



UNIVERSIDAD CENTRAL "MARTA ABREU" DE LAS VILLAS
VERITATE SOLA NOBIS IMPONETUR VIRILISTOGA. 1948

FACULTAD DE QUIMICA Y FARMACIA
DEPARTAMENTO DE FARMACIA

Trabajo de Diploma

Título: *La relación de causalidad del Dermofural (G1) y procesos oncogénicos en pacientes sometidos a ensayos clínicos (I, y II).*

Diplomante: *Malvern Mtemeli.*

Tutor: *Dr.sc: Jorge A. Pérez Donato.*

Dr.: Enrique Silveira Prado.

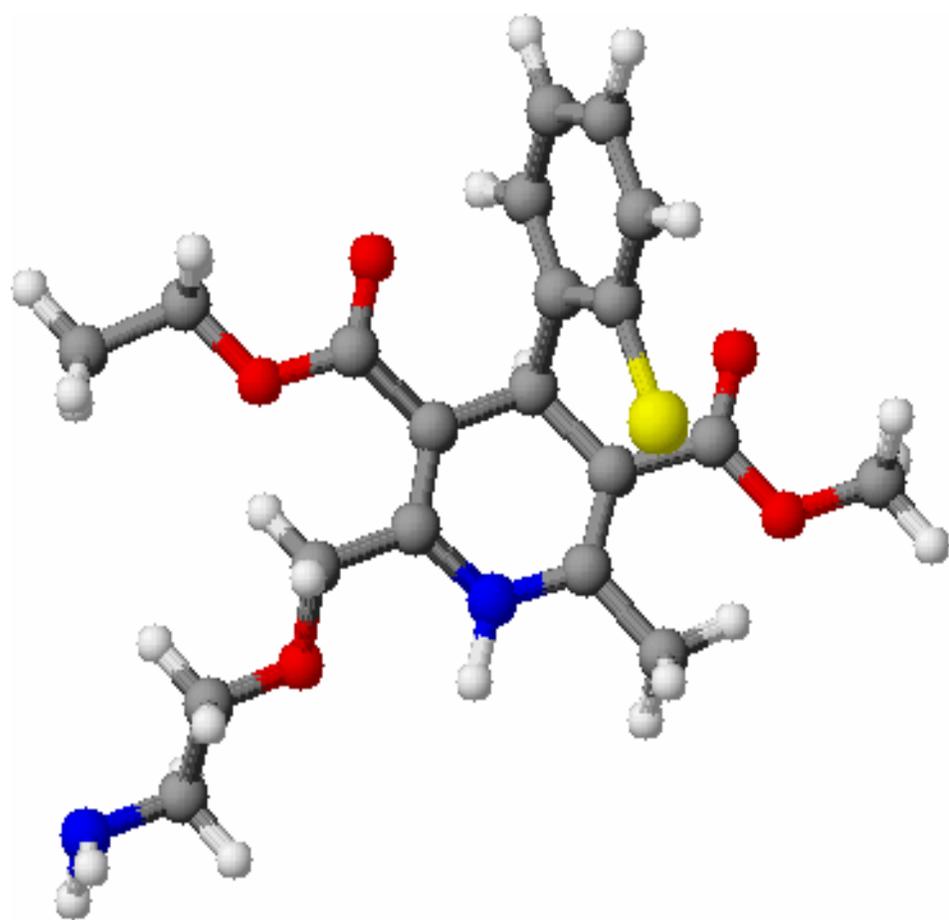
Dra.: Estela Fernández Lugo.

*“Año 49 de la Revolución”
Santa Clara
Curso 2006-2007*

CON SU ENTRAÑABLE TRANSPARENCIA

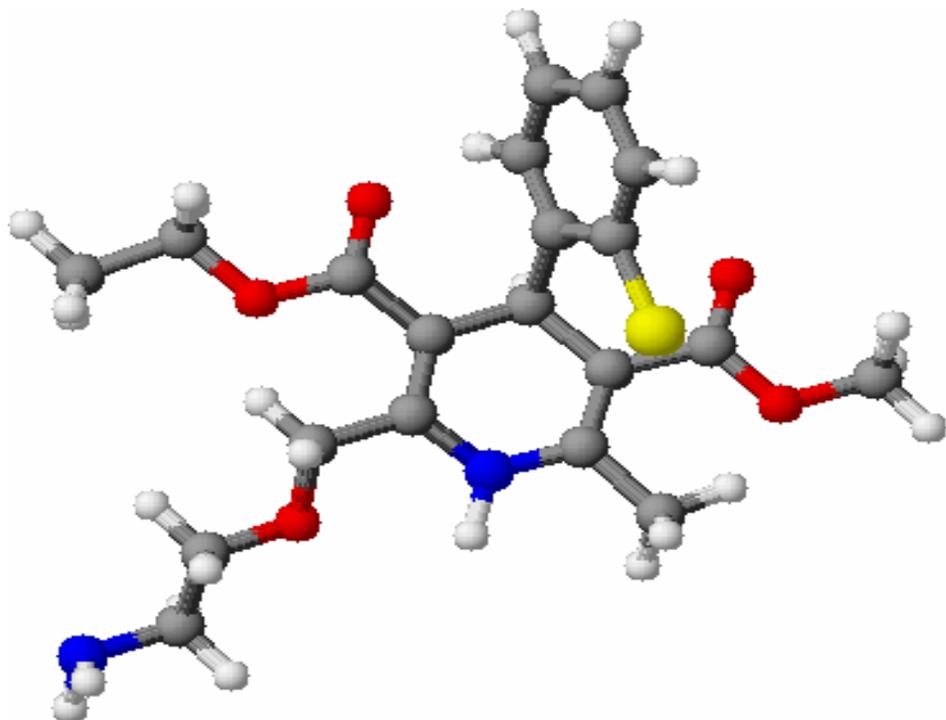


DEDICATORIA



Dedico este trabajo a Dios que me ha guardado y me ha dado salud durante mi estancia en Cuba de los seis años y en segundo lugar a mi familia que nunca dejaron de apoyarme a pesar de la distancia.

AGRADECIMIENTOS



Quiero agradecer a todo mis querido amigos en especial mis hermanos de la iglesia, todo mis queridos compañeros de lucha y del aula, profesores y mis compañeros de mi país. De verdad les debo mucho, gracias por su compañerismo, cariño y amistad. No los voy a olvidar.

Un agradecimiento especial a unos queridos Profesores y Amigos Luís Torres, muchas gracias por todo, y al Prof. Tony Donato Pérez, Enrique y compañía por ser buenos Tutores de mi trabajo de diploma. *Muchas Gracias!*

El éxito lo comparto con todos ustedes!

SALUD!!!

TABLA DE CONTEIDO

Resumen	
Introducción	
Revision Bibliografica	
2.1 Conceptos Básicos y Definiciones.....	4
2.2 Orígenes de Cáncer.....	7
2.2.1 Mecanismos moleculares de defensa.....	7
2.2.2 Etapas de la Carcinogénesis.....	8
2.2.3 Carcinógenos no genotóxicos o epigenéticos.....	13
2.3 Clasificación de los carcinógenos.....	14
2.3.1 Clasificación de las sustancias químicas cancerígenas (IARC).....	14
2.3.2 Los Agentes Genotóxicos y el Daño Genético.....	16
2.3.3 Metabolismo de los agentes genotóxicos.....	16
2.3.4 La inhibición del metabolismo.....	18
2.3.5 Interacciones con el ADN.....	18
2.3.6 Mecanismos de reparación del ADN.....	19
2.4.1 Determinación de carcinógenos genotóxicos.....	19
2.4.2 Bioensayo in vivo. Determinación de carcinogenicidad en animales.....	22
2.5 Alternativas sin animales.....	22
2.5.1 SARs y QSARs.....	22
2.5.2 Ensayos in vitro.....	23
2.5.3 Ensayos de transformación celular.....	23
2.5.4 Ensayos de transformación celular en roedores.....	24
2.5.5 El sistema de transformación basado en células humanas.....	25
2.6. Aspectos generales del Dermofural (G-1).....	26
2.6.1 Calidad De Dermofural.....	26
2.6.2 Aspectos Farmacológicas.....	27
2.6.3 Aspectos Toxicologicas.....	30
2.6.3.1 Absorción dérmica.....	30
2.6.3.2 Toxicidad aguda.....	30
2.6.3.3 Toxicidad subcrónica.....	31
2.6.3.4 Toxicidad crónica.....	31
2.6.3.5 Genotoxicidad.....	32
2.6.3.6 Sensibilización en piel.....	33
2.6.3.7 Irritación dérmica.....	33
2.6.3.8 Irritación oftálmica.....	33

2.6.3.9 Eficacia.....	33
3Materiales y métodos	
3.1 Método para la recopilación de información de la incidencia de cáncer en la provincia de Villa Clara.....	35
3.2.1 Criterios de inclusión.....	35
3.2.2Criterios de exclusión.....	35
3.2.3 Criterios de salida.....	35
3.3 Diseño Del estudio.....	36
3.4 Recolección y Manejo de los Datos.....	37
3.5Medidas para garantizar la calidad de las encuestas.....	40
4 Resultados y Discusión.....	41
5. Conclusiones.....	49
6 Recomendaciones	50
7Referencias Bibliograficas.....	51
8Anexos.....	58

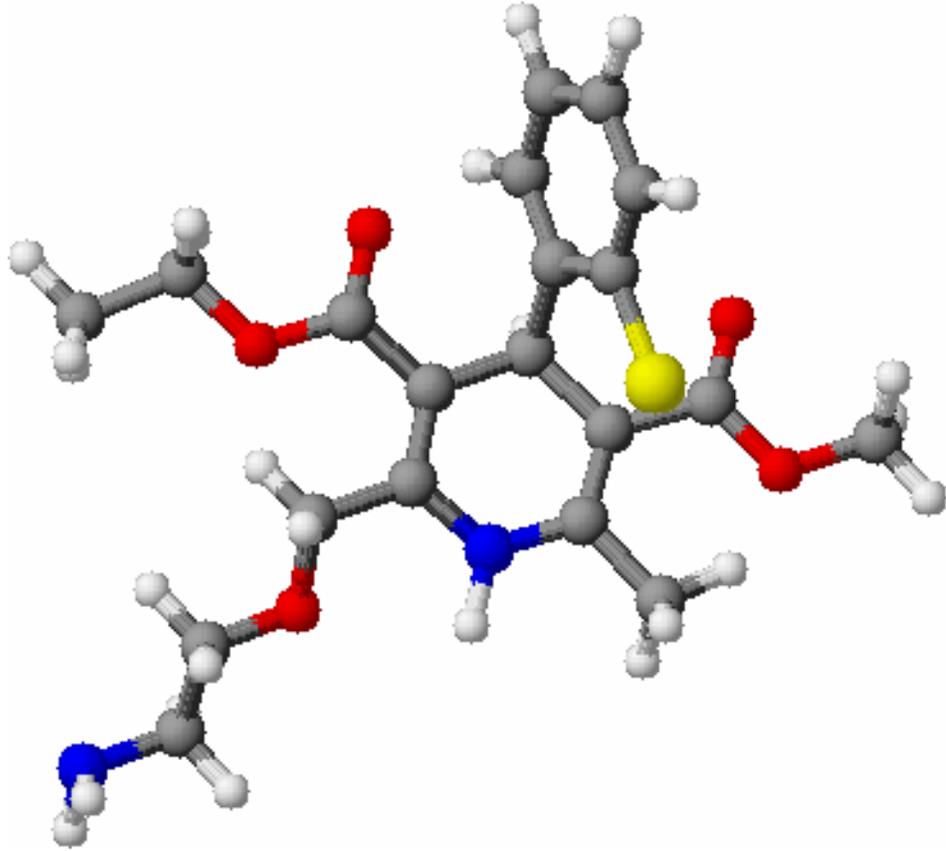
Resumen

Se desarrolla un estudio retrospectivo de corte transversal con el objetivo de corroborar la posible implicación oncogénica de la molécula de G1 en pacientes sometidos a estudios clínicos fase I y II en los años 1991-92 en la provincia de Villa Clara (VC). La muestra potencial para el estudio es de 127 pacientes, los cuales fueron tratados con el producto de uso tópico Dermofural, que contiene el ingrediente activo G1. Dicho medicamento resultó ser reanalizado en el año 2006 por el órgano regulador cubano, el cual manifestó su aprobación y conformidad en realizar el presente trabajo de diploma, el cual sería un elemento más a considerar en cuanto a la seguridad del mismo.

Se efectúa una recopilación de datos de incidencia de cáncer en la provincia VC, desglosado además por municipio, obteniéndose el indicador de tasa por 10^5 habitantes, dato que sería utilizado como criterio comparativo, se establece que la tasa bruta anual estimada por 10^5 habitantes osciló entre los rangos 410,5 y 467,8 por 10^5 para el período 1999-2004. Además se confeccionó una encuesta que respondiera a las exigencias antes referidas, la cual fue certificada a todas las instancias establecidas por el Ministerio de Salud Pública.

De la muestra potencial solo se pudieron encuestar 82(64,6%) pacientes, no localizados por diferentes razones 45 (35,4%), de los cuales solo 10 (7,9%) tienen probabilidad de ser localizados y encuestados en el futuro. En el estudio se muestra los resultados de edad, sexo, localización anatómica de la aplicación, concentración del preparado aplicado, duración de la aplicación, así como el efecto de evidencia de acción oncogénica para los 82 pacientes encuestados.

Se arriba a la conclusión de que no se reportaron evidencias de relación causal entre el empleo del Dermofural y la aparición de procesos oncogénico en la muestra.



RESULTADOS Y

DISCUSION

Dos de las primeras observaciones realizadas acerca de la relación entre exposición de las personas a ciertos agentes químicos y aumento de la incidencia de cáncer, fueron realizadas en los años 1761 y 1775, independientemente. Estas observaciones hacían referencia al cáncer nasal (debido a sustancias inhaladas) y cáncer de escroto (en los deshollinadores). En el año 1918 se demostró experimentalmente esta relación en animales. Finalmente, en la década de 1930-1940 se aisló un agente carcinogénico del alquitrán del carbón, el benzopireno, hidrocarburo aromático policíclico que resulta de la combustión incompleta de moléculas orgánicas. Hacia 1950 se describió una amplia variedad de agentes químicos de diversas estructuras que podían producir cáncer en animales. Se sugirió que estas sustancias requerían la activación metabólica a intermediarios electrofílicos reactivos que se unen covalentemente a centros nucleofílicos de proteínas, ARN o ADN. Desde entonces se han descrito muchos más carcinógenos que actúan de esta forma y producen mutaciones en células procarióticas y eucarióticas.

Hoy en día el cáncer es considerado como una de las enfermedades más fatal de las enfermedades crónicas, a nivel mundial actualmente está ubicado en el segundo lugar cuando se compara con las enfermedades cardiopatías. Por causa de cáncer, cada año se presentan más de seis millones de muertes por algún tipo de neoplasia maligna en el ámbito mundial. Asimismo, se estima que cerca de veinte millones de personas presentarán algún tipo de cáncer cada año, de las cuales cerca de nueve millones corresponderán a casos incidentes.

En Cuba el cáncer constituye un verdadero problema de salud por sus altos índices de morbilidad, su tendencia creciente en la tasa de incidencia, la tendencia estable en sus tasas de mortalidad y por ser la segunda causa de muerte en el país en casi todas las edades. En la provincia de Villa Clara sola en 1999 fueron reportados 2 567 casos de cáncer (0,30% de la población) y después de seis años la cifra de los casos reportados aumentó a 2 996 (0,36% de la población)

El cáncer puede originarse a partir de cualquier tipo de célula en cualquier tejido corporal, no es una enfermedad única sino un conjunto de enfermedades que se clasifican en función del tejido y célula de origen. Existen varios cientos de formas distintas, siendo tres los principales subtipos: los *sarcomas* proceden del tejido conectivo como huesos, cartílagos, nervios, vasos sanguíneos, músculos y tejido adiposo. Los *carcinomas* proceden de tejidos epiteliales como la piel o los epitelios que tapizan las cavidades y órganos corporales, y los tejidos glandulares de la mama y próstata. En el tercer subtipo se encuentran las *leucemias* y *linfomas* que incluyen los cánceres de los tejidos formadores de las células sanguíneas. Producen inflamación de los ganglios linfáticos, invasión del bazo y médula ósea, y sobreproducción de células blancas inmaduras. En el cuarto subtipo se encuentra en las células de Sistema Nervioso: neuroblastomas y gliomas.

Se consideran tumores agudos si son de aparición rápida y crónicos si aparecen gradualmente. El tumor epitelial se denomina también adenoma si es benigno y adenocarcinoma si es maligno.

Las modalidades principales para la prevención del cáncer incluyen cambios de hábitos como el tabaquismo, el consumo de alcohol, la dieta y actividad física, radiaciones solares, ionizantes, medicamentos, hábitos sexuales, traumatismo crónico entre otras, así como hacer el diagnóstico temprano de las neoplasias malignas en sus primeras etapas y lesiones premalignas, siguiendo los procedimientos indicados por la Organización Mundial de Salud.

Mientras en el mundo de investigación de cáncer se están buscando estudios alternativos que van a ahorrar cien de millones de dólares y millones de horas gastado en experimentos por el personal, así como millones de animales sacrificados, ya que sólo un número pequeño de miles de químicos industriales pasan al mercado y de éstos la mayoría aun tienen que pasar las pruebas de carcinogenicidad. Además las investigaciones realizadas han revelado que estas pruebas de carcinogenicidad en animales faltan mucha especificidad en cuanto a la identificación de los no carcinógenos así dudando su habilidad en el predecir del bioassay. También por las limitaciones científicas de muchos bioassays de carcinogenicidad y muchos obstáculos biológicos que se presentan causan que haya muchas dificultades en extrapolar datos que pudieran ser útiles en predecir si un químico es carcinogénico o no.

Entre los años 1991 y 1992 se desarrolló un Ensayo Clínico Fase II, multicéntrico, con el objetivo de evaluar la factibilidad del Dermofural, formulado en base hidrófila para el tratamiento de enfermedades infecciosas de la piel. Este formulado contiene como ingrediente farmacéutico activo el 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano, denominado G-1, el cual constituye un producto desarrollado por el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas (UCLV) a partir del furfural, materia prima derivada del bagazo de la caña de azúcar. Los resultados obtenidos permitieron que se autorizara en 1993 el desarrollo de un ensayo clínico Fase III, en cuatro unidades hospitalarias del país, con el objetivo de evaluar la eficacia en el tratamiento de varias enfermedades dermatológicas por bacterias y hongos dermatofitos.

A pesar de que se obtuvieron resultados satisfactorios de eficacia y seguridad comparable a los medicamentos controles, el Dermofural (G-1) no contaba con estudios preclínicos que demostraban de una forma concreta que no tenía ninguno vínculo a las posibles causas de Oncogénesis en pacientes que se lo había aplicado. Así el problema siendo para el investigador la creación de un estudio y confeccionamiento de una encuesta adecuada que nos permite establecer la relación del tratamiento con el Dermofural con los procesos oncogénicos en pacientes que se lo aplicaron.

Objetivo General:

Evaluar la posible relación entre la aplicación dérmica del ingrediente farmacéutico activo del Dermofural (G-1) y el desarrollo de procesos oncogénicos en los pacientes expuestos.

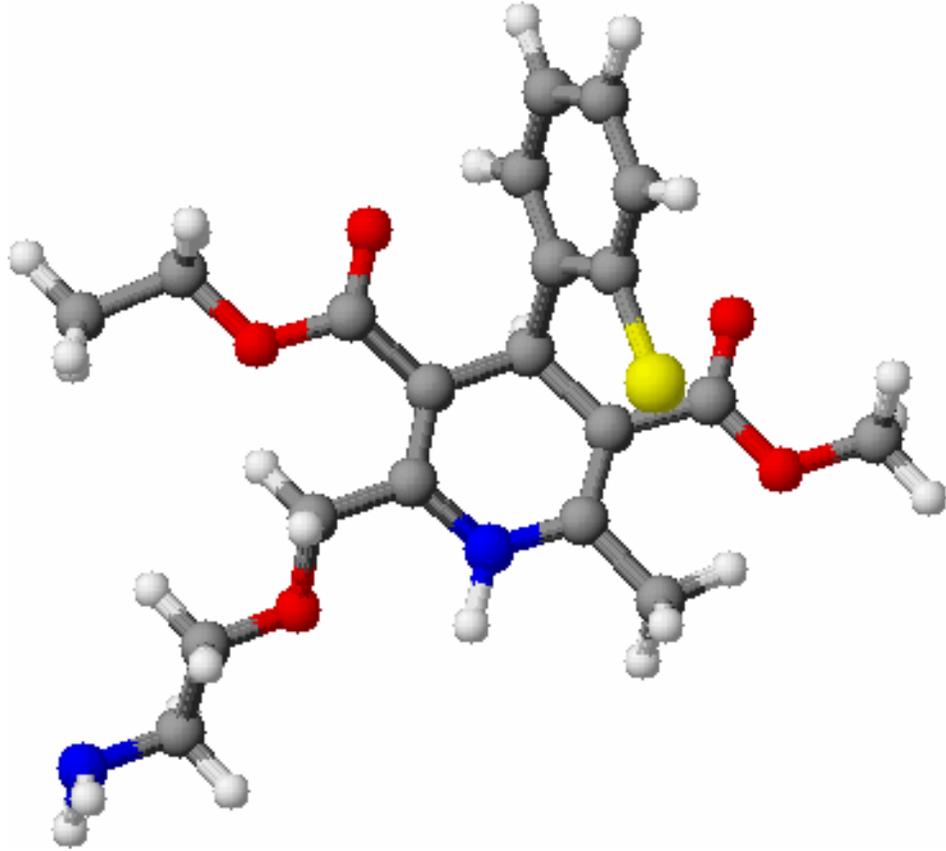
• Objetivos Específicos:

1. conocer cual es la incidencia de procesos neoplásicos de los habitantes de la provincia Villa Clara y sus municipios.
2. diseñar una encuesta que cumpla con los aspectos regulatorios exigidos que permita obtener la información mas exacta que esclarezca la relación de casualidad entre el uso de dermofural y el tratamiento de los pacientes tratado con el dermofural.
3. Distribuir los pacientes pesquisados según edad y sexo.
4. Identificar cuantos pacientes en estudio y pesquisados dieron resultados positivos según edad y sexo.
5. Utilizar técnicas estadísticas para discriminar la posible relación entre la aplicación de la molécula G-1 y desarrollo de procesos cancerígenos en los pacientes tratados, tomando además como referencia los datos históricos de la provincia

Hipótesis de trabajo

Dado que por las características del estudio se esta evaluando en primera instancia la seguridad terapéutica del producto respecto a su potencial carcinogénico, la hipótesis se baso en ello, expresada de esta manera:

El Dermofural se considera un producto relativamente seguro desde el punto de vista carcinogénico, siempre que no se registren pacientes con manifestaciones de procesos oncogénicos, y habiéndose demostrado lo anterior mediante una encuesta confeccionada al efecto, sobre la base de las historias clínicas y el examen físico dermatológico, que permite establecer la relación de causalidad respecto al tratamiento con el Dermofural hace más de 13 años.



REVISION

BIBLIOGRAFICA

2.1 Conceptos Básicos y Definiciones

Adenocarcinoma. Tumor maligno originado en el epitelio glandular o que forma estructuras de tipo glandular. t. rel. **Cáncer, adenoma.**

Adenoma. Tumor benigno desarrollado en el epitelio glandular o que forma estructuras de tipo glandular. t. rel. adenocarcinoma.

Benigno. 1. Enfermedad que no produce efectos nocivos persistentes. 2. Tumor que no invade otros tejidos (metástasis); aunque hay pérdida del control de crecimiento no se pierde el de situación. ant. **Maligno.**

Bioensayo. Procedimiento para evaluar la actividad biológica, la presencia o la cantidad de una sustancia (tóxico, toxina, hormona, antibiótico, etc.) mediante la medida de sus efectos sobre un organismo o cultivo celular en comparación con una preparación estándar apropiada. m. gral. **ensayo.**

Cáncer. Denominación de las tumoraciones malignas. Los **carcinomas** se originan en las células epiteliales; los **sarcomas** en el tejido conjuntivo. m. est. **carcinoma, epitelioma, sarcoma.** t. rel. **Carcinógeno, carcinogénesis, carcinogenicidad, neoplasia, tumor.**

Carcinogénesis. Proceso de inducción de neoplasias malignas por agentes físicos, químicos o biológicos. t. rel. **Carcinógeno, cancerígeno.**(WHO, 1989a)

Carcinogenicidad. Capacidad para inducir cáncer; según la evidencia que sobre ello se tenga de cada agente (sin atender a la potencia) se distingue:

Evidencia suficiente. Se ha establecido relación de entre la exposición al agente y la aparición de cáncer en humanos o en animales. 2. Evidencia limitada. Se ha observado asociación positiva entre exposición y cáncer, pero la evidencia no es suficiente por no poder descartarse con suficiente seguridad la participación de casualidad, o de factores que induzcan a confusión. 3. Evidencia inadecuada. Los estudios disponibles son de insuficiente calidad, consistencia o de escasa representatividad estadística para permitir una conclusión acerca de la existencia o ausencia de una relación de causalidad. 4. Falta de evidencia. Se dispone de estudios adecuados, que abarcan el rango de dosis a los que los seres humanos pueden estar expuestos y que se confirman mutuamente, que no demuestran la existencia de la inducción de cáncer a ningún nivel de exposición. La designación de «falta de carcinogenicidad» está inevitablemente limitada a los tipos de cáncer, dosis, tiempo de exposición y demás circunstancias consideradas en los estudios. Además, nunca puede excluirse la posibilidad de algún riesgo a los niveles de exposición estudiados.

Carcinógeno. Agente físico, químico o biológico capaz de incrementar la incidencia de neoplasias malignas. sin. **Cancerígeno.**

Carcinoma. Tumor maligno de células epiteliales. sin. **Epitelioma.** t. rel. **Sarcoma.**

Cocarcinógeno. Factor físico, químico o biológico que intensifica el efecto de un carcinógeno.

Dosis tóxica. Proporción de una sustancia que produce intoxicación sin que llegue a ser letal.

Ensayo de carcinogenicidad. Estudio a largo plazo (crónico) diseñado para cualquier posible efecto carcinógeno de una sustancia.

Ensayo de toxicidad. Estudio experimental de los efectos adversos de una sustancia sobre un organismo vivo, durante un tiempo determinado y condiciones definidas. t. rel.

Ensayos de toxicidad aguda, ensayos de toxicidad crónica, ensayos de carcinogenicidad.

Ensayo de toxicidad aguda. Estudio experimental para determinar los efectos adversos que pueden aparecer en un corto tiempo (usualmente 14 días) después de una dosis única de una sustancia, o de varias dosis administradas en 24 h. t. rel. **ensayo límite, dosis letal media (DL50).**

Ensayo de toxicidad crónica. Estudio en el cual se observan organismos a lo largo de una gran parte de su vida, durante y después de la exposición a la sustancia que se ensaya. sin. **ensayo a largo plazo.** ant. **Ensayo de toxicidad aguda** (IRIS 1986)

Epigenesis, epigenético. Cambios en un organismo a causa de alteraciones en la expresión de la información genética, sin alteración del genoma; se afecta el fenotipo pero no el genotipo. t. rel. **Mutación, fenotipo, tumor.**

Epitelioma. Tumor originado en el epitelio. m. est. **Carcinoma.**

Genotoxicidad. Capacidad para causar daño al material genético; el daño puede ser de tipo mutágeno o carcinógeno.

In vitro. Literalmente, en vidrio. Estudio de laboratorio realizado sobre células, tejidos u órganos aislados o con sistemas subcelulares o bioquímicos (enzimas). ant. **in vivo.**

In vivo. Estudio realizado sobre individuo vivo. ant. **in vitro**

Maligno. 1. Tendencia a empeorar progresivamente hasta la muerte, si no se trata. 2. En relación con el cáncer, células que crecen de forma incontrolada y con tendencia a invadir y destruir otros tejidos. t. rel. **cáncer, metástasis, tumor, hipertermia.** ant. **benigno.**

Mutación. Cualquier cambio heredable, relativamente estable, del material genético que puede ser una transformación química de un gen individual (mutación génica o puntual) que altera su función, o un reordenamiento, ganancia o pérdida de un cromosoma, visible al microscopio (mutación cromosómica). Las mutaciones pueden ocurrir en células germinales y transmitirse a la descendencia o en células somáticas y pasar de una célula a otra al dividirse éstas. t. rel. **Cromosoma, gen, clastogénesis, genotoxicidad.**

Mutagenicidad. Capacidad de un agente biológico, químico o físico para inducir cambios heredables (**mutaciones**).

Mutágeno. Cualquier sustancia que puede inducir cambios heredables (mutaciones) en el genotipo de una célula como consecuencia de alteraciones o de pérdida de genes o de cromosomas o de parte de los mismos.

Oncogen. Gen que puede causar transformación neoplásica de las células: los oncogenes son genes con ligeros cambios respecto a genes normales llamados proto-oncogenes.

Oncogénesis. Producción de tumores.

Procarcinógeno. Sustancia que ha de ser metabolizada para inducir tumores malignos.

Sarcoma. Tumor maligno que crece en el tejido conectivo y compuesto primariamente de células anaplásicas que simulan tejido de sostén.

Toxicidad. Capacidad para producir daño a un organismo vivo, en relación con la cantidad o dosis de sustancia administrada o absorbida, la vía de administración y su distribución en el tiempo (dosis única o repetidas), tipo y severidad del daño, tiempo necesario para producir éste, la naturaleza del organismo afectado y otras condiciones intervinientes.

Toxicidad aguda. Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos dentro de un corto plazo de tiempo (usualmente hasta 14 d) después de la administración de una dosis única (o una exposición dada) o tras dosis o exposiciones múltiples en 24 h. t. rel. **Efecto agudo.** ant. **Toxicidad crónica.**

Toxicidad crónica. Capacidad de una sustancia para producir efectos adversos consecuentes a una exposición prolongada; éstos pueden aparecer durante o después

de interrumpida la exposición. t. rel. **Ensayo de toxicidad crónica.** ant. **Toxicidad aguda** (IRIS, 1986)

Toxicidad subcrónica. 1. Efectos adversos ocasionados por administración o exposición repetida de una sustancia durante un corto período de tiempo, usualmente el 10% de la vida (al menos 90 días en animales). 2. Capacidad para producir efectos adversos tras exposición subcrónica. t. rel. **Ensayos de toxicidad subcrónica.**

Toxicidad subcrónica, ensayo de. Experimentación animal para estudiar los efectos producidos por una sustancia cuando se administra repetida o continuamente durante 90 días (WHO, 1979)

Tóxico. Cualquier agente químico o físico capaz de producir un efecto adverso para la salud. Todos los agentes físicos y químicos son tóxicos potenciales, ya que su acción depende de la dosis y de las circunstancias individuales y ambientales (Repetto, 1988)

Toxicología. Ciencia que estudia las sustancias químicas y los agentes físicos en cuanto que son capaces de producir alteraciones patológicas a los seres vivos, a la par que estudia los mecanismos de producción de tales alteraciones y los medios para contrarrestarlas, así como los procedimientos para detectar, identificar y determinar tales agentes y valorar su grado de toxicidad (Repetto, 1987)

Tumor. 1. Inflamación (bulto) o crecimiento anormal de un tejido, ya sea benigno o maligno. 2. Crecimiento anormal, en velocidad y estructura a partir del tejido normal, sin utilidad fisiológica. Sin. **Neoplasia.**

Xenobiótico. En sentido estricto, cualquier sustancia que interactúa con un organismo y que no es uno de sus componentes naturales. Sin. **Sustancia exógena, sustancia extraña.** (Repetto y Sans, 1995)

La Carcinogénesis como Proceso.

En la dieta diaria se ingieren diferentes tóxicos y mutágenos, los organismos han desarrollado un sistema de adaptación relacionado a su capacidad individual de detoxificación; Cabe señalar que existen dos mecanismos por los cuales los genes pueden alterarse:

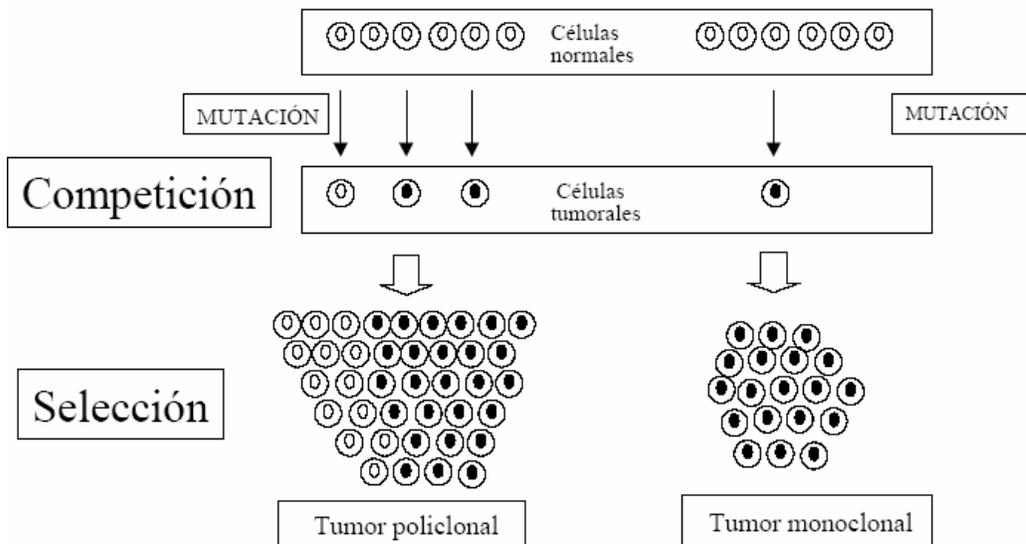
a) **GENÉTICO** donde se producen alteraciones estructurales del genoma por **cambios** en la disposición de los propios genes o de sus bases, como son **las mutaciones, translocaciones o deleciones**

b) **EPIGENÉTICO** en acciones moleculares por alteraciones de las enzimas o de los sustratos de las mismas, tal el caso de la metilación de las bases. Este mecanismo generalmente compromete simultáneamente los dos alelos y la **hipometilación** conduce a la mayor expresión de los genes, por lo tanto, una mayor cantidad de la enzima **metiltransferasa** que inhibe la metilación, puede conducir a la mayor expresión de **oncogenes.** Esta enzima se encuentra elevada en los tejidos tumorales.

2.2 ORIGEN DEL CANCER

El proceso de formación de un tumor a partir de una célula implica la acumulación sucesiva de alteraciones en los genes durante el periodo de años de crecimiento hasta que se hace aparente. Las células van adquiriendo alteraciones en su material genético que les proporciona ventaja en cuanto al crecimiento frente a las normales, van siendo seleccionadas y serán mayoritarias en el tumor. Así, el proceso de carcinogénesis tumoral se compone de alteración genética (mutación), competición y selección celular y tiene lugar durante años.

Figura 1.



2.2.1 Mecanismos Moleculares de Defensa

La célula expuesta a tantos factores que pueden dañar el genoma, cuenta sin embargo con mecanismos de defensa, de los cuáles depende la normal replicación celular. Consideraremos de interés los siguientes:

- La apoptosis, o muerte celular programada.
- Las proteínas anticiclina que “enlentecen” el ciclo celular y dan tiempo a actuar a los mecanismos reparadores del genoma.
- Las proteínas del complejo NER (nucleotide-excisión-repair) también denominadas MMR (mismatch repair genes) que localizan los sectores dañados, devanan la hélice, excluyen el segmento de ADN afectado e incorporan las secuencias correctas.

- El acortamiento fisiológico de los telómeros. Los telómeros, son secuencias del genoma que se encuentran en los extremos de los cromosomas y no se ha constatado hasta ahora, que codifiquen señales de proliferación. Impiden la pérdida y alteración espontánea de las secuencias de ADN y al mismo tiempo son marcadores del envejecimiento celular, puesto que se van acortando con cada división y llega un punto que ellos mismos inducen el "suicidio" de la célula. Cuando los telómeros son "repuestos" por acción de una telomerasa, no llega ese final conveniente para el porvenir del "clon", de ahí, que la presencia de telomerasas, constituya un signo desfavorable. Las telomerasas se sobreexpresan en los tejidos neoplásicos. Sin embargo, esta enzima puede estar aumentada también en células normales que requieren reproducción activa útil, como son las germinales y algunas hematopoyéticas.

2.2.2 Etapas de la Carcinogénesis

Cuando el clínico se encuentra ante un tumor, no observa más que un pequeño momento de la vida del proceso canceroso, el denominado periodo clínico. Este periodo, a su vez, puede ser subdividido en dos fases, una fase local, en la que el tumor se encuentra todavía localizado en las estructuras primarias afectadas, y una fase de generalización, en la que en ocasiones se produce la diseminación del tumor (aparición de metástasis), configurando lo que hemos venido a denominar "enfermedad cancerosa". Sea con una sola o con las dos subfases, este periodo puede ser asimilado a lo que representa la parte visible de un iceberg, que mantiene fuera de nuestra vista el periodo más largo, el que va desde la actuación de la causa hasta la emergencia clínica y que encierra el periodo precanceroso (iniciación, promoción y una parte más o menos importante de la progresión). La primera etapa del proceso de la carcinogénesis, absolutamente preclínica y en una primera etapa aún no cancerosa (precancerosa) consta de tres etapas principales:

Iniciación:

Ocurre a nivel del genoma y las alteraciones pueden darse en los tumores benignos y malignos al igual que la segunda etapa, pero la tercera, o sea la de progresión, es exclusiva de la transformación maligna.

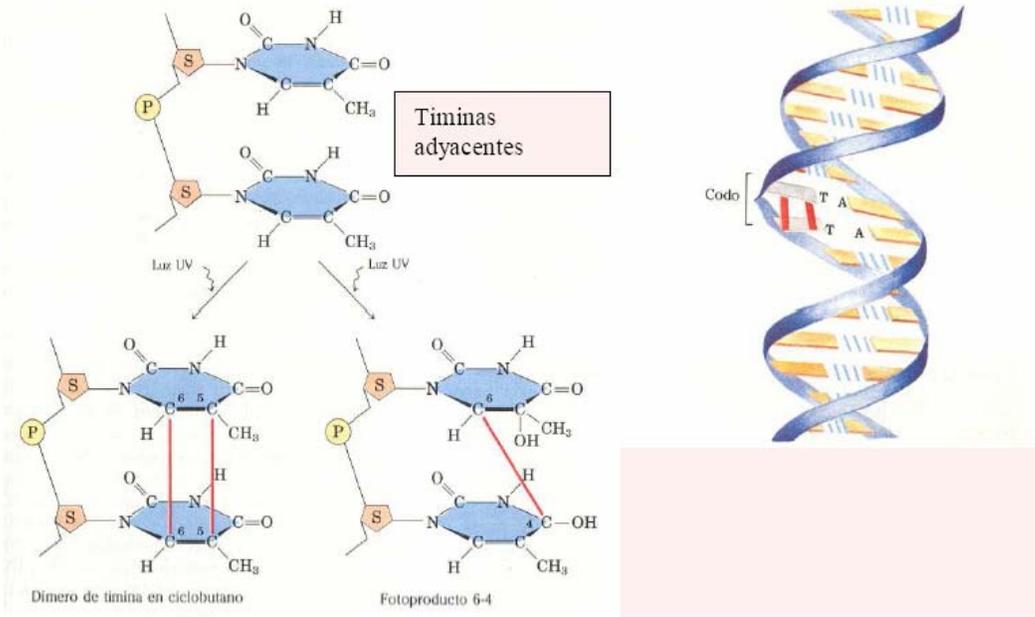
Los agentes que actúan en la primer etapa pueden ser: **FÍSICOS - QUÍMICOS o VIRALES.**

AGENTES FISICOS MUTAGENICOS

Las radiaciones poseen un elevado potencial mutagénico (5% de los cánceres en el hombre) al incidir sobre la molécula de ADN, a la que alteran de distintos modos, causando roturas en las cadenas de nucleótidos o induciendo la formación de enlaces covalentes estables entre bases de la misma o distinta cadena, lo que genera a su vez errores durante la replicación o expresión del ADN. La acción de los mutágenos puede ser directa o, a veces, indirecta, mediante la interacción con otras moléculas y la formación de radicales libres que dañarán el ADN. Las radiaciones ionizantes (con energía suficiente para provocar la separación de uno o más electrones de un átomo o de una molécula), producen la liberación de grandes cantidades de energía capaz de

romper los enlaces químicos de las moléculas de ADN y de proteínas. El mecanismo más probable de acción de este tipo de radiaciones, como las del radón (causante de cánceres especialmente de pulmón), es la generación de deleciones o pérdidas de fragmentos en el ADN, y de traslocaciones cromosómicas. La radiación UV, por su parte, está asociada a la aparición de cánceres de piel. El mecanismo de la acción mutágena es la formación de dímeros de pirimidina en el ADN (ver figura 3), y además tiene efectos nocivos sobre el sistema inmune. El posible efecto mutagénico de radiaciones electromagnéticas débiles provenientes de fuentes de emisión industriales o caseras (microondas) no ha sido demostrado.

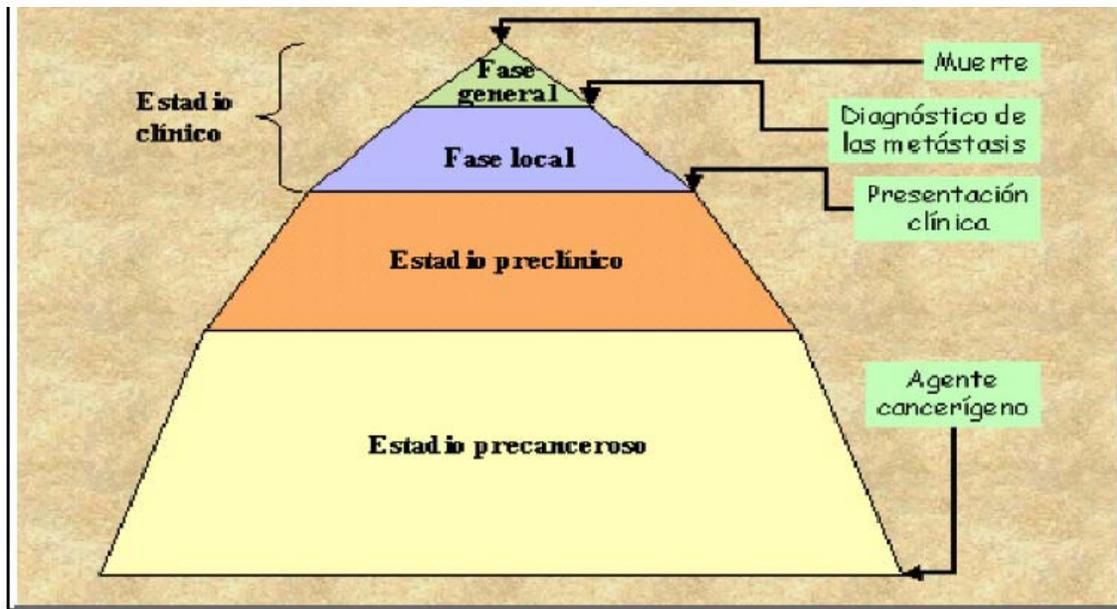
Figura 3.



Los carcinógenos **químicos** tienen como blanco preferencial al nitrógeno de la guanina (Alquilantes, aminas aromáticas, nitrosaminas y grasas poliinsaturadas) produciendo mutaciones irreversibles. La aflatoxina (aislada de alimentos contaminados con un tipo de hongo) se considera oncogénica para la célula hepática. Se atribuyen afectos genotóxicos a los compuestos policlorados contenidos en insecticidas y plaguicidas, así como también productos de la manufactura de materiales eléctricos y plásticos formando parte de los contaminantes ambientales, que llegan a los seres vivos a través del aire, del agua y de los alimentos. (7)

Los carcinógenos virales actúan introduciendo sus propias oncoproteínas al genoma de la célula afectada con lo que la misma cambiará su código normal, por el que le imponen los oncogenes virales. Tal es el caso del papiloma virus humano, del Epstein Bar y de las hepatitis B y C. Los oncogenes virales se ubican generalmente en las proximidades de proto-oncogenes o de oncogenes supresores, activando a los primeros y desactivando a los segundos.

Figura 4.



Promoción:

Representa la etapa de crecimiento tisular con la formación del tumor. Participan: los factores de crecimiento y los receptores a los factores de crecimiento, como así también la angiogénesis y degradación de las matrices extracelulares.

Los factores de crecimiento (FC), son péptidos producidos por las mismas células o por las vecinas y actúan como facilitadores de la mitosis incorporando en fase S, a algunas células que se encuentran en fase G0 o G1 prolongada.

Los FC se sintetizan en una célula y luego migran al espacio intercelular, ejerciendo sus acciones sobre las células vecinas. Los primeros FC descubiertos fueron el de crecimiento neuronal (NGF) y el epidérmico (EGF), a los que se sumaron muchos más, entre ellos el derivado de plaquetas (PDGF), el de hepatocitos (HGF), el de crecimiento de fibroblastos (FGF) el estimulante de crecimiento de colonias, el símil insulina (IGF-1). Algunas hormonas ejercen acciones similares a estos factores peptídicos una vez que fueron captadas por los receptores de membrana o intracitoplasmáticos. Es reconocido el efecto proliferativo de los estrógenos sobre los epitelios mamarios y del tracto genital; las gonadotropinas hipofisarias, estimulan especialmente al epitelio ovárico; la prolactina ejerce su acción en el ámbito de la mama y también del ovario; la insulina de origen pancreático y el factor símil insulina, de origen hepático, son verdaderos factores de crecimiento.

Merece un comentario aparte la acción de los estrógenos, tan vinculados a cánceres hormonodependientes y su uso como terapia hormonal de reemplazo, a originando controversias al respecto.

- a) estimulan algunos proto-oncogenes como el FOS
- b) estimulan la acción de otros factores de crecimiento (FC) y los receptores para FC.
- c) Facilitan la síntesis y liberación de prolactina
- d) Estimulan la síntesis de receptores de PG
- e) Aumentan el AMP cíclico que participa en la transducción de señales activando la replicación celular.
- f) Eleva los niveles de cíclicas (especialmente la E) posiblemente por mecanismos indirectos. (Vía estimulación de proto-oncogenes por el AMPc responsive elements)

Los receptores de membrana, son compuestos gluco-proteicos, que se unen a los factores de crecimiento y transmiten los mensajes proliferativos por intermedio de sus conexiones transmembrana. Algunas veces, la sobre expresión de éstos receptores los hace autoinducibles es decir, que se encuentran en acción permanente aún en ausencia del factor de crecimiento.

Algunas citocinas, que son productos de distintos tipos de células, pueden ejercer efectos moduladores o inhibitorios de la proliferación; tal es el caso del factor TGF beta, del interferón y del TNF o factor de necrosis tumoral que antagonizan a los factores de crecimiento.

Progresión:

Implica la capacidad de invadir tejidos vecinos o a distancia, por parte de la célula tumoral maligna. Esa capacidad está codificada también en los genes de la misma con modificaciones estructurales y funcionales. (Robbins y col, 1995)

Las células normales, se encuentran “ancladas” en un habitat que le es propio. El contacto con las células vecinas controla su propia división celular y existen moléculas de adhesión que las mantienen próximas y permiten la transmisión de señales de una a otra; las células normales son incapaces de atravesar la membrana basal que las separa del tejido conjuntivo sub-basal de donde obtiene los materiales que la nutren; tampoco tienen capacidad de introducirse a los capilares sanguíneos o linfáticos, aunque los linfocitos, hacen excepción a esta particularidad.

En algunas ocasiones tras estas primeras etapas en el proceso carcinogénico es posible objetivar lesiones titulares (evidenciables microscópicamente) denominadas precancerosas (situaciones patológicas que, de manera estadísticamente significativa, preceden o favorecen la aparición de procesos tumorales).

(54)

Un resumen más comprensible se muestra en la figura 5:

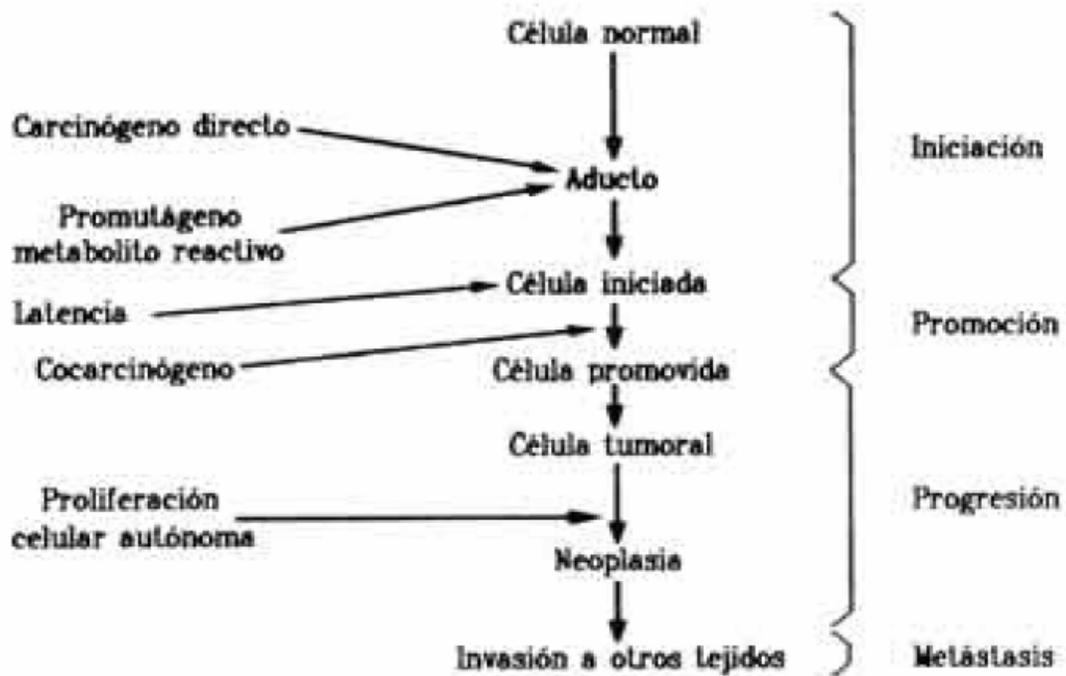
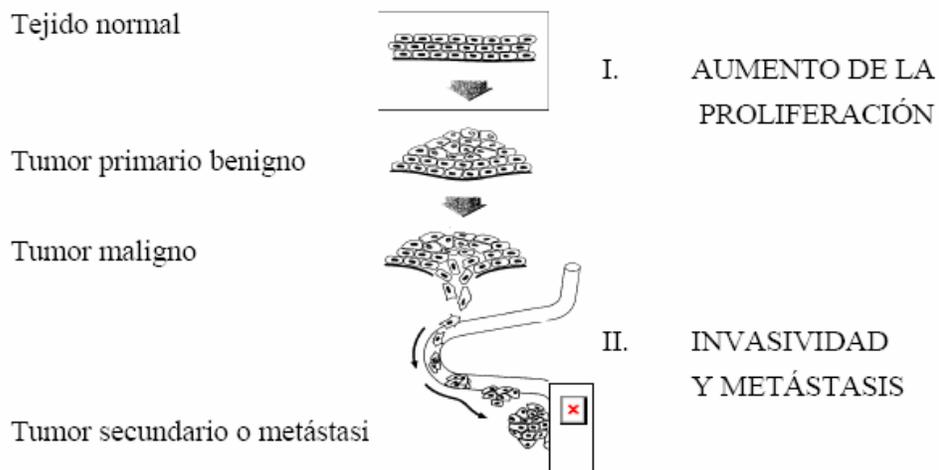


Figura 5.1

FASES DE LA APARICIÓN DE UN CÁNCER



2.2.3 Carcinógenos no genotóxicos o epigenéticos.

Son aquellos compuestos químicos que actúan por mecanismos que no incluyen la modificación directa del ADN, dando lugar finalmente a células genéticamente inestables (tumor). Estos agentes parece ser que modulan el crecimiento y la muerte celular. En general, estos compuestos actúan modificando la fisiología normal de órganos y sistemas específicos produciéndose una sobreestimulación persistente cuyo resultado es una replicación celular intensificada (alteración del ciclo celular con efecto mitogénico).

Esto puede dar lugar a un incremento de mutaciones espontáneas y de las probabilidades de alterar el ADN, tanto por factores endógenos como exógenos antes de que haya posibilidad de reparación. Normalmente se trata de compuestos exógenos, aunque en determinadas circunstancias compuestos endógenos (hormonas) podrían considerarse como carcinógenos epigenéticos. La acción carcinógena de los compuestos puede tener diferentes mecanismos pero todos ellos comparten las siguientes características principales:

Especificidad:

Los compuestos epigenéticos, al contrario que los genotóxicos, pueden ser más específicos en su capacidad de inducir carcinogénesis ya que frecuentemente inducen la formación de tumores en una especie animal, un sexo determinado y en la mayor parte de los casos en uno o varios órganos determinados dentro de una especie. Esta especificidad puede ser explicada por diferencias fisiológicas, metabólicas y de sensibilidad inter-especies.

Existencia de un umbral en el desarrollo del tumor:

En la mayoría de los casos el efecto carcinógeno se produce solamente cuando se administran altas dosis de los compuestos por lo que la carcinogénesis no aparecerá hasta que se alcance un determinado umbral. Según estos datos, se pueden construir curvas de dosis-respuesta para correlacionar qué dosis son perjudiciales. El análisis de estas curvas dosis-respuesta es de especial utilidad para determinar a qué niveles de un compuesto determinado no se produce efecto adverso y cuales constituyen factores de riesgo para el desarrollo del tumor en humanos.

Reversibilidad:

Los carcinógenos epigenéticos actúan generalmente como promotores del tumor cuando son administrados continua y prolongadamente. Los efectos producidos pueden revertir parcialmente cuando se interrumpe la administración del compuesto.

Citotoxicidad:

Los agentes epigenéticos son citotóxicos, produciendo un perjuicio crónico en las células que resulta en un aumento en la proliferación celular. Este incremento en la proliferación celular puede ser responsable del desarrollo neoplásico, ya que el ADN es cada vez más sensible a mutaciones a lo largo de sucesivas divisiones celulares. Por otro lado, la modificación producida en el ADN ya sea de forma endógena o exógena tiene posibilidades muy altas de convertirse en mutaciones heredables puesto que las posibilidades de reparación disminuyen.

En general, los agentes epigenéticos se pueden considerar como promotores en la expansión de células espontáneamente iniciadas. Algunos de estos agentes químicos son el benceno, cloroformo, tricloroetileno, furfural, metapirileno, lindano y bifenilos policlorinados. Un ejemplo clásico de carcinogénesis epigenética es la aparición de hepatomas o hepatocarcinomas inducidos en modelos. (54)

2.3 Clasificación de los carcinógenos

La evidencia más relevante para asegurar que cualquier sustancia química supone un riesgo de carcinogenicidad para el hombre deriva de los estudios epidemiológicos realizados en la especie humana, pero la asunción de riesgos que supondría el uso indiscriminado de nuevas sustancias químicas sin unos previos estudios del potencial carcinogénico de esas sustancias no podría ser socialmente aceptable. A pesar de los importantes avances en el desarrollo de pruebas para detectar precozmente la actividad carcinogénica, sin necesidad de tener que recurrir al concurso de seres vivos complejos, que exigen estudios largos, pesados y muy costosos, una parte importante de los estudios debe realizarse todavía en animales porque, tal como señala la Organización Mundial de la Salud, la única prueba definitiva de actividad carcinogénica continúa siendo el desarrollo de un tumor histológicamente evidenciable en un animal. De todos modos, no se puede afirmar con precisión absoluta que una sustancia que ha sido comprobada como carcinogénica en animales lo vaya a ser también en los humanos; sin embargo, en la mayoría de los casos, los carcinógenos comprobados en los humanos también lo son al menos en una especie animal y, a menudo, en varias.(6,7,8,9,10)

2.3.1 Clasificación de las sustancias químicas cancerígenas (IARC)

Tabla 1.

Grupo	Descripción	Referencia a la carcinogenicidad en los animales
1	La sustancia es cancerígena para el hombre (o las condiciones de la exposición conllevan exposiciones cancerígenas para el hombre)	Aunque no existan pruebas suficientes de carcinogenicidad en humanos, excepcionalmente se puede incluir en esta categoría a una sustancia si las pruebas son suficientes en animales y los mecanismos implicados son significativos para el hombre
2A	La sustancia es posiblemente cancerígena para el hombre (o las condiciones de la exposición conllevan exposiciones posiblemente cancerígenas para el hombre)	Cuando existen pruebas limitadas de carcinogenicidad en humanos y pruebas suficientes en experimentación animal En algunos casos, se pueden incluir sustancias de las que existen pruebas inadecuadas de carcinogenicidad en humanos y pruebas suficientes en animales (siempre que haya evidencias claras de que en la patogenia están implicados mecanismos significativos para el hombre)
2B	La sustancia es posiblemente cancerígena para el hombre (o las condiciones de la exposición conllevan exposiciones posiblemente cancerígenas para el hombre)	Cuando existen pruebas limitadas de carcinogenicidad en humanos y pruebas insuficientes en experimentación animal En algunos casos, se pueden incluir sustancias de las que existen pruebas inadecuadas de carcinogenicidad en humanos y pruebas suficientes en animales. Ocasionalmente, si existen pruebas inadecuadas de carcinogenicidad en humanos, pruebas limitadas en animales y otros datos significativos que lo apoyen.
3	Los datos no permiten que la sustancia pueda ser clasificada respecto a su carcinogenicidad para el hombre	Cuando existen pruebas inadecuadas de carcinogenicidad en humanos y pruebas inadecuadas o limitadas en experimentación animal Excepcionalmente, si hay pruebas inadecuadas en humanos y suficientes en animales pero existen evidencias claras de que el mecanismo de carcinogenicidad en animales no funciona en humanos.

En este sentido, se puede asegurar que existe una clara correlación positiva entre las observaciones realizadas en el hombre y los índices de carcinogenicidad en los animales, que además, a menudo han precedido a las observaciones humanas. Por ello, la observación de carcinogenicidad de una determinada sustancia en una especie animal debería, al menos, ser interpretada como una señal de atención para estudiar la adopción de medidas preventivas.

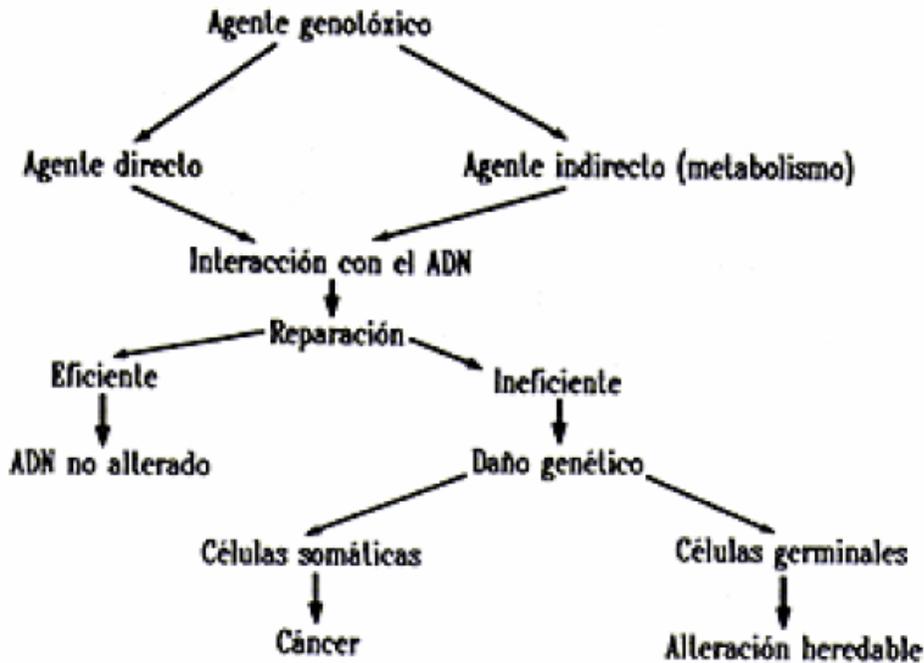
La utilización de los animales en la evaluación de la carcinogenicidad de las sustancias químicas resulta obligatoria ya que la misma clasificación de las sustancias carcinogénicas, se basa, entre otros criterios, en la existencia o no de suficiente evidencia de carcinogenicidad en animales. A este respecto no citaremos aquí más que la que probablemente es la de mayor prestigio internacional actualmente, la de la Agencia Internacional para la Investigación sobre el Cáncer (International Agency for Research on Cancer, IARC), en la que (aunque domina el criterio de las pruebas en humano) la existencia de pruebas en los animales permite ubicar (con carácter habitual, ocasional o excepcional) a las sustancias en los distintos grupos de riesgo carcinogénico. (54)

Además, los productos químicos pueden ser clasificados en una de las cinco categorías de toxicidad basadas en la toxicidad aguda por vía oral, cutánea o por inhalación, con arreglo a los criterios numéricos expresados en valores aproximados de la DL50 (oral, cutánea) o CL50 (inhalación).

2.3.2 Los Agentes Genotóxicos y el Daño Genético.

Durante el proceso de mutagenicidad el agente xenobiótico ingresa al organismo, se absorbe, se distribuye y atraviesa las membranas. Una vez dentro de la célula, el agente químico puede ser reactivo por sí mismo (de acción directa), o bien puede ser activado por las enzimas metabólicas, en cuyo caso es de acción indirecta y se llama promutágeno. Se produce entonces la interacción con el ADN, que puede ser reparada eficiente o ineficientemente de manera tal que el daño genético inicial se fijará o no, expresándose en las diferentes estirpes celulares, tal como se muestra en el esquema.

Figura 6.



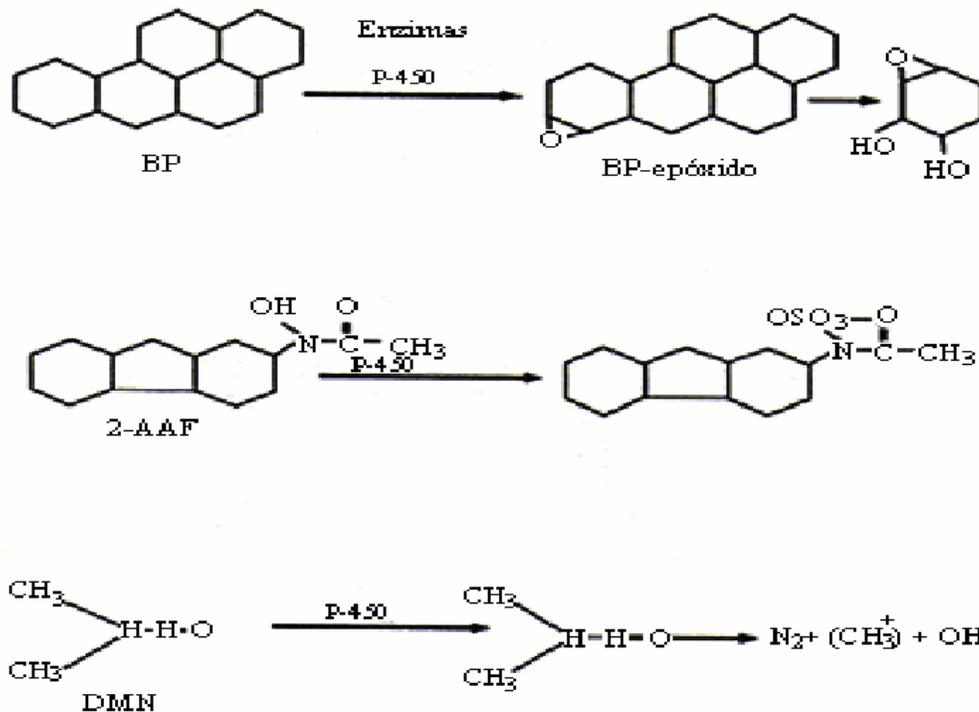
2.3.3 Metabolismo de los agentes genotóxicos

En realidad, la gran mayoría de los agentes genotóxicos son inertes en los seres vivos. Es a través de las enzimas metabólicas que las genotoxinas son biotransformadas a productos más reactivos, o electrofílicos, capaces de interactuar con diversas macromoléculas celulares, tales como las proteínas y los ácidos nucleicos. Los organismos procariontes son incapaces de bioactivar promutágenos, y entre los eucariontes existen diferencias importantes en cuanto a la capacidad metabólica. De hecho, las enzimas metabólicas muestran diferencias considerables en los diferentes órganos del individuo, entre los individuos de la misma especie y entre las diferentes especies. La actividad enzimática varía en el individuo dependiendo de la edad, el sexo, factores nutricionales, niveles hormonales y otros factores biológicos. En principio, el

conjunto de enzimas de los eucariontes hidroliza, oxida y reduce compuestos extraños, reacciones que se llevan a cabo en el sistema enzimático del citocromo P-450 que se encuentra en el citoesqueleto y en el retículo endoplásmico de las células con núcleo. Los productos intermedios así generados en ocasiones se conjugan con proteínas, formándose compuestos altamente reactivos. Es decir, en las células existen numerosas enzimas que activan a los promutágenos, pero también otras enzimas que desintoxican e inactivan a los productos intermedios: el equilibrio entre estas dos funciones celulares es el que en última instancia determina el potencial genotóxico del promutágeno (compuesto químico inerte que requiere ser metabolizado, transformándose así en un compuesto electrofílico y por lo tanto reactivo).

En la figura siguiente se muestra la activación inicial de algunos promutágenos. Muchos de ellos pasan por diversos procesos metabólicos, generándose varios productos intermedios. El compuesto electrofílico terminal es el que va a interactuar con los átomos nucleofílicos del ADN (los sitios nucleofílicos de las bases nitrogenadas son los centros que pueden ser atacados por moléculas electrofílicas, por ejemplo el nitrógeno 7 y el oxígeno 6 de la guanina) (1,4,14).

Figura 7: Activación metabólica de algunos promutágenos.



Es importante mencionar que existen también compuestos químicos que no son carcinógenos, pero que potencian el efecto de carcinógenos. Estos agentes químicos se llaman cocarcinógenos y suelen actuar en la etapa de promoción tumoral.

2.3.4 La inhibición del metabolismo

Durante el metabolismo normal de las células se generan radicales libres que suelen ser muy reactivos y, por lo tanto, potencialmente muy dañinos. Los organismos han desarrollado mecanismos que, por cierto, están muy conservados evolutivamente, para atrapar a los radicales libres. Entre estos mecanismos están diversas enzimas que catalizan la conversión de oxígeno reducido (O_2) a peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y de éste a agua y oxígeno ($H_2O + O_2$), y otros como el glutatión, que reacciona directamente con los compuestos electrofílicos de acción directa, o con los producidos durante el metabolismo. Así tenemos que los radicales libres se forman como productos intermedios en los procesos bioquímicos naturales. Se piensa que las enfermedades degenerativas como la arterioesclerosis, el cáncer y el envejecimiento celular se deben en gran medida a la pérdida de la capacidad enzimática de las células para atrapar radicales libres.

En los alimentos que ingerimos normalmente existen mutágenos y antimutágenos, y durante el metabolismo se generan compuestos mutagénicos, como las nitrosaminas, que se producen en el estómago al reaccionar los nitritos que se emplean como aditivos de alimentos con las aminas presentes en la carne. Es un hecho conocido que la dieta y los hábitos diarios de la persona influyen notablemente en el tipo de cáncer que los individuos desarrollan. Evidencias experimentales han mostrado que la ingesta diaria de vitaminas como la A, C, E, y los betacarotenos, que son cofactores que atrapan radicales libres protegen a los individuos en contra de los efectos nocivos de los radicales libres. Los mecanismos de acción de estas vitaminas son variados, el tocoferol o vitamina E puede interferir durante la formación de nitrosaminas, atrapa-radicales libres, al igual que la vitamina C y los beta-carotenos, y la vitamina A suprime la fase de promoción tumoral(19).

2.3.5 Interacciones con el ADN

Los productos reactivos generados a través del metabolismo interactúan con el ácido desoxirribonucleico, produciéndose lesiones premutagénicas, o aductos, que en muchos casos se fijan y producen mutaciones puntuales en el ADN, tales como sustituciones de bases, transiciones y transversiones, o bien mutaciones de corrimiento del marco de lectura. Sin embargo, en muchos casos, las lesiones premutagénicas son eficientemente reparadas por enzimas que funcionan en los organismos para mantener la integridad y fidelidad de los ácidos nucleicos. Se piensa que las enzimas que intervienen en los procesos de reparación aparecieron pronto en la evolución, ya que están presentes en las bacterias. Los mecanismos de reparación pueden funcionar antes o después de la replicación del ADN. Su eficiencia varía, ya que pueden reparar eficientemente, es decir, sin errores, situación que se presenta cuando la exposición a agentes genotóxicos es baja; o bien reparar de manera ineficiente, promoviendo errores en el ADN, lo que depende de la saturación del primer mecanismo y que generalmente ocurre cuando hay exposiciones altas (Figura 8).

Sin embargo, ambos mecanismos se ven afectados por numerosas variables además de la exposición. Dependen también de la estructura química del mutágeno, del tipo de aducto formado y de la cantidad de daño inducido. Una vez establecidos estos principios generales de interacción de los agentes genotóxicos con las macromoléculas celulares, analizaremos los tipos de agentes tóxicos y los efectos biológicos y genéticos que producen en los seres vivos. (31)

2.3.6 Mecanismos de reparación del ADN.

Figura 8.



2.4. Métodos para Determinar la Acción Carcinogénica.

2.4.1 Determinación de carcinógenos genotóxicos:

Existe un alto nivel de redundancia en los tipos de ensayos incluidos en las evaluaciones genotoxicológicas por lo que los mismos se han agrupado en 4 clases que miden:

1. Mutación génica.
2. Aberraciones cromosómicas.
3. Daño primario al ADN (mide la respuesta secundaria producida como resultado de una lesión primaria, tales como estimulación de la reparación del ADN, recombinación somática entre homólogos o cromátidas hermanas, o la ruptura de cadena del ADN).
4. Transformación celular (no evalúa efectos directos sobre el ADN sino la habilidad de la sustancia de ensayo de transformar las células normales en neoplásicas, esta categoría de daño es exclusivamente una medida del potencial oncogénico sin ninguna o poca relevancia para la producción de daños heredables).

Existen numerosos ensayos para evaluar los posibles efectos genotóxicos de las sustancias. Estos se evalúan a su vez en múltiples biomodelos o sistemas biológicos, desde bacterias, hongos y levaduras y plantas hasta células aisladas y mamíferos íntegros. Pero para poder realizar estudios evaluativos más homogéneos y predictores de acciones genotóxicas se han realizado numerosos intentos y se han propuesto baterías de varios ensayos en orden lógico y en las

que se incluyan las evaluaciones de las principales categorías de daño genético. Actualmente se realizan esfuerzos mancomunados para armonizar las guías para la evaluación genotoxicológica de las sustancias químicas y dentro de las Conferencias Internacionales de Harmonización (ICH) se ha propuesto un grupo de ensayos que son legislados por EUA, UE y Japón.

La batería propuesta está conformada por cuatro ensayos básicos:

1- Ensayo de detección de mutación génica en bacterias. Ensayo de mutación reversa en *Salmonella typhimurium*/*E. Coli*.

Este ensayo es el más ampliamente utilizado para propósitos de screening de mutágenos y carcinógenos (es el único validado). Combina una alta sensibilidad con una relativa facilidad técnica, rapidez y economía.

En este ensayo se utilizan diferentes cepas mutantes auxotróficas (incapaces de sintetizar histidina) de *Salmonella typhimurium*. Cada una de estas cepas tiene diferentes mutaciones que desactiva el gen que codifica para la enzima requerida en la síntesis de este aminoácido vital. De manera que no pueden crecer en un cultivo a no ser que el medio esté suplementado con este aminoácido. Si el gen afectado es mutado se produce una reversión al estado salvaje u original y entonces la bacteria será capaz de crecer en ausencia del aminoácido este fenómeno es conocido como reversión y las colonias como revertantes. Además de esa mutación en el operón histidina, presentan otras mutaciones que incrementan su sensibilidad a los mutágenos, ej:

- Mutación *rfa*, causa pérdida parcial de los lipopolisacáridos de la pared celular bacteriana, incrementándose la permeabilidad a macromoléculas.
- Mutación *uvrB*, incrementa la sensibilidad a los mutágenos por delección de los genes que codifican para los mecanismos de reparación por excisión.
- Plásmido pKM101 (factor R) causa un incremento en los mecanismos de reparación propensos a error aumentando la sensibilidad, también confiere resistencia al Ampicillin lo que es un buen marcador para detectar la presencia del plásmido. Dos tipos de mutaciones son detectables por este ensayo: sustitución de pares de bases y corrimiento en el marco de lectura.

Esas líneas detectan cambios en los sitios guanina-citosina de los genes histidina, sin embargo, algunos carcinógenos también modifican los pares de bases adenina-timina, por lo que más recientemente se han introducido líneas que detecten mutaciones en estos sitios, ej. La cepa TA 102 de *Salmonella typhimurium* y *E. coli* WP2*uvrA* la cual detecta esta mutación en el gen triptófano.

2- Ensayo *in vitro* de Linfoma L5178Y tk +/- de ratón.

Este ensayo evalúa dual punto final de acción genotóxica (mutación génica y aberración Cromosómica) ya que es capaz de detectar mutaciones puntuales que involucran sustituciones de base, delecciones, corrimientos y reordenamientos dentro del *locus TK* y además detecta lesiones clastogénicas que involucran delecciones multilocus y múltiples genes. Las células de mamífero generalmente tienen 2 copias de cada gen, pero esta línea tiene solamente una copia funcional del gen (células heterocigóticas para el locus

timidina-kinasa derivadas de linfoma de ratón). La timidina-kinasa no es una enzima esencial, la misma incorpora timidina exógena por fosforilación de la timidina. La trifluorotimidina (TFT) también puede ser fosforilada por la enzima y por consiguiente las células que contienen la enzima son sensibles a los efectos citotóxicos y citostáticos de la TFT. Las células son expuestas al compuesto con y sin activación metabólica e incubadas por un período de tiempo que permita la expresión de cualquier mutación que conlleve a la transformación a células homocigóticas tk -/- (enzima infuncional), las cuales son resistente a la TFT y permanecen viables en presencia de esta sustancia.

Se evalúan varias concentraciones, al menos 4 niveles de dosis, la máxima debe reducir la Sobrevivencia en un 80 a un 90%, y para compuestos no tóxicos esta debe ser el estándar límite de 5000 μ g/mL. Se considera un resultado positivo si hay un incremento estadísticamente significativo en la frecuencia de mutaciones.

3- Ensayo citogenético *in vitro* con células de ovarios de hámster (CHO).

Estos ensayos son utilizados para confirmar si un mutágeno presuntivo es mutagénico para animales mayores. Las células de mamífero presentan un mayor grado de organización que las bacterias y su capacidad metabólica, y de reparación del ADN también es mucho más compleja. Una gran variedad de líneas celulares y sistemas han sido utilizados para estudiar la actividad mutagénica, sin embargo la mayoría de los estudios se llevan a cabo en los sistemas siguientes:

- Líneas permanentes o inmortales: células de ovario de hámster (CHO), células de pulmón de hámster (V79) y células de linfoma de ratón (L5178Y).
- Cultivos primarios de linfocitos.

En contraste con los ensayos de mutación génica los ensayos citogenéticos se utilizan para determinar los cambios inducidos en la estructura o número de cromosomas, lo que es visto a través de un microscopio. Existen muchas técnicas para las evaluaciones citogenéticas tanto *in vitro* como *in vivo*, que se dividen en tres tipos diferentes:

- Las que detectan aberraciones cromosómicas.
- Las que detectan intercambios entre cromátidas hermanas.
- Las que detectan micronúcleos.

Los métodos se basan en la exposición de células proliferativas (en división) al agente de ensayo durante un tiempo que garantice que las células estén expuestas durante todas las etapas del ciclo celular, entonces son tratadas con un veneno del huso (colchicina) para acumular las células en metafase y que permita su visualización microscópica.

Los ensayos citogenéticos *in vitro* utilizan líneas celulares permanentes (inmortales) usualmente derivadas de Hamster Chino, ej. Células de ovario y de pulmón; y cultivos primarios, generalmente de origen humano como linfocitos humanos.

4- Ensayo *in vivo* de inducción de eritrocitos policromatófilos micronucleados en médula ósea de ratón.

2.4.2 Bioensayo in vivo. Determinación de carcinogenicidad en animales.

2.4.2.1 Ratones alterados genéticamente:

Se utilizan varias líneas transgénicas y knockout, incluso potencialmente para propósitos regulatorios. (45) Los transgénicos tienen activados oncogenes introducidos en su genoma (lo que facilitan las neoplasias); y los knockout tienen inactivados o eliminados genes supresores de tumores. No han sido aún validados, pero la FDA ha aceptado datos de transgénicos como parte de la determinación de seguridad de algunos fármacos. (46) Ej. de líneas:

2.4.2.2 Reducción del período del ensayo clásico:

Se está abogando por varios investigadores que el período de evaluación sea reducido a 12 a 18 meses porque en ese período es cuando en la mayoría de las evaluaciones (se analizaron 210 carcinógenos) se revelan los efectos tumorigénicos.

2.4.2.3 Estudios farmacocinéticos, farmacodinámicos y de corta y media duración en roedores y humanos:

Se propone que en el caso de fármacos humanos la apreciación de la estructura química, (48) la farmacocinética (ADME) y la farmacodinámica (mecanismo de acción), combinado con la evaluación de corta duración de las propiedades, como la genética, toxicidad en roedores y tejido-específica, pudiera permitir predicciones confiables de potenciales carcinógenos genotóxicos y no genotóxicos. Otros plantean la utilización de ensayos combinados de genotoxicidad in vivo y estudios toxicológicos en dos especies de 3 a 6 meses y ensayos clínicos fase I y II para identificar factores de riesgo carcinogénico (50). En general varios autores plantean que muchas veces, si se realizan dichos estudios y se realiza una interpretación correcta de los resultados, el ensayo convencional en roedores es redundante.

2.5 Alternativas sin animales:

2.5.1 SARs y QSARs

Las relaciones estructura-actividad (SARs) predicen actividades biológicas como la Carcinogénesis, basado en la presencia de sub-estructuras moleculares u otros indicadores químicos los cuales les confieren actividad biológica a la molécula original. Las relaciones cuantitativas estructura-actividad (QSARs) son descripciones matemáticas de la relación entre las propiedades físico-químicas de las moléculas y sus actividades biológicas. (42,46)

Al analizar los resultados de 301 químicos evaluados, demostraron que la presencia de grupos amino aromáticos y grupos nitro, agentes alquilantes, y otros grupo químicos incrementan la probabilidad de carcinogénesis en roedores. Cronin y colaboradores (50) describieron un número de sub-estructuras moleculares electrofílicas comunes a un rango de toxicidades potenciales en varias especies, incluyendo mutagenicidad y carcinogenicidad. A pesar de que han ocurrido fallos iniciales, los datos de QSAR más

recientes han demostrado ser muy útiles para predecir la carcinogenicidad de compuestos. Matthews y Contrera

(42) describieron la evaluación de un sistema computarizado QSAR que demostró un 97% de sensibilidad para carcinógenos roedores y 98% de especificidad para no carcinógenos. Estos análisis tienen la marcada ventaja de ser muy rápidos y relativamente baratos.

2.5.2 Ensayos *in vitro*:

Los ensayos *in vitro*, incluyendo bacterias, levaduras, protozoos, cultivos celulares de células de mamíferos y humanos, pueden contribuir junto con una caracterización del "peso de la evidencia" lo cual es suficiente para hacer innecesaria el bioensayo en roedores. Brusick (51) encontró una correlación de aproximadamente 90% entre mutagénesis microbiana *in vitro* y propiedades carcinogénicas en mamíferos para una larga lista de químicos. Tennant y colaboradores (7,8,9,10) predijeron exitosamente los hallazgos de 86% de 44 químicos a los que se evaluó carcinogénesis por el Programa Nacional de Toxicología (NTP), por medio del uso de la mutagenicidad en *Salmonella*, ensayos de toxicidad sub-aguda en roedores (90 días) combinado con información estructural química. Los ensayos de genotoxicidad de Ames, mutación reversa en *Samonella typhimurium* y aberraciones cromosómicas han sido aceptados por agencias regulatorias. (29)

2.5.3 Ensayos de transformación celular

Generalidades de transformación celular

Estos detectan cambios morfológicos que orientan a signos tempranos de identificación fenotípica de carcinogénesis. El fenómeno de la transformación morfológica de la célula incluye cambios en el control del comportamiento y crecimiento de las células cultivadas, caracterizadas por uno o más de las siguientes características (dependiendo del sistema celular):

- Alteraciones en la morfología celular.
- Perfiles desorganizados del crecimiento de las colonias.
- Adquisición de "crecimiento independiente de anclaje". (30).

Tales efectos resultan de cambios en la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores. La transformación ha sido definida como la inducción de ciertas alteraciones fenotípicas en células cultivadas que constituyen características tumorigénicas. Estas alteraciones fenotípicas pueden ser inducidas por exposición de células normales a procesos de carcinogénesis o por la expresión de oncogenes activos en estas células. Las células transformadas que han adquirido todas las características de células malignas tienen la habilidad de formar tumores invasivos en animales susceptibles. Tradicionalmente esto es determinado por inyección de células transformadas en ratones atímicos o animales recién nacidos de la misma especie de la línea celular, no obstante algunos sistemas de transformación tales como el ensayo de células SHE (31,32) ha demostrado ser altamente predictivo.

Desde su descubrimiento la transformación celular *in vitro* ha demostrado ser un proceso de múltiple pasos los cuales modelan los diferentes estadios de la carcinogénesis *in vivo* (51), varias razones apoyan esta expresión.

a) La inducción de transformación celular resulta de la exposición a químicos los cuales son carcinogénicos en animales.

b) Las células transformadas malignamente y que son inyectadas en animales hospederos susceptibles pueden formar tumor a diferencia de las no transformadas que no lo pueden provocar.

c) La transformación celular in vitro ocurre en varias etapas donde adquieren varios fenotipos diferentes y donde las células progresan de un fenotipo normal a uno maligno en experimentos de transfección con oncogenes activados, y por el hecho que los agentes promotores de tumores pueden aumentar la frecuencia de transformación celular en células tratadas con bajas concentraciones de carcinogenicidad.

La transformación celular in vitro parece brindar algunas evidencias específicas y cruciales para determinar el potencial tumorigénico de un químico lo que no puede ser brindado por los ensayos genotóxicos a pesar de que varios ensayos de transformación in vitro se han desarrollado su relevancia y confiabilidad para identificar carcinógenos genotóxicos no ha sido aun ampliamente aceptada.

Indudablemente para determinar este tipo de carcinogenicidad se han utilizado los ensayos de genotoxicidad (31,32). Existe un interés en el uso de la transformación celular para detectar carcinogenicidad por el hecho de que algunos ensayos son sensibles a químicos que actúan por un diverso rango de mecanismos, incluyendo mecanismos genotóxicos y no genotóxicos (54).

Existen varias razones para el relativo bajo uso de bioensayos de transformación celular para predecir carcinogenicidad, esto incluye: a) Las habilidades técnicas requeridas, b) la carencia de estandarización y caracterización y c) el hecho de que la prevalencia y fiabilidad de los ensayos no han sido establecidos en estudios independientes hasta donde ellas pueden ser consideradas para ser validadas con aceptación y uso regulatorio.

2.5.4 Ensayos de transformación celular en roedores:

Estos incluyen las células de periodo de vida finito tales como ensayo de células SHE, así como las líneas celulares inmortalizadas, ejemplo Balb/c3T3 y C3H/10T½. La transformación morfológica de las colonias celulares y formación de focos de una monocapa celular son los puntos finales mas usados. La transformación celular puede ser ensayada simultáneamente en los mismos cultivos con otros puntos finales, ejemplo mutación génica, formación de intercambio de cromátidas hermanas, daño cromosómico, inducción de micronúcleos y aneuploidias (14). Estos estudios combinados pueden ser útiles en proveer información adicional que puede ser valiosa en la interpretación de los datos sobre transformación ejemplo: en decidir cuando la actividad transformante de un químico se debe a mecanismo genotóxico o no genotóxico.

Ensayo de transformación celular en células de embriones de Hámster Sirio (SHE). Ha sido descrito como el ensayo de corta duración más predictivo para carcinógenos en roedores. (53) Detecta transformaciones celulares morfológicas, el estadio fenotípico de carcinogénesis más tempranamente identificable. (se han demostrado correlaciones de hasta 91%. (21) Su principal ventaja con otros ensayos in vitro es la habilidad de detectar algunos químicos genotóxicos al igual que no genotóxicos. (54)

2.5.5 El sistema de transformación basado en células humanas

Indudablemente un ensayo de transformación ideal debe ser aquel que utilice células humanas debido a que la mayoría de los ensayos de transformación desarrollados para determinar el riesgo de transformación humana a potenciales carcinogénicos. Además

la validación de los ensayos de transformación celular humana tendrá que ser desarrollada tomando como referencia los datos en animales que posean suficiente relevancia para el riesgo en humanos. Los dos sistemas de transformación celular humana que han sido desarrollados y estudiados son:

-El modelo de transformación celular en queratinocitos (HaC). Esta fue derivada por inmortalización espontánea de ATe queratinocitos humanos normales muy probablemente debido a mutaciones en el gen P₅₃ y la consecuente pérdida de genes sensibles (19). Esta célula puede ser propagada indefinidamente, tienen un cariotipo aneuploide con cambios cromosómicos específicos, pero poseen enteramente muchas propiedades fenotípicas de los queratinocitos humanos (Breitkreutz, 1998).

- Líneas celulares MSU-1. Esta línea consiste en un modelo de transformación celular en fibroblastos humanos, en esta el oncogen v-myc fue transfectado en fibroblastos humanos normales, las células clonadas que expresan la potencia v-myc fueron las seleccionadas e inmortalizadas, posteriormente se obtuvo una variante de la línea celular, la msu-1.1.

Ambas líneas celulares son no tumorigénicas en ratones atímicos.

-Uso no regulatorio de ensayos de transformación celular. Estos han sido utilizados en estudios mecanísticos de carcinogenicidad y para los posibles mecanismos de acción de carcinogenicidad conocidos o sospechosos, han sido ampliamente empleados a la hora de tomar decisiones tempranas en la priorización de químicos para ser evaluados en ensayos de carcinogenicidad en animales. El análisis de las bases de datos disponibles sugiere que solo el ensayo de transformación SHE ha demostrado ser el que mejor cumple con los parámetros exigidos desde el punto de vista de propósitos de screening carcinogénico.

-Uso regulatorio de los ensayos de transformación celular. La transformación celular como un punto final aparece en algunos esquemas y estrategias de ensayos para evaluación de la Mutagenicidad/carcinogenicidad de químicos (17), no obstante tales ensayos son recomendados solamente cuando se sospecha fundamentalmente que las bases moleculares del fenotipo transformado y su relación con el cáncer in vivo no están totalmente esclarecidos, dicha problemática se ha originado a causa de la carencia de comprensión de los mecanismos fundamentales incluidos en la transformación, la subjetividad alejada de los puntos finales in vivo que se obtienen, la carencia de datos de ensayos regulatorios en transformaciones celulares y la ausencia de adecuada validación de estudios.

Otros procesos y análisis que contribuyen a la determinación de la carcinogenicidad son:

cDNA microarrays (de muy reciente utilización y con promisorio futuro) investigaciones epidemiológicas y evaluación de datos históricos.

2.6. ASPECTOS GENERALES DEL DERMOFURAL (G-1)

2.6.1 Calidad De Dermofural

Ingrediente farmacéutico activo

Los estudios de estabilidad de estante fueron llevados a cabo durante dos años en Cuba y la evaluación en Canadá de muestras almacenadas durante 8 años demostraron que el producto posee una inusual alta estabilidad en estado sólido, no requiriendo de refrigeración para su almacenamiento.

Formulado

El Dermofural consiste en una formulación oleosa del G-1 al 0.15% en base petrolato líquido pesado/petrolato sólido blanco, p/p 20/csp 100 g). Hasta los dos años de almacenamiento a temperatura controlada, en lotes a nivel de laboratorio, no se detectaron pérdidas por degradación. Ya se montaron tres lotes industriales para seguir la estabilidad de estante cumpliendo con las exigencias de registro nacionales e internacionales.

Las especificaciones de los índices de calidad del Dermofural se muestran en la Tabla 2:

Tabla 2.

Índice	Límites
Características organolépticas	Producto semisólido de aspecto uniforme, libre de impurezas mecánicas, de color ligeramente amarillo y olor característico
Masa promedio	25 ± 2.5 g
Identificación de bromo en la molécula de 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano	Se observa la formación de un precipitado de color ligeramente amarillo.
Identificación del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano (HPLC)	El tiempo de retención (tr) de la muestra coincide con el del estándar y no difieren en $\pm 5\%$
Valoración (HPLC)	El contenido de 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano por 100.0 g de ungüento debe ser entre 90.0 y 110.0% (de 0.135 a 0.165g) de la cantidad nominal declarada en la fórmula

2.6.2 ASPECTOS FARMACOLOGICAS

Efectividad

La efectividad *in vitro* del G-1 se evaluó mediante el método de microdilución en caldo frente a 1620 cepas de 29 especies de bacterias Gram negativas, 898 cepas de 15 especies de bacterias Gram positivas, 154 cepas de 5 especies de levaduras del

género *Candida* y 30 cepas de 4 especies de hongos filamentosos (dermatofitos). Según los valores de la CIM₅₀, CIM₉₀ y los respectivos rangos expuestos en las Tablas 1, 2, 3 y 4 el G-1 es un agente antimicrobiano con amplio espectro frente a patógenos bacterianos y fúngos y puede tener un tremendo potencial terapéutico. Han sido evaluadas cepas de 11 especies de bacterias y candidas (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulasa negativo*, *Staphylococcus aureus* Meticillin resistente, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus sp.*, *Moraxella catarrhalis*) resistentes a varios antibióticos que elevan el valor agregado del producto .

Tabla 3. Concentración inhibitoria mínima frente a bacterias Gram negativas

Microorganismo	n	CIM (µg/mL)		
		CIM ₅₀	CIM ₉₀	Rango
Aerobias				
<i>Acinetobacter calcoaceticus</i>	1	4	4	4
<i>Acinetobacter sp.</i>	1	4	4	4
<i>Citrobacter diversus</i>	1	16	16	16
<i>Citrobacter freundii</i>	10	16	16	8-16
<i>Citrobacter sp.</i>	9	32	32	16-32
<i>Enterobacter aerogenes</i>	4	16	16	8-32
<i>Enterobacter amnigenus</i>	1	8	8	8
<i>Enterobacter cloacae</i>	11	16	16	8-32
<i>Escherichia coli</i>	222	16	16	4-32
<i>Klebsiella oxytoca</i>	8	16	16	8-32
<i>Klebsiella ozaenae</i>	1	16	16	16
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	73	16	32	8-32
<i>Moraxella catarrhalis</i>	87	1	2	0.5-4
<i>Morganella morganii</i>	12	16	32	16-32
<i>Neisseria meningitidis</i>	5	1	1	<0.5-1
<i>Pasteurella multocida</i>	1	1	1	1
<i>Proteus mirabilis</i>	46	4	16	4-16
<i>Providencia stuartii</i>	1	8	8	8
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1084	2	4	0.5-16
<i>Pseudomonas stutzeri</i>	1	4	4	4
<i>Salmonella sp.</i>	1	16	16	16
<i>Serratia marcescens</i>	21	16	32	4-32
<i>Serratia sp.</i>	2	8	8	8
<i>Xanthomonas maltophilia</i>	7	8	8	8
Anaerobias				
<i>Acinetobacillus sp.</i>	1	16	16	16
<i>Bacteroides vulgatus</i>	1	0.5	0.5	0.5
<i>Bacteroides fragilis</i>	6	1	2	0.5-16
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	1	8	8	8

<i>Bacteriodes</i> (pigmentados)	1	1	1	1
----------------------------------	---	---	---	---

Tabla 4. Concentración inhibitoria mínima frente a bacterias Gram positivas

Microorganismo	n	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
		CIM ₅₀	CIM ₉₀	Rango
Aerobias				
<i>Enterococcus faecalis</i>	9	16	32	8-32
<i>Enterococcus faecium</i>	2	16	32	16-32
<i>Enterococcus</i> sp.	57	16	16	2-32
<i>Staphylococcus aureus</i>	198	8	16	4-32
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1	8	8	8
<i>Staphylococcus coagulasa</i> neg.	50	16	32	4-32
<i>Streptococcus agalactiae</i>	11	4	8	4-8
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	307	32	32	8-64
<i>Streptococcus pyogenes</i>	243	4	4	0.25-16
<i>Listeria</i> sp.	1	32	32	32
Anaerobias				
<i>Propionibacterium acnes</i>	12	1	4	1-4
<i>Propionibacterium</i> sp.	3	1	1	0.5-1
<i>Peptostreptococcus magnus</i> .	1	0.5	0.5	0.5
<i>Peptostreptococcus</i> sp.	1	4	4	4
<i>Clostridium perfringens</i>	2	0.5	2	0.5-1

Tabla 5. Concentración inhibitoria mínima frente a levaduras

Microorganismo	n	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
		CIM ₅₀	CIM ₉₀	Rango
<i>Candida albicans</i>	138	2	2	1-4
<i>Candida (Torulopsis) glabrata</i>	1	2	2	2
<i>Candida krusei</i>	2	4	4	4
<i>Candida parapsilosis</i>	4	2	2	2-4
<i>Candida tropicalis</i>	7	4	4	2-4
Levaduras	2	1	2	1-2

Tabla 6. Concentración inhibitoria mínima frente a hongos dermatofitos

Microorganismo	n	CIM ($\mu\text{g/mL}$)		
		CIM ₅₀	CIM ₉₀	Rango
<i>Trichophyton rubrum</i>	14	4	4	1-4

<i>Trichophyton mentagrophytes</i>	14	2	4	1-4
<i>Microsporium canis</i>	1	2	2	2
<i>Epidermophyton floccosum</i>	1	0.5	0.5	0.5

Tabla 7. Comparación de la actividad *in vitro* del G-1 frente a cepas de *Pseudomonas aeruginosa* sensibles o resistentes a varios agentes antipseudomonales⁵

Antibiótico	Actividad	n	CIM ($\mu\text{g/ml}$)		
			CIM ₅₀	CIM ₉₀	Rango
Ciprofloxacina	Sensible	909	2	4	$\leq 0.5-16$
	Intermedio	60	2	4	1-4
	Resistente	83	2	4	1-8
Imipenem	Sensible	960	2	4	$\leq 0.5-16$
	Intermedio	74	2	4	1-8
	Resistente	44	2	4	1-4
Cefepime	Sensible	937	2	2	$\leq 0.5-16$
	Intermedio	72	2	2	$\leq 0.5-8$
	Resistente	72	2	4	$\leq 0.5-8$
Tobramycin	Sensible	1020	2	4	$\leq 0.5-16$
	Intermedio	15	2	4	1-4
	Resistente	41	2	2	1-4
Gentamicina	Sensible	982	2	4	$\leq 0.5-16$
	Intermedio	41	2	2	$\leq 0.5-4$
	Resistente	57	2	2	1-4
Ceftazidima	Sensible	905	2	4	$\leq 0.5-16$
	Intermedio	120	2	4	0.5-8
	Resistente	40	2	4	1-4
Piperacilina/Tazobactam	Sensible	989	2	4	$\leq 0.5-16$
	Intermedio	---	---	---	---
	Resistente	83	2	2	0.5-4
Amikacina	Sensible	1024	2	4	$\leq 0.5-16$
	Intermedio	79	2	4	$\leq 0.5-4$
	Resistente	28	2	4	1-4

Observaciones: en la Tabla antes expuesta se ejemplifica con la *Pseudomonas aeruginosa* las evaluaciones *in vitro* del G-1 con cepas de 11 especies de bacterias y candidas resistentes a numerosos agentes antimicrobianos.

2.6.3 ASPECTO TOXICOLOGICA

Seguridad

La seguridad del Dermofural como formulado para uso tópico en el hombre se demuestra por los resultados de estudios de absorción dérmica y sensibilización en piel realizados utilizando el ingrediente farmacéutico activo marcado con ^{14}C , estudios de toxicología aguda, subcrónico y crónico, estudios de genotoxicidad *in vitro* e *in vivo* realizados en Cuba y en EE.UU., así como estudios de irritabilidad dérmica y oftálmica. (29, 30, 31,32)

2.6.3.1 Absorción dérmica

En un estudio *in vitro* sobre absorción cutánea y percutánea en piel humana (obtenida por cirugía plástica) del G-1 al 0.15% en cinco tipos de vehículos tópicos con el ingrediente farmacéutico activo marcado con ^{14}C , se reveló que la absorción cutánea del G-1 formulado en base oleosa fue significativamente más elevada que en un vehículo hidrófilo (56.8 vs. 20.5 $\mu\text{g/g}$) y la absorción percutánea fue solo ligeramente más elevada (0.9 vs. 0.8 $\mu\text{g/cm}^2/\text{h}$). Las cualidades del formulado oleoso aseguran una buena penetración del ingrediente farmacéutico activo a través de los estratos superiores de la piel y a la vez, no permiten que lleguen niveles elevados de éste al estrato inferior. (41)

2.6.3.2 Toxicidad aguda

La DL_{50} del G-1 fue establecida por las vías orales y percutánea en ratones OF-1 y ratas Sprague Dawley de ambos sexos. Para la vía oral el G-1 se suspendió en goma tragacanto y los animales recibieron una dosis única; para la vía percutánea se formuló en una mezcla de acetona-aceite de maní (95:5) y se aplicó en los animales en dosis única en un área de 10-15% de la superficie corporal. En ambos casos la dosis aplicada se correspondió con el rango de dosis previamente establecida para los grupos experimentales teniendo en cuenta el sexo y la especie del roedor (27). La DL_{50} oral (en mg/kg de masa corporal) para ambas especies de roedores y sexos se muestra en la Tabla 8.

Tabla 8. Resumen de los resultados de los estudios toxicológicos agudos

Especie	Sexo	Vía Oral	Vía Percutánea
Ratones	Hembras	1078	1470
	Machos	1817	1950
Ratas	Hembras	1506	2205
	Machos	1856	2370

Estos resultados permiten nominar al G-1 como ligeramente tóxico tanto por la vía oral como por vía percutánea e indican que el G-1 es más tóxico por vía oral en ambos sexos.

El hallazgo patológico postmortem de mayor interés fue la congestión hepática, con una frecuencia e intensidad correlacionada con el nivel de concentración del producto. Además, en la administración percutánea se observó congestión en la piel, asociada a la administración de las concentraciones más elevadas. (27,37, 38, 39)

2.6.3.3 Toxicidad subcrónica

Se estudió el efecto de la aplicación tópica del G-1 durante 60 días en ratas de la línea Sprague Dawley en concentraciones de 0.125, 0.5 y 1.25% en petrolato blanco. El análisis de las variaciones en la ganancia media de la masa corporal, los resultados de los estudios hematológicos, hemoquímicos y anatomopatológicos, no revelaron diferencias notables entre los grupos tratados y los controles, por lo que el G-1 a las concentraciones y en el vehículo ensayado, no ejerce efecto tóxico subcrónico durante 60 días de aplicación tópica (26).

2.6.3.4 Toxicidad crónica

Se realizó un estudio de toxicología crónica del G-1 con una duración de 180 días en 100 ratas Sprague Dawley, de ambos sexos distribuidos aleatoriamente en 5 grupos: dosis baja, dosis media, dosis alta, control de vehículo y control no tratado. Los niveles de dosis empleadas fueron 0.125, 1.062 (8 veces la dosis baja) y 2.0% (16 veces la dosis baja), respectivamente. La vía de aplicación fue percutánea y el vehículo una mezcla de acetona y aceite de girasol (v/v 95:5). Al finalizar el estudio los animales fueron sacrificados y se realizaron estudios a 16 parámetros hemoquímicos y 11 hematológicos, así como evaluaciones anatomopatológicas de 14 órganos (corazón, bazo, hígado, pulmones, duodeno, riñones, páncreas, testículos/ovarios, adrenales, encéfalo, médula espinal, piel, timo, ganglios cervicales).

En el grupo de dosis baja, grupo con la dosis más cercana a la terapéutica prevista en el humano, las alteraciones fueron leves o no se apreciaron. En los grupos de dosis alta y media se concluyó que el G-1 produce una disminución significativa de la masa corporal al compararlos con los controles. En los estudios hemoquímicos y hematológicos no se apreciaron variaciones en 11 de los primeros ni en 9 de los segundos; solamente se observaron movimientos en los parámetros: proteínas totales, albúmina, creatinina, hemoglobina, hematocrito, potasio plasmático y glicemia. Es necesario esclarecer que dichas alteraciones fueron estadísticas, no así biológicas, donde todas las determinaciones estuvieron dentro de los rangos fisiológicos para la especie en ensayo.

Los estudios anatomopatológicos concluyeron que el órgano más dañado fue la piel correspondiente al área de aplicación, donde se detectaron lesiones como hiperqueratosis, acantosis, aumento del número de folículos, colagenización de la dermis, liquefacción de la capa basal y engrosamiento ligero de la dermis, estas alteraciones se asociaron con el incremento de la dosis, donde el grupo de máxima dosis fue el más dañado y en los animales de dosis baja estas alteraciones fueron muy leves o no fueron observadas.

Posteriormente las muestras de piel se estudiaron mediante morfometría microscópica analizándose el espesor de la epidermis, de la capa de células de la epidermis, de la capa de queratina y la densidad de folículos. Se encontró que entre los grupos tratados con el producto G-1, el de dosis baja (la dosis más cercana a la terapéutica prevista en humanos) presentó los valores más bajos de altura del epitelio, altura de la capa celular y altura de la capa de queratina. El número de folículos pilosos de los grupos de dosis alta, media y baja registró valores significativamente mayores respecto al control (26, 27, 36, 37,39).

2.6.3.5 Genotoxicidad

El riesgo genotóxico de la molécula G-1 se evaluó según una estrategia elaborada acorde a los requerimientos planteados por las agencias regulatorias de varios países y más recientemente definida en las Conferencias de Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Sustancias Farmacéuticas para uso en Humanos.

Los resultados obtenidos en los estudios genotoxicológicos permiten afirmar que el G-1 se clasifica en el nivel de interés LOC I (de menor riesgo) como un compuesto capaz de interactuar con el ADN bajo ciertas condiciones *in vitro* (mutágeno *in vitro*) pero sin evidenciar genotoxicidad *in vivo*. Puede asumirse que existen fuertes evidencias de que el riesgo genotóxico para el uso en el hombre es poco probable. En la Tabla 9 se exponen los resultados de la batería de ensayos que se aplicó en una primera etapa.

Tabla 9. Resultados de la primera batería de ensayos genotoxicológicos

Ensayo	Tipo	Resultado
Ensayo de detección de mutación génica en bacterias. Ensayo de mutación reversa en <i>Salmonella typhimurium</i> / <i>Escherichia coli</i> (Ensayo de Ames)	<i>In vitro</i>	+
Ensayo citogenético <i>in vitro</i> con células de ovarios de hámster (CHO)	<i>In vitro</i>	+
Ensayo <i>in vitro</i> de Linfoma L5178Y tk ^{+/} - de ratón	<i>In vitro</i>	-
Ensayo <i>in vivo</i> de inducción de eritrocitos policromatófilos micronucleados en médula ósea de ratón.	<i>In vivo</i>	-

En este punto nos encontramos ante un compuesto con respuestas positivas y negativas en los ensayos *in vitro* que lo eleva del nivel de interés I (LOC I) al nivel de interés II (LOC II) y se considera como un genotóxico *in vitro* necesitándose de otros ensayos *in vivo* en tejidos diferentes a la médula ósea o sangre.

Una segunda etapa de evaluaciones se efectuó a través de un conjunto de ensayos conducidos por investigadores de centros de investigación en Cuba (CENPALAB) (33, 34, 35,36) y se muestra en la Tabla 10.

Tabla 10. Resultados de la segunda batería de ensayos genotoxicológicos

Ensayo	Tipo	Resultado
Ensayo de inducción de micronúcleos en eritrocitos policromatófilos de médula ósea de ratón	<i>In vivo</i>	-
Ensayo de inducción de aberración cromosómica en médula ósea de rata Sprague Dawley	<i>In vivo</i>	-
Ensayo de inducción de aberración cromosómica en célula germinal de ratón	<i>In vivo</i>	-
Ensayo de morfología espermática en ratón	<i>In vivo</i>	-

Ensayo de inducción de micronúcleos en reticulocitos de sangre periférica *In vivo* - de ratón

Los resultados negativos en los 4 primeros ensayos confirman la no clastogenicidad del producto *in vivo*. Los resultados del tercer y cuarto ensayos evidencian la no interacción del G-1 a nivel de las gónadas, y el quinto ensayo proporciona información acerca de la no inducción de genotoxicidad *in vivo* en otro punto final de acción genotóxica.

Los estudios en su conjunto fueron sometidos al criterio de reconocidos especialistas en la materia (French IW. Presidente de la firma IWF CONSULTING SERVICES, Ontario, Canadá; Binnie Craig, de la firma York Medical Inc., de Canadá y Marcos Ricardo. Catedrático de Genética y Coordinador del Grupo de Mutagénesis de la Universidad Autónoma de Barcelona reconociéndose por los mismos una alta seguridad genotóxica(14,20).

2.6.3.6 Sensibilización en piel

Se realizó un estudio preclínico conducido por Nucro-Technics Inc. (Canadá) (20) sobre sensibilización en piel en cobayos con el G-1 marcado con ¹⁴C y formulado al 0.15% en base oleosa (petrolato líquido-sólido) (p/p 20/csp100) según el procedimiento de "Maximization Test". Los resultados revelaron que el formulado no produjo sensibilización en piel en las condiciones del ensayo.

2.6.3.7 Irritación dérmica

Se evaluó el potencial irritante dérmico en conejos albinos Nueva Zelandia del G-1 al 0.15% formulado en base oleosa (petrolato líquido pesado/petrolato sólido blanco, p/p 20/csp100 g). No se observaron signos de irritación en piel y se obtuvo un Índice de Irritación Primaria (IIP) de 0 por lo que el producto se clasificó como no irritante.

2.6.3.8 Irritación oftálmica

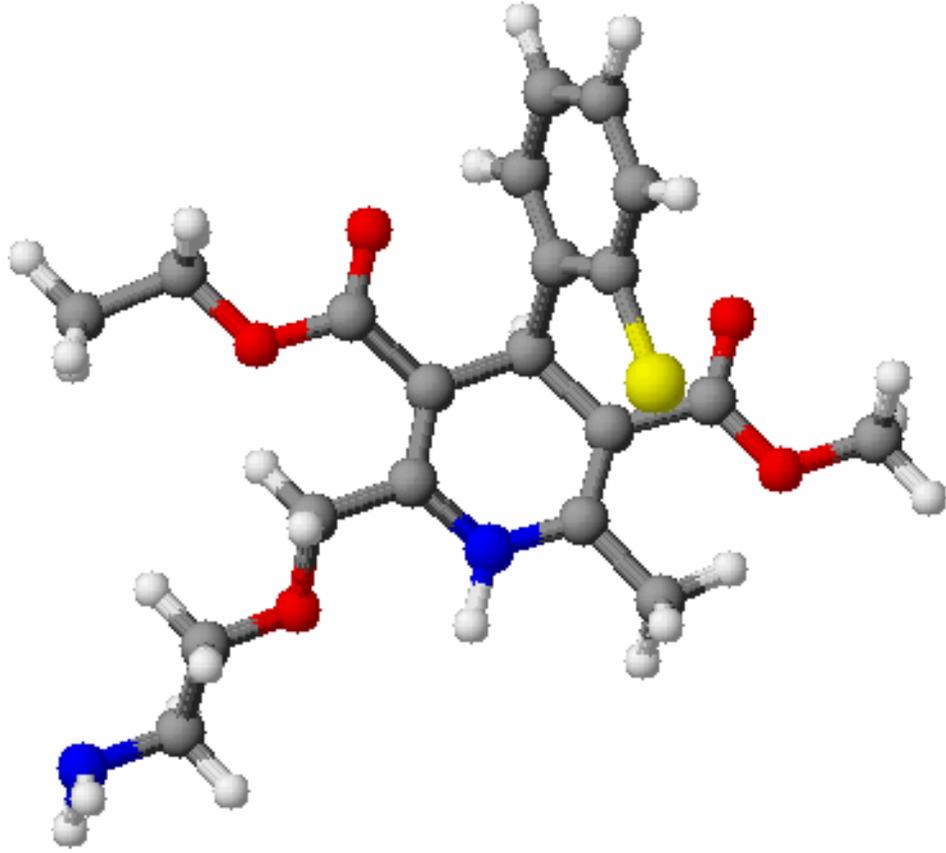
En el estudio sobre irritabilidad oftálmica iterativa del G-1 formulado al 0.15% en petrolato líquido-sólido (p/p 40/csp100), el formulado se aplicó en dosis de 100 mg en el ojo derecho del animal, con una frecuencia de dos veces al día durante 30 días; el ojo izquierdo se reservó como control negativo. Los resultados más sobresalientes revelaron que el formulado no fue irritante y no produjo manifestaciones clínicas ni lesiones de efectos significativos en las estructuras oculares internas que puedan invalidarlo para el uso al que está destinado.

2.6.3.9 Eficacia

Sobre la formulación oleosa del G-1 al 0,15% para uso dérmico existen antecedentes sobre el desarrollo de ensayos clínicos en humanos.

Recientemente concluyó un ensayo clínico Fase III, multicéntrico, en el que se evaluó el Dermofural en 526 pacientes portadores de *Tinea corporis* y *Tinea pedis escamosa* y como medicamento control la crema de Ketoconazol al 2%. Curados clínicamente se reportó el 44.1% de los tratados con Dermofural y el 62.6% con el Ketoconazol (p = 0.001). Negativizaron el cultivo final 59.9% de los tratados con Dermofural y 89.1% con el Ketoconazol, con diferencias estadísticas significativas. Abandonó el 34% en el grupo de Dermofural y el 27.7% con el Ketoconazol; no se encontraron diferencias estadísticas significativas. En general el 30.7% de los incluidos abandonaron el estudio.

Se realizó un análisis final de la potencia del estudio que permitió conocer que esta descendió de 90%, para el que se estimó el tamaño de muestra, a 68%. Del total de pacientes que llevaron algún tratamiento, se reportaron eventos adversos severos en 1.9% (5 eventos) de los pacientes tratados con Dermofural y en 0.4% (1 evento) de los tratados con Ketoconazol. En ninguno de los grupos se reportaron eventos adversos graves. En general, en ambos casos los eventos adversos fueron semejantes (Dermofural: prurito, eritema, vesículas, ardor, exudación, edema, dermatitis, ampollas, enrojecimiento, aumento de lesiones, dolor, fisuras, pápulas, forúnculos y sudoración. Ketoconazol: cefalea, ardor, asma, aumento de lesión, fiebre, linfangitis, prurito, sensación de calor y sudoración). No se reportaron eventos de tipo sistémico. El estudio nos permitió concluir que el Dermofural en ungüento a una concentración de 0.15% no demostró tener una eficacia semejante al Ketoconazol crema al 2%, pero si un efecto antimicótico en pacientes con *Tinea pedis* escamosa y *Tinea corporis*, con una aplicación diaria durante 6 semanas de tratamiento y demostró tener una adecuada seguridad terapéutica dada la proporción de pacientes que presentaron eventos adversos.



MATERIALES Y

METODOS

3.1 Método para la recopilación de información de la incidencia de cáncer en la provincia de Villa Clara.

La fuente de obtención de los datos de la incidencia de cáncer en Villa Clara es a partir del **Registro Nacional de Cáncer**, Departamento Provincial de Estadísticas Villa Clara, para un año fiscal Enero-Diciembre durante el periodo de 6 años (1999-2004). El dato primario comprende el cálculo de las tasas anuales para una población de 10^5 habitantes para los 14 municipios de la provincia de Villa Clara (ver tabla 11 en Anexo), además se brinda el dato en porciento para que facilite la comparación. Para el cálculo de las tasas se actualiza con la oficina que atiende demografía en el Comité Estatal de Estadística de la provincia de Villa clara

El universo de la muestra es de 127 pacientes, los cuales fueron tratados con la crema de Dermofural en el Servicio de Dermatología del Hospital Provincial Universitario "Arnaldo Milián Castro" de Santa Clara, durante los ensayos clínicos Fases II y III en los años 1991 a 1992.

Las historias clínicas que se utilizan como base de dato primario para efectuar la encuesta. Se encuentran custodiadas en el archivo de seguridad de datos perteneciente a la Unidad de Garantía de la calidad (UGC) del CBQ.

3.2.1 Criterios de inclusión

- Pacientes participantes en los ensayos clínicos Fases II y III con el Dermofural para este estudio expresaron por escrito la voluntariedad de responder las preguntas previstas en la encuesta confeccionada sobre la base de las historias clínicas y posteriormente se sometieron a un examen físico dermatológico y procedieron a un examen oncológico.

3.2.2 Criterios de exclusión

- Los que negaron a participar en el estudio.
- Los que no se pudieron localizar en la dirección con que se contaba en la historia clínica.

3.2.3 Criterios de salida

Los que se presentaron cualquiera de los criterios de exclusión ya mencionados.

3.3 DISEÑO DEL ESTUDIO

Consistió en un estudio epidemiológico retrospectivo, no aleatorizado, unicéntrico que consta de tres fases o etapas.

Primera etapa o fase.

Consistió en visitar al paciente, informarle sobre la intención de realizar el estudio y obtener el consentimiento de éste a participar en el mismo. Si el paciente accedía voluntariamente a participar en el estudio se le aplicaba una encuesta cuyo objetivo era obtener información general sobre cualquier enfermedad o complicaciones presentadas con posterioridad a su participación en el ensayo clínico con el Dermofural (Fase II o Fase III). Finalmente, el encuestador indicaba al paciente a asistir a una consulta habilitada al efecto para ser sometido a un examen físico dermatológico, para lo cual le brindo' la información necesaria al respecto.

Segunda etapa o fase.

Consistió en someter los pacientes evaluados de "0" en la primera etapa a un profundo examen físico dermatológico utilizando el modelo oficial establecido al efecto por el Ministerio de Salud Pública, con el objetivo de detectar signos o síntomas compatibles o sospechosos con cualquier proceso de naturaleza oncogénica.

Los investigadores clínicos se analizaban la información histórica (documentos e historia clínica de los ensayos clínicos Fases II y III) y la información actual (resultados de la encuesta y examen físico dermatológico).

La información obtenida se evaluaba de la forma siguiente:

- 0 = Paciente que al examen físico dermatológico no presentaba signos o síntomas compatibles o sospechosos con cualquier proceso de naturaleza oncogénica.
- 1 = Paciente que al examen físico dermatológico presentaba signos o síntomas compatibles o sospechosos con cualquier proceso de naturaleza oncogénica.
- 2 = Salida del estudio debido al surgimiento de uno o más criterios de exclusión

Como resultado de lo anterior, el dermatólogo emitía un resumen de historia clínica actual.

Los pacientes evaluados de "0" concluían el estudio.

Los pacientes evaluados de "1" se remitirían a la consulta de Oncología (tercera etapa) enviándose el resumen de historia clínica confeccionado por el dermatólogo.

Tercera etapa

Consistió en someter los pacientes en el caso si había los evaluados de “1” en la segunda etapa a un minucioso examen oncológico, según se encuentra establecido por el Ministerio de Salud Pública.

El especialista indicaba las acciones que normalmente corresponden en estos casos y con respecto al Dermofural, se determinaba la relación de causalidad con el proceso oncogénico detectado.

La evaluación de la causalidad se realizaba con el auxilio de algoritmos reportados en la literatura ajustados a las características del estudio y clasificada de la forma siguiente:

3.4 RECOLECCIÓN Y MANEJO DE LOS DATOS

Validación de la encuesta aplicada.

La encuesta es validada mediante la técnica estadística Alfa de Cronbach la cual permite validar las preguntas de la encuesta con los objetivos propuestos en la investigación. Permite alcanzar tanto el objetivo general como específico del estudio, este instrumento refleja un dominio específico de contenido de lo que se mide.

$$\alpha = n. P/(n-1) P$$

Expediente del paciente

Documentos

El expediente del paciente se conformó a partir de los siguientes documentos:

- Historia Clínica (confeccionada durante el ensayo clínico con el Dermofural)
- Consentimiento Informado.
- Modelo de Encuesta.
- Calificación de la Encuesta Individual.
- Resumen de la historia clínica actual —examen físico dermatológico, resultados del examen oncológico, determinación y fundamentación de la relación de causalidad.

El expediente del paciente se inicio' con la Historia Clínica generada durante el ensayo clínico con el Dermofural. En la primera etapa del estudio se enriqueció con el consentimiento informado del paciente, el modelo de encuesta y la calificación de ésta. Posteriormente se incluyeron el resumen de la historia clínica actual en la que se registró la información que correspondió al examen físico dermatológico y su evaluación. Si era necesario, se incluía el informe de los resultados del examen oncológico y su evaluación.

3.4.1 Descripción de los documentos

Historia Clínica (confeccionada durante el ensayo clínico con el Dermofural)

Cada paciente contaba con la historia clínica confeccionada durante el ensayo clínico al cual fue sometido. La historia clínica poseía un gráfico del cuerpo humano en anverso y reverso y otras partes del cuerpo, donde se señalaron las localizaciones de las lesiones presentadas por los pacientes.

Consentimiento Informado (ver ANEXO 1.1)

Consistió en un documento mediante el cual se informaba a los pacientes las características del estudio y objetivos que se perseguían con el mismo, solicitándole su cooperación. Si el paciente accedía a participar en el estudio, se registraba su nombre y firma del paciente, un testigo y el encuestador así como las fechas correspondientes. Si el paciente no accedía, solo se registraba los datos que correspondían al encuestador.

Modelo de Encuesta (ver ANEXO 1.2)

Consistió en un modelo dividido en las siguientes secciones:

1. Historia clínica Número, nombre y apellidos del paciente, dirección postal.
2. Encuesta propiamente dicha, consistió en siete preguntas redactadas en lenguaje muy sencillo y un apartado para observaciones, en caso de ser necesarias.
3. Destinada a las firmas del paciente y el encuestador y las fechas correspondientes.

Calificación de la Encuesta Individual (ver ANEXO 1.3)

Cada encuestador, según concluía la entrevista llenaba el modelo Calificación de la Encuesta Individual, que era un complemento del modelo de encuesta. Esta operación no debía ser de conocimiento del paciente, que aceptaba o no participar en el estudio. En el modelo se registraba el resultado de la localización y voluntariedad del paciente, si procedía, la causa por que no se pudo realizar la encuesta y, finalmente, la calificación de la misma. El modelo concluía con el nombre y firma del encuestador y la fecha correspondiente. Contaba con un espacio para registrar la supervisión del Director del Estudio. En caso de que se sometía a inspección por el Dpto. de Aseguramiento de Calidad se haría constar el nombre y la firma del inspector y la fecha.

Resumen de historia clínica actual (ver ANEXO 1.4)

Consistió en un modelo en el que se registró el No. de la Historia Clínica actual y el nombre y apellidos del paciente. A continuación se exponía un resumen del examen físico dermatológico y su evaluación, el resumen de los resultados del examen oncológico y la evaluación de la relación de causalidad de la enfermedad oncogénica con el Dermofural (0, 1, 2, 3) fundamentando la misma. El modelo concluyó con el nombre y apellidos de los investigadores clínicos, firmas y fechas correspondientes.

Forma de entrega de los documentos a los encuestadores e investigadores clínicos. Flujo diario de la información.

El Director del Estudio entregaba a los encuestadores las historias clínicas confeccionadas durante el ensayo clínico con el Dermofural, acompañadas de los correspondientes documentos (Anexos 1.1, 1.2 y 1,3), ordenadas y clasificadas por barrios de la ciudad de Santa Clara y en algunos casos, por municipios, para facilitar la localización de los pacientes.

Al finalizar el día de trabajo, los encuestadores entregaba la documentación generada al Director del Estudio (expediente del paciente) y de éste se confeccionaba el Registro diario de pacientes incluidos, no incluidos y resultados de las encuestas (Anexo 2)

El expediente de cada paciente que accedía a participar en el estudio, fue entregado a los investigadores clínicos, los que enriquecían el mismo según la documentación generada durante el estudio (Anexo 1.4).

Registro diario de pacientes incluidos, no incluidos y resultados de las encuestas

Consistió en un modelo en que el Director del Estudio registraba diariamente los pacientes incluidos, no incluidos y los resultados de las encuestas realizadas correspondientes al día de trabajo) (Anexo 2). Contaba con espacios para la firma del Director del Estudio y la fecha que correspondía. Si el registro diario era inspeccionado se anotaba el nombre y firma del inspector y la fecha.

Procedimiento para conservar la información

Todos los documentos generados durante el estudio incluyendo el informe final, serán conservados durante un período de 10 años por la Unidad de Aseguramiento de Calidad del Centro Promotor. Por este mismo período de tiempo se conservará la información electrónica.

3.5 MEDIDAS PARA GARANTIZAR LA CALIDAD DE LAS ENCUESTAS

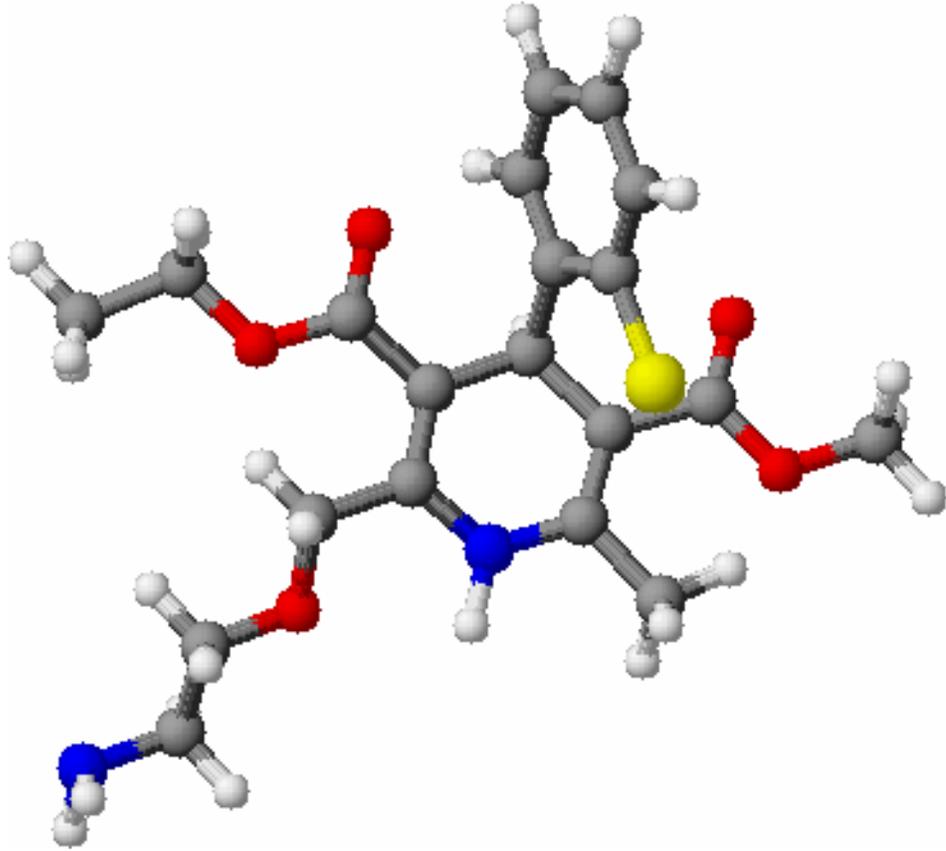
Los encuestadores eran estudiantes del 5to. Curso de la especialidad de Farmacia de la Facultad de Química-Farmacia de la Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Estos estudiantes poseían el grado de formación académica necesaria para llevar a cabo el trabajo de las entrevistas, además, de que participaron en el Taller de Unificación de Criterios y en la Reunión Previa al Inicio del Estudio, actividades que comprenden, entre otros aspectos la capacitación.

Se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

1. El encuestador llenaba el registro diario sobre los resultados de los pacientes encuestados y lo acompañaba el expediente de cada paciente entrevistado.
2. Diariamente, cada una de las encuestas concluidas fue revisada por el Director del Estudio comprobando la evaluación realizada por el encuestador.
3. La información generada se registraba inmediatamente en un sistema de base de datos creado al efecto para su posterior procesamiento estadístico.

El Director del Estudio fue el encargado del cumplimiento de lo anteriormente expuesto.

El Dpto. de Aseguramiento de Calidad del CBQ confeccionó un cronograma para controlar el cumplimiento de lo establecido en el protocolo. Al concluir el estudio, se emitirá un documento final sobre los resultados globales de los controles realizados y la evaluación final de la calidad del estudio.



RESULTADOS Y

DISCUSION

Cuando se observa un tumor no es más que un pequeño momento de la vida del proceso canceroso, el denominado periodo clínico. Este periodo, a su vez, puede ser subdividido en dos fases, una fase local, en la que el tumor se encuentra todavía localizado en las estructuras primarias afectadas, y una fase de generalización, en la que en ocasiones se produce la diseminación del tumor (aparición de metástasis), configurando lo que hemos venido a denominar "enfermedad cancerosa". Sea con una sola o con las dos sub-fases, este periodo puede ser asimilado a lo que representa la parte visible de un iceberg, que mantiene fuera de nuestra vista el periodo más largo, el que va desde la actuación de la causa hasta la emergencia clínica y que encierra el periodo precanceroso (iniciación, promoción y una parte más o menos importante de la progresión). La primera etapa del proceso de la carcinogénesis, absolutamente preclínica y en una primera etapa aún no cancerosa (precancerosa) consta de tres etapas principales, la de iniciación, promoción y progresión. No se debe dudar que es un proceso relativamente largo, que no pasa por sus estadios de una forma aguda. Es por ello que al analizar el posible efecto oncogénico de una sustancia química este debe pasar por un largo y tortuoso camino hasta demostrar su relativa seguridad.

En este sentido, se puede asegurar que existe una clara correlación positiva entre las observaciones realizadas en el hombre y los índices de carcinogenicidad en los animales, que además, a menudo han precedido a las observaciones humanas. Por ello, la observación de carcinogenicidad de una determinada sustancia en una especie animal debería, al menos, ser interpretada como una señal de atención para estudiar la adopción de medidas preventivas.

La capacidad de una sustancia de producir una neoplasia se denomina carcinogénesis. En el proceso de transformación progresiva de las células normales en células malignas, se produce la adquisición de anatomía por las

mismas, lo que es un reflejo de una regulación y expresión normal de su carga genética. Como consecuencia final se induce una neoplasia (crecimiento autónomo de un tejido o de una parte de las células del mismo) (2).

Recientemente el CECMED/Cuba aprobó a finales del año 2006 incluir en su registro de aprobación de la documentación presentada por Centro de Bioactivos Químico de la UCLV con vistas a registrar el Dermofural. Es conocido que uno del elemento toxicológico más cuestionado en la etapa de prerregistro fue el referido a la toxicología del ingrediente activo; en lo referente a su potencialidad mutagénica y cancerígena. En este sentido el órgano regulador cubano indicó, que aportar datos relacionados con el posible efecto oncogénico en los pacientes expuestos a estudios clínicos hace más de una década resultaría un elemento que avalaría la seguridad toxicológica del Dermofural. En este sentido se proyecta este estudio para dar respuesta al objetivo general que consiste en “evaluar la posible relación entre la aplicación dérmica del ingrediente farmacéutico activo del Dermofural (G-1) y el desarrollo de procesos oncogénicos en los pacientes expuestos”.

La Unidad de Aseguramiento de Calidad del CBQ, tiene bajo su custodia 127 historias clínicas de pacientes tratados en las diferentes fases preclínicas con Dermofural en los años 1991-92. De la cifra anterior, 82(64.6%) pacientes fueron localizados y conforman la muestra del presente estudio. No localizados por diferentes razones 45 (35,4%), de los cuales solo 10 (7,9%) tienen probabilidad de ser localizados y encuestados en el futuro.

Un primer aspecto, de suma importancia consistió en ubicar la incidencia de cáncer en la provincia de Villa Clara, este dato serviría de referencia para comparar nuestros resultados.

En la tabla No 1 se reflejan los resultados del análisis correspondiente a la incidencia de cáncer en la población de Santa Clara. Se selecciona este municipio puesto que todos los pacientes expuestos a los ensayos clínicos pertenecen a esta ciudad. En el análisis de incidencia de cáncer en el período 1999-2004 se aprecia que la tasa bruta anual estimada por 10^5 habitantes osciló entre los rangos 410,5 y 467,8 para los años 1999 y 2004 respectivamente. Al convertir este dato a por ciento sería 0,41% y 0,47%, lo que

representaría menos de un fallecido por cien habitantes. De lo anterior se desprende la subhipótesis, que en la muestra estudiada no se debería presentar ningún caso de cáncer que relacione la aplicación del Dermofural y la generación del mismo, de lo contrario la inocuidad del producto estudiado no se demostraría, y se convertiría en una evidencia sin valor o negativa para el mismo.

En la etapa de recopilación de información para acometer el estudio se presenta el segundo inconveniente, este relacionado con no encontrar trabajos precedentes con un enfoque semejante al que pretendíamos realizar. Esto nos condujo a elaborar un protocolo especial para demostrar de forma retrospectiva y de corte transversal el objetivo propuesto.

La primera versión del protocolo fue aprobada por la Unidad de Aseguramiento de Calidad el Consejo Científico Institucional (CCI) del CBQ, En ambos casos se sugirieron algunas modificaciones que fueron tomadas en consideración y se emitieron los correspondientes documentos de aprobación, confeccionándose entonces la Versión No. 2. (Ver anexo 5.1 la aprobación de CCI)

La Versión No. 2 fue entregada al Comité de Revisión y Ética del Hospital Universitario “Dr. Celestino Hernández Robau” el que emitió el correspondiente documento de aprobación sin recomendaciones ni modificaciones. (Ver anexo 6)

Esta Versión fue sometida a la aprobación para iniciar el estudio por la Dirección Provincial del MINSAP y una vez, aprobado éste, se celebró el Taller de Unificación de Criterios.

En el Taller de Unificación de Criterios surgieron varias recomendaciones que conllevaron a modificaciones en el protocolo, siendo necesario confeccionar la Versión No. 3, que fue sometida nuevamente al Comité de Revisión y Ética. Estas modificaciones no alteraron en nada la concepción general del estudio, por lo que este inicio, previo a una reunión de inicio en que participaron el investigador clínico principal, los estudiantes responsabilizados con las encuestas y otros participantes en el estudio.

El anexo no1 corresponde al protocolo confeccionado al efecto, la encuesta está validada por el Alfa de Crombach, por lo que la misma cumple las expectativas esperadas relacionadas con los objetivos propuestos por la investigación, esto se demuestra con el valor de 0.80 alcanzado en el cálculo del mismo.

La selección del protocolo de encuesta se fundamenta en la experiencia de encuestas aplicadas por diferentes autores para detectar la capacidad oncogénica de diferentes sustancias químicas (54,55,56,57,58). Se pudieran referir otros muchos trabajos de investigación, que en esencia su diseño experimental se aparta del objetivo perseguido en este trabajo.

El modelo de encuesta aplicado comprende 9 preguntas, estas responden en esencia los objetivos propuestos. Si a metodología de aplicación de encuesta esta cumple con los lineamientos generales que propone la literatura internacional (59, 60,61).

El anexo no 2 se muestra el listado de los 82 pacientes objeto del estudio, así como los parámetros edad, sexo, localización anatómica de la aplicación, concentración del preparado aplicado, duración de la aplicación, así como el efecto de evidencia de acción oncogénica. Al valorar el parámetro edad de los pacientes antes referidos, se aprecia que el promedio esta fue de 41 años, siendo la de más edad 70 años y solo 5 pacientes sobrepasan los 60 años. Por otra parte el mas joven de 16 años y se reportan 3 pacientes con menos de 20 años. Como se aprecia la fluctuación es bastante amplia, pero la inmensa mayoría se encuentran entre 20 y 60 años de edad. La edad es un parámetro que juega un rol importante en la incidencia de cáncer, es conocido que con la edad aumentan las probabilidades de padecer esta enfermedad. En nuestro caso somos del criterio que la edad de la muestra fue adecuada para valorar la evidencia de la posible inducción de cáncer producto a la aplicación del Dermofural.

La proporción de los pacientes en cuanto a sexo (f-53; m-29) con una proporción de 1,83 aproximadamente a favor del sexo femenino, lo que indica que la muestra no resulta desproporcionada en lo referente a este parámetro. En las condiciones de nuestra provincia la incidencia de cáncer es ligeramente superior en el sexo femenino con relación a los hombres (56).

En lo referente a la localización del área de aplicación, anexo no 6, contiene fotos de los pacientes expuestos al tratamiento, que además de mostrar la efectividad de la terapéutica se muestra el perfecto estado en que se encuentra el área donde se aplicó el preparado en el ensayo clínico. Las localizaciones principales de aplicación del preparado se ubicaron en manos, pies, cara, espalda y pecho. Los lugares de mayor frecuencia de aplicación resultaron en manos y pies con más de un 80% de los tratamientos.

En lo referente a la concentración del preparado aplicado se emplea dos concentraciones en tres variantes de tratamiento con el Dermofural al 0,125 %, 0,250% y el uso combinado de estas; con la primera concentración se trataron 60 pacientes para un 73,3 %, con la segunda concentración 13 pacientes para un 15,8% y con el uso combinado de las dos concentraciones 9 pacientes para un 10,9%. La razón de esta variación terapéutica en los diferentes ensayos clínicos de fase I y II realizados hace más de una década se debe a estrategia posológica seguida por los diseñadores de dichos estudios. En los estudios preclínicos otros autores refieren que concentraciones por debajo de 0,5% son consideradas relativamente seguras en cuanto a poder irritante del ingrediente activo (24, 25, 26,40). Los pacientes tratados durante el estudio recibieron dosis reducidas en un 75% y 50% de la dosis irritante planteadas como límite en los estudios preclínicos.

La duración promedio de la aplicación se extendió 5,9 meses (177 días), siendo la más prolongada de 19 meses y más corta de 26 días. En el caso de la exposición más prolongada es importante destacar que esta se realizó con la concentración de 0,25%, lo que constituye un caso de exposición límite, en cuanto a riesgo toxicológico para nuestro estudio. Los estudios preclínicos de mayor durabilidad realizados a esta molécula se refieren a los de toxicidad crónica durante seis meses (180 días); desarrollado en ratas Sprague Dawley aplicando el ingrediente activo en formulación aceite/acetona (v/v) 95/5 % (26, Tesis de Remigio). Como se plantea en la regulación metodológica para la

evaluación preclínica de medicamentos del ministerio de salud pública de la republica de Cuba, en su acápite de administración prolongada donde se establece un mes de aplicación en humanos, cuando los estudios preclínicos se han realizados por 6 meses (54). Como se aprecia hay violaciones del decreto antes referido pues la media del intervalo de aplicación fue de 5.9 meses y en casos particulares se extendió mucho mas allá de los 180 días.

En lo referente a la evidencia de efecto oncogénico atribuible al ingrediente activo G 1, aplicado en las diferentes variantes terapéuticas utilizadas (0,125 %, 0,250% y su combinación) no se reportó ningún caso de cáncer. Al analizar este resultado es necesario resaltar que indiscutiblemente la muestra resulta relativamente pequeña desde el punto de vista estadístico, puesto que las tasas de incidencia histórica reportada para el período 1999-2004 es 433,25 por 10⁵ habitante, lo anterior indica que por 231 habitante se presenta un caso de cáncer según la epidemiología de esta enfermedad en Santa Clara. La muestra empleada en nuestro trabajo se encuentra muy por debajo de esta cifra, es importante seguir controlando este aspecto en estudios Farmacoepidemiológicos y de Toxicovigilancia. Particularmente recomendamos los segundos para seguir de forma diferenciada la problemática de la acción oncogénica de esta molécula.

La molécula G-1, se considera una molécula bien evaluada desde el punto de vista mutagénico, según los requerimientos planteados por las agencias regulatorias de varios países y más recientemente definida en las Conferencias de Armonización de Requerimientos Técnicos para el Registro de Sustancias Farmacéuticas para uso en Humanos (55,56,57).

Los resultados obtenidos en los estudios genotoxicológicos permiten afirmar que el G-1 se clasifica en el nivel de interés LOC I (de menor riesgo) como un compuesto capaz de interactuar con el ADN bajo ciertas condiciones *in vitro* (mutágeno *in vitro*) pero sin evidenciar genotoxicidad *in vivo*. Puede asumirse que existen fuertes evidencias de que el riesgo genotóxico para el uso en el hombre es poco probable (7, 8, 10,11). En este punto nos encontramos ante un compuesto con respuestas positivas y negativas en los ensayos *in vitro* que lo eleva del nivel de interés I (LOC I) al nivel de interés II (LOC II) y se considera

como un genotóxico *in Vitro*. Por lo anterior se hizo necesario acudir otros ensayos *in vivo* en tejidos diferentes a la médula ósea o sangre. Una segunda etapa de evaluaciones se efectuó a través de un conjunto de ensayos conducidos por investigadores de centros de investigación en Cuba (CENPALAB) (33, 34, 35,36).

Los resultados negativos en los 4 primeros ensayos confirman la no clastogenicidad del producto *in vivo*. Los resultados del tercer y cuarto ensayos evidencian la no interacción del G-1 a nivel de las gónadas, y el quinto ensayo proporciona información acerca de la no inducción de genotoxicidad *in vivo* en otro punto final de acción genotóxica.

Los estudios de genotoxicidad fueron sometidos en su integralidad criterio de reconocidos especialistas en la materia (French IW. Presidente de la firma IWF CONSULTING SERVICES, Ontario, Canadá; Binnie Craig, de la firma York Medical Inc., de Canadá y Marcos Ricardo. Catedrático de Genética y Coordinador del Grupo de Mutagénesis de la Universidad Autónoma de Barcelona reconociéndose por los mismos una alta seguridad genotóxica (14,20). En los casos anteriores se llegó a la conclusión que los estudios son suficientes y que el ingrediente activo puede emplearse en la terapéutica pues es positivo a técnicas de mutagénesis *in vitro*, pero las *in vivo* resultaron negativas. Como concepto integral este aspecto permite no vetar la molécula con fines terapéuticos.

Es conocido que el planteamiento de genotoxicidad para estudios *in vitro*, conjuntamente con las características estructurales de la molécula ha influido en el concepto toxicológico relacionado con la aprobación del registro del Dermofural. Por otra parte los estudios que hemos concluido en este trabajo no han dado evidencia de la peligrosidad de este producto. Es importante que la muestra es muy reducida en lo que a estudio epidemiológico se refiere, pero sin dudas es un elemento más a valorar en el criterio integral que se tenga sobre esta molécula en general y el Dermofural en particular.

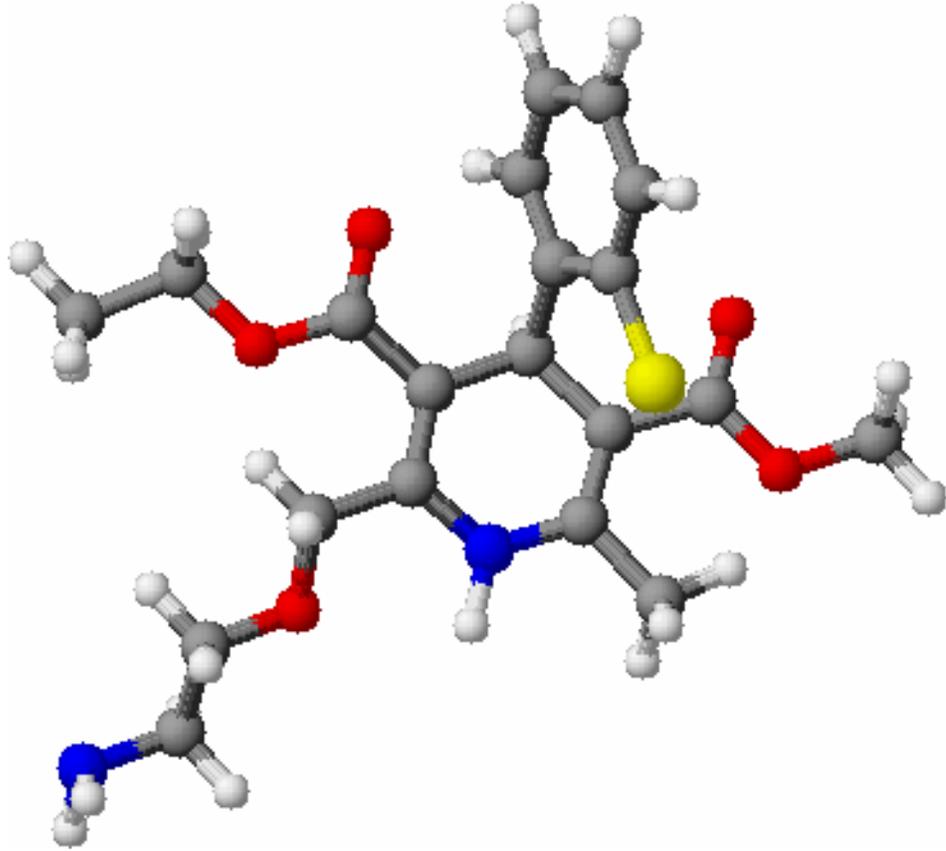
NB: Ver (anexo 6) imagines de los pacientes tratados por el Dermofural

Hasta la fecha de la exposición del presente Trabajo de Diploma, los resultados obtenidos en las tres etapas o fases en que se organizó el estudio son los siguientes:

Pacientes que asistieron a la consulta de Dermatología y fueron evaluados de 0	82	64,6%
Pacientes que asistieron a la consulta de Dermatología y fueron evaluados de 1	0	0

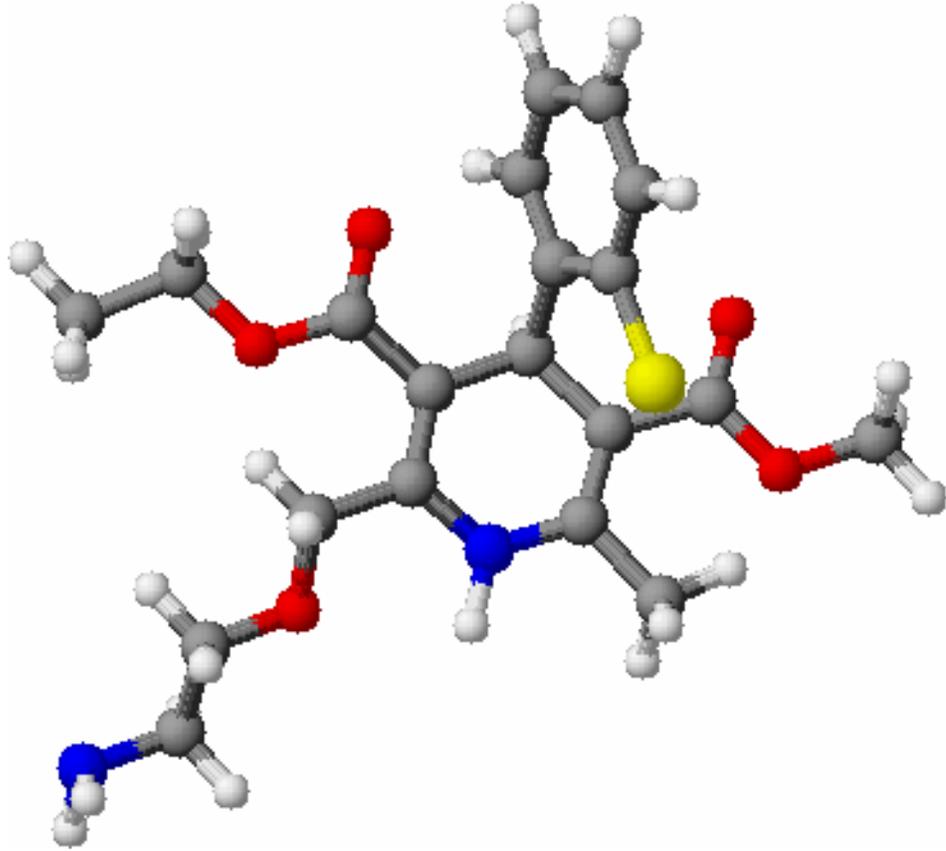
- 0 = Paciente que al examen físico dermatológico no presenta signos o síntomas compatibles o sospechosos con cualquier proceso de naturaleza oncogénica.
- 1 = Paciente que al examen físico dermatológico presenta signos o síntomas compatibles o sospechosos con cualquier proceso de naturaleza oncogénica.
- 2 = Salida del estudio debido al surgimiento de uno o más criterios de exclusión

-
- La muestra total de pacientes que fueron sometidos a la fase Clínica I y II con el Dermofural durante los años 1991 y 1992 es de 127 pacientes, de los cuales el 64,6% de ellos fueron localizados nuevamente con vista al presente estudio.
 - La encuesta confeccionada responde a un diseño novedoso del autor, puesto que en la literatura no se localizó un estudio con un diseño para acción carcinogénica en fases de estudiosos clínicos I y II, y que resuelva un problema científico semejante al abordado en este estudio. La encuesta (anexo 1.2) permite establecer la relación de causalidad entre la aplicación de G-1 e incidencia de cáncer en los pacientes tratados.
 - Los 82 pacientes encuestados mostraron los siguientes resultados para los parámetros edad promedio 41 años, sexo masculino 29 y femenino 53, la localización del área de aplicación muestra que el 80% de los encuestados se les aplicó el Dermofural en manos y pies.
 - El preparado se aplicó en dos concentraciones y en tres variantes de tratamiento con el Dermofural al 0,125 %, 0,250% y el uso combinado de estas; con la primera concentración se trataron 60 pacientes para un 73,3 %, con la segunda concentración 13 pacientes para un 15,8% y con el uso combinado de las dos concentraciones 9 pacientes para 10,9%.
 - La duración promedio de la aplicación se extendió 5,9 meses (177 días), siendo la más prolongada de 19 meses y la más corta de 26 días.
 - No se reportaron evidencias de relación causal entre el empleo del Dermofural y la aparición de procesos oncogénicos en los pacientes sometidos a ensayo clínico fase I y II en los años 1991-92.



RECOMENDACIONES

- 1- Aplicar esta encuesta a todos los pacientes sometidos a estudios clínicos en cualquiera de sus fases y tipo de formulación para aumentar la muestra y el criterio de evaluación.
- 2- Realizar un estudio piloto con todos los trabajadores de CBQ, y que en base a su calificador ocupacional han estado expuestos al Ingrediente Activo G-1.



REFERENCIAS

BIBLIOGRAFICAS

- 1- Huff J. (1999). Long-term chemical carcinogenesis bioassays predict human cancer hazards. Issues, controversies, and uncertainties. *Annals of the New York Academy of Sciences* **895**, 56–79.
- 2- Wilbourn, J., Haroun, L., Heseltine, E., Kaldor, J., Partensky, C. & Vainio, H. (1986). Response of experimental animals to human carcinogens: an analysis based upon the *IARC Monographs Programme*. *Carcinogenesis* **7**, 1853–1863.
- 3- Rall, D.P. (2000). Laboratory animal tests and human cancer. *Drug Metabolism Reviews* **2**, 119–128.
- 4- Gold, L.S., Manley, N.B., Slone, T.H., Rohrbach, L. & Garfinkel, G.B. (2005). Supplement to the Carcinogenic Potency Database (CPDB): results of animal bioassays published in the general literature through 1997 and by the National Toxicology Program in 1997–1998. *Toxicological Sciences* **85**, 747–808.
- 5- Greek, C.R. & Greek, J.S. (2000). *Sacred Cows and Golden Geese: The Human Costs of Experiments on Animals*. 242pp. New York, NY, USA: Continuum International.
- 6- Pound, P., Ebrahim, S., Sandercock, P., Bracken, M.B. & Roberts, I. (2004). Where is the evidence that animal research benefits humans? Much animal research into potential treatments for humans is wasted because it is poorly conducted and not evaluated through systematic reviews. *British Medical Journal* **328**, 514–517.
- 7- Anon. (2004). US Environmental Protection Agency. Website <http://www.epa.gov>.
- 8- Anon. (2003). *U.S. EPA's Process for IRIS Assessment Development and Review*. Website <http://www.epa.gov/iris/process.htm>
- 9- Anon. (2004). *What is IRIS?* Website <http://www.epa.gov/iris/intro.htm>
- 10- Anon. (1999). *Objective and Scope*. IARC 7 Dec. 1999. Website <http://www.cie.iarc.fr/monoeval/objectives.htm>.
- 11- Anon. (2005). *Guidelines for Carcinogen Risk Assessment*. EPA/630/P-03/001B. Washington DC, USA: Risk Assessment Forum, U.S. Environmental Protection Agency. Website <http://www.epa.gov/iris/backgrd.htm>.

12- Ennever, F.K. & Lave, L.B. (2003). Implications of the lack of accuracy of the lifetime rodent bioassay for predicting human carcinogenicity. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **38**, 52–57.

13- Johnson, F.M. (2001). Response to Tennant *et al.*: attempts to replace the NTP rodent bioassay with transgenic alternatives are unlikely to succeed. *Environmental Molecular Mutagenesis* **37**, 89–92.

14-De Los Santos CE. Guía Básica para el Tratamiento del Paciente Quemado. Publicado en 1999. Segunda edición, electrónica [E-Libro], Ed. Cyberlibro, España, 2001-2002.

15-Gómez, Martha; De la Paz, Nilia; Morales I.G; Barizonte, Caridad. G-1 0.15% ungüento. Informe tecnológico. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). C. de La Habana. 1999.

16-González O, Silveira EA, Medina R, Machado R, Delgado MS, Castañedo NR, et al. Mínima concentración inhibitoria del G-1 frente a bacterias y levaduras del género *Candida*. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central “Marta Abreu”. Las Villas, 1994.

17-González O, Silveira EA, Conde N, Rodríguez MA, Castañedo NR, Estrada A, et al. Actividad antimicrobiana del 1-(5-bromo-fur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1). Queratofural, ungüento oftálmico de uso Veterinario. Registro Nacional de Medicamentos Veterinarios No. 211. La Habana, Ministerio de la Agricultura, 1993.

18-Blondeau JM, Castañedo N, González Oraida, Medina R, Silveira E. In vitro evaluation G1: A novel antimicrobial compound. Final Report. Royal University Hospital, Saskatoon, Saskatchewan, Canada. 1998.

19-Jorge Elisa, Jiménez Ibis, Bravo LR, Díaz Mirta, Diduk Natalia, Morales S, Calvo Amalia M, Estudios de estabilidad de la materia prima para medicamentos. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas. Santa Clara. Cuba. 2003.

20-Dalton Chemical Laboratories Inc. Estudio de estabilidad de las muestras producidas en 1992. Informe no publicado. Toronto. Canadá. 1999.

21-Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. CIDEM. G-1 0.15% en base oleosa. Estudio de estabilidad. Comunicación parcial. C. Habana. 1999.

22-Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos. CIDEM. G-1 0.15% en base oleosa. Especificaciones de los índices de calidad. C. Habana. 1999.

23-Foldvari Marianna. In vitro cutaneous and percutaneous absorption of G1 (0.15% w/w) through human skin from topical vehicles. Final Report. PharmaDerm Laboratories Ltd. Saskatoon, Saskatchewan, Canada. 1998.

24-Pérez JA, Cortés RR, Pérez IA, Reiner Teresita, Morales A. DL₅₀ del producto G-1 administrado por las vías oral y percutánea en ratones de la línea OF 1. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba. 2003.

25-Pérez JA, Cortés RR, Pérez IA, Reiner Teresita, Morales A. DL₅₀ del producto G-1 administrado por las vías oral y percutánea en ratas de la línea Sprague Dawley. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba. 2003.

26-Pérez JA, Cortés RR, Reiner Teresita, Romero Delina, Silveira EA, Sosa R, Cárdenas E, Morales A, Trimiño Caridad, Hurtado, Matilde. Efecto de la aplicación tópica del G-1 en petrolato blanco durante 60 días en ratas. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba. 2003.

27-Pérez JA, Cortés RR, Pérez IA, Marrero O, Reiner Teresita, Romero Delina, Hurtado Matilde, Morales A, Rodríguez C, Silveira EA, Norman, O. Efecto de la aplicación tópica del G-1 en solución aceite-acetona durante 180 días en ratas. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba. 2003.

28-García Marisabel B, Prado L, Silveira EA, Sarasa Nélica. Indicadores morfométricos de la acción sobre la piel del 2-bromo-5-(2-bromo-2-nitrovinil)-furano REDVET Vol. IV No. 12. Diciembre 2003.
<http://www.veterinaria.org/revistas/redvet/n121203.html>

29-Pant KJ. Evaluation of a test article in the *Salmonella typhimurium/Escherichia coli* plate incorporation mutation assay in the presence and absence of Aroclor-induced rat liver S-9 with a confirmatory study. Final Report. Sitek Research Laboratories. Rockville, Maryland, EE.UU. 1996.

30-Xu J. Test for chemical induction of chromosome aberration in cultured chinese hamster ovary (CHO) cells with and without metabolic activation. Final Report. Sitek Research Laboratories. Rockville, Maryland, EE.UU. 1996.

31-Pant KJ. Evaluation of a test article in the I5178y+/- mouse lymphoma mutagenesis assay with colony size evaluation in the presence and absence of Aroclor-induced rat liver S-9. Final Report. Sitek Research Laboratories. Rockville, Maryland, EE.UU. 1996.

32-Xu J. *In vivo* test for chemical induction of micronucleated polychromatic erythrocytes in mouse bone marrow cells. Final Report. Sitek Research Laboratories. Rockville, Maryland, EE.UU. 1996.

33-Carballo N, Montero Antonia R, Pérez Gladys, Fernández Nidia. Ensayo de micronúcleos en la médula ósea del ratón CEMP: NMRI. Centro de Toxicología y Experimentación Animal (CETEX). Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Informe Final. La Habana. Cuba. 1997.

34-Carballo N, Fernández Nidia, Pérez Gladys. Análisis citogenético de médula ósea en rata CEMP: SPRD. Centro de Toxicología y Experimentación Animal (CETEX). Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Informe Final. La Habana. Cuba. 1997.

35-Carballo N, Fernández Nidia, Pérez Gladys. Análisis citogenético de las células germinativas del ratón CENP: NMRI. Centro de Toxicología y Experimentación Animal (CETEX). Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Informe Final. La Habana. Cuba. 1997.

36-Carballo N, Pérez Gladys, Fernández Nidia, Montero Antonia R. Ensayo de anomalías de la cabeza del espermatozoide del ratón CENP:NMRI. Centro de Toxicología y Experimentación Animal (CETEX). Centro Nacional para la Producción de Animales de Laboratorio (CENPALAB). Informe Final. La Habana. Cuba. 1997.

37-Pérez Giselle, Saínez Osaida, González JI. Evaluación *in vivo* del potencial del G-1 para inducir reticulocitos micronucleados en sangre periférica de ratón. Informe Final. Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Centro de Toxicología Experimental. Instituto Superior de Ciencias Médicas de Villa Clara. Santa Clara. Cuba. 1997.

38-Pucay K, Niarchos Faye, Kenthol Aldona, Walker Anne, Taylor S, Illes Susan, Kulasothy K, Mihalcea E. Skin sensitization study in guinea pigs (Maximization Test) of G-1 ointment, 0,15% WPMO. Project No. 57640. Final Report. Nucro-Technics, Scarborough, Ontario, Canada. 1998.

39-Vega Raiza, Guerra Isabel. Evaluación del potencial irritante dérmico del Dermofural 0.15% ungüento. Informe técnico. Centro de Investigación y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM). C. de La Habana. Cuba. 1999.

40-Tenorio Esvieta, Cotado Concepción, Pérez JA. irritabilidad oftálmica iterativa del 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno (G-1) en petrolato líquido-sólido. . Centro de Bioactivos Químicos. Universidad Central "Marta Abreu" de Las Villas. Santa Clara. Cuba. 2003.

41-Evaluación del Dermofural en pacientes portadores de Tinea corporis y Tinea pedis escamosa. Centro Nacional Coordinador de Ensayos Clínicos. Centro de Bioactivos Químicos. Informe Final. Abril 2003.

42-Comber, M.H., Walker, J.D., Watts, C. & Hermens, J. (2003). Quantitative structure-activity relationships for predicting potential ecological hazard of organic chemicals for use in regulatory risk assessments. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**, 46 A. Knight *et al.*

43- Hogan, K.A. (2000). Characterization of Data Variability and Uncertainty: Health Effects Assessments in the Integrated Risk Information System (IRIS). EPA/635/R-00/005A. 12pp. National Center for Environmental Assessment, Washington DC, USA: Environmental Protection Agency, Office of Research and Development.

44- Haseman, K. (2000). Using the NTP database to assess the value of rodent carcinogenicity studies for determining human cancer risk. *Drug Metabolism Reviews* **32**, 169–186.

45-Cannon, R.E. (2003). The Tg.AC mouse model passes test by failing to respond. *Toxicological Sciences* **74**, 233–234.

46-Combes, R., Schechtman, L., Stokes, W.S. & Blakey, D. (2002). The international symposium on regulatory testing and animal welfare: recommendations on best scientific practices for subchronic/chronic toxicity and carcinogenicity testing. *ILAR Journal* **43**, Suppl. 1, 112–117.

47-Cohen, S.M. (2001). Alternative models for carcinogenicity testing: weight of evidence evaluations across models. *Toxicologic Pathology* **29**, Suppl. 1, 183–190.

48-McClain, R.M., Keller, D., Casciano, D., Fu, P., MacDonald, J., Popp, J. & Sagartz, J. (2001). Neonatal mouse model: review of methods and results. *Toxicologic Pathology* **29**, Suppl. 1, 128–137.

49- Davies, T.S., Lynch, B.S., Monro, A.M., Munro, I.C. & Nestmann, E.R. (2000). Rodent carcinogenicity tests need be no longer than 18 months: an analysis based on 210 chemicals in the IARC Monographs. *Food and Chemical Toxicology* **38**, 219–235.

50- Cronin, M.T., Dearden, J.C., Walker, J.D. & Worth, A.P. (2003). Quantitative structure-activity relationships for human health effects: commonalities with other endpoints. *Environmental Toxicology and Chemistry* **22**, 1829–1843.

51-Kirkland, D., Aardema, M., Henderson, L. & Muller, L. (2005). Evaluation of the ability of a battery of three *in vitro* genotoxicity tests to discriminate rodent

carcinogens and non-carcinogens I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. *Mutation Research* **584**, 1–256.

52-Osterberg, R.E. (2001). ICH approaches to reducing Alternatives to the animal carcinogenicity bioassay 47 animal use. In *TestSmart–Pharmaceuticals: An Efficient and Humane Approach to Predictors of Potential Toxic effects of Drugs*, held in Baltimore, Maryland, May 7–9, 2001. Baltimore, Maryland, USA: The Center for Alternatives to Animal Testing.

Website <http://caat.jhsph.edu/programs/workshops/testsmart/pharm/osterberg.htm> (Accessed 13.01.05).

53-Knight, A., Bailey, J. & Balcombe, J. (2006). Animal carcinogenicity tests: 2. obstacles to extrapolation of data to humans. *ATLA* **34**, 29–38.

54-Regulación no 39/2004 principios de las buenas practicas de laboratorio no clínicas de seguridad y medio ambiente .

53-Camacho L, Berniger M.: Haciendo Avanzar nuevos medicamentos de “la mesa de trabajo al paciente y viceversa”. *OncoLog*, diciembre 2005, vol.50, No12.

54-Puentes N, Clark G, Solares JC, Cereno M.: Tumores de mama, una preocupación para la salud. *Rev. Cubana. Enfermería*. Vol.18 n 3. Ciudad de la Habana. Sep-dic. 2002.

55-Martínez I, ; Prevención del cáncer. *Rev. cubana oncol*. 1999; 9(1): 46-47.

56-Cuba, Ministerio de Salud Pública. Programa nacional de diagnóstico precoz de cáncer bucal, la habana: Ed. Ciencias Médicas. 2000 pp 2.

57-OPS/OMS. Participación social en los Sistemas Locales de Salud.

Washington, 1987: (Serie Desarrollo de Servicios de Salud; No. 35).

58-Ilizástigui F. Elaboración y diseño del nuevo plan de estudio de Medicina. En: *Educación médica y salud de la población*. Folleto ISCM, 1993:39-72.

59-Sánchez L, Martínez S. Importancia de la asignatura Sociedad y Salud en la formación del médico general básico. *Educ Med Sup* 1992;6(2):47-52.

60-Sánchez L, Martínez S. Superación profesoral para la enseñanza de higiene y epidemiología en pregrado. *Educ Med Sup* 1993;7(2):75-84.

61-Mazariegos A. et al. Capacitación de médicos en epidemiología. Una experiencia en los servicios. *Rev Educ Med Salud* 1994;28(4):545-56.

Anexos :

Tabla 11: Numero de habitantes de la provincia de Villa Clara por municipio y año

año municip	1999	2000	2001	2002	2003	2004
Corralillo	27674	27779	27839	27661	27661	27297
Quemado de Guines	23965	23946	24009	23949	23949	23803
Sagua	61279	61100	61048	61129	61129	60590
Encrucijada	35879	35904	35963	35932	35932	35777
Camajuaní	64067	64212	64238	64360	64360	64167
Caibarién	40825	40721	40755	40764	40764	40845
Remedios	49192	49154	49166	49181	49181	48871
Placetas	74444	74438	74273	74087	74087	73640
Santa Clara	226330	227349	228987	231394	231394	232346
Cifuentes	36147	36071	35994	36077	36077	35869
Santo Domingo	55675	55753	55826	55886	55886	55512
Ranchuelo	63993	63957	63772	63538	63538	63039
Manicaragua	74452	74689	75087	75143	75143	74415
Total	833922	835073	836957	839101	839101	836171

Tabla 12: Incidencia de cáncer para el municipio de Santa Clara en el periodo 1999 - 2004

año	1999	2000	2001	2002	2003	2004
No de casos	929	1013	1005	950	986	1087

Tasa bruta	410,5	445,6	438,9	410,6	426,1	467,8
%	0,41	0,45	0,44	0,41	0,43	0,47

Tabla 13.

Clasificación de la relación de causalidad		
0	Remota	No existía relación entre el evento clínico y el producto en investigación.
1	Posible	El evento clínico tenía una relación temporal razonable con el producto, pero que también podría ser explicado por otras causas.
2	Probable	El evento clínico tenía una relación temporal razonable con el medicamento y era improbable que sea explicado por otras causas.
3	Muy probable	El evento clínico tenía una relación temporal creíble con el producto y no se puede explicar por otras causas.

Tabla 14: Incidencia de Cáncer en el municipio de Santa Clara.

Año	1999	2000	2001	2002	2003	2004
No. de casos	929	1013	1005	950	986	1087
Tasa bruta	410,5	445,6	438,9	410,6	426,1	467,8
Población	226330	227349	228987	231394	231394	232346
%	0,41	0,45	0,44	0,41	0,43	0,47

Nota: Tasa x 100 000 habitantes

Tasa = $\frac{\text{No Casos}}{\text{Total de Población}} \cdot 100\ 000$

Tabla 15: Pacientes participantes en el estudio durante la Fase I y II

Pacientes H.C	Edad	Sex	Color	Tiempo evolucion	Localización	Estado	Concentración	Duración	Eficacia
005	63	F	B	5-10Años	mano	cronic	0,125%	174d	(0)
009	44	M	B	1-3mes	pies	cronic	0,125%	90d	(0)
012	45	F	B	5-10Años	pies	cronic	0,125%	112d	(0)
013	54	M	N	1-3mes	pies	agudo	0,124%	45d	(0)

017	50	M	B	1-3mes	cara	agudo	0,125%	34d	(0)
018	42	F	B	1-5años	pies	cronic	0,125%	136d	(0)
019	65	F	B	+10años	manos	cronic	0,125%	351d	(0)
021	45	F	B	1-5años	pies	agudo	0,125%	38d	(0)
027	48	F	B	+10años	brazo	subag	0,125%	58d	(0)
028	50	M	N	35años	pies	cronic	0,125%	250d	(0)
031	15	F	B	6-9mes	mano	agudo	0,125%	24d	(0)
036	47	F	B	+10años	pies y pie	subag	0,125%	163d	(0)
037	34	F	B	1-5años	manos	cronic	0,125	154	(0)
038	30	M	B	3-6mes	pies	subag	0,125%	175d	(0)
039	53	F	B	1-5años	pies	cronic	0,125%	58d	(0)
041	47	F	B	1-3mes	pies	subag	0,125%	88d	(0)
043	39	F	B	+10años	pies	subag	0,125%	111d	(0)
042	18	M	B	1-5años	cara	cronic	0,125%	70d	(0)
045	54	M	B	+10años	pies	cronic	0,125%	92d	(0)
046	45	F	B	1-5años	pies	subag	0,125%	159d	(0)
047	50	M	B	28años	manos	cronic	0,125%	70d	(0)
051	39	F	B	1-5años	manos	cronic	0,125%	45d	(0)
052	35	F	B	5-10años	manos	cronic	0,125%	510d	(0)
053	50	F	N	1-5años	pies	cronic	0,125%	15d	(0)
056	46	M	B	1-3mes	pies	aguda	0,125	22d	(0)
057	27	F	B	1-5años	manos	cronic	0,125%	77d	(0)
059	52	M	B	1-5años	pies	subag	0,125%	510d	(0)
060	43	F	B	1-5años	pies	cronic	0,125%	126d	(0)
061	47	F	B	1-5años	pies	subag	0,125%	132d	(0)
068	35	F	B	1-5años	pies	cronic	0,125%	71d	(0)
072	65	F	B	1-5años	manos	subag	0,125%	27d	(0)
075	40	M	N	+10años	manos y pies	cronic	0,125%	118d	(0)
076	18	F	B	+10años	manos	cronic	0,125%	61d	(0)
079	60	F	B	1-5años	manos	cronic	0,125%, 0,250%	201d	(0)
077	31	F	B	1-5años	uñas	cronic	0,250%	298d	(0)
006	50	F	B	5-10años	uñas	cronic	0,250%	27d	(0)
001	39	F	B	1-5años	pies	cronic	0,125%0 ,250%	240d	(0)
002	40	M	B	+20años	manos y pies	cronic	0,125%	253d	(0)
003	49	M	B	+5años	manos	cronic	0,125%	60d	(0)
004	55	M	N	+5años	pies	subag	0,125%	90d	(0)
007	48	F	B	1-5años	uñas	cronic	0,125%	156	(0)
008	50	F	B	+5años	uñas	cronic	0,250%	196	(0)
010	62	F	N	+5años	pies	cronic	0,125% 0,250%	252d	(0)

011	20	F	B	1año	pie	agudo	0,125%	18d	(0)
014	35	F	B	1-5años	pies	subag	0,125%	203d	(0)
015	49	F	N	5-10años	uñas	cronic	0,250%	231d	(0)
016	44	F	B	1año	pie	subag	0,125% 0,250%	95d	(0)
020	29	F	B	1año	mano	agudo	0,125%	12d	(0)
022	49	F	N	+5años	pies	subag	0,125%	177d	(0)
023	35	M	B	+5años	manos	cronic	0,125%	130d	(0)
025	56	M	B	1-5años	pies	cronic	0,125% 0,250%	499d	(0)
026	39	F	B	1-5años	manos	cronic	0,250%	73d	(0)
029	35	M	B	1año	pies	agudo	0,125%	46d	(0)
030	47	F	B	1-5años	pies	cronic	0,125%	357d	(0)
032	31	M	B	+5años	pies	agudo	0,125%	150d	(0)
033	44	F	B	1año	pies	subag	0,125%	20d	(0)
034	70	F	B	+5años	pies	cronic	0,250%	570d	(0)
035	56	F	B	1año	pies	cronic	0,250%	300d	(0)
040	70	M	B	1año	cara	subag	0,125%	150d	(0)
044	52	M	B	1año	pies	subag	0,125%	30d	(0)
048	47	M	B	1-5años	cara	agudo	0,125%	128d	(0)
049	39	F	B	1año	manos	cronic	0,125%	282d	(0)
050	45	F	B	1año	pie	cronic	0,125% 0,250%	194d	(0)
054	54	F	B	1año	manos	cronic	0,250%	73d	(0)
055	37	F	B	1año	brazo	subag	0,125%	240	(0)
058	55	F	B	1año	manos	cronic	0,125% 0,250%	63d	(0)
062	49	M	B	1año	pie	subag	0,125%	318d	(0)
063	28	M	B	1año	mano	cronic	0,125%	246d	(0)
064	27	F	N	1año	manos	cronic	0,250%	500d	(0)
066	39	F	B	20años	mama	subag	0,125%	180d	(0)
067	32	F	B	+5años	pubis	cronic	0,250% 0,125%	70d	(0)
069	47	F	B	+5años	manos	cronic	0,250%	450d	(1)
070	42	F	B	1-5años	manos	cronic	0,125%	350d	(0)
071	25	M	B	+5años	brazo	cronic	0,125%	86d	(0)
073	29	F	B	+5años	manoy pie	cronic	0,125%	188d	(0)
074	23	M	B	1año	brazo abdo	subag	0,125%	150d	(0)
078	46	F	N	1-5años	manos y pies	cronic	0,125%	220d	(0)
080	42	M	B	1año	pierna	agudo	0,125%	130d	(0)
024	30	F	B	1año	manos	subag	0,125%	180	(0)
079	27	M	B	1-5años	manos	cronic	0,125%	210d	(0)

					pies		0,250%		
081	34	F	B	1año	manos	subag	0,125%	60d	(0)
082	42	F	B	1año	manos	aguda	0,125%	30d	(0)

Tabla 16: RESULTADOS ACTUALIZADOS DEL ESTUDIO EPIDEMIOLOGICO

	n	%
Aceptó y asistió a la consulta de Dermatología	82	64.6
Aceptó pero no ha asistido a la consulta de Dermatología	0	0.0
Aceptó pero no ha asistido a la consulta de Dermatología y se le imposibilita asistir	0	0.0
No aceptó. No recuerda haber utilizado el medicamento	1	0.8
No aceptó. No quiere participar en el estudio	1	0.8
No se localizó. Cambio a domicilio desconocido o error en la información	16	12.6
No se localizó. Cambio a domicilio fuera de la provincia	3	2.4
Se localizó el paciente pero éste se encuentra en el extranjero	13	10.2
Se localizó el paciente pero no se pudo contactar con él	3	2.4
Se localizó la dirección del paciente pero este falleció	3	2.4
Paciente aún no visitado por encuestador	5	3.9
Total	127	100.0

ANEXO 1. EXPEDIENTE DEL PACIENTE

1.1 Consentimiento Informado

Entre 1991 y 1993 usted formó parte de un ensayo clínico durante el cual usó la crema denominada Dermofural producida por el Centro de Bioactivos Químicos (CBQ) para el tratamiento de una enfermedad infecciosa de la piel. El CBQ y el Ministerio de Salud Pública de Cuba (MINSAP) han diseñado el presente estudio titulado “**Estudio epidemiológico en pacientes de la provincia de Villa Clara sometidos a los Ensayos Clínicos Multicéntricos Fases II y III Evaluación Clínica del Dermofural en base crema**” para obtener mayor información acerca de este producto.

¿Por qué se realiza este estudio?

La intención es conocer si el Dermofural provocó cualquier efecto o alteración perjudicial a los pacientes tratados en el tiempo transcurrido después de finalizado dicho tratamiento. Esta información es de vital importancia para el futuro desarrollo del medicamento y su aplicación a otros pacientes con este tipo de enfermedad.

¿Qué pacientes participarán?

Todos los pacientes que hayan recibido tratamiento con el Dermofural en los Ensayos Clínicos Fases II y III realizados en el Hospital Universitario “Arnaldo Milián Castro” que residan en el país y que estén en disposición de ofrecer la información que se solicita y someterse a los exámenes necesarios. Se excluirán los pacientes que no puedan ser localizados o que se nieguen a participar en el estudio.

¿En qué consiste la investigación?

Si usted consiente en participar en el estudio deberá responder una serie de preguntas como parte de una encuesta que ha sido diseñada con el fin de conocer los problemas de salud que usted haya presentado en cualquier momento después de haber utilizado el Dermofural. Luego deberá asistir a una consulta en la cual un dermatólogo le realizará un examen físico dermatológico para saber si presenta alguna lesión en la piel.

Si usted tiene alguna enfermedad oncológica o sospechosa de ser oncológica deberá ser consultado por un especialista en esta materia que analizará su caso y valorará si esta enfermedad ha sido consecuencia del uso del Dermofural o no.

¿Qué beneficios puedo obtener con mi participación en esta investigación?

Al participar en esta investigación se le realizará un examen físico minucioso desde el punto de vista dermatológico y se le harán otros tipos de análisis en caso de que su caso lo requiera por lo que podrán detectarse y/o prevenirse problemas de salud que no le hayan sido diagnosticados anteriormente.

Además con los datos que se obtendrán en esta investigación se ampliará la información disponible con respecto al Dermofural lo que contribuirá a que este medicamento pueda ser usado por cualquier paciente que presente enfermedades infecciosas de la piel.

¿Existirá confidencialidad en el manejo de todo lo referente a mi persona?

Toda la información referida a usted, aunque puede ser revisada por otros investigadores, autoridades hospitalarias y regulatorias estatales o quienes estas designen, no se hará pública en ningún caso. Su identidad no será revelada en ninguna publicación científica.

¿Cuáles son mis derechos como participante?

Su participación en el estudio es totalmente voluntaria. La información que se recoge en este modelo usted puede consultarla con familiares y amigos antes de dar su consentimiento de participación. Igualmente el modelo deberá ser firmado por un testigo que dará fe de que usted no ha sido manipulado para la obtención de su aprobación.

Usted debe recibir una copia de este modelo para consultarlo cada vez que desee. Además puede hacer todas las preguntas que desee respecto al estudio y debe recibir periódicamente información acerca de la evolución de la investigación y los resultados de la misma.

Usted puede negarse a participar en el estudio sin que ello traiga consecuencias desfavorables para su persona. También puede abandonar el mismo cuando desee, sin dar explicaciones por ello, y sin afectar los cuidados posteriores que deba recibir.

¿A quién puedo dirigirme para información adicional, consultar problemas, etc.?

En caso de que desee información adicional o tenga cualquier inquietud puede dirigirse a:

- ◆ Dr. Enrique Silveira Prado – Jefe de Registros y Ensayos Clínicos CBQ – Teléfono 28 1473.
- ◆ Dra. Estela Lugo Fariña – Especialista en Dermatología Hospital Pediátrico “José Luis Miranda” – Teléfono 27 2013.

Si usted decide participar en el estudio entonces dará fe, mediante la firma del presente modelo, de que se le ha ofrecido suficiente información tanto oral como escrita y que la ha comprendido, y que no ha sido coaccionado para la firma del presente documento.

Nombre y apellidos del paciente _____ Firma |__|__|/|__|__|/|__|__|
Fecha (Día/Mes/Año)

Nombre y apellidos del testigo _____ Firma |__|__|/|__|__|/|__|__|
Fecha (Día/Mes/Año)

Nombre y apellidos del encuestador _____ Firma |__|__|/|__|__|/|__|__|
Fecha (Día/Mes/Año)

1.2 Modelo de Encuesta

Historia _ _ _ _	clínica:	Paciente:
Dirección:	Barrio o Reparto:	Municipio:

1. ¿Después de finalizado el tratamiento presentó alguna complicación o alteración relacionada o no con la enfermedad de la piel por la cual fue tratado? Sí. |_|_| No: |_|_|

2. ¿Cuál o cuáles?

3. ¿Acudió al Dermatólogo que lo atendió en el estudio al cuál fue sometido o algún otro especialista en Dermatología u otro Servicio Médico especializado? Sí. |_|_| No: |_|_|

4. ¿Cuál fue el Servicio Médico al cual asistió o fue remitido?

5. ¿Cuál fue el diagnóstico que le informó el especialista?

6. ¿Cuál fue el tratamiento que le fue impuesto?

7. ¿Por qué no asistió al Servicio de Dermatología u otro Servicio Médico especializado?

8. Observaciones:

9. Información desconocida:

Firma del paciente

|_|_|_|/|_|_|_|/|_|_|_|
Fecha (Día/Mes/Año)

Firma del encuestador

|_|_|_|/|_|_|_|/|_|_|_|
Fecha (Día/Mes/Año)

1.3 Calificación de la Encuesta Individual

Historia clínica: Paciente:

|_|_|_|

Resultados

1. ¿Se localizó el paciente? Sí. |_| No: |_|

2. ¿Aceptó firmar voluntariamente el consentimiento informado? Sí. |_| No: |_|

3. Si las respuestas a las preguntas 1 y 2 son NO, señale la causa:

a. Dirección no disponible o errada en la HC: |_|

b. Fallecimiento: |_|

c. Cambio a domicilio desconocido: |_|

d. Cambio a domicilio fuera de provincia: |_|

f. En el extranjero: |_|

g. Otras, ¿cuáles? _____

3. ¿Persona que brindó la información (causas "b" a "g") y relación familiar con el paciente?

Nombre: _____ Relación familiar: _____

Calificación final

Encierre en un círculo la calificación de la encuesta:

0 = Paciente que accede voluntariamente a participar en el estudio

1 = Salida del estudio debido al surgimiento de uno o más criterios de exclusión

	Nombre	Firma	Fecha (Día/Mes/Año)
Hecho por:			_ _ / _ _ / _ _
Supervisado por:			_ _ / _ _ / _ _
Inspeccionado por:			_ _ / _ _ / _ _

1.4 Resumen de Historia Clínica Actual

Historia clínica: Paciente:

|_|_|_|

Resumen del examen físico dermatológico:

Evaluación:

Encierre en un círculo la calificación

-
- 0 = Paciente que al examen físico dermatológico no presenta signos o síntomas compatibles o sospechosos con cualquier proceso de naturaleza oncogénica.
-
- 1 = Paciente que al examen físico dermatológico presenta signos o síntomas compatibles o sospechosos con cualquier proceso de naturaleza oncogénica.
-
- 2 = Salida del estudio debido al surgimiento de uno o más criterios de exclusión
-

Observaciones:

Si el paciente es evaluado de "0" concluye el estudio.

Si el paciente es evaluado de "1" se remite a la consulta de Oncología

	Nombre	Firma	Fecha (Día/Mes/Año)
Investigador clínico:			_ _ / _ _ / _ _
Investigador clínico:			_ _ / _ _ / _ _

Resumen de la investigación oncológica:

Clasificación de la relación de causalidad:

Encierre en un círculo la calificación

Clasificación de la relación de causalidad		
0	Remota	No existe relación entre el evento clínico y el producto en investigación. Existe una relación temporal entre el evento clínico y el producto que es incompatible con una asociación causal y puede ser explicada por otras causas.
1	Posible	El evento clínico tiene una relación temporal razonable con el producto, pero también podría ser explicado por otras causas.
2	Probable	El evento clínico tiene una relación temporal razonable con el medicamento y es improbable que sea explicado por otras causas.
3	Muy probable	El evento clínico tiene una relación temporal creíble con el producto y no se puede explicar por otras causas.

Fundamentación:

	Nombre	Firma	Fecha (Día/Mes/Año)
Investigador clínico:			_ _ / _ _ / _ _
Investigador clínico:			_ _ / _ _ / _ _

ANEXO 2. REGISTRO DIARIO DE PACIENTES INCLUIDOS, NO INCLUIDOS Y RESULTADOS DE LAS ENCUESTAS

No de orden	HC N°	Iniciales del paciente	del	Calificación	Causa de no inclusión	Iniciales del encuestador
_ _	_ _ _	_ _ _ _		_	_	_ _ _ _
_ _	_ _ _	_ _ _ _		_	_	_ _ _ _
_ _	_ _ _	_ _ _ _		_	_	_ _ _ _
_ _	_ _ _	_ _ _ _		_	_	_ _ _ _

	Nombre	Firma	Fecha (Día/Mes/Año)
Hecho por:			_ _ / _ _ / _ _
Supervisado por:			_ _ / _ _ / _ _
Inspeccionado por:			_ _ / _ _ / _ _

ANEXO 3. APROBACIÓN DE PARTICIPACIÓN EN EL ESTUDIO Y COMPROMISO DE CONFIDENCIALIDAD

_____ de _____ del 200__

A: Dr. Nilo Castañedo Cancio

Director

Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV)

De: _____

Por la presente le comunico mi conformidad de participar en el estudio que ampara el protocolo de investigación titulada “Estudio epidemiológico en pacientes de la provincia de Villa Clara sometidos a los Ensayos Clínicos Multicéntricos Fases II y III Evaluación Clínica del Dermofural en base crema”, para lo cual me comprometo a:

1. Asistir a las reuniones relacionadas con el desarrollo del estudio, así como participar en los Talleres de Unificación de Criterios y para el análisis y discusión del Informe Final.

2. Desarrollar los aspectos que me correspondan y me sean señalados por el Director del Estudio en correspondencia con el protocolo de estudio.
3. Velar por el cumplimiento de lo establecido respecto a la identidad y voluntariedad del paciente.
4. Cumplir estrictamente con lo expuesto en el protocolo sobre la divulgación y confidencialidad de los datos generados durante el estudio y sobre los resultados del mismo.

Atentamente

ANEXO 4. CONFORMIDAD DE LA INSTITUCIÓN DE PARTICIPAR EN EL ESTUDIO Y GARANTIZAR LOS MEDIOS NECESARIOS PARA CUMPLIR EL COMPROMISO ASUMIDO.

_____ de _____ del 200_____

A: Dr. Nilo Castañedo Cancio
Director
Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), Universidad Central “Marta Abreu” de Las Villas (UCLV)

De: Dr. Osnedo Valdés Recio
Director
Hospital Universitario “Dr. Celestino Hernández Robau”

Por la presente le comunicamos que después de analizar el protocolo de la investigación titulada: “Estudio epidemiológico en pacientes de la provincia de Villa Clara sometidos a los Ensayos Clínicos Multicéntricos Fases II y III Evaluación Clínica del Dermofural en base crema”, estamos de acuerdo con que esta institución participe en la misma, para lo cual nos comprometemos a:

1. Solicitar previamente al Comité de Revisión y Ética (CRE) de nuestra institución analice el protocolo y emita dictamen desde el punto de vista ético, científico y metodológico.
2. Una vez aprobado por el CRE, incluir este estudio en el plan de investigaciones de la unidad, controlar consecuentemente su marcha y tomar todas las medidas necesarias para que se cumpla lo establecido en el protocolo.
3. Autorizar a los investigadores participantes en el estudio, que más abajo se relacionan a consumir el tiempo necesario para desarrollar el mismo con la calidad requerida.
4. En caso de que alguno de los investigadores abandone el estudio, se informará inmediatamente quién lo reemplazará.

Los investigadores que participarán en este estudio son:

Nombre	Servicio	Responsabilidad
--------	----------	-----------------

Se da por entendido que los investigadores de la unidad participarán en la confección y análisis de la información que se genere de esta investigación, así como en la autoría de las comunicaciones científicas que se produzcan y contengan los datos de los pacientes de la unidad.

Atentamente

Cuño

ANEXO 5: Aprobación de Estudio Epidemiológico.

14 de diciembre del 2006
"Año de la Revolución Energética en Cuba"

A: Dr. Nilo Castañedo Cancio
Director
Centro de Bioactivos Químicos (CBQ), Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas (UCLV)

De: Dr. José Ramón Ruíz Hernández
Director Provincial de Salud de Villa Clara
Santa Clara

Ref: Aprobación de "Estudio epidemiológico en pacientes de la provincia de Villa Clara sometidos al Ensayo Clínico Multicéntrico Fase III Evaluación clínica del Dermofural en base crema"

Compañero:

Después de haber analizado el dictamen del Comité de Revisión y Ética del Hospital Universitario "Dr. Celestino Hernández Robau" que evaluó desde el punto de vista ético, científico y metodológico el protocolo de investigación de título "Estudio epidemiológico en pacientes de la provincia de Villa Clara sometidos al Ensayo Clínico Multicéntrico Fase III Evaluación clínica del Dermofural en base crema", investigación propuesta por el Centro que Ud dirige, le comunicamos que estamos conformes en que dicho estudio se realice, lo que hacemos constar mediante la presente autorización.

Con saludos cordiales



Cuño

Dr. José Ramón Ruíz Hernández



Anexo 5.1: Aprobación de Consejo Científico Institucional.



CENTRO
DE BIOACTIVOS
QUÍMICOS

Universidad Central "Marta Abreu" de las Villas
Santa Clara, Villa Clara
C.P. 54830, Cuba.
Teléf: (53 42) 281192, 281473
Fax: (53 42) 281130
Email: niloc@uclv.edu.cu

DICTAMEN DEL CONSEJO CIENTÍFICO INSTITUCIONAL

Título del ensayo clínico:

"ESTUDIO EPIDEMIOLÓGICO EN PACIENTES DE LA PROVINCIA DE VILLA CLARA SOMETIDOS AL ENSAYO CLÍNICO MULTICÉNTRICO FASE III EVALUACIÓN CLÍNICA DEL DERMOFURAL EN BASE CREMA"

Tipo: Estudio epidemiológico retrospectivo

Director del estudio: Dr. Enrique A. Silveira Prado

Miembros del Consejo Científico:

Nombre y apellidos	Cargo y Especialidad	Firma
Dr. Nilo Castañedo Cancio	Presidente	
Dr. Miguel Ángel Cabrera Pérez	Vice-presidente	
Dra. Zenaida Rodríguez Negrín	Secretario	
Dr. Exiquio T. Gaytán Placeres	Miembro	
M.C. Osmani Marrero Chang	Miembro	
M.C. Ricardo Medina Marrero	Miembro	
M.C. Raquel Hernández González	Miembro	
M.C. Lic. Amalia Calvo Alonso	Miembro	
M.C. Zoía Sánchez Moreno	Miembro	

Fecha de la reunión: 27/11/06 (dd/mm/aa)

Conclusiones: Aprobado

Aprobado con recomendaciones

No aprobado



Observaciones:

- En caso de aprobarse el protocolo con recomendaciones, éstas se adjuntarán en hoja anexa.
- En caso de no aprobarse el protocolo, se adjuntarán en hoja anexa las causas por las cuales no fue aprobado.

Ministerio de Salud Pública.

Hospital Universitario "Dr. Celestino Hernández Robau". Santa Clara. Villa Clara.

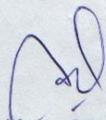
El *Comité de Ética de la Investigación Clínica*, ha evaluado desde el punto de vista ético, científico y metodológico el protocolo de investigación clínica propuesto por el promotor: *Centro de Inmunología Molecular* para la realización del ensayo clínico: "*Estudio epidemiológico en paciente de la provincia de Villa Clara sometidos al ensayo clínico multicéntrico fase III evaluación clínica del Dermofural en base crema*" cuya conducción está a cargo de los Investigadores:

Por el Centro de Bioactivos Químicos de Villa Clara:

<u>Responsabilidad</u>	<u>Nombre y apellidos</u>	<u>Especialidad</u>
<i>Investigador Principal</i>	<u>Dr. Enrique A Silveira Prado</u>	<u>Doctor en Medicina Veterinaria</u>
<i>Co - Investigadores</i>	<u>Dr. Jorge A Pérez Donato</u>	<u>Doctor en Medicina Veterinaria</u>
	<u>MSc. Osvaldo Norman Montenegro</u>	<u>Licenciado Cibernética</u>
	<u>Lic. Yudith Cañizares Carmenate</u>	<u>Licenciada en C. Farmacéuticas</u>
	<u>MSc. Mirleida Santos Marcelo</u>	<u>Licenciada en C. Farmacéuticas</u>
	<u>Dra. Estela Lugo Fariñas</u>	<u>Especialista en Medicina Interna</u>
	<u>Dr. Rodolfo A Cápiro Alejo</u>	<u>Especialista en Medicina Interna</u>

Por el Hospital Universitario "Dr. Celestino Hernández Robau" de Villa Clara:

<u>Responsabilidad</u>	<u>Nombre y apellidos</u>	<u>Especialidad</u>
<i>Co - Investigadores</i>	<u>Dr. Julio O Hernández Cruz</u>	<u>Especialista 1er. Grado en Oncología</u>
	<u>Dr. Ramón A Ortiz Carrodegua</u>	<u>Especialista 1er. Grado en Oncología</u>
	<u>Lic. Mevlán Cepeda Portales</u>	<u>Licenciada en Enfermería</u>
	<u>Lic. Ma. Margarita Ríos Cabrera</u>	<u>Licenciada en C. Farmacéuticas</u>
	<u>Lic. Kirenia Pérez Ramirez</u>	<u>Licenciada en C. Farmacéuticas</u>


Presidente CEIC

Para la evaluación se tuvieron en cuenta los siguientes aspectos:

Total de participantes Todos los pacientes tratados con la crema Dermofural en el servicio de Dermatología del Hospital Universitario "Arnaldo Milián Castro" de Santa Clara.

No. de sitios de investigación 3

Fase del Ensayo Clínico I II III IV

Epidemiológico retrospectivo

Descripción general del estudio NP

- ✓ Aleatorización : Simple Estratificada
- ✓ Controlado : Placebo Mejor terapia Tratamiento sostén
- ✓ Abierto
- ✓ A ciegas : Simple Doble Triple
- ✓ Uso de muestras biológicas

Objetivos del estudio.

General: Evaluar la posible relación entre la aplicación dérmica del ingrediente farmacéutico activo del Dermofural en concentraciones desde 0,125 a 0,25% y el desarrollo de procesos oncogénicos.

Específicos: Identificar posibles patologías oncogénicas en los pacientes tratados y establecer la relación de causalidad con el tratamiento aplicado.


Presidente CEIC

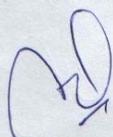
Considerando que:

- a. El protocolo, en su versión 00 cumple con los requisitos éticos y de Buenas Prácticas Clínicas, que se trata de una investigación justificable desde el punto de vista científico, que los riesgos y molestias previsibles para los sujetos están justificados y guardan un balance apropiado con los beneficios esperados.
- b. El acta del consentimiento informado, en su versión 00 cumple con todos los elementos que la hacen correcta y válida desde el punto de vista ético y que son adecuados los procedimientos para su obtención.
- c. El Cuaderno de Recogida de Datos, en su versión __, diseñado a los efectos de la investigación, cumple con los requisitos para la recolección de los datos del paciente necesarios para la investigación. (NP)

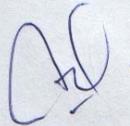
El CEIC decide:

- Aprobación sin modificaciones.
- Aprobación con modificaciones no obligatorias (se adjuntan).
- Aprobación condicionada a modificaciones (se adjuntan).
- Aprobación condicionada a documentación adicional (se adjunta).
- Desaprobado.

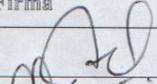
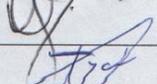
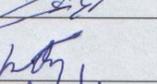
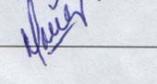
Por lo tanto el CEIC de esta institución deberá revisar nuevamente la propuesta: Sí No


Presidente CEIC

Evaluación	Correcto	Incorrecto	NP
Objetivos	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Metodología	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Análisis beneficio/riesgo	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Criterios de inclusión	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Criterios de exclusión	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Criterios de interrupción de tratamiento	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Criterios de salida del ensayo	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Análisis de sujetos vulnerables	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Reclutamiento de sujetos	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Tamaño de muestra	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Uso del grupo control	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Calificación y experiencia del grupo investigador	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Infraestructura del sitio de investigación	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Contenido del consentimiento informado	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Confidencialidad	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Información a los sujetos	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Suministro de producto de investigación	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Métodos de monitoreo	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Métodos de obtención de los datos	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
Método para la publicación de resultados	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
Impacto de la investigación en la comunidad	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>


 Presidente CEIC

Miembros del CEIC que participaron en la evaluación.

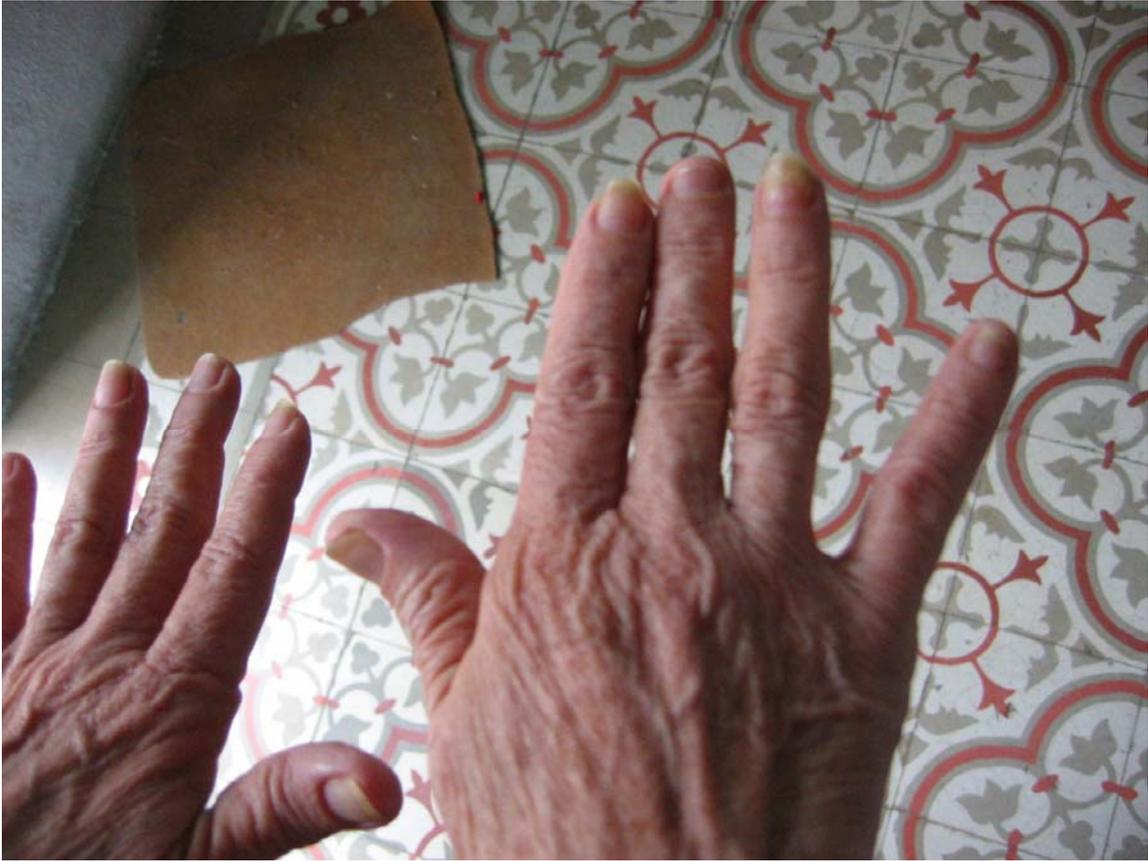
Nombre y apellidos	Calificación	Firma
Dr. José Antonio Vila González	Esp. 2º. Grado Med. Interna	
Dr. Alberto Quintana Vázquez	Esp. 1º. Grado Med. Interna	
MSc. Orlando Cartaya Pérez	MSc. Psicología	
Lic. Isabel Rosety González	Lic. Enfermería	
Lic. Marilyn Rivero Montañez	Lic. Enfermería	

Dado en la ciudad de Santa Clara, a los 8 días del mes de diciembre del año 2006, a las 11.00AM horas.

Comité de Revisión y Ética. Hospital Universitario
"Dr. Celestino Hernández Robau".
Calle Cuba No. 564. Santa Clara. Villa Clara. Teléfono 27 20 15.


Presidente CEIC

Anexo 6: Pacientes tratado por Dermofural en las manos y uñas.



Anexo 6.1: Paciente tratada por Dermofural en los pies



Anexo 6.2: Equipo de Investigacion con la Paciente



Anexo 6.3: una paciente con la mano y uñas tratadas.



Anexo 6.4: Equipo de Investigacion con las pacientes



Anexo 6.5: Examen dermatológica por la Especialista.



Anexo 6.6: Mano sanada de un paciente.



Anexo 6.7: Equipo de Investigacion con el paciente.

