

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA QUIMIO-RESPUESTA DE UNA
LÍNEA CELULAR DE TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE
CANINO

Por

EDSON ANTONIO SANTAMARIA MARTÍNEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN
INMUNOBIOLOGÍA

2024

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA QUIMIO-RESPUESTA DE UNA LÍNEA

CELULAR DE TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO

Comité de Tesis



Dr. Moisés Armides Franco Molina

Presidente



Dr. Pablo Zapata Benavides

Secretario



Dra. Diana Zárate Triviño

Vocal



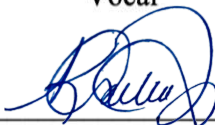
Dra. Ana Carolina Martínez Torres

Vocal



Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Vocal



Dra. Katiushka Arévalo Niño



DIRECCIÓN
DE POSGRADO

Subdirector de Posgrado

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA QUIMIO-RESPUESTA DE UNA LÍNEA

CELULAR DE TUMOR VENÉREO TRANSMISIBLE CANINO

Dirección de Tesis



Dr. Moisés Armides Franco Molina

Director



Dra. Diana Ginette Zárate Triviño

Co-Director

AVISO DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT-México) le agradezco la beca recibida durante el último semestre de doctorado.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Al Laboratorio de Inmunología y Virología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

A los miembros del laboratorio número VI, (en donde se llevaron a cabo la mayor parte del trabajo de esta tesis) por su invaluable ayuda y apoyo, durante los 4 años que duró este estudio.

Quiero hacer un especial agradecimiento a la Dra. Cristina Rodríguez Padilla por abrirme las puertas del Laboratorio de Inmunología y Virología, así como por las facilidades otorgadas para la realización de mi presente trabajo de tesis doctoral.

Al Dr. Moisés Franco, cuya guía, visión y soporte como maestro y amigo me han permitido llegar al término de esta empresa. Amigo, gracias por formarme como investigador y darme la oportunidad de educarme y crecer de manera personal.

Agradezco a la Dra. Ana Carolina Martínez Torres, al Dr. Pablo Zapata Benavides y a la Dra. Diana Zárate Triviño, a quien de manera muy especial agradezco su apoyo, sus observaciones, sus consejos y su atención. A todos los miembros de mi comité de tesis les agradezco las sugerencias y consideraciones durante el desarrollo de la investigación.

A la Dra. Yarellys Ramos, Dra. Silvia Santana, Dr. Gustavo Sobrevilla, M.C. Paola García, M.C. Natanael Palacios, M.C. Beatriz Castro, M.C. Jennifer Leos, M.C. Kennia Moreno y tantos otros que colaboraron de una forma u otra en este proceso.

¡GRACIAS!

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia y compañeros.

ÍNDICE

1.- Introducción	1
2.- Antecedentes	4
2.1 Tipos de drogas quimioterapéuticas y su mecanismo de acción	7
2.1.2 Quimioterapéuticos que actúan sobre el ADN	8
2.1.2.1 Agentes alquilantes	8
2.1.2.2. Antibióticos citotóxicos	9
2.1.3 Antimetabolitos	10
2.1.4 Antineoplásicos que actúan sobre la mitosis (antimitóticos)	13
2.1.5 Inhibidor de las desacetilasa de histonas	14
2.1.6 Inhibidor del receptor de la tirosina kinasa (IRTK)	14
3.- Justificación	16
4.- Hipótesis	17
5.- Objetivo	18
5.1 Objetivos específicos	18
6.- Materiales y métodos	19
6.1 Línea celular y cultivo celular	19
6.2 Evaluación citotóxica de los fármacos antineoplásicos	19
6.3 Ensayo de formación de colonias	19
6.4 Ensayo de migración celular	20
6.5 Ensayo de ciclo celular	20
6.6 Ensayo de administración secuencial de fármacos	21
6.7 Análisis de efectividad de combinación de fármacos	21
6.8 Análisis estadístico	22

7.- Resultados	23
7.1 Efecto de diferentes agentes farmacológicos sobre la viabilidad de la línea celular CTVT.	23
7.1.1 Los fármacos individuales disminuyen la viabilidad de Células CTVT	23
7.1.2 Efecto del tratamiento con un solo fármaco sobre la migración, la formación de colonias y el ciclo celular de las células CTVT	24
7.1.3 Efecto de fármacos combinados sobre la viabilidad de las células CTVT	29
7.1.4 Vincristina aumenta la quimio sensibilidad de las células de CTVT a toceranib	30
8.- Discusión	33
9.- Conclusión	37
10.- Perspectivas	38
11.- Bibliografía	39

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración citotóxica ₅₀ de los fármacos utilizados.	24
Tabla 2. Índice de Combinación de fármacos.	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.- Efecto de diferentes agentes farmacológicos sobre la viabilidad de la línea celular CTVT.	23
Fig.2.- Fotografías representativas tomadas bajo microscopía de campo brillante de células TVT tratadas con el CC ₅₀ de cada fármaco.	24
Fig.3.- Efecto del tratamiento con un solo fármaco sobre la migración celular.	25
Fig.4.- Grafica del porcentaje de cierre de herida.	25
Fig.5.- Fotografías del ensayo clonogénico.	26
Fig.6.- Grafica del número de colonias.	26
Fig.7.- Histogramas representativos de ciclo celular.	27
Fig.8.- Grafica del porcentaje de células en cada fase del ciclo celular.	28
Fig.9.- Efecto de fármacos combinados sobre la viabilidad de las células CTVT.	29
Fig.10.- Efecto de los tratamientos secuenciales sobre la viabilidad de las células CTVT después de vincristina.	30
Fig.11.- Viabilidad de células CTVT expuestas a la administración secuencial de diferentes fármacos y posteriormente vincristina.	31

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURA

TVTC	Tumor Venéreo Transmisible Canino
DMEM F12	Medio Eagle Modificado de Dulbecco enriquecido
CC	Concentración Citotóxica CI
Concentración Inhibitoria	
IC	Índice de combinación de fármacos
DRI	Índice de reducción de dosis
Vin	vincristina
Dox	doxorubicina
Tmz	temozolamida
Pan	panabinostat
Gem	gemcitabina
Toc	toceranib
5-Fu	5- fluorouracilo
Cyclo	ciclofosfamida
Metho	metotrexato
Cis	cisplatino
FMS	factor estimulante de colonias de macrófagos
KIT	receptor de tirosina cinasa
DAC	desacetilaza de histonas
HDAC	inhibidor de la desacetilasa de histonas
REMS	estrategias de evaluación y mitigación de riesgos

RTK	receptor de tirosin cinasa
IRTK	inhibidor del receptor de tirosin kinasa
VEGFR epitelial	receptor del factor de crecimiento vascular
PDGFR	receptor del factor de crecimiento derivado de las plaquetas
CSF-1	factor estimulante de colonias
Flt-3	FMS-Tipo tirosina cinasa 3
dFdCDP	difosfato de gemcitabina
tFdCTP	triosfato de gemcitabina
PBS	suero fetal bovino

RESUMEN

El tumor venéreo transmisible canino (CTVT) es la malignidad más común en los perros. Debido a que existen reportes de que este tumor es resistente al sulfato de vincristina, las opciones quimioterapéuticas son escasas y es necesario el desarrollo de nuevos abordajes terapéuticos. En este estudio, se evaluó la actividad citotóxica de vincristina, doxorubicina, temozolomida, panobinostat, toceranib, gemcitabina, cisplatino, fluorouracilo, ciclofosfamida y metotrexato en una línea celular CTVT, determinando que todos los fármacos disminuyen la viabilidad de manera dependiente de la dosis. Además, inhiben la migración celular de forma dependiente del tiempo y del fármaco, según lo evaluado por el ensayo de cicatrización de heridas. Por otro lado, vincristina, panobinostat, gemcitabina, toceranib, ciclofosfamida y metotrexato aumentaron el porcentaje de células en fase subG1, y doxorubicina, temozolomida, gemcitabina, toceranib y metotrexato disminuyeron el porcentaje de células en fase de síntesis. Sólo el toceranib aumentó el efecto citotóxico de la vincristina de manera sinérgica. Estos resultados confirman el uso de vincristina como el estándar de oro para el tratamiento de CTVT como monoterapia y sugieren el uso de un tratamiento combinatorio y secuencial con toceranib.

ABSTRACT

The canine transmissible venereal tumor (CTVT) is the most common malignancy in dogs. Because there are reports that this tumor is resistant to vincristine sulfate, the chemotherapeutic options are scarce, and the development of new therapeutic approaches is necessary. In this study, we evaluated the cytotoxic activity of vincristine, doxorubicin, temozolomide, panobinostat, toceranib, gemcitabine, cisplatin, fluorouracil, cyclophosphamide, and methotrexate on a CTVT cell line, determining that all drugs decreased the viability in a dose-dependent manner. Furthermore, they inhibit cellular migration in a time- and drug-dependent manner, as evaluated by the wound healing assay. On the other hand, vincristine, panobinostat, gemcitabine, toceranib, cyclophosphamide, and methotrexate increased the percentage of cells in the subG1 phase, and doxorubicin, temozolomide, gemcitabine, toceranib, and methotrexate decreased the percentage of cells in the synthesis phase. To efficientize the use of vincristine, only toceranib increased the cytotoxic effect of vincristine in a synergistic manner. Our results confirm the use of vincristine as the gold standard for CTVT treatment as monotherapy and suggest the use of a combinatorial and sequential treatment with toceranib.

1.- INTRODUCCIÓN

El ser humano, desde su inicio como especie, siempre ha guardado una relación muy estrecha y especial (pero siempre espacial) con los animales, cuenta de esto lo dan los múltiples registros históricos que se conocen; desde las representaciones pictóricas en cuevas y grabados en piedra que se han encontrado alrededor del mundo, los restos de hueso, piel, cuernos, astas y otros elementos animales encontrados en los sitios que se han identificado como los primeros asentamientos humanos; cuerdas, cabestros, frenos, monturas, “herraduras” y otros objetos más, descubiertos también en sitios arqueológicos que sirven como evidencia de la incipiente domesticación de algunos animales con ello el consabido establecimiento y desarrollo de las civilizaciones. La manera como los seres humanos se han relacionado con los animales a través de la historia no ha cambiado mucho, aún siguen siendo la fuente principal de alimento, siguen proporcionando abrigo (en menor grado gracias al desarrollo de fibras y materiales sintéticos), en algunos lugares, son el medio de transporte predominante y en otros más, también los motores de la agricultura y de la economía, cabe recalcar, la importancia que revisten como fuente de trabajo y como eje central de muchas actividades económicas a nivel mundial; no menos importante es mencionar, el papel que juegan en muchas culturas y sociedades, ya sea como parte de las tradiciones y/o herencias culturales; arraigados fuertemente en un sistema de creencias y costumbres que les da un nicho especial en estas sociedades (sobre todo las más antiguas) y que sobreviven hasta nuestros días. De igual manera es imposible negar la importancia que ha cobrado en la mayor parte del mundo la percepción de cómo se les trata y a partir de mediados de los años 60’s, una creciente corriente ideológica con argumentos sólidos respaldados por estudios científicos multidisciplinarios, han marcado los principios básicos y las normas para su explotación, manejo y tenencia, logrando así, el reconocimiento de la necesidad de la creación de legislaciones mundiales, nacionales, estatales, municipales y/o regionales tendientes a asegurar el bienestar para la inocuidad de los productos de origen animal y al mismo tiempo y no con poco esfuerzo, cambiar la percepción que se tenía de ellos, incluso, llegar a establecer reglamentos y leyes para el bienestar y protección animal de todas las especies de un país y en algunos lugares, garantizar sus derechos. No hay que olvidar el lugar cada vez más considerable que ocupan los animales de compañía en las sociedades, preponderantemente los perros y los gatos, dos especies bien adaptadas a las

sociedades humanas y que, en la mayoría de estas, sobre todo en las que están en vías de desarrollo, representan un problema grave de salud pública. La adaptación de estos animales a la vida civilizada no resulta difícil de entender, los perros han acompañado a los humanos desde hace algunos miles de años, los primeros, siguiendo a las tribus nómadas, aprovechando los restos de comida de las comunidades de manera habitual, conducta que se repite hasta nuestros días y que es otro de los problemas que la falta de control de estos animales genera. Si bien se debe reconocer el lugar que ocupan en muchas familias como “mascotas” y aunque en algunos lugares su población es controlada de manera puntual, en la mayoría de los países de África, medio oriente, Asia y Latinoamérica su población crece exponencialmente, en donde la mayoría se encuentran en situación de calle reproduciéndose descontroladamente, incrementando la contaminación, generando fecalismo, diseminando enfermedades, algunas de las cuales pueden ser de tipo zoonótico e incrementando el riesgo de ataques y transmisión de rabia (India). Según la Asociación Mexicana de Médicos Veterinarios Especialistas en Pequeñas Especies, se estimó que en México en 2016 había alrededor de 20 millones de perros en situación de calle y cada año se incrementará en un 20%, otras fuentes señalan que el 80% de los perros en la calle fueron abandonados por sus dueños. Dentro de las múltiples causas que generan el abandono, una de las más importantes es el Tumor Venéreo Transmisible Canino o CTVT, esta enfermedad “estigmatiza” a los portadores debido a sus manifestaciones clínicas, la cual en el 98% de los casos se presenta como una masa amorfa en la región vulvar, vaginal y perianal de hembras (y en el pene y testículos en el caso de los machos) las cuales se ulceran, se infectan, sangran y despiden un olor nauseabundo muy característico, razón por la cual los propietarios deciden abandonarlos sin darles tratamiento en la mayoría de los casos, no obstante a la existencia de éste, el cual, cabe mencionar se basa en una monoterapia de un fármaco llamado vincristina, el que ha sido utilizado históricamente casi de manera empírica e indiscriminada (en parte debido a los pocos estudios que existen sobre este tipo de cáncer) lo cual, es de sospechar, ha generado la cada vez mayor resistencia reportada de este tumor a dicho fármaco, razón por la cual es imperioso buscar alternativas terapéuticas más accesibles, de mayor disponibilidad y más efectivas, que abonen en la resolución de esta enfermedad y la problemática social y de salud pública que la acompaña, todo esto en el marco de una crisis de quimioterapéuticos por la cual atraviesa nuestro país.

2.- ANTECEDENTES

El tumor venéreo transmisible canino (CTVT) también conocido como tumor o sarcoma de stiker (Jones *et al.*,1997), sarcoma infeccioso, granuloma venéreo, linfosarcoma transmisible, es un tipo de cáncer que se transmite por la transferencia de células vivas como aloinjerto de un huésped a otro generalmente durante el coito, esto le ha permitido subsistir a través del tiempo como un “cáncer parásito” diseminándose así, de perro en perro desde hace aproximadamente 11,000 años (Strakova, A.; Murchison, E.P. 2015.) . Es el cáncer más antiguo que se conoce y a diferencia de todos los demás tipos de cáncer, su contenido genético difiere en el número de cromosomas (54-59) con el del huésped portador (78) (Bridgett M,Ostrander EA 2006). Estudios recientes basados en sus “características” genéticas han permitido estimar el tiempo en el que apareció e incluso el lugar (Báez-Ortega *et al.*,2019). Aunque existe evidencia bibliográfica de la descripción de este tumor desde 1810 (Delabere Blaine,1810), no fue hasta 1876 cuando Nowinsky describió por primera vez las células de CTVT y sus características biológicas, convirtiéndose desde entonces en un modelo de estudio popular entre los científicos de aquella época (Harmelin A. *et al* 2002). A pesar de los años de investigación en el tema no existía mucha información sobre el cultivo celular de este tumor, hasta 1951 cuando Blomm *et al.* reportaron un cultivo celular de CTVT con éxito, el cual duró muy poco; después, en 1968, Adams *et al.* describió el establecimiento de un cultivo de CTVT estable por más de 18 meses. Finalmente, hace aproximadamente 5 años en el laboratorio de Inmunología y Virología de la facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León en México, logró cultivarse una línea celular de este tumor (Zayas *et al.*, 2019), la cual permanece estable hasta la fecha, esto permitió realizar varios ensayos con la finalidad de demostrar la sensibilidad de este tipo de tumor y su respuesta a diferentes fármacos y sus combinaciones *in vitro*, con el propósito de predecir si determinado fármaco u la combinación de estos pudiera ser utilizado en ensayos posteriores con la intención de desarrollar nuevos tratamientos o protocolos terapéuticos que puedan ser llevados a la práctica médica para resolver el problema de resistencia y disminuir los efectos adversos de los tratamiento disponibles.

En la terapéutica del cáncer, todos los esfuerzos van dirigidos a eliminar completamente la presencia de las masas tumorales e incluso la de las células

cancerígenas en su totalidad, ya sea, las que pudieran haber quedado de manera residual en el sitio de localización del tumor que fue identificado en primera instancia, así como las que pudieron haber migrado a sitios distantes del lugar donde se originó la masa tumoral primaria, evitando de esta manera las recidivas del tumor, las cuales, son señaladas como las causantes de la mayoría de las muertes por esta enfermedad, esto, tratando de minimizar al máximo los efectos adversos colaterales producidos por efecto del tratamiento empleado. Debido a su complejidad, se han implementado distintas estrategias para hacer frente a dicha enfermedad, estas estrategias cuentan con distintas disciplinas y herramientas diseñadas para su uso, ya sea de manera individual o en forma de terapia combinatoria; dentro de estas disciplinas se encuentran: la cirugía, la radioterapia, inmunoterapia, terapia génica y la quimioterapia, siendo esta última, una de las herramientas más utilizadas hasta hoy.

En la quimioterapéutica del cáncer, el primer caso documentado del uso de un agente químico para tratar de manera sistémica el cáncer, data de 1865 cuando Lissauer le administró arsenito de potasio a un paciente con leucemia observando un efecto positivo, posteriormente fue hasta mediados del siglo XIX, cuando en 1946 Gilman y Phillips publicaron una revisión de un trabajo experimental en el cual usaron la mostaza nitrogenada (un derivado del gas mostaza utilizado en la segunda guerra mundial) para tratar un paciente con linfosarcoma (Pratt.W.B.2004). Casi inmediatamente, en 1947, Sídney Faber demostró incipientemente que un “preparado químico” podía tener efectos positivos sobre la salud de pacientes con leucemia y su signología (aunque este efecto, fuera relativamente de corta duración). Estos dos hechos, marcaron el comienzo de la era de lo que hoy conocemos como quimioterapia o quimioterapéutica del cáncer. En la quimioterapéutica del cáncer, en aquellos primeros años, se puede decir que muchos de los intentos realizados en esta área, fueron hechos de manera empírica, incluso sin saber aún la etiología y el origen de la enfermedad, la mayoría de la investigación se desarrolló con el objetivo de encontrar la cura y poca con la intención de descubrir la causa o la etiología de dicha enfermedad. Basados en la experiencia hasta entonces obtenida y sin pruebas preclínicas o de algún otro tipo, se comenzaron a emplear fármacos de manera casi experimental en pacientes con distintos tipos de la enfermedad, bajo la premisa de que si funcionaba para un tipo de cáncer debería de funcionar para todos (la cura universal). Sin embargo, al descubrir que este no era el caso, algunos médicos/investigadores, comenzaron a probar otros fármacos e incluso sus combinaciones, lo cual propició, el desarrollo masivo de medicamentos e incluso se diseñaron los primeros ensayos clínicos para medir la

efectividad de estas drogas contra la enfermedad, estableciéndose no mucho después, los primeros protocolos de terapia múlti-drogas para el cáncer, en los cuales, cabe mencionar, se utilizaba generalmente más de dos o tres fármacos, cuyas dosis, incluso, llegaron a emplearse en concentraciones tan altas, que resultaban potencialmente tóxicas, las cuales resultaron en un éxito relativo en aquellos días, fue hasta 1958 cuando Min Chiu Li y su equipo reportaron la remisión total de un coriocarcinoma empleando ácido fólico y metrotexato, constituyendo este hecho, la primera cura quimioterapéutica del cáncer en adultos (Li MC *et al.*, 1958). En la actualidad, muchos de estos protocolos y muchas de estas primeras drogas se siguen usando, con sus respectivas variantes y sus adecuaciones según sea el caso en particular, sin embargo, recientemente se ha puesto al descubierto, que muchos de los fármacos que se usan en terapias combinadas, tienen interacciones entre sí que podrían modificar el efecto de cada fármaco de manera individual y que al ser usados de forma combinatoria, resulta en la acción parcial o total de algún (os) fármaco(s) exclusivamente, (efecto aditivo, sinérgico o antagónico) y muy probablemente esta acción esté determinada por la concentración y en que son administrados, así como a la fase del ciclo celular en la que ejercen su efecto, más que por su mecanismo de acción, pudiendo estas dosis, estar relacionadas no sólo con la efectividad de la mezcla, sino con sus potenciales efectos adversos, que en el caso de los seres humanos, son una de las principales causas por las cuales se abandona el tratamiento contra el cáncer.

Un claro ejemplo de estas interacciones negativas, quedó demostrado por Xiaoxiong Xiong y su equipo, los cuales evaluaron una de las combinaciones más utilizadas en la quimioterapéutica de tumores sólidos (como el cáncer de mama y pulmón), carboplatino y paclitaxel y reportaron su efecto antagónico cuando eran administrados en dicho orden y que al ser invertido se observaban mejores resultados sobre la viabilidad de las líneas celulares empleadas en el estudio (Xiong, X. *et al.*, 2007). En un esfuerzo por reducir estos efectos adversos, se ha planteado elegir combinaciones de fármacos que en conjunto demuestren tener efectos mayores sobre la enfermedad y pocos efectos secundarios. Se han desarrollado pruebas para determinar la interacción de los quimioterapéuticos para ser usados en terapias combinatorias. Estas pruebas o ensayos están diseñados para medir dicha interacción, ya sea en el uso concomitante de estos fármacos o cuando son utilizados de manera secuencial, un ejemplo de estas pruebas son los quimioensayos, los cuales permiten determinar el efecto de los fármacos sobre líneas celulares o cultivos primarios y por tanto también se han usado como ensayos predictivos antes de realizarse ensayos preclínicos y clínicos, incluso,

existen programas computarizados para determinar estas interacciones; uno de ellos, por ejemplo, es el índice de combinación de fármacos, así como el índice de reducción de dosis (compusyn®) entre algunos otros. El uso de estos ensayos permite hacer una selección de quimioterapéuticos con mejor interacción entre ellos. Nuestro grupo de investigación ha realizado estudios previos con la línea celular de tumor venéreo transmisible canino. Sin embargo, el presente trabajo es el primero en realizar un estudio sistemático de la sensibilidad y respuesta de la línea celular de CTVT a diferentes fármacos antineoplásicos y/o sus combinaciones, cabe destacar que la mayoría de los fármacos utilizados en este trabajo, nunca se han empleado para el tratamiento del Tumor Venéreo Transmisible Canino.

2.1 Tipos de drogas quimioterapéuticas y su mecanismo de acción

Las drogas quimioterapéuticas para el tratamiento del cáncer se han clasificado de acuerdo a su mecanismo de acción. Además, un fármaco puede tener efecto sobre la célula cancerígena debido a su acción sobre más de un mecanismo, confiriendo de esta manera su clasificación. Es importante mencionar que, debido a la naturaleza biológica del cáncer y su curso patológico, el desarrollo de los fármacos antineoplásicos va dirigido principalmente a interrumpir o interactuar de manera negativa con las funciones características de las células cancerígenas, ya sea deteniendo su acelerada proliferación por medio de la interrupción de las vías de señalización celular, interactuando con el material genético de dicha célula, interfiriendo con su nutrición o evitando su proliferación (Benedi J. Gomes del Rio M.A. 2006).

2.1.2 Quimioterapéuticos que actúan sobre el ADN

2.1.2.1 Agentes alquilantes

Ejercen su efecto citotóxico mediante la unión de los grupos alquilo y las bases nitrogenadas del ADN de forma covalente, interfiriendo físicamente tanto la replicación de éste como la transcripción del ARN y en consecuencia la división celular y la formación de proteínas. Su acción se puede observar en todas las etapas del ciclo celular, sin embargo, su mayor

efectividad se ha observado en los tipos celulares que poseen un rango de división más acelerada (Coeffic D. *et al* 2002).

Estos fármacos alquilantes, son los más utilizados en quimioterapia antineoplásica.

Su clasificación puede ser la siguiente: **Clásicos**, como ciclofosfamida, clorambucilo, ifosfamida, melfalán y trofosfamida; **Nitrosoureas**, tales como carmustina, estramustina y fotemustina; y **Tetrazinas** como dacarbacina y temozolomida.

Ciclofosfamida. De este grupo, es el fármaco de mayor uso. es una molécula carente de actividad, por lo cual, es necesaria su bioactivación por medio del hígado, en donde es transformada en fosforamida, siendo este el metabolito de mayor actividad antitumoral. Su administración puede ser oral o parenteral, siendo la vía endovenosa una forma segura para su administración; sus más reportados efectos secundarios son náuseas, vómito, mielosupresión y pérdida de cabello, sin olvidar el daño a la mucosa de la vejiga, lo cual causa cistitis hemorrágica (esto por la acción de la acroleína, uno de sus metabolitos), la cual puede ser evitada mediante la ingesta de grandes cantidades de líquidos en un periodo de 24 a 48 horas antes de la administración de fármaco. La ciclofosfamida es sin duda uno de los medicamentos que más se usan en la terapia oncológica, siendo en un número considerable de casos parte de los protocolos de multifármacos debido a su acción contra distintos tipos de cáncer como lo son las leucemias, linfomas, cáncer de mama, cáncer de ovario y algunos sarcomas. También ha demostrado ser útil en el protocolo de inducción que anteceden al trasplante de médula ósea (Lorenzo P, *et al* 2005).

Temozolomida. Es un agente alquilante clasificado dentro de las tetrazarinas, son pequeñas moléculas, las cuales liberan un ion diazóxido cuando se degradan químicamente, el cual es muy reactivo y a su vez es capaz de alquilar el ADN. A este fármaco al igual que otros miembros de este grupo, se le asocia con efectos tóxicos secundarios como náusea, vómitos y mielosupresión, su uso se ha indicado principalmente para el linfoma de Hodgking, así como el melanoma metastásico maligno (Benedi J. Gomes del Rio M.A. 2006).

2.1.2.2. Antibióticos citotóxicos. Son producidos por algunas especies de hongos y tienen la capacidad inhibir el desarrollo y proliferación de otros organismos o incluso células.

Antraciclinas. Son producidas por el hongo *Streptomyces spp.* y su mecanismo de acción puede considerarse como múltiple, las moléculas de este antibiótico pueden

intercalarse entre las bases nitrogenadas del ADN provocando una alteración en la replicación y la transcripción de las proteínas, estos compuestos también interfieren con la acción de la topoisomerasa II, mediante su inhibición, alterando la estructura terciaria del ADN, provocando su ruptura y causando daño en los procesos mediante los cuales se repara. Las antraciclinas tienen una distribución sistémica excepto en el sistema nervioso central, se metabolizan principalmente en el hígado por lo cual su dosificación estará sujeta a estado de la función hepática, la cual podría ser la causa en parte del efecto adverso más reportado con el uso de estos fármacos, la cardiotoxicidad. Ésta, se puede presentar debido a que las antraciclinas se pueden unir a ciertas proteínas de la membrana celular como la cardiolipina dando como resultado la producción y liberación de radicales libres, los cuales se han señalado como los causantes de dicha cardiotoxicidad, cabe mencionar, que este efecto tóxico sobre el corazón puede presentarse de forma aguda la cual se manifiesta en días o incluso horas cuando la primera administración del fármaco excede la dosis tolerable o indicada y/o de forma crónica la cual dependerá de la cantidad de fármaco total acumulado (Lorenzo P, *et al* 2005).

Doxorrubicina. La doxorrubicina o adriamicina es el antibiótico antraciclínico más utilizado. Su mecanismo de acción comprende la interferencia del ADN por medio de la intercalación y estabilización de sus bases mediante la formación de uniones o puentes electrostáticas de las cadenas de aminoglicósidos, por tanto produce alteraciones en los procesos de replicación y transcripción proteica. Asimismo, causa una inhibición de la topoisomerasa II, siendo este el efecto antitumoral más importante durante el ciclo celular pero inespecífico de fase (aunque su mayor efecto se observa sobre la fase S) su uso está recomendado para el tratamiento de leucemias agudas, cáncer de mama, ovario, vejiga y tiroides, así como neuroblastoma y tumor de Wilms, linfomas Hodgkin y no Hodgkin, osteosarcoma y sarcomas de tejidos blandos. También se ha usado como paliativo para tratar otras neoplasias. Sus principales efectos adversos reportados son la mielosupresión, náuseas, vómito y alopecia, como también miocardiotoxicidad la cual se relaciona con la dosis. Debido a que se considera vesicante, otro potencial riesgo de su uso es la ulceración grave de la piel si se llegara a presentar la extravasación (Lorenzo P, *et al* 2005).

2.1.3 Antimetabolitos

Los antimetabolitos son fármacos anticancerígenos utilizados en quimioterapia debido a su acción citotóxica, que se produce en la fase S del ciclo celular. Se caracterizan por

su similitud con los metabolitos necesarios para las reacciones celulares, dividiéndolos así en tres grupos: análogos del ácido fólico, análogos de purina y análogos de pirimidina (Ribeiro S., Correia P. 2022).

Análogos de pirimidinas. Son un grupo de fármacos de suma importancia en la terapéutica del cáncer, poseen un espectro de acción muy amplio.

El 5-fluorouracilo (5-FU). Es un compuesto pirimidínico fluorado que competitivamente inhibe a la timidilato sintetasa mediante el desplazamiento de su sustrato natural, puede incorporarse al ADN y al ARN causando una alteración en sus funciones, cuando se utiliza en conjunto con el ácido folínico, forma un compuesto terciario, el que resulta más estable y con mayor actividad bloqueadora de esta enzima, aumentando así, su efecto citotóxico. Está indicado como adyuvante en el tratamiento del cáncer de mama, gástrico y colorrectal principalmente. También se ha observado ser efectivo contra neoplasias de cabeza y cuello, además de otros tumores del tracto gastrointestinal, cuando se administra en forma de infusión continua, su uso está indicado de igual manera para el tratamiento del cáncer de páncreas, endometrio, ovario y en tumores de hígado. Dentro de sus efectos adversos se pueden mencionar la mielosupresión, eritema y descamación dolorosa de manos y pies, y si interactúa con compuestos como el folinato cálcico, su toxicidad puede modificarse desencadenando problemas como mucositis y diarrea los cuales pueden ser de importancia médica, también se ha reportado neurotoxicidad a nivel central, la cual se caracteriza por un síndrome cerebeloso y cardiotoxicidad dependiente de la dosis (Lorenzo P, et al 2005)

Anti folatos. Muy Similares al ácido fólico o folato.

Metotrexato. Estructuralmente guarda una gran similitud con el ácido dihidrofólico o dihidrofolato. El metotrexato, se une a la enzima dihidrofolato reductasa, impidiendo de esta manera la síntesis de tetrahidrofolato, el cual tiene como función, donar o ceder grupos mono carbonados con los cuales se sintetizan purinas y pirimidinas y en consecuencia, ácidos nucleicos. Una característica importante de este grupo es su actividad antitumoral la cual es muy amplia, sin embargo, su principal uso se observa como adyuvante en la terapéutica del cáncer de mama, en donde participa de manera muy considerable. Tanto el fluoruracilo como el metotrexato son mielotóxicos y aunque otros efectos adversos como las náuseas y el vómito son de poca relevancia con el uso de estos medicamentos, la toxicidad de estos, puede verse incrementada si

preexiste alguna falla renal. También se ha descrito la mucositis como efecto adverso con el uso de estos fármacos (Lorenzo P, et al 2005).

Derivados del platino. Son un grupo de fármacos muy importantes en la terapéutica del cáncer.

Cuando estos fármacos se activan dentro de la célula, el platino libera dos valencias, los cuales se unen al ADN formando enlaces muy estables, resultando en un cambio en la estructura tridimensional de éste y por consiguiente, la falla en el proceso de transcripción y replicación al impedir la separación de sus dos cadenas. Como se mencionó antes, el cisplatino posee un espectro amplio de actividad antitumoral, se le considera como un fármaco de primera línea para el tratamiento de neoplasias de tipo germinal, se ha observado su actividad en tumores como carcinomas epidermoides dentro de los que se encuentran los tumores de cabeza y cuello (células escamosas), así como cáncer de esófago, vejiga y cérvix. También ha sido indicado para el tratamiento del osteosarcoma, neuroblastoma y cáncer de estómago, pulmón (células pequeñas) y endometrio. Es el tratamiento de elección para el carcinoma epitelial de ovario. El cisplatino, posee una toxicidad relevante, siendo el quimioterapéutico más nefrotóxico, lo cual se evidencia con el aumento de urea y creatinina séricas. Dentro de las lesiones en el tejido renal se han descrito la esclerosis glomerular, así como la fibrosis y necrosis tubular, las cuales son las responsables por la presencia de hipomagnesemia, hiponatremia e hipocalcemia, debido a esto, es de suma importancia monitorear el nivel de hidratación del paciente, así como el uso de un diurético como el manitol, esto con la finalidad de contrarrestar los efectos adversos sobre la función renal (Barnes KR, Lippard SJ. 2004).

Gemcitabina. Es un antimetabolito análogo del arabinósido de citosina (Ara-C) cuya activación intracelular se produce tras su transporte al interior celular mediado por 5 transportadores de nucleósidos, ENT1, ENT2, CNT1, CNT2 y CNT31. Una vez dentro de la célula, la enzima deoxicitidina cinasa (dCK) fosforila la molécula de gemcitabina a gemcitabina monofosfato (dFdCMP). La fosforilación secuencial produce los metabolitos activos, gemcitabina difosfato (dFdCDP) y trifosfato (dFdCTP). El metabolito dFdCTP compete con deoxicitidina trifosfato en la unión al ADN polimerasa y provoca la inhibición de la enzima, la terminación de la cadena de elongación del ADN e induce la apoptosis. Además, se han descrito otras actividades citotóxicas como la inhibición de la síntesis de ARN dosis y tiempo dependiente y la inhibición de varias enzimas, entre las que destacan la enzima ribonucleótido

reductasa, la citidina trifosfato sintetasa, la deoxicitidilato desaminasa y la topoisomerasa I, enzimas que tienen un papel primordial en la síntesis y reparación del ADN (Ramón-López et al., 2012).

La gemcitabina (2',2'-difluoro 2'-desoxicitidina, dFdC) es el análogo de citidina más importante desarrollado desde arabinósido de citosina (Ara-C). La evidencia de su potente actividad antitumoral en un amplio espectro de estudios in vitro y en modelos tumorales in vivo se han confirmado con éxito en el entorno clínico. A pesar de lo estructural y similitudes farmacológicas con Ara-C, la gemcitabina muestra características distintivas de la farmacología celular, metabolismo y mecanismo de acción. Después de la entrada a través de la membrana celular a través de transportadores de nucleósidos, la gemcitabina sufre una conversión intracelular compleja a los nucleótidos difosfato de gemcitabina (dFdCDP) y trifosfato (dFdCTP) responsable de sus acciones citotóxicas. La actividad citotóxica de la gemcitabina puede ser el resultado de varias acciones sobre la síntesis de ADN. dFdCTP compite con el trifosfato de desoxicitidina (dCTP) como inhibidor de la ADN polimerasa. dFdCDP es un inhibidor potente de la ribonucleósido reductasa, lo que resulta en el agotamiento de grupos de desoxirribonucleótidos necesarios para la síntesis de ADN y, por lo tanto, potenciando los efectos de dFdCTP. dFdCTP se incorpora al ADN y después de la incorporación de un nucleótido más conduce a la terminación de la hebra de ADN. Este nucleótido adicional puede ser importante para ocultar el dFdCTP de las enzimas de reparación del ADN, como la incorporación de dFdCTP en el ADN parece ser resistente a los mecanismos normales de reparación del ADN (Mini et al., 2009).

La gemcitabina se puede inactivar eficazmente por la acción de la desoxicitidina desaminasa a 2',2'- difluorodesoxiuridina. Además, la 5'-nucleotidasa se opone a la acción de las nucleósidos quinasas al catalizar la conversión de nucleótidos a nucleósidos. Se han identificado sitios adicionales de acción y efectos autopotenciadores. Existe evidencia de que la regulación hacia arriba o hacia abajo de los transportadores de membrana múltiples, enzimas implicadas en el metabolismo de la gemcitabina y alteraciones en las vías apoptóticas pueden conferir sensibilidad/resistencia a este fármaco, se ha proporcionado en modelos experimentales y más recientemente también en el entorno clínico. Se ha demostrado la sinergia entre la gemcitabina y varios otros agentes antineoplásicos en modelos experimentales basados en interacciones farmacodinámicas específicas. Estos estudios

fundamentan el uso clínico más racional de este fármaco en regímenes combinados y en terapia personalizada (Mini et al., 2009).

2.1.4 Antineoplásicos que actúan sobre la mitosis (antimitóticos)

Alcaloides de la Vinca

La vincristina y la vinblastina pertenecen a este grupo de fármacos, estos compuestos se aislaron de la *Catharanthus roseus*, una planta originaria y endémica de Madagascar; los alcaloides de esta planta se unen a una proteína, la β -tubulina presente en el extremo positivo de los microtúbulos, estabilizándolos e impidiendo la división de la célula. Aunque ambos compuestos alcaloides son muy similares estructuralmente, su uso se indica para diferentes tipos de neoplasias y de igual forma, ambos producen diferentes efectos adversos secundarios (Stanton RA, *et al* 2011).

Vincristina. Su mayor uso se observa en la terapéutica de neoplasias del tipo infantil y/o pediátrico, también es muy utilizada para tratar el cáncer hematológico en individuos adultos. En el caso del tratamiento del CTVT es el fármaco de primera elección, el más indicado y el más usado.

Vinblastina. La interacción entre la vinblastina y la β -tubulina, tiene como consecuencia, una unión rápida e irreversible, la cual causa un cambio en la conformación del microtúbulo, el cual se relaciona con la auto asociación de la proteína, dicho cambio induce la estabilización permanente de esta estructura, la cual imposibilita el proceso de división celular o mitosis. Como efectos tóxicos adversos de estos fármacos se han descrito la mielosupresión, la cual puede ser reversible y la neuropatía periférica, para la cual hasta el momento no ha podido ser elucidado el mecanismo por el cual se presenta (Jordan MA, Wilson L. 2004).

2.1.5 Inhibidor de las desacetilasa de histonas

Panabinostat. Es un inhibidor de la desacetilasa (DAC). Los DAC, también conocidos como histonas DAC (HDAC), son responsables de regular la acetilación de alrededor de 1750 proteínas en el cuerpo; sus funciones están involucradas en muchos procesos biológicos, incluida la replicación y reparación del ADN, la remodelación de la cromatina, la transcripción de genes, la progresión del ciclo celular, la degradación de proteínas y la reorganización del citoesqueleto (Choudhary *et al.*, 2009). En algunos tipos de cáncer, existe una sobreexpresión de las proteínas DAC. Panobinostat inhibe las proteínas de clase I (HDAC 1, 2, 3, 8), clase II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9, 10) y clase IV

(HDAC 11). Se cree que la actividad antitumoral de panobinostat se atribuye a la modulación epigenética de la expresión génica y la inhibición del metabolismo de las proteínas (Jacob *et al.*, 2015). Se han reportado, diarreas graves y eventos cardiacos graves y mortales, arritmias y cambios en el electrocardiograma (ECG) en pacientes que recibieron panabinostat.

2.1.6 Inhibidor del receptor de la tirosina kinasa (IRTK)

Toceranib. Es una molécula que bloquea varios tipos de RTKs además de KIT como VEGFR, PDGFR, CSF-1 y Flt-3. Aunque este fármaco fue comercializado para su uso en mastocitomas inoperable de grado II o III por su acción sobre el receptor Kit, es evidente que presenta un potencial de actividad antitumoral mucho más amplia debido al mayor espectro de RTK que puede bloquear y sobre todo dada su acción sobre VEGFR y PDGFR presenta una actividad antiangiogénica importante (Sanches Gomez, 2013).

Los IRTK pueden como cualquier otro tratamiento anticáncer presentar efectos adversos, mayoritariamente asociados a la inhibición de RTK presentes en las células normales. Los efectos más comunes son alteraciones gastrointestinales (anorexia, inapetencia, pérdida de peso, náusea, vómitos, sangrado intestinal, diarrea) con una prevalencia de entre el 40-50% para toceranib en los estudios clínicos realizados en perros con mastocitomas. La aparición de estos síntomas puede ser muy variable de unos días en tratamiento o después de semanas. Otros efectos adversos descritos menos frecuentemente son neutropenia, trombocitopenia, vasculitis, tromboembolismo pulmonar, dolores musculares, cojeras, toxicidad hepática, síndrome nefrótico, etc. (Sanches Gomez O. 2013).

3.-JUSTIFICACIÓN

Debido a lo mencionado con anterioridad acerca de la creciente frecuencia, incidencia y prevalencia de este padecimiento, así como su implicación en el sustancial aumento de animales que son abandonados en la vía pública, ya sea por la imposibilidad económica para acceder a los tratamientos disponibles y/o a la ineficacia o poca respuesta a éstos. La importancia de este estudio radica en la posibilidad de establecer la sensibilidad de una línea celular de Tumor Venéreo Transmisible Canino a diferentes fármacos y sus combinaciones para su posterior uso en estudios a nivel preclínico y clínico con la intención de superar los obstáculos antes mencionados, y así, poder ofrecer nuevas terapias más efectivas para solucionar el problema que este padecimiento representa en la salud de estos animales, como en lo concerniente a la salud pública, entorno social y cultural, sin dejar de lado el aporte científico al conocimiento e investigación del cáncer.

4.- HIPÓTESIS

El tumor venéreo transmisible canino es sensible a la combinación de vincristina con otros fármacos antineoplásicos.

5.- OBJETIVO

Determinar la quimiosensibilidad en un modelo *in vitro* de la línea celular de CTVT a fármacos antineoplásicos y sus combinaciones.

Objetivos específicos

1.- Determinar en un modelo *in vitro* el efecto citotóxico de los antineoplásicos vincristina, gemcitabina, panabinostat, doxorubicina, ciclofosfamida, toceranib, 5-fluorouracilo, metotrexato, temozolamida y cisplatino sobre la línea celular de CTVT.

2.- Determinar el efecto de los antineoplásicos vincristina, gemcitabina, panabinostat, doxorubicina, ciclofosfamida, toceranib, 5-fluorouracilo, metotrexato, temozolamida y cisplatino sobre la capacidad de migración celular, formación de colonias y ciclo celular de CTVT en un modelo *in vitro*.

3.- Determinar el efecto citotóxico en un modelo *in vitro* de la combinación de los antineoplásicos gemcitabina, panabinostat, doxorubicina, ciclofosfamida, toceranib, 5-fluorouracilo, metotrexato, temozolamida y cisplatino con el fármaco de primera línea vincristina sobre la viabilidad de la línea celular de CTVT.

4.- Determinar el efecto citotóxico de la administración secuencial de los antineoplásicos gemcitabina, panabinostat, doxorubicina, ciclofosfamida, toceranib, 5-fluorouracilo, metotrexato, temozolamida y cisplatino con el fármaco de primera línea vincristina sobre la línea celular de CTVT en un modelo *in vitro*.

6.- MATERIALES y MÉTODOS

6.1 Línea celular y cultivo celular

Se utilizó la línea celular de Tumor Venéreo Transmisible Canino proporcionada por el banco de células del Laboratorio de Inmunología y Virología de la FCB, UANL; para su mantenimiento se cultivaron en una caja para cultivo celular de 75 cm² que contenía medio de cultivo celular Eagle Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM-F12, GIBCO® by Life Technologies™, US) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (GIBCO®), 1% antibiótico y antimicótico (Antibiotic-Antimycotic 100X; GIBCO®) a 37°C en una atmósfera con 5% de CO₂ y 80% de humedad. Se utilizó StemPro Accutase (GIBCO®) para disgregación celular.

6.2 Evaluación citotóxica de los fármacos antineoplásicos

Las células de CTVT fueron sembradas en una concentración de 15,000 células por pozo en cajas de 96 pozos de fondo plano e incubadas en una atmósfera a 37°C y 5% de humedad durante 12 horas para su adherencia; posteriormente, fueron tratadas con los diferentes tratamientos en dosis de 10 a 100 mM por triplicado e incubadas durante 24 horas para determinar su porcentaje de viabilidad mediante una prueba de resazurina. Un 70% de inhibición de la viabilidad celular será considerado como óptimo para ser considerado como efecto antitumoral. La significación estadística se realizó mediante la prueba post hoc de Dunnett (*p<0.05)

6.3 Ensayo de formación de colonias

Para la realización de los ensayos de formación de colonias, las células de TVTC se sembraron a 4000 células por pocillo en placas de 96 pozos durante 24 horas y se incubaron durante 48 horas con la CC25 o CC50 de los quimioterapéuticos. Después de 24 horas, los medios se reemplazaron con medios libres de fármacos

6.4 Ensayo de migración celular

Estos ensayos se realizaron mediante la técnica de “scratch” o herida. Las células se tripsinizaron a partir de monocapas de las que se diluyeron en medio de cultivo completo a una densidad de 25,000 células en 300mL suspensión celular por pocillo en placas de 48 pocillos y se cultivaron hasta confluencia. Las monocapas de células se rascaron usando una punta de pipeta de 200 mL, creando así una “hendidura”. Se eliminaron los medios y las células se lavaron con PBS para eliminar las células flotantes, luego se añadieron los medios con bajo contenido en suero (1%) a los pocillos junto con los quimioterapéuticos. Inmediatamente después del raspado y la adición de los medios se tomaron imágenes de las heridas usando un lector de imágenes multimodo Bio Tek Cytation 5 (Bio Tek, Winoosky, VT). Después de 14 horas, se tomaron imágenes de las heridas nuevamente. Las áreas de las heridas antes y después del tratamiento se cuantificaron usando el software Image J82. El porcentaje de cierre de herida de cada prueba se calculó en comparación con los experimentos tratados solo con vehículo. Cada experimento se realizó por triplicado y se obtuvieron 2 imágenes para cada pocillo. La significación estadística se realizó mediante la prueba post hoc de Dunnet (*p <0.05) y se permitió que las células crecieran durante 96 horas adicionales. Para visualizar las células que crecieron durante este periodo, se retiraron los medios de los pocillos de la placa de 96 y las células se fijaron con una mezcla de metanol y ácido acético 3:1 (v/v). Después de 5 minutos, se eliminó la solución de fijación y las células se tiñeron con cristal violeta al 0.5% p/v en metanol al 25 % durante 30 minutos. Finalmente, se eliminó el cristal violeta y las placas se lavaron con agua corriente para eliminar el exceso de colorante. La significación estadística se realizó mediante la prueba post hoc de Dunnet (*p<0.05).

6.5 Ensayo de ciclo celular

Análisis del ciclo celular de células CTVT se realizó por medio de la técnica de citometría de flujo. Las células fueron tratadas con CC50 de los fármacos antineoplásicos durante 24 horas, La significación estadística se realizó mediante la prueba post hoc de Dunnet (*p<0.05).

6.6 Ensayo de administración secuencial de fármacos

Se evaluó el potencial efecto sinérgico de la vincristina combinada con los otros fármacos. Para ello, las células CTVT fueron expuestas a diluciones seriadas (1:100, 1:10 y 1:1) de la CC50 de vincristina más las mismas diluciones de la CC50 de cada uno de los otros fármacos. Se expusieron células TVT (5×10^3 /pocillo) a la CC50 de Vincristina más varias diluciones (1:100, 1:10 y 1:1) de la CC50 de los otros fármacos durante 24 h. posteriormente se invirtió la secuencia de administración de fármacos a la línea celular y se evaluó si existe un efecto de sensibilización en alguno de estas administraciones secuenciales. La viabilidad celular relativa se determinó con el ensayo Alamar Blue. La significación estadística se determinó mediante la prueba post hoc de Tukey (* $p < 0.05$).

6.7 Análisis de efectividad de combinación de fármacos

Los efectos de la dosis de cada fármaco o combinación de fármacos fueron definidos por la mitad de la concentración inhibitoria máxima (IC50) valores y se calcularon utilizando el método de Chou-Talalay (Chou T-C., 2010) para cada fármaco y combinación de fármacos se calculó IC50, y el efecto sinérgico o antagónico de la combinación de fármacos fue cuantificado. Los efectos de la combinación de fármacos se definieron por el teorema del índice de combinación resultante (CI) de ChouTalalay, que ofrece una definición cuantitativa de los efectos aditivos (CI = 1), sinergismo (IC < 1) y antagonismo (IC > 1). El índice de reducción de dosis (DRI) está definido por la ecuación DRI de Chou Talalay, y es una medida de cuántas veces es la dosis de cada fármaco en una combinación sinérgica puede reducirse a un nivel de efecto dado en comparación con las dosis de cada fármaco solo. Los datos fueron analizados con el software CompuSyn (Chou T, Martin N., 2005) y las curvas dosisrespuesta se construyeron con GraphPad Prism 6.

6.8 Análisis estadístico

Para el análisis de los datos se utilizaron las pruebas de análisis de varianza de una vía (ANOVA) y la prueba de Dunnett's o Tukey's *post hoc*. Todos los resultados fueron expresados como la media \pm SD y los valores de $P < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos

7.- RESULTADOS

7.1 Efecto de diferentes agentes farmacológicos sobre la viabilidad de la línea celular CTVT.

7.1.1 Los fármacos individuales disminuyen la viabilidad de Células CTVT

Nuestros resultados muestran que los fármacos probados significativamente ($* p \leq 0.05$) disminuyeron la viabilidad de las células CTVT de manera dependiente de la dosis (Figura 1). El CC50 para cada fármaco fue determinada a partir de la curva dosis-respuesta (tabla 1). Los fármacos con mayor actividad citotóxica fueron vincristina (CC50 = 0,1 $\mu\text{g/ml}$), metotrexato (CC50 = 0,1 $\mu\text{g/ml}$), panobinostat (CC50 = 0,5 $\mu\text{g/ml}$), toceranib (CC50 = 0,6 $\mu\text{g/ml}$), gemcitabina (CC50 = 0,9 $\mu\text{g/ml}$) y doxorubicina (CC50 = 1 $\mu\text{g/ml}$). No todos los fármacos indujeron cambios morfológicos en las células CTVT (Figura 2).

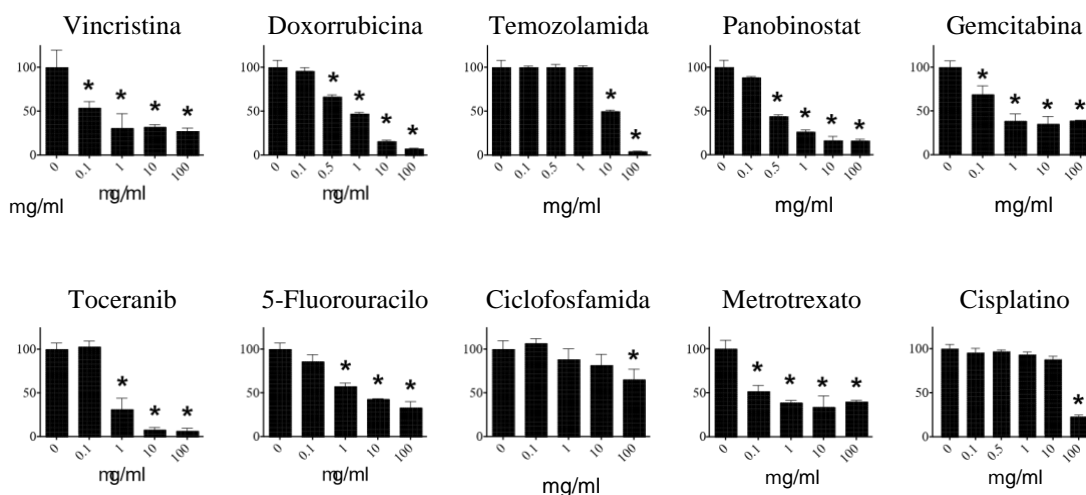


Fig.1

Se expusieron células CTVT (5×10^3 /pocillo) a diferentes concentraciones (de 0 a 100 $\mu\text{g/ml}$) de los fármacos Vin, Dox, Tmz, Pan, Gem, Toc, 5-Fu, Cyclo, Metho y Cis durante 24 h. La viabilidad celular relativa se determinó mediante el ensayo Alamar-blue. Cada gráfico de barras representa el promedio de 6 mediciones independientes \pm SD. La significación estadística se realizó mediante la prueba post hoc de Dunnett ($*p < 0,05$ (C))

Fármaco CC ₅₀ (µg/ml)	Vin	Dox	Tmz	Pan	Gem	Toc	5-Fu	Ciclo	Met	Cis
	0.1	10	9.9	0.5	0.9	0.6	5.1	430.6	0.1	46.2

Tabla .1

La CC₅₀ de cada fármaco se calculó a partir de los datos de viabilidad obtenidos con el ensayo Alamar blue utilizando el programa Quest Graph™ ED50 Calculator (AAT Bioquest, Inc.). El CC₅₀ se expresa en µg/ml.

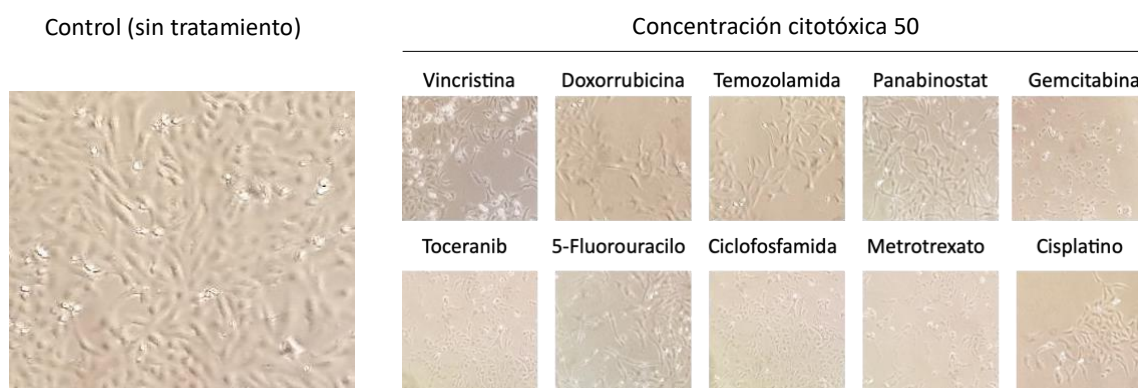


Fig.2

Fotografías representativas tomadas bajo microscopía de campo brillante de células TVT tratadas con el CC₅₀ de cada fármaco. Aumento: 40 ×. Vin, vincristina; Dox, doxorubicina; Tmz, temozolomida; Pan, panabinostat; gema, gemcitabina; toc, toceranib; 5-Fu, 5-fluorouracilo; ciclo, ciclofosfamida; meto, metotrexato; Cis, cisplatino.

7.1.2 Efecto del tratamiento con un solo fármaco sobre la migración celular, la formación de colonias y el ciclo celular de las células CTVT

La temozolomida, el panabinostat, la gemcitabina, el toceranib, la ciclofosfamida, el metotrexato y el cisplatino redujeron significativamente ($*p \leq 0,05$) la migración de las células CTVT durante 6 horas después de la eliminación del tratamiento.

Gemcitabina, toceranib, y ciclofosfamida disminuyeron significativamente ($*p \leq 0,05$) la migración de células CTVT durante 24 h después de la eliminación del tratamiento (Figura 3).

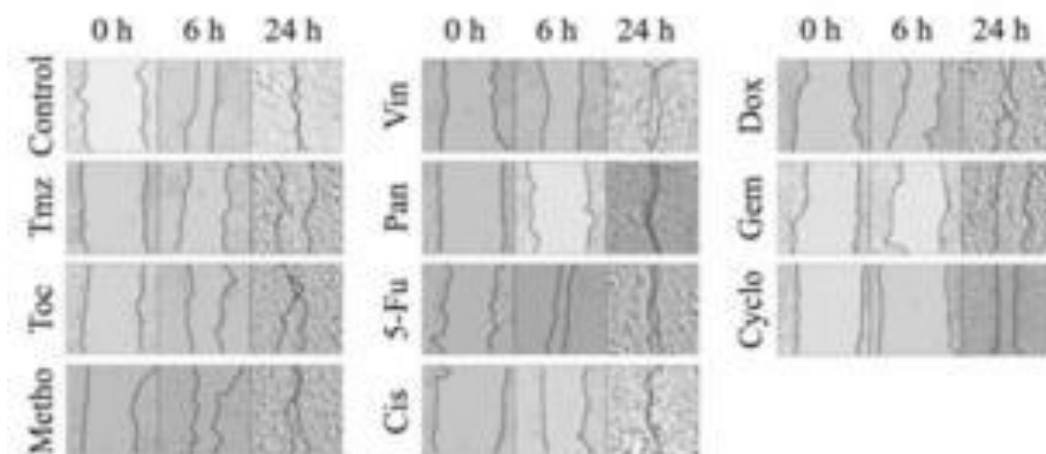


Fig.3

Las imágenes muestran fotografías representativas tomadas bajo el microscopio de campo brillante a 40x a las 0,6 y 24 h.

La temozolomida, el panobinostat, la gemcitabina, el toceranib, la ciclofosfamida, el metotrexato y el cisplatino redujeron significativamente ($*p \leq 0,05$) la migración de las células CTVT durante 6 horas después de la eliminación del tratamiento. Gemcitabina, toceranib y metotrexato disminuyeron significativamente ($*p \leq 0,05$) la migración de células 24 horas después de la eliminación del tratamiento

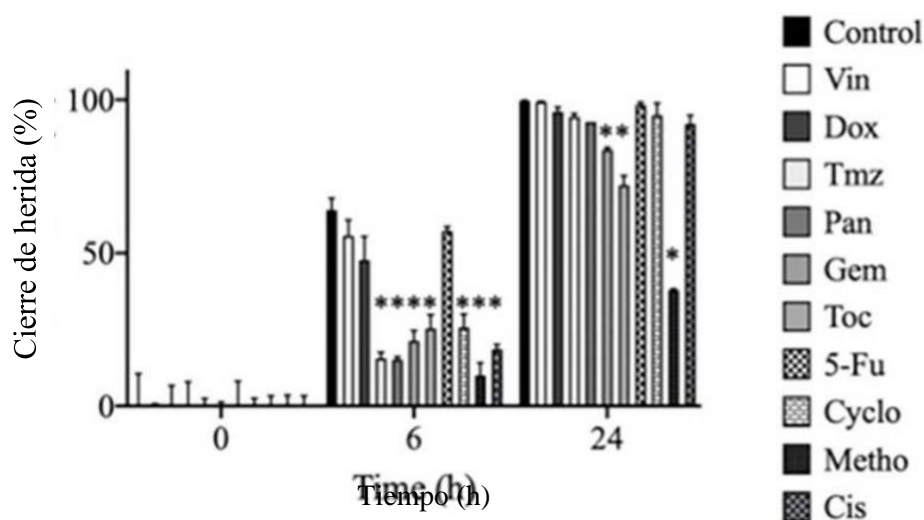


Fig. 4

Ensayo de cierre de herida, las células de TVTC fueron tratadas con la CC50 de Vin, Dox, Tmz, Pan, Gem, Toc, 5-Fu, Ciclo, Metho, y Cis por 24 h. la gráfica representa el porcentaje de cierre de herida de tres repeticiones \pm SD

Todos los fármacos probados disminuyeron significativamente ($*p \leq 0,05$) la capacidad de las células CTVT para formar colonias, excepto la ciclofosfamida y el

5-fluorouracilo. La doxorrubicina, el panobinostat, la gemcitabina, el metotrexato y el cisplatino inhibieron por completo la formación de colonias (Figura 5).

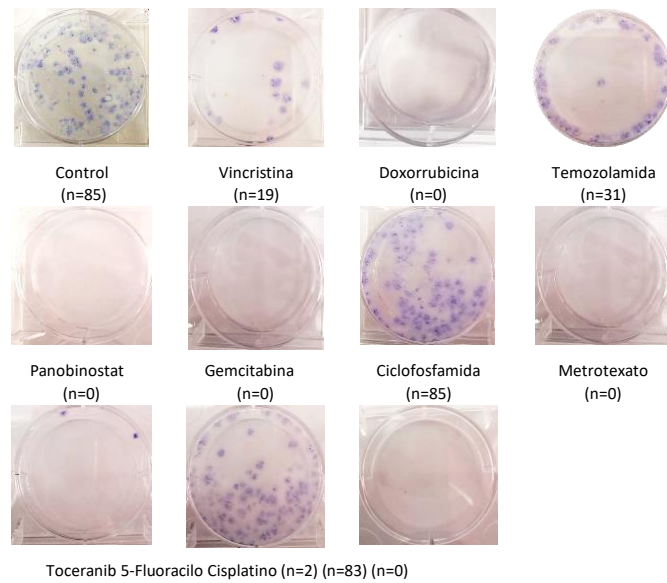


Fig.5

Ensayo de formación de colonias de las células de TVTC tratadas la CC_{50} o de Vin, Dox, Tmz, Pan, Gem, Toc, 5-Fu, Ciclo, Meto y Cis for 24 h, y posteriormente incubadas con medio de cultivo por 21 días. Todos los fármacos probados disminuyeron significativamente ($*p \leq 0,05$) la capacidad de las células CTVT para formar colonias, excepto la ciclofosfamida y el 5-fluorouracilo. La doxorrubicina, el panobinostat, la gemcitabina, el metotrexato y el cisplatino inhibieron por completo la formación de colonias

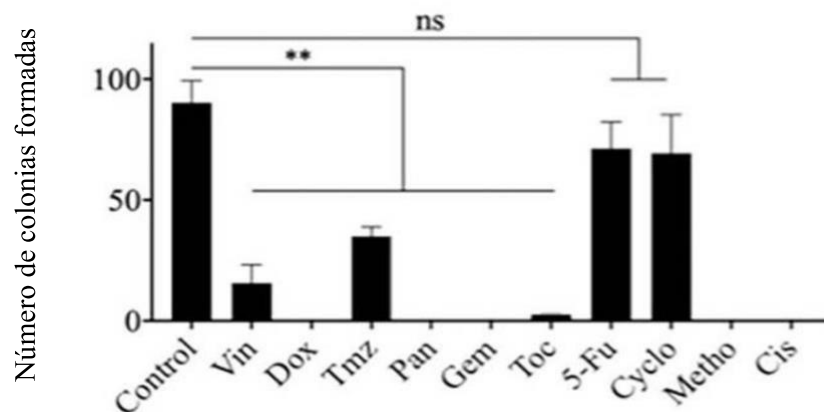


Fig.6

La grafica de barras representa el número de colonias formadas en tres \pm SD.

En cuanto a la distribución de las fases del ciclo celular, vincristina (19,1 %), panobinostat (21,5 %), gemcitabina (11 %), toceranib (10,4 %), ciclofosfamida (15,7 %) y metotrexato (36 %), aumentaron el porcentaje de células en la fase subG1 en

comparación con las células no tratadas (3,3%). Doxorubicina (15,4%), temozolomida (15,6%), gemcitabina (17,1%), toceranib (15,8%) y metotrexato (11,5%) disminuyeron el porcentaje de células en fase de síntesis en comparación con las células no tratadas (20,4%) (Figura 8).

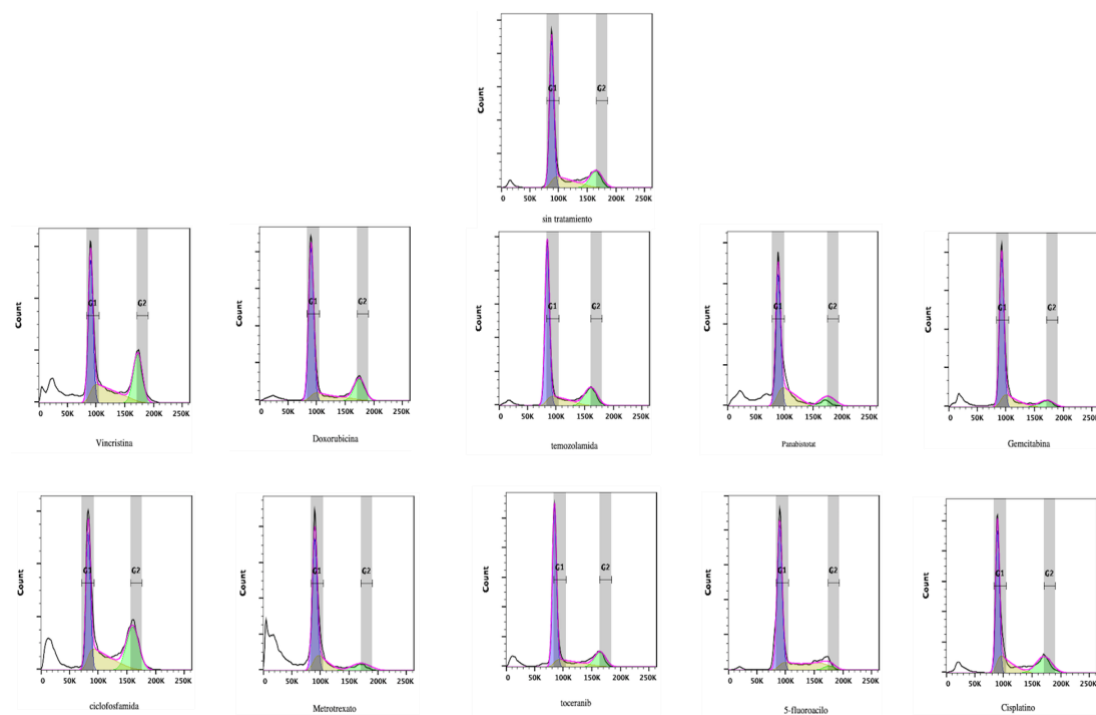


Fig.7

Histogramas representativos del ciclo celular

Análisis de ciclo celular de TVTC tratadas con la CC50 de Vin, Dox, Tmz, Pan, Gem, Toc, 5-Fu, Ciclo, Meto, y Cis por 24 h, y determinada por citometría de flujo

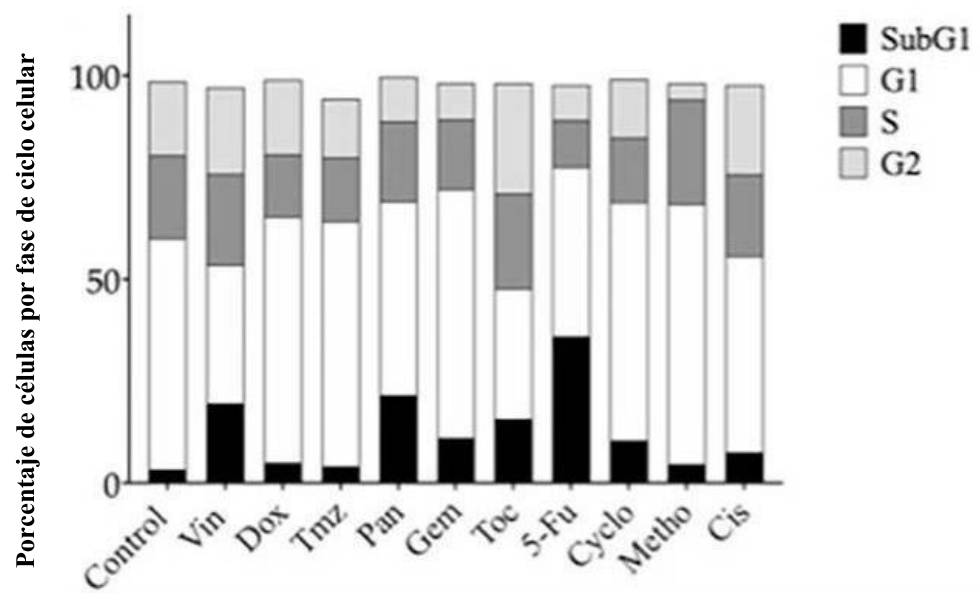


Fig.8

La grafica de barras representa el porcentaje de células en cada fase del ciclo (SubG1, G1, S, and G2). La significancia estadística de determino por medio de la prueba de Dunnet's post hoc (*p >=0.05). Vin, vincristine; Dox, doxorubicina; Tmz, temozolamida; Pan, panobinostat; Gem, gemcitabine; Toc, toceranib; 5-Fu, 5-fluorouracil; Cyclo, ciclofosfamida; Metho, metotrexato; Cis, cisplatino.

7.1.3 Efecto de fármacos combinados sobre la viabilidad de las células CTVT

Se evaluó el potencial efecto sinérgico de la vincristina combinada con los otros fármacos. Para ello, las células CTVT se expusieron a diluciones seriadas (1:100, 1:10 y 1:1) de la CC50 de vincristina más las mismas diluciones de la CC50 de cada uno de los otros fármacos. Solo la combinación de vincristina más toceranib en la dilución 1:10 y 1:1 (56 y 33%, respectivamente), disminuyó significativamente (* $p \leq 0,05$) la viabilidad de las células CTVT en comparación con el efecto de los fármacos individuales, 96 y 72,5% para vincristina, y 89 y 77% para toceranib (Figura 9).

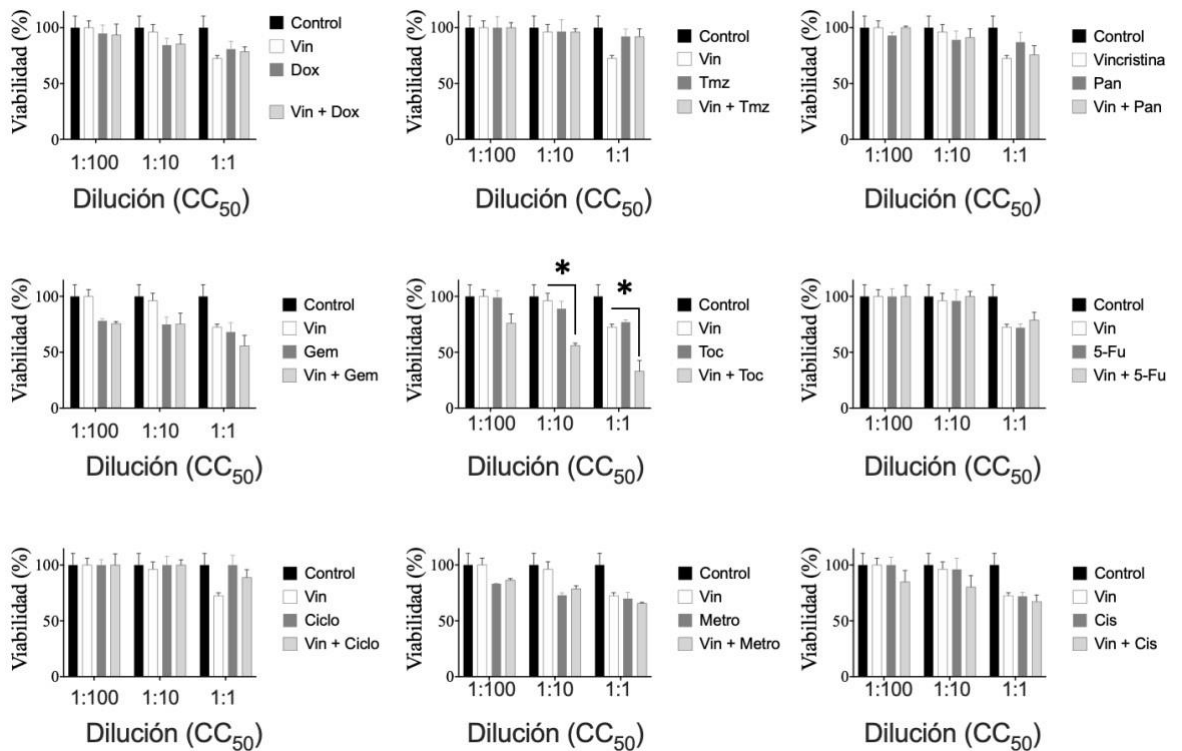


Fig.9

La viabilidad de células CTVT expuestas a la administración simultánea de vincristina más diferentes fármacos. Se expusieron células TVT (5×10^3 /pocillo) a la CC50 de Vin más varias diluciones (1:100, 1:10 y 1:1) de la CC50 de los fármacos Dox, Tmz, Pan, Gem, Toc, 5-Fu, Cyclo, Metho o Cis durante 24 h. La viabilidad celular relativa se determinó con el ensayo Alamar Blue. Cada gráfico de barras representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm SD. La significación estadística se determinó mediante la prueba post hoc de Tukey (* $p < 0,05$). Vin: vincristina, Dox: doxorubicina, Tmz: temozolomida, Pan: panobinostat, Gem: gemcitabina, Toc, toceranib; 5-Fu, 5-fluorouracilo; ciclo, ciclofosfamida; meto, metotrexato; Cis, cisplatino.

7.1.4 Vincristina aumenta la quimio sensibilidad de las células CTVT a toceranib

También se evaluó el efecto de los tratamientos secuenciales sobre la viabilidad de las células CTVT. Brevemente, tratamos las células CTVT con el CC50 de vincristina durante 24 h (fase de sensibilización), eliminamos el tratamiento y añadimos una dilución 1:1 del CC50 de cada uno de los otros fármacos. El tratamiento secuencial de vincristina seguido de toceranib disminuyó significativamente (* $p \leq 0,05$) la viabilidad de las células CTVT (48,79 %), en comparación con vincristina y toceranib solos (79,78 y 67,04 %, respectivamente) (Figura 10). También evaluamos si diferentes fármacos aumentarían la quimio sensibilidad de las células CTVT a la vincristina; sin embargo, nuestros hallazgos revelaron que ninguno de los fármacos probados aumentó la quimio sensibilidad de las células CTVT a la vincristina (Figura 11).

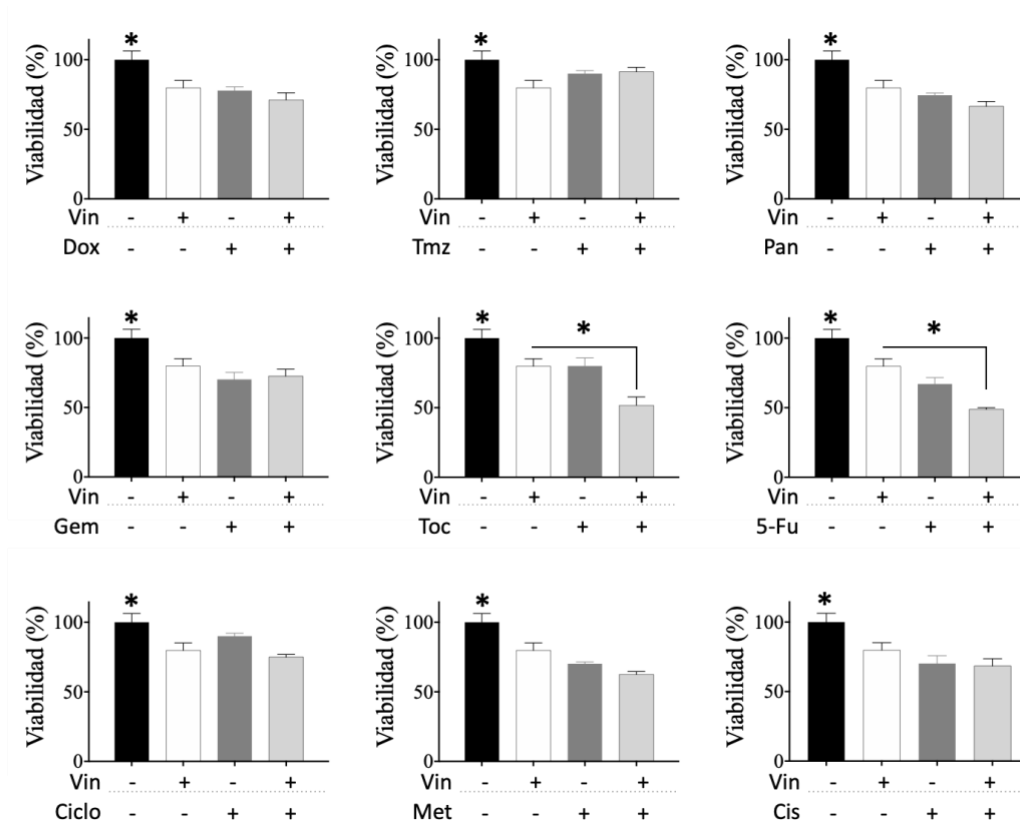


Fig.10

Viabilidad de células CTVT expuestas a la administración secuencial de vincristina más diferentes fármacos. Las células CTVT (5×10^3 /pocillo) se expusieron al CC50 de Vin durante 24 h. Luego se retiró Vin y se añadió una dilución 1:1 del CC50 de Dox, Tmz, Pan, Gem, Toc, 5-Fu, Cyclo, Metho o Cis durante 24 h. La viabilidad celular relativa se determinó con el ensayo Alamar Blue. Cada gráfico de barras representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm SD. La significación estadística se determinó mediante la prueba post hoc de Tukey (* $p < 0,05$). Vin, vincristina; Dox, doxorubicina;

Tmz, temozolamida; Pan, panobinostato; gema, gemcitabina; toc, toceranib; 5-Fu, 5-fluorouracilo; ciclo, ciclofosfamida; meto, metotrexato; Cis, cisplatino.

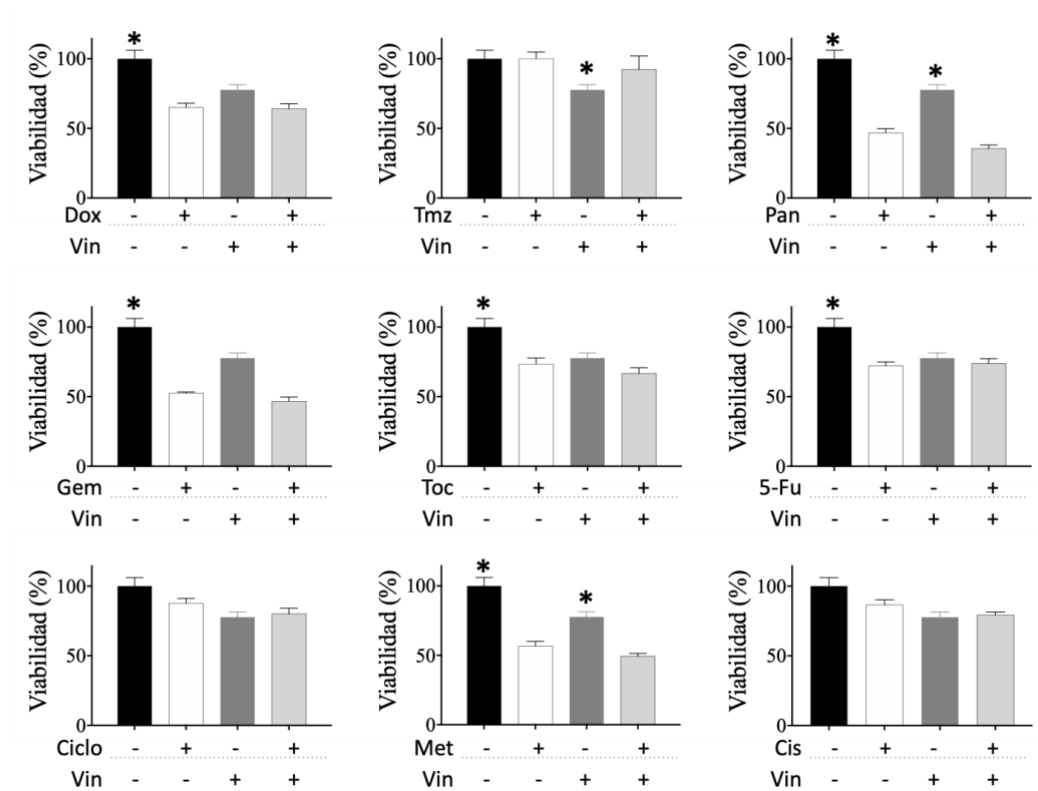


Fig.11

Viabilidad de células CTVT expuestas a la administración secuencial de diferentes fármacos más vincristina. Las células CTVT (5×10^3 /pocillo) se expusieron a la CC50 de los fármacos Dox, Tmz, Pan, Gem, Toc, 5-Fu, Cyclo, Metho o Cis durante 24 h. Luego se retiró cada fármaco y se añadió una dilución 1:1 del CC50 de Vin durante 24 h. La viabilidad celular relativa se determinó con el ensayo Alamar Blue. Cada gráfico de barras representa el promedio de 3 experimentos independientes \pm SD. La significación estadística se determinó utilizando la prueba post hoc de Tukey (* $p < 0,05$), sin significancia (ns). Vin, vincristina; Dox, doxorubicina; Tmz, temozolomida; Pan, panobinostato; gema, gemcitabina; toc, toceranib; 5-Fu, 5-fluorouracilo; ciclo, ciclofosfamida; meto, metotrexato; Cis, cisplatino.

Análisis de efectividad de combinación de fármacos

Combinacion de Tx	Diluciones	CI	Efecto
Vincristina + Doxorubicina	1:1	803.896	Antagonismo
	1:10	946.817	Antagonismo
	1:100	16.0779	Antagonismo
Vincristina + Temozolamida	1:1	7275521	Antagonismo
	1:10	2.894E8	Antagonismo
	1:100	2.894E7	Antagonismo
Vincristina + Pannobinostat	1:1	3039.78	Antagonismo
	1:10	5.45E27	Antagonismo
	1:100	465.941	Antagonismo
Vincristina + Gemcitabina	1:1	27.8135	Antagonismo
	1:10	1.37067	Antagonismo
	1:100	0.00641	Antagonismo
Vincristina + Toceranib	1:1	512.531	Antagonismo
	1:10	0.00688	Sinergismo
	1:100	0.04561	Sinergismo
Vincristina + Fluoracilo	1:1	1.73E14	Antagonismo
	1:10	3.46E13	Antagonismo
	1:100	3.46E12	Antagonismo
Vincristina + Metrotexato	1:1	8376114	Antagonismo
	1:10	4.97E12	Antagonismo
	1:100	3.588E8	Antagonismo
Vincristina + Ciclofosfamida	1:1	No Determinado	
	1:10	No Determinado	
	1:100	No Determinado	
Vincristina + Cisplatino	1:1	1474136	Antagonismo
	1:10	4770135	Antagonismo
	1:100	1.016E7	Antagonismo

Tabla 2

Índice de combinación de fármacos (CI)

Los valores de IC fueron 0,0461 y 0,0068 para las diluciones 1:10 y 1:1, respectivamente, lo que indica un efecto sinérgico. Ninguna de las combinaciones restantes probadas exhibió un efecto sinérgico (Tabla 2).

Los datos fueron analizados usando el software Compusyn ® CI <1, =1, and >1, indican sinergismo, efecto aditivo y antagonismo respectivamente. Vin, vincristina; Dox, doxorubicina; Tmz, temozolamida; Pan, panobinostat; Gem, gemcitabina; Toc, toceranib; 5-Fu, 5-fluorouracil; Ciclo, ciclophosphamide; Metho: methotrexato; Cis, cisplatino.

8.- DISCUSIÓN

En el presente estudio, investigamos los efectos de diferentes fármacos y sus combinaciones en una línea celular de cáncer CTVT, utilizando la prueba de sensibilidad a fármacos con el objetivo de proponer nuevas alternativas de tratamiento para CTVT. Las pruebas de sensibilidad a fármacos son una herramienta útil que permite seleccionar adecuadamente un quimioterapéutico de interés (Lu DY, Lu TR. 2020), facilitando el proceso de selección de fármacos por parte de los clínicos veterinarios para el tratamiento de CTVT. Nuestros resultados demostraron que todos los fármacos probados redujeron significativamente la viabilidad celular de la línea celular CTVT de una manera dependiente de la dosis, lo que sugiere que cada uno de estos fármacos se puede utilizar como monoterapia en el tratamiento de CTVT. Sin embargo, estos datos deben corroborarse *in vivo* y usarse con cautela en los casos en que no se disponga de vincristina.

La efectividad de cada fármaco ha sido reportada a nivel clínico en el tratamiento de varios tipos de cáncer además del CTVT (Sun C, *et al* 2006; Choi S-I, *et al* 2021; Çizmeçi S, *et al* 2012; Dominguez PA, *et al* 2009; Gerardi DG, *et al* 2014; Harttrampf AC, *et al* 2021; Khan ZA, *et al* 2012; Sethy C, Kundu CN.2021; Treggiari E, *et al* 2017) Hasta ahora, no hubo informes sobre el uso de 5-FU, metotrexato, gemcitabina, temozolomida, panobinostat y toceranib en el tratamiento de CTVT.

Estos fármacos pueden utilizarse en el tratamiento de la TVCT debido a diversos mecanismos de acción: El 5-fluorouracilo (5-FU) es un fármaco antimetabólico que inhibe la timidilato sintetasa y la incorporación de sus metabolitos en el ARN y el ADN (Zhou B, *et al* 2018). El metotrexato es un antimetabolito utilizado en el tratamiento del cáncer que, al inhibir la enzima dihidrofolato reductasa, inhibe la síntesis de las purinas y pirimidinas necesarias para la síntesis de ácidos nucleicos (Sarder A, *et al* 2015). La gemcitabina es un análogo de citidina, donde dos átomos de flúor han reemplazado al hidroxilo en la ribosa. Es un profármaco y, una vez transportado a la célula, debe ser fosforilado por la desoxicitidina quinasa a una forma activa. Tanto el difosfato de gemcitabina como el trifosfato de gemcitabina inhiben los procesos necesarios para la síntesis de ADN. Después de la incorporación del nucleótido de gemcitabina en el extremo de la cadena de ADN que se alarga, se agrega un

desoxinucleótido más y, posteriormente, el ADN polimerasas no pueden continuar (Ciccolini J, *et al* 2016).

La temozolomida es un agente alquilante monofuncional que induce daño citotóxico a través de la creación de aductos de metilo en la posición O6 en la base guanina del ADN. Cuando las enzimas reparadoras de errores de emparejamiento del ADN intentan extirpar el nucleótido modificado, generan roturas de cadena simple y doble en el ADN que activan las vías apoptóticas si no hay más reparación disponible (Chien CH, *et al* 2021; Singh A, *et al* 2016; Pawlak A, *et al* 2017; Zhang J, *et al.* (2012).

Panobinostat es un agente anticancerígeno que actúa como histona desacetilasa inhibiendo el crecimiento, la proliferación y la diferenciación de las células tumorales, lo que en última instancia conduce a la detención del ciclo celular. Como la acetilación de histonas es una función fundamental de panobinostat, media su efecto biológico a través de la regulación de la expresión génica a través de la hiperacetilación directa de histonas y la acetilación de proteínas no histonas (Singh A, *et al* 2016). El fosfato de toceranib inhibe los receptores de tirosina quinasa tanto normales como mutados mediante la inhibición competitiva de la unión del trifosfato de adenosina, que es necesaria para la fosforilación y la señalización posterior. Los objetivos de toceranib son elementos de la familia de cinasas divididas, como la tirosina cinasa-3 similar a FMS, KIT, el receptor 2 del factor de crecimiento endotelial vascular y el receptor β del factor de crecimiento derivado de plaquetas (Choi S-I, *et al* 2021). Estos medicamentos ofrecen diferentes opciones para los mecanismos de muerte de las células cancerosas en diferentes niveles moleculares.

Por otro lado, gemcitabina, toceranib y metotrexato fueron los fármacos que mostraron una mayor inhibición de la capacidad invasiva de la TVCT. Los fármacos con la propiedad de inhibir la capacidad invasiva están asociados al proceso de motilidad celular o metástasis y son útiles en el tratamiento del cáncer (Ritch SJ, *et al* 2019). Todos los quimioterapéuticos evaluados disminuyeron la formación de colonias, pero doxorubicina, panobinostat, gemcitabina, metotrexato y cisplatino la inhibieron por completo; y la ciclofosfamida y el 5-fluorouracilo no tienen la capacidad de inhibir la formación de colonias de CTVT. Estos resultados son relevantes porque estos fármacos ofrecen la posibilidad de luchar contra las células madre de CTVT que pueden generar clones de cáncer diferenciados, induciendo recurrencia o resistencia al tratamiento, lo que representa una complicación en el desarrollo de terapias efectivas (Esquer H, *et al* 2020; Fedr R, *et al* 2013). Cuando analizamos el efecto de la

quimioterapia en la progresión del ciclo celular en células CTVT, determinamos que diferentes fármacos actúan en la fase subG1 (vincristina, panobinostat, gemcitabina, toceranib, ciclofosfamida y metotrexato). Se sabe que fármacos que actúan sobre diferentes fases del ciclo celular controlan la progresión de las células cancerosas, capacidad importante dado que algunas neoplasias expresan mutaciones en genes que participan en la regulación del ciclo celular (Murad H, *et al* 2016).

La administración secuencial de fármacos puede maximizar los efectos terapéuticos sin aumentar la toxicidad clínica (Todd JE, *et al* 2021; Shah MA, *et al* 2000). Para aclarar el programa óptimo de combinaciones de vincristina y fármacos probados en este estudio, analizamos los efectos de la exposición simultánea y secuencial a estas combinaciones. Encontramos que solo la combinación con vincristina más toceranib posee un efecto sinérgico que aumenta la quimio sensibilidad de la línea celular CTVT; las demás combinaciones ensayadas no tienen un resultado citotóxico óptimo para recomendarlo, correlacionándose con estudios clínicos donde el estándar de oro es el tratamiento con vincristina y su uso combinatorio con otros quimioterapéuticos (Todd JE, *et al* 2021). La combinación de fármacos con capacidad de ejercer actividad antitumoral a través de diferentes mecanismos podría mejorar los resultados clínicos del paciente con cáncer.

El uso clínico de vincristina-toceranib como terapia combinada afectará a los perros portadores de CTVT de la misma manera que la prueba *in vitro*. Esta combinación se ha utilizado con un análogo de vincristina (vinblastina) en el tratamiento de tumores de mastocitos (Todd JE, *et al* 2021). Vincristina es eficaz para el tratamiento de CTVT, aunque sus mecanismos de acción siguen bajo investigación. La actividad de la vincristina se ha relacionado con la inhibición de la formación de micro túbulos en el huso mitótico, lo que da como resultado una detención de las células en división en la etapa de metafase. Aumento de la apoptosis, tasas de unión a lectina y disminución de la expresión de los factores antiapoptóticos, lo que causa en parte la regresión de CTVT (Özyigit MÖ. *et al* 2014).

Creemos que la combinación de vincristina y toceranib aumenta la actividad antitumoral porque toceranib inhibe los receptores de tirosina quinasa normales y mutados que son necesarios para la fosforilación y la señalización posterior, mata las células tumorales y disminuye el suministro de sangre al tumor debido a su efecto antiangiogénico (Choi S-I, *et al* 2021).

Algunas limitaciones de este estudio son que no incluimos objetivos in vivo que demuestren la eficacia de cada fármaco y combinación, y la falta de una línea celular de cáncer CTVT resistente a la vincristina para realizar pruebas de sensibilidad a los fármacos y determinar la efectividad de los fármacos y sus combinaciones, Además, la falta de información sobre dianas moleculares de CTVT a nivel in sílico dificulta la adecuación del fármaco. Además, este estudio incluyó solo algunas de las quimioterapias utilizadas en el tratamiento del cáncer, y es necesario continuar probando con más quimioterapias, para ofrecer más posibilidades para el tratamiento de CTVT.

9.- CONCLUSIÓN

En conclusión, nuestros resultados confirman el uso de vincristina como tratamiento estándar de oro del TVCT en monoterapia y sugieren el uso de tratamiento combinatorio y secuencial con toceranib para aumentar su eficacia antitumoral. Además, este estudio abre la posibilidad del uso de gemcitabina o metotrexato como monoterapia debido a la quimio sensibilidad similar a la vincristina demostrada. Sin embargo, estas opciones de tratamiento deben ser corroboradas a nivel clínico. Además, es importante considerar la determinación de dianas moleculares y vías de señalización necesarias en el desarrollo de líneas celulares CTVT para una mejor comprensión en el tratamiento de esta enfermedad. Los resultados obtenidos pueden, por lo tanto, adoptarse en entornos clínico con una influencia potencialmente significativa en el tratamiento de CTVT.

10.- PERSPECTIVAS

Este trabajo puede sentar las bases para posteriores trabajos a nivel preclínico con la finalidad de desarrollar y establecer protocolos clínicos que puedan ser aplicados e instituidos en la terapéutica veterinaria, así como en la humana, incluso, gracias a los resultados obtenidos en este estudio, se han propuesto ya una serie de trabajos, los cuales, no solo ratificarían lo encontrado en nuestros experimentos , sino que podrían ser utilizados de manera inmediata para diseñar estrategias terapéuticas e incluso modificar las ya existentes desde una perspectiva confiable no tradicional y basada en estudios que puedan ser predictivos y que de manera muy real garanticen los mejores resultados con los menores efectos adversos posibles para los pacientes.

11.- BIBLIOGRAFIA

Jones, T. C.; Hunt, R. D.; King, N. W. 1997. *Veterinary pathology*. Baltimore: Williams & Wilkins,

Strakova, A.; Murchison, E.P. 2015. The cancer which survived: insights from the genome of an 11,000-year-old cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* 2015, 30:49–55 Elsevier Ltd.

Bridgett M., Ostrander EA, 2006. The singular history of a canine transmissible tumor *CELL*; 146:445-447

Baez-Ortega et al. 2 August 2019: Somatic evolution and global expansion of an ancient transmissible cancer lineage. *Science*, vol. 365, no. 6452.

Delabere Blaine. *A domestic treatise of the disease of dogs*. 1810. 4th edition London

Novinsky, M.: 0 privivanii rakovikh novoobrazovanii.1876. [On the inoculation of cancerous neoplasms.] *hled. Festnih* 16: 289-290.

Harmelin A, Pinthus JH, Friedmanni MD, KaufmanK, Brenner O.2002.

Lack of MHC expression and retention of ultrastructural characteristics by xenograft transmissible venereal tumor cells in SCID mice; 86:4245-249

Adams, E.W., Carter, L.P. and Sapp, W.J., 1968. Growth and maintenance of the canine venereal tumor in continuous culture. *Cancer Research*, 28, 753-757

Gilman A, Phillips FS, 1946. The Biological Actions and Therapeutic Applications of the B-Chloroethyl Amines and Sulfides SCIENCE 5 Apr 1946 Vol 103, Issue 2675 pp. 409-436 DOI:10.1126/science.103.2675.409

Min Chiu Li, M.D.†, Roy Hertz, M.D.‡, and Delbert M. Bergenstal, 1958. Therapy of Choriocarcinoma and Related Trophoblastic Tumors with Folic Acid and Purine Antagonists New England Journal of Medicine

Xiaoxiong Xiong, Meihua Sui, Weimin Fan & Andrew S. Kraft. 2007. Cell-cycle dependent antagonistic interactions between paclitaxel and carboplatin in combination therapy Pages 1067-1073 | Published online

Benedi J., Gomez del Rio M.A. 2006. Fármacos antineoplásicos (I) Farmacia Profesional. Vol. 20. Num.2 pp 60-65 elsevier ISSN: 0213-9324

Lorenzo P, Moreno A, Leza JC, Lizasoain I, Moro MA. Velázquez. Farmacología Básica y Clínica. Madrid: Editorial Médica Panamericana; 2005. PP. 980-981

Ribeiro S., Correia P. 2022. Antimetabolitos: Estudo das propriedades farmacológicas. Suplemento nº 3, 216.

Barnes KR, Lippard SJ. Cisplatin and related anticancer drugs: recent advances and insights. Met Ions Biol Syst. 2004;42:143-77.

Stanton RA, Gernert KM, Nettles JH, Aneja R. 2011. Drugs that target dynamic microtubules: A new molecular perspective. Med Res Rev [Internet]. 2011 [citado el 9 de mayo de 2018]; 31(3):443-81.

Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3155728/>

Jordan MA, Wilson L. 2004. Microtubules as a target for anticancer drugs. *Nat Rev Cancer* [Internet]. 2004 [citado el 7 de mayo de 2018]; 4(4):253-65. Disponible en: <https://www.researchgate.net/publication/8644554>

Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, 2009. et al Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. *Science* ;834–40.

Jacob P. Laubach; Philippe Moreau; Jesús F. San-Miguel; Paul G. Richardson

Panobinostat for the Treatment of Multiple Myeloma 2009 *Clin Cancer Res* (2015) 21 (21): 4767–4773. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-0530> Online ISSN: 1557-3265 Print ISSN: 1078-0432

Sanches Gomez O. 2013. Estudio Clínico de la efectividad de los ITKS en el tratamiento de tumores matocitomas y no matocitomas

Proyecto Fin de Máster (Curso 2012/2013) Facultad de Veterinaria, Universidad de Zaragoza

Ramón-López A., Escudero-Ortiz B.V., Duart-Duarta M.J., Pérez-Ruixoc J.J., Valenzuela B. 2012. *Farmacia hospitalaria* Vol. 36. Núm. 4. pp 194-206 DOI: 10.1016/j.farma.2011.04.002 ISSN: 1130-6343

Mini*E., S. Nobili, B. Caciagli, I. Landini & T. Mazzei. 2006.

Cellular pharmacology of gemcitabine *Annals of Oncology* 17

(Supplement 5): v7–v12, symposium article doi:10.1093/annonc/mdj941

Stockmann D, Ferrari HF, Andrade AL, Lopes RA, Cardoso TC, Luvizotto MCR. 2011. Canine transmissible venereal tumors aspects related to programmed cell death. *Braz J Vet Pathol.* 4:67–75.

Zayas YR, Molina MA, Guerra RT, Padilla CR. 2009. Evaluation of a canine transmissible venereal tumor cell line with tumor immunity capacity but without tumorigenic property. *J Vet Res.* 63:225–33. doi: 10.2478/jvetres-2019-0024

Barboza AD, Algibay NR, Caorsi CM, Villardino NB, Oribe CA, Brandl S, et al. 2021. Lomustine therapy for vincristine-resistant canine transmissible venereal tumor: a case report. *Brazilian J Vet Res.* 43:1320. doi: 10.29374/25272179.bjvm001320

Unger FT, Witte I, David KA. 2014. Prediction of individual response to anticancer therapy: historical and future perspectives. *Cell Mol Life Sci.* 72:729–57. doi: 10.1007/s00018-014-1772-3

Lu DY, Lu TR. 2020. Drug sensitivity testing, a unique drug selection strategy. *Adv Biomarker Sci Technol.* 2:59–66. doi: 10.1016/j.abst.2020.11.001

Korec DI, Louke DS, Breitbach JT, Geisler JA, Husbands BD, Fenger JM. 2021.

Characterization of receptor tyrosine kinase activation and biological activity of toceranib phosphate in canine urothelial carcinoma cell lines. *BMC Vet Res.*

17:320. doi: 10.1186/s12917-021-03027-0

Moore D. 2016. Panobinostat (Farydak): a novel option for the treatment of relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma. *P T.* 41:296–300.

Zachari MA, Chondrou PS, Pouliliou SE, Mitrakas AG, Abatzoglou I, Zois CE, et al. 2013. Evaluation of the alamar blue assay for adherent cell irradiation experiments. *Dose Response.* 12:246–58. doi: 10.2203/dose-response.13-024.Koukourakis

ab. AAT Bioquest, Inc. Quest Graph™ ED50 Calculator. (2022). AAT Bioquest. Available online at: <https://www.aatbio.com/tools/ed50-calculator> (accessed April 01, 2022).

Chou T, Martin N. 2005. CompuSyn for drug combinations: PC software and user's guide: a computer program for quantitation of synergism and antagonism in drug combinations, and the determination of IC50 and ED50 and LD50 values.

CompuSyn, Paramus, NJ.

Chou T-C. 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res.* 70:440–6. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1947

Chou T-C. 2006. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. *Pharmacol Rev.* 58:621–81. doi: 10.1124/pr.58.3.10

Venter C, Niesler CU. 2019. Rapid quantification of cellular proliferation and migration using ImageJ. *Biotechniques.* 66:99–102. doi: 10.2144/btn-2018-0132

Wang X, Decker CC, Zechner L, Krstin S, Wink M. 2019. In vitro wound healing of tumor cells: Inhibition of cell migration by selected cytotoxic alkaloids. *BMC*

Pharmacol Toxicol. 20:4. doi: 10.1186/s40360-018-0284-4

Sun C, Zhou L, Gou M, Shi S, Li T, Lang J. 2016. Improved antitumor activity and reduced myocardial toxicity of doxorubicin encapsulated in MPEG-PCL nanoparticles. *Oncol Rep.* 35:3600–6. doi: 10.3892/or.2016.4748

Choi S-I, Nam Y-L, Kim J-K, Park H-J, Song K-H, Seo KW. 2016. Retrospective evaluation of Toceranib Phosphate (palladia) for treatment of different tumor types in 31 dogs. *Korean J Vet Res.* 61: e10. doi: 10.14405/kjvr.2021.61.e10

Çizmeçi S, Köse A, Dinc D. 2012. Clinical efficiency of Doxorubicin and Cisplatin in treatment of transmissible venereal tumor of bitches. *Revue de Médecine Vétérinaire*. 163:516–21.

Dominguez PA, Dervisis NG, Cadile CD, Sarbu L, Kitchell BE. 2009. Combined gemcitabine and carboplatin therapy for carcinomas in dogs. *J Vet Res Int Med*. 23:130–7. doi: 10.1111/j.1939-1676.2008.0248.x

Gerardi DG, Tinucci-Costa M, Silveira AC, Moro JV. 2014. Expression of Pglycoprotein, multidrug resistance-associated protein, glutathione-S-transferase pi and p53 in canine transmissible venereal tumor. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 34:71–8. doi: 10.1590/S0100-736X2014000100012

Harttrampf AC, da Costa ME, Renoult A, Daudigeos-Dubus E, Georger B. 2021. Histone deacetylase inhibitor Panobinostat induces antitumor activity in epithelioid sarcoma and rhabdoid tumor by growth factor receptor modulation. *BMC Cancer*. 21:08579-w doi: 10.1186/s12885-021-08579-w

Khan ZA, Tripathi R, Mishra B. 2012. Methotrexate: a detailed review on drug delivery and clinical aspects. *Expert Opin Drug Deliv*. 9:151–69. doi: 10.1517/17425247.2012.642362

Sethy C, Kundu CN. 2021. 5-Fluorouracil (5-fu) resistance and the new strategy to enhance the sensitivity against cancer: Implication of DNA repair inhibition. *Biomed Pharmacother*. 137:111285. doi: 10.1016/j.biopha.2021.111285

Treggiari E, Elliott JW, Baines SJ, Blackwood L. 2017. Temozolomide alone or in combination with doxorubicin as a rescue agent in 37 cases of canine multicentric lymphoma. *Vet Comp Oncol*. 16:194–201. doi: 10.1111/vco.12335

Zhou B, Jin Y, Zhang D, Lin D. 2018. 5-Fluorouracil may enrich cancer stem cells in canine mammary tumor cells in vitro. *Oncol Lett.* 15:7987– 92. doi: 10.3892/ol.2018.8267

Sarder A, Rabbani MdG, Chowdhury AS, Sobhani M. 2015. Molecular basis of drug interactions of methotrexate, cyclophosphamide and 5- fluorouracil as chemotherapeutic. *Agents Cancer J Trans Med.* 2:1–11. doi: 10.7603/s40730-0150005-1

Ciccolini J, Serdjebi C, Peters GJ, Giovannetti E. 2016. Pharmacokinetics and pharmacogenetics of Gemcitabine as mainstay in adult and pediatric oncology: an EORTC-PAMM perspective. *Cancer Chemotherapy Pharmacol.* 78:1– 12. doi: 10.1007/s00280-016-3003-0

Chien, CH, Hsueh WT, Chuang JY, Chang KY. 2021. Dissecting the mechanism of temozolomide resistance and its association with the regulatory roles of intracellular reactive oxygen species in glioblastoma. *J Biomed Sci.* 28:18. doi: 10.1186/s12929021-00717-7

Singh A, Patel VK, Jain DK, Patel P, Rajak H. 2016. Panobinostat as pan-deacetylase inhibitor for the treatment of pancreatic cancer: recent progress and future prospects. *Oncol Ther.* 4:73–89. doi: 10.1007/s40487-016-0023-1

Pawlak A, Kutkowska J, Obminska-Mrukowicz B, Rapak A. 2017. Methotrexate induces high level of apoptosis in canine lymphoma/leukemia cell lines. *Res Vet Sci.* 114:518–23. doi: 10.1016/j.rvsc.2017.09.026

Zhang J, Stevens FG, Bradshaw T. 2012. Temozolomide: Mechanisms of action, repair, and resistance. *Curr Mol Pharmacol.* 5:102–14. doi: 10.2174/1874467211205010102

Ritch SJ, Brandhagen BAN, Goyeneche AA, Telleria CM. 2019. Advanced assessment of migration and invasion of cancer cells in response to mifepristone therapy using double fluorescence cytochemical labeling. *BMC Cancer*. 19:3. doi: 10.1186/s12885019-5587-3

Esquer H, Zhou Q, Abraham AD, LaBarbera DV. 2020. Advanced high contentscreening applications of clonogenicity in cancer. *SLAS Discov*. 25:734–43. doi: 10.1177/2472555220926921

Fedr R, Pernicová Z, Slabáková E, Straková N, Bouchal J, Grepl M, et al. 2013. Automatic cell cloning assay for determining the clonogenic capacity of cancer and cancer stem-like cells. *Cytometry Part A*. 83:472–82. doi: 10.1002/cyto.a.22273

Murad H, Hawat M, Ekhtiar A, AlJapawe A, Abbas A, Darwish H, et al. 2016. Induction of G1-phase cell cycle arrest and apoptosis pathway in MDA-MB-231 human breast cancer cells by sulfated polysaccharide extracted from *laurencia papillosa*. *Cancer Cell Int*. 16:4 doi: 10.1186/s12935-016-0315-4

Todd JE, Nguyen SM, White J, Langova V, Thomas PM, Tzannes S. 2021. Combination vinblastine and palladia for high-grade and metastatic mast cell tumors in dogs. *Can Vet J*. 62:1335–40.

Shah MA, Schwartz GK. 2000. The relevance of drug sequence in combination chemotherapy. *Drug Res Updates*. 3:335–56. doi: 10.1054/drup.2000.0165

Özyigit MÖ, Nak D, Ak, sit H, Öztürkoglu IS, Sim, sek G, Uzabaci E, et al. 2014. The effects of vincristine sulfate on expression of galectin-3, bcl-2, and carbohydrate structures specific for eel, GSL-1, and RCA-1 lectins in bitches with naturally occurring canine transmissible venereal tumor. *Turkish J Vet Animal Sci*. 38:331–8. doi: 10.3906/vet-1311-4

