptón-Argón/Laser ión kriptón (filtro rojo)/Arco Xenón	Alexa647	650	665
		Cy5	650	670
	Campo claro	Fuente de tungsteno	HRP-Diaminobencidina-Ni	NA
Biotina-Diaminobencidina			Café	

## **Fijado.**

El fijado es una etapa fundamental, y su objetivo es preservar tanto la morfología de las células como sus respectivos contenidos, la mejor opción para inmunocitoquímica es el paraformaldehído al 4% <sup>19</sup>, que a diferencia de otros fijadores como la formalina, no es autofluorescente. Debe diluirse en reguladores de pH con valores fisiológicos entre 7.2 y 7.4 tales como el PBS. Para células en cultivo es conveniente un tiempo de 10 a 30 minutos<sup>18 16</sup>. En la caso del fijado de tejido pancreático, es conveniente siempre que sea posible el infiltrar con el fijador por medio de perfusión cardiaca, el cual es un proceso complicado que requiere experiencia, para detalles de este procedimiento se sugieren consultar<sup>39</sup>, En caso en que no sea factible realizarlo, se debe optar por la extracción del páncreas inmediatamente después de la eutanasia. Mismo que deberá ser cortado con bisturí en fragmentos cuyos lados no tengan un grosor mayor a 4mm. Los tiempos de fijado para órganos suelen ser de 2 a 18h máximo<sup>39</sup>.

## **Preparación de cortes para inmunocitoquímica.**

Para obtener cortes a partir de tejidos fijados, primero es necesario eliminar los restos de fijador con regulador de fosfatos, posteriormente se procede a infiltrar el tejido con una solución crioprotectora, tal como la sacarosa al 20 o 30%<sup>38</sup> usualmente se deja actuar todo la noche a 4°C en agitación, después de este proceso se elimina el exceso de sacarosa y se procede ya sea a congelar el tejido o a incluir el tejido en un vehículo de embebido para corte por congelación, tal como él (TissueTek®) o equivalente. Es fundamental en este punto la orientación del tejido, para el caso de las células pancreáticas, el objetivo es lograr observar los islotes de Langerhans, dado la naturaleza viscosa resulta factible colocar el tejido en la orientación requerida. Se sugiere consultar bibliografía especializada para el proceso de congelamiento, ya que es una etapa crítica para lograr evitar dañar las células<sup>38</sup>.

## **Bloqueo y permeabilización**

Durante la ejecución de técnica de inmunocitoquímica pueden ocurrir situaciones que ocasionen uniones no específicas de los anticuerpos, para contrarrestar este efecto hay diversas estrategias: Para bloquear las cargas se ha usado con éxito la fracción V de la albúmina sérica bovina (BSA)<sup>20</sup>, en el caso de la unión inespecífica de anticuerpos se puede usar un suero normal procedente de la misma especie del anticuerpo primario. Previo o durante el bloqueo es necesaria la permeabilización de las células, esto para permitir el acceso de los anticuerpos al interior de la célula, para este proceso se usan detergentes no iónicos como el tritón X-100, en concentración de 0.05 al 0.5% durante 10 a 20 minutos a temperatura<sup>21</sup>, se deben evitar los detergentes iónicos como el SDS o el desoxicolato, ya tienen efecto sobre la estructura terciaria de las proteínas, por otra parte, la permeabilización no debe realizarse a 4°, ya que la disolución de los lípidos es incompleta. Es conveniente que las soluciones de lavado así como de los anticuerpos, en la medida de lo posible tengan el agente de bloqueo. Por otra parte no es recomendable el uso de detergentes en las soluciones de lavado o en las soluciones de anticuerpo, ya que limitar la penetración y unión específica de los anticuerpos<sup>38</sup>.

## **Diseño del método inmunocitoquímico y procedimiento de incubación con anticuerpos.**

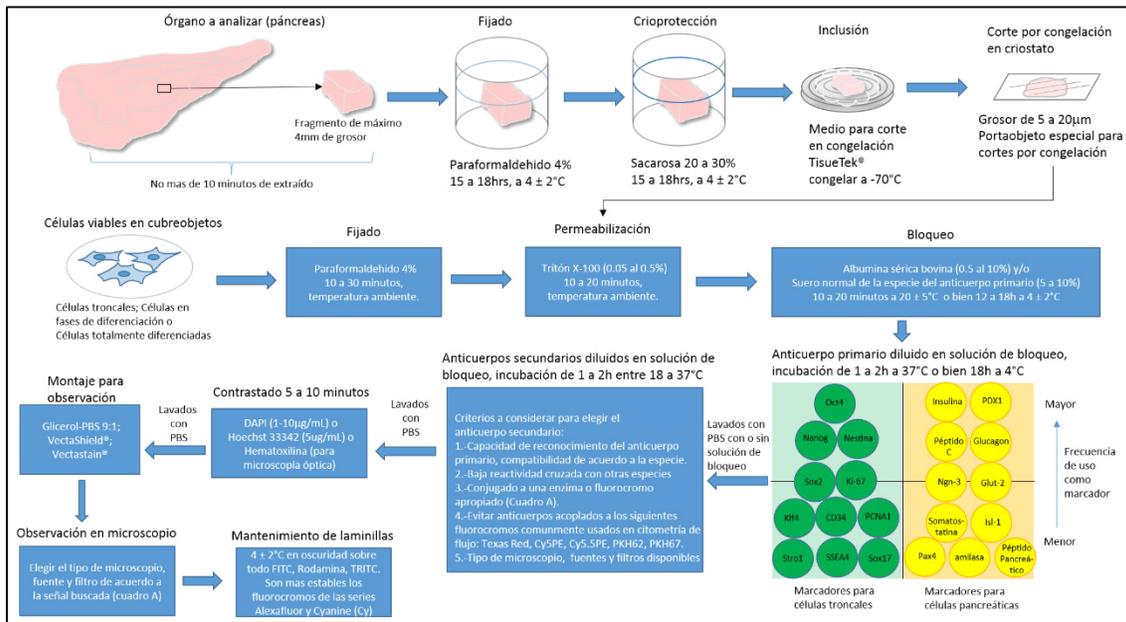
En la caracterización de células ya sea troncales o bien diferenciadas, El diseño del método citoquímico más usado es el indirecto, que emplea uno o más anticuerpos primarios y sus correspondientes anticuerpos secundario, acoplados a señales discernibles, por ejemplo una señal en verde contra una en rojo y contraste de núcleos en azul. La incubación con las soluciones de anticuerpo se realizan una vez que se han permeabilizado y bloqueado las células y/o tejidos, cuando se trabaja con células en microplacas de 24 pozos, se recomienda adicionar los anticuerpos primarios en un volumen de 250uL en cada pozo con un tiempo de incubación que de 12 a 18h en refrigeración<sup>22</sup>, para el caso del uso de anticuerpos secundarios se recomienda en este sistema incubar el mismo volumen pero con un tiempo de incubación de 1 a 2h<sup>22</sup>, Cuando se trabaja con laminillas con cortes de tejido, es conveniente usar volúmenes de entre 35 a 100uL, limitados con el uso de marcadores especiales hidrófobos, que eviten la dispersión de la solución del anticuerpo, en estos casos resulta conveniente, incrementar los tiempos de interacción con los anticuerpos primarios entre 24 y 48hrs, esto debido a que la disminución del movimiento impide la asociación del anticuerpo con su antígeno complementario, así mismo es necesario evitar que se pierda volumen por evaporación, por tanto las laminillas deben mantenerse en cámaras húmedas<sup>38</sup>.

Una etapa fundamental son los lavados entre cada anticuerpo, es conveniente entre 5 y 10 lavados con agitación moderadas de 5 minutos, es importante evitar eliminar el total del líquido de lavado de la muestra, ya que podría ocasionar el secado y unión inespecífica de anticuerpos, para esto se recomienda dejar aproximadamente un 10% del volumen usado para el lavado, es decir si se lava con 500uL es conveniente dejar en la muestra un remante de 50uL en cada lavado<sup>38</sup>.

Después de la etapa de incubación con los anticuerpos es usual el uso de sustancias de contraste para identificar el núcleo o bien teñir el fondo del citoplasma, para la microscopía de fondo claro se puede usar hematoxilina<sup>3</sup>, en el caso de microscopia de fluorescencia se suelen marcar núcleos con DAPI en concentraciones de 1 a 10ug/mL o también el colorante Hoechst 33342 a 5 ug/mL<sup>23</sup>.

## **Montaje final y observación microscópica.**

Las laminillas con células o portaobjetos con tejidos deben prepararse para observarse al microscopio, proceso que se le denomina montaje, consiste en obtener la muestra embebida en una solución que evite la dispersión de luz que atraviesa la muestra, esto mejora la resolución. Un medio usado es glicerol al 90%<sup>24</sup>, aunque también existen alternativas comerciales útiles como VectaShield®<sup>25</sup>. La laminillas se deberán observar en microscopio de fondo claro cuando se usen enzimas, en el caso de uso de fluorocromos se deben observar con microscopios de epifluorescencia, o si hay disponibilidad, resulta más adecuado el microscopio confocal, ya que este permite la identificación y colocalización de la señal en una ubicación tridimensional de la muestra. Se debe considerar que dado que algunos fluorocromos no son estables a la luz estos deben ser observados lo antes posible. Algunas condiciones que mantienen la fluorescencia por mayor tiempo es el mantener las laminillas en refrigeración y aisladas de la luz.



**Figura 2.** Diagrama de flujo del proceso Inmunocitoquímico\*. Se presentan dos estrategias generales para el proceso de inmunocitoquímica para la detección de marcadores de células troncales (verde) o células pancreáticas (amarillo). La selección de marcadores se realizó considerando las siguientes fuentes: Dor, 2004; Govindasamy, 2011; Rezania, 2011; Rolletschek, 2011; Seok, 2014; Carnevale, 2013; Chandra, 2011; Rapoport, 2009. \*Bravo Madrigal Jorge

### Análisis por RT-PCR.

La especialización celular se lleva a cabo por la regulación génica, que se consigue gracias a la expresión génica diferencial, logrando que a pesar de que una célula humana tiene cerca de 30 000 genes, no todos se expresen en todo momento. Esta expresión diferencial es la responsable de las variaciones en la estructura, comportamiento y procesos al interior de los más de 200 diferentes tipos celulares que componen un organismo vivo y que a pesar de ser diferentes mantienen el mismo código genético.

Las células madre o células troncales son células no diferenciadas y que a través de la activación de la expresión diferencial génica pueden dar origen a diversas estirpes celulares, este proceso puede ser replicado in vitro y actualmente es una herramienta que se está utilizando para avanzar en la ingeniería de tejidos y terapia celular para tratar algunos padecimientos. Uno de los padecimientos en los que se trabaja arduamente en encontrar una manera más eficiente de tratar es la diabetes. Se han enfocado esfuerzos en investigar para mejorar la obtención de células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina, sin embargo a pesar de los diversos protocolos disponibles para dicho fin, aún no se ha logrado tener una biomasa suficiente y funcional para poder ser utilizadas como terapia celular. Durante la aplicación de los protocolos para diferenciar células troncales a células  $\beta$  pancreáticas es importante además del seguimiento de evolución morfológica y funcional, monitorear a través de análisis de expresión génica los genes que son fundamentales para activar y concluir el proceso de diferenciación. Este análisis se realiza por medio de

retrotranscriptasa reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) que es una técnica que nos ayuda a evaluar la presencia de ARN mensajero en determinado momento del desarrollo del proceso de diferenciación *in vitro*<sup>26</sup>.

Los genes que comúnmente se utilizan para este seguimiento se conocen a través de los estudios enfocados a la organogénesis pancreática y se sabe que son esenciales para la obtención de células  $\beta$  pancreáticas. Los genes marcadores de este linaje celular son Pdx-1, Ngn3, Pax4, Nkx6.1, Isl-1, Insulin, y Glut2. Pdx-1 (por sus siglas en inglés Pancreatic and Doudenal homeobox) juega un rol maestro en la regulación de diferentes estadios del desarrollo pancreático y la morfogénesis de las células de los islotes; Nkx6.1, factor de homeodominio NK, participa en el desarrollo de células  $\beta$  productoras de insulina; Isl-1 proteína de homeodominio LIM, es un factor crítico para el desarrollo dorsal del páncreas exocrino y puede dirigir a las células mesenquimales hacia la diferenciación de etapas exocrinas o endocrinas; Neuro D1 (factor de transcripción hélix-loop-helix) se ha demostrado que es un factor esencial que actúa como activador y como represor transcripcional estableciendo y manteniendo a las células endócrinas maduras; Pax-6, regula el desarrollo normal del páncreas endócrino y en conjunto con Pdx-1 regula la transcripción de insulina, GLUT-2 y Nkx6.1 en células  $\beta$  maduras. El factor de transcripción neurogenina 3 (Ngn3), regula la transcripción de Isl-1. Pax-6 y Neuro-D y su presencia activa la diferenciación de células  $\beta$  desde el endodermo pancreático. La participación de estos genes en diferentes etapas es que los hace excelentes marcadores a seguir en la diferenciación *in vivo*, permitiendo la evaluación en etapas de la implementación de cultivos de células  $\beta$  productoras de insulina a partir de células troncales<sup>16,17,27</sup>.

### **Modelos animales en Diabetes**

Existen varios tipos de modelos animales utilizados en la investigación preclínica en estudios contra la Diabetes, sin embargo en la mayoría de los casos el modelo de la enfermedad es inducido ya sea mediante la dieta, el estrés, lesiones traumáticas o mediante la administración de químicos y las combinaciones de estos. Recientemente, algunos modelos han empleado otras técnicas como la ingeniería genética, la transgénesis o el silenciamiento de algún gene en específico que trae como consecuencia un abordaje distinto y un esclarecimiento en la patofisiología de la enfermedad en la búsqueda de un tratamiento oportuno a nivel clínico.

#### **Modelo nutricional con un alto en aporte calórico.**

Este modelo se puede realizar tanto en rata o ratón y es consecuencia de una alta ingesta calórica ya sea rica en grasas y/o carbohidratos, esta dieta trae como resultado una clara resistencia hacia la insulina. Además, este modelo es idóneo para realizar investigación enfocada hacia pruebas de tolerancia a la glucosa. Otra de las grandes ventajas es que asemeja las características de los pacientes con predisposición genética para el desarrollo de diabetes tipo 2. Asimismo, este modelo murino llega a recrear algunas de las comorbilidades más comunes asociadas a la patología de la obesidad<sup>28</sup>.

#### **Modelo de daño inducido.**

Los modelos de daño inducido han sido frecuentemente utilizados en la investigación de tipo preclínico por años. Su principio se fundamenta en la resistencia adquirida hacia la

insulina después de haber sido sometido a algún procedimiento quirúrgico, por otra parte en quemaduras involucrando gran extensión corporal se ha observado y también está asociada a traumatismos o comprometimiento hepático. En este modelo de daño adquirido la hiperglicemia y la resistencia hacia la insulina que se observa se desarrolla principalmente en el tejido muscular, en el tejido adiposo y principalmente en el hígado<sup>29</sup>. Una de las ventajas que ofrece este modelo es que se desarrolla en pocos minutos después del trauma aproximadamente de 15 a 60 minutos.

#### **Modelo de intoxicación por estreptozotocina.**

Uno de los modelos comúnmente utilizados ha sido la intoxicación sistémica de ratones por la inyección de 2-deoxy-2-(3-(metil-3-nitrosureido)-Dglucopiranososa) mejor conocida como estreptozotocina. La estreptozotocina es un agente quimioterapéutico con cualidades antimicrobianas y es sintetizado por el *Streptomicestessachromogenes*. En medicina ha sido empleado como un agente terapéutico en determinadas neoplasias, pero su uso también ha sido comprobado para provocar artificialmente diabetes, ya que también ejerce un poderoso efecto citotóxico de células B pancreáticas. Su forma de administración es sistémica y esta molécula utiliza el sistema transportador de la glucosa para provocar la muerte celular. Se considera un modelo de tipo no reversible y es un excelente método para estudios a largo plazo en modelos animales de diabetes<sup>30,31</sup>.

#### **Modelo intoxicación por dexametasona.**

Al igual que la intoxicación por estreptozotocina, el modelo inducido por la administración de dexametasona es un modelo que recrea la resistencia a la insulina, con la ventaja de ser relativamente barato y de fácil inducción/mantenimiento del modelo, además clínicamente este método presenta una baja mortalidad al ser empleado en ratones con respecto a otros modelos de inducción<sup>32</sup>.

#### **Modelo obtenido por la inyección con zimosan.**

El zimosan es unglucano con repeticiones de glucosa, componente entre otros de la pared celular obtenidas de la levadura *Saccharomycescerevisiae*, las ratas que son inyectadas de forma intraperitoneal con zimosan exhiben una resistencia a la insulina periférica y hepática, dando como resultado una disminución en la captura de glucosa mediada por la insulina en el musculo esquelético, en el tejido cardiaco y en el diafragma. Este modelo ha sido utilizado para inducir procesos de inflamación y diabetes<sup>33</sup>. Una de sus principales ventajas con respecto a otros modelos es que produce una resistencia a la insulina de tipo reversible y controlada.

#### **Modelos genéticos.**

Actualmente existen una gran variedad de modelos genéticos de estudio, cuya característica principal es representar más fidedignamente las características fenotípicas de la Diabetes, con la sobreexpresión o eliminación de un solo gen o varios. Sin embargo, este campo cada día se fortalece más y se generan nuevas mutaciones, dando lugar a más modelos genéticos de la enfermedad o comorbilidades. Por lo que, en este capítulo solo mencionaremos los dos más representativos.

#### Ratón leptinaob/ob y leptinadb/db

La leptina es una proteína de 167 aminoácidos, una de sus principales funciones, es de regular la ingesta de alimentos y el adecuado mantenimiento de la homeostasis del ciclo energético. Los ratones con esta característica son autosómicos recesivos con una deficiencia en el gene de leptina y de su receptor<sup>34</sup>. Ambos modelos muestran un fenotipo similar al observado en el proceso de obesidad y de resistencia a la insulina, mimetizando muchos de los signos asociados a estas patologías<sup>35</sup>.

#### Ratas Zucker fa/fa.

La rata Zucker es uno de los principales modelos de obesidad espontánea de orden genético. La obesidad en estas ratas se desarrollada en etapas tempranas de edad por la deficiencia del receptor de leptina, esta se hereda como carácter autosómico recesivo. Una de las principales características de estos animales es la presencia de hiperinsulinemia, intolerancia a la glucosa, el incremento en el perfil lipídico o desbalance. Siendo un modelo murino de utilidad para el estudio de obesidad y diabetes<sup>36</sup>.

#### Ratón obeso de Nueva Zelanda (NZO).

Este ratón es un claro ejemplo de un modelo poligenético. Muestra niveles elevados de insulina plasmática, hiperglucemia moderada, hiperfagia, obesidad e inclusive hiperlipidemia<sup>37</sup>. En el ratón NZO se puede desarrollar la resistencia a la insulina de tipo hepática a partir de las primeras semanas de vida comprometiéndose aún más en fases tardías del desarrollo.

#### **Conclusiones.**

Existen varios modelos asociados con la obesidad y diabetes. Inclusive, muchos de ellos asemejan lo observado en diversos grados de estas patologías. Sin embargo el mejor modelo animal a utilizar dependerá del mecanismo de acción y del efecto a observar durante la investigación en curso.

## REFERENCIAS

1. Ahnfelt-Ronne, J. & Madsen, O. D. Betatrophin. *Islets* 1-6, e28686 (2014).
2. Bhonde, R. R., Sheshadri, P., Sharma, S. & Kumar, A. Making surrogate (beta)-cells from mesenchymal stromal cells: Perspectives and future endeavors. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 46, 90–102 (2014).
3. Chen, L.-B., Jiang, X.-B. & Yang, L. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World J. Gastroenterol.* 10, 3016–3020 (2004).
4. Heathman, T. R. J. et al. Characterization of human mesenchymal stem cells from multiple donors and the implications for large scale bioprocess development. *Biochemical Engineering Journal* (2015). doi:10.1016/j.bej.2015.06.018
5. Kobolak, J., Dinnyes, A., Memic, A., Khademhosseini, A. & Mobasheri, A. Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods* 99, 62–68 (2015).
6. Dominici, M. et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315–7 (2006).
7. Holmes, K., Lantz, L. M., Fowlkes, B. J., Schmid, I. & Giorgi, J. V. Preparation of cells and reagents for flow cytometry. *Curr. Protoc. Immunol.* Chapter 5, Unit 5.3 (2001).
8. Alexander, C. M. et al. Separating Stem Cells by Flow Cytometry: Reducing Variability for Solid Tissues. *Cell Stem Cell* 5, 579–583 (2009).
9. Chhabra, P. & Brayman, K. L. sStem cell therapy to cure type 1 diabete: from hype to hope. *Stem Cells Transl. Med.* 2, 328–36 (2013).
10. Baumgartner, B. K., Cash, G., Hansen, H., Ostler, S. & Murtaugh, L. C. Distinct requirements for beta-catenin in pancreatic epithelial growth and patterning. *Dev. Biol.* 391, 89–98 (2014).
11. Gasa, R. CAPÍTULO 8 Desarrollo embrionario del páncreas y regeneración en el páncreas adulto. *Control* 125–137
12. Nostro, M. C. et al. Efficient generation of NKX6-1+ pancreatic progenitors from multiple human pluripotent stem cell lines. *Stem Cell Reports* 4, 591–604 (2015).
13. Migliorini, A., Bader, E. & Lickert, H. Islet cell plasticity and regeneration. *Mol. Metab.* 3, 268–274 (2014).
14. Carnevale, G. et al. In vitro differentiation into insulin-producing-cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. *Dig. Liver Dis.* 45, 669–676 (2013).
15. Dor, Y., Brown, J., Martinez, O. I. & Melton, D. a. Adult pancreatic beta-cells are formed by self-duplication rather than stem-cell differentiation. *Nature* 429, 41–46 (2004).
16. Govindasamy, V. et al. Govindasamy, 2011. *J. Dent. Res.* 90, 646–652 (2011).
17. Lee, J. S., An, S. Y., Kwon, I. K. & Heo, J. S. Transdifferentiation of human periodontal ligament stem cells into pancreatic cell lineage. 605–611 (2014).
18. Carnevale, G. et al. In vitro differentiation into insulin-producing  $\beta$ -cells of stem cells isolated from human amniotic fluid and dental pulp. *Dig. Liver Dis.* 45, 669–76 (2013).
19. Huang, C.-Y. C., Pelaez, D., Dominguez-Bendala, J., Garcia-Godoy, F. & Cheung, H. S. Plasticity of stem cells derived from adult periodontal ligament. *Regen. Med.* 4, 809–821 (2009).
20. Kanafi, M. M. et al. Transplantation of islet-like cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores normoglycemia in diabetic micKanafi, M. M., Rajeshwari, Y. B., Gupta, S., Dadheech, N., Nair, P. D., Gupta, P. K., & Bhonde, R. R. (2013). Transplantation of is. *Cytotherapy* 15, 1228–1236 (2013).
21. Ferro, F., Spelat, R., Beltrami, A. P., Cesselli, D. & Curcio, F. Isolation and Characterization of Human Dental Pulp Derived Stem Cells by Using Media Containing Low Human Serum Percentage as Clinical Grade Substitutes for Bovine Serum. *PLoS One* 7, 1–9 (2012).
22. Schiesser, J. V. & Wells, J. M. Generation of  $\beta$  cells from human pluripotent stem cells: Are we there yet? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1311, 124–137 (2014).
23. Turksen, K. *Stem Cell Biology and Regenerative Medicine.* (2011).

24. Gao, F. et al. In vitro cultivation of islet-like cell clusters from human umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells. *Transl. Res.* 151, 293–302 (2008).
25. Schulz, T. C. et al. A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. *PLoS One* 7, (2012).
26. Gallicano, G. I. Modeling to optimize terminal stem cell differentiation. *Scientifica (Cairo)*. 2013, 574354 (2013).
27. Pandian, G. N., Taniguchi, J. & Sugiyama, H. Cellular reprogramming for pancreatic  $\beta$ -cell regeneration: clinical potential of small molecule control. *Clin. Transl. Med.* 3, 6 (2014).
28. Ai, J. et al. Development of Wistar rat model of insulin resistance. *World journal of gastroenterology* 11, 3675-3679 (2005).
29. Williams, V. L., Martin, R. E., Franklin, J. L., Hardy, R. W. & Messina, J. L. Injury-induced insulin resistance in adipose tissue. *Biochemical and biophysical research communications* 421, 442-448, doi:10.1016/j.bbrc.2012.03.146 (2012).
30. Saleh, S., El-Maraghy, N., Reda, E. & Barakat, W. Modulation of diabetes and dyslipidemia in diabetic insulin-resistant rats by mangiferin: role of adiponectin and TNF-alpha. *Anais da Academia Brasileira de Ciencias* 86, 1935-1948, doi:10.1590/0001-3765201420140212 (2014).
31. Arikawe, A. P., Oyerinde, A., Olatunji, B., Il & Obika, L. F. Streptozotocin diabetes and insulin resistance impairment of spermatogenesis in adult rat testis: central vs. local mechanism. *Nigerian journal of physiological sciences: official publication of the Physiological Society of Nigeria* 27, 171-179 (2012).
32. Severino, C. et al. Low-dose dexamethasone in the rat: a model to study insulin resistance. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 283, E367-373, doi:10.1152/ajpendo.00185.2001 (2002).
33. Wang, L. Y. et al. Insulin resistance induced by zymosan as a new animal model in mice. *Hormone and metabolic research = Hormon- und Stoffwechselforschung = Hormones et metabolisme* 45, 736-740, doi: 10.1055/s-0033-1345118 (2013).
34. Zhang, Y. et al. Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432, doi: 10.1038/372425a0 (1994).
35. Tartaglia, L. A. et al. Identification and expression cloning of a leptin receptor, OB-R. *Cell* 83, 1263-1271 (1995).
36. Aleixandre, A. & Miguel, M. Zucker rats as an experimental model for the study of various diseases. *Endocrinologia y nutricion: organo de la Sociedad Espanola de Endocrinologia y Nutricion* 55, 217-222, doi:10.1016/S1575-0922(08)70670-3 (2008).
37. Oana, F. et al. Physiological difference between obese (fa/fa) Zucker rats and lean Zucker rats concerning adiponectin. *Metabolism: clinical and experimental* 54, 995-1001, doi:10.1016/j.metabol.2005.02.016 (2005).
38. Burry, RW. *Immunocytochemistry: a practical guide for biomedical research*. 2010. Springer New York
39. Jeon J, Correa-Medina M, Ricordi C, Edlund H, Diez JA. Endocrine cell clustering during human pancreas development. *J Histochem Cytochem* 2009; 57:811-824.