

Expertos Invitados

● QUIMIOTERAPIA DEL CANCER COLORRECTAL



Columnista Experto de SIIC
Dr. Weijing Sun

Assistant Professor of Medicine, Attending Physician Specialization field: Medical Oncology.

Introducción

El cáncer colorrectal (CRC) es una de las neoplasias del tracto gastrointestinal más frecuentes en todo el mundo, especialmente en Norteamérica y Europa. Se proyecta que para el 2004, en los EE.UU., el CRC contribuya con 146 949 nuevos casos y 56 730 muertes, el segundo lugar en cuanto a las muertes relacionadas al cáncer en dicho país.¹ En las últimas dos décadas, el avance en el conocimiento de la enfermedad evolucionó hasta el punto en que la atención del paciente cambió radicalmente. Debido a las mejoras y al uso generalizado de los métodos de detección, el pronóstico es excelente si la enfermedad es descubierta tempranamente y se utiliza la cirugía curativa. Sin embargo, aproximadamente dos tercios de los pacientes con cáncer del intestino grueso recientemente diagnosticado presentan compromiso linfático y metástasis a distancia.^{2,3} En el marco de una enfermedad avanzada, local o metastásica, las terapias sistémicas desempeñan un papel crucial para aumentar las tasas de curación y prolongar la supervivencia. Los avances recientes obtenidos con el desarrollo de drogas citotóxicas y de blanco molecular no sólo han cambiado las estadísticas de supervivencia y perspectivas de la enfermedad, sino también la calidad de vida de aquellos pacientes con CRC. La mediana global de supervivencia (MOS) de los pacientes con CRC metastásico ha traspasado los 2 años⁴ y la supervivencia libre de enfermedad (DFS) a los 3 años, en aquellos con patología local avanzada, ha llegado a ser tan alta como 78.2%.⁵

Tratamiento del cáncer colorrectal metastásico avanzado

Quimioterapia

Luego de las más de 3 décadas de uso del 5-FU como la única medicación efectiva para el CRC, su combinación en infusión intravenosa con el oxaliplatino o el irinotecán se ha transformado en los nuevos regímenes quimioterápicos citotóxicos estándar: FOLFOX y FOLFIRI (tabla 1).⁶⁻⁹

El irinotecán (Camptosar®, CPT-11), un derivado de la camptotecina que inhibe la topoisomerasa I, posee actividad antitumoral amplia. Dos de los regímenes más utilizados administran un bolo de 5-FU asociado con leucovorina (LV) (IFL) (tabla 1) o 5-FU/LV en infusión (FOLFIRI) sustentados en los datos de dos grandes estudios de fase III que encauzaron la aprobación del irinotecán en el tratamiento del CRC, y con el que se obtuvo una supervivencia global mejorada (OS) de 2 a 3 meses y una supervivencia libre de progresión (PFS) de casi 2 meses, comparada con los regímenes tradicionales de 5-FU/LV.⁶⁻⁷ Sin embargo, el consenso general basado en resultados más recientes establece que el IFL no debería considerarse más el régimen "estándar" debido a su toxicidad y su relativa menor eficacia. Se han señalado más eventos adversos con el IFL a partir de los datos mostrados por varios estudios recientes (ensayos CALBG 89803 y N9741), especialmente en pacientes como los ancianos, aquellos con estado clínico ECOG2 o mayor y en los sujetos con funciones orgánicas limitadas.¹⁰ Se ha sugerido que la diarrea asociada al IFL puede deberse a la conversión del irinotecán en un metabolito activo por la microflora intestinal y recientemente se ha comunicado que la prevención de este cuadro puede llevarse a cabo con la utilización oral de neomicina y bacitracina (1 000 mg dos veces por día durante 4 días).¹¹ El régimen que debería utilizarse cuando se considere la asociación de irinotecán y 5-FU es el FOLFIRI, en virtud de su

menor toxicidad y mejor eficacia.

Tabla 1

El oxaliplatino (Eloxatin®, L-OHP, *cis*-[(1R, 2R)]-1,2 ciclohexanediamino-*N-N'*oxalato-(2)-*O,O'*), un diaminociclohexano con platino, inhibe la replicación del ADN y la transcripción a través de la formación de aductos de ADN intracatenarios e intercatenarios. A diferencia del cisplatino y el carboplatino, el oxaliplatino posee actividad significativa sobre las líneas celulares colónicas.¹² Esta droga, además, tiene un perfil de seguridad diferente, y entre sus efectos colaterales los pacientes pueden presentar neuropatías periféricas transitorias dependientes de la dosis, las cuales se manifiestan con parestesias de los dedos, manos, pulgares y labios y con disestesias precoces en las extremidades, boca y cuello, desencadenadas o exacerbadas por la exposición al frío.¹³ Se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* la actividad antitumoral sinérgica del oxaliplatino administrado en asociación con el 5-FU/LV.^{14,15}

La combinación de oxaliplatino y la infusión intravenosa de 5-FU ha sido uno de los estándares de tratamiento del CRC durante muchos años en Europa. Dos ensayos europeos de fase III (EFC 2961 y EFC 2962) compararon la asociación con el 5-FU/LV en infusión (LV5FU2) y demostraron estadísticamente un beneficio significativo de la combinación con oxaliplatino en la tasa de respuesta objetiva (53% vs. 16% y 50.7% vs. 22.3%) y en la PFS (8.7 vs. 6.1 meses, $p = 0.048$ en el EFC 2961 y 9.0 vs. 6.2 meses, $p = 0.0003$ en el EFC 2962).^{16,17} Sin embargo, no fue hasta agosto de 2002 cuando esta combinación fue aprobada por la *Food and Drug Administration* (FDA) estadounidense para el tratamiento de aquellos pacientes con CRC en los que había fracasado la administración de irinotecán y 5-FU/LV, según lo observado en un análisis interino de los resultados de un gran ensayo multicéntrico aleatorizado.⁸ Sobre la base de los resultados de un gran estudio multicéntrico de fase III (N9741), la asociación de oxaliplatino y 5-FU en infusión fue aprobada para el tratamiento de los pacientes que no habían recibido quimioterapia para el CRC.⁹ Este estudio comparó la eficacia y toxicidad del oxaliplatino con el 5-FU/LV en infusión (FOLFOX4), irinotecán y el 5-FU/LV en bolo (IFL) y la combinación del irinotecán y oxaliplatino (IROX) como terapia de primera línea en 795 pacientes seleccionados con CRC. El régimen FOLFOX4 fue superior al IFL y al IROX en cuanto al tiempo a la progresión (TTP) (8.7 vs. 6.9 meses [$p = 0.0014$] vs. 6.5 meses [$p = 0.001$]), la tasa de respuesta (RR) (45 vs. 31 < I vs. 35%) y la supervivencia global (OS) (19.5 vs. 15.0 meses [$p = 0.001$] vs. 17.4 meses [$p = 0.04$]). El estudio mostró además que el FOLFOX4 arrojaba tasas significativamente más bajas de náuseas de grado 3-4, vómitos, diarrea, deshidratación y neutropenia febril. Debido a las limitaciones de este ensayo, hubo debates en cuanto a la influencia de la administración del 5-FU

(en infusión vs. en bolo) y las diferencias en el tratamiento posterior al estudio para cada grupo que fueron secundarias a la disponibilidad de las drogas. No obstante, la asociación de oxaliplatino con el 5-FU/LV en infusión ha sido aceptada como uno de los regímenes de primera elección en los pacientes con cáncer colorrectal metastásico. Los datos mostraron que la asociación con el 5-FU/LV es importante para maximizar la eficacia del oxaliplatino en el tratamiento del CRC. Existen dos aspectos interesantes de la combinación del 5-FU y oxaliplatino en infusión que se plantean en la práctica: qué grado de diferencia existe entre los tres regímenes más frecuentemente utilizados (FOLFOX4, FOLFOX6 y FOLFOX7) (tabla 1) y cuánto se evita o demora la neurotoxicidad sensorial acumulada. En un estudio de fase III (OPTIMOX) diseñado para aclarar estos dos interrogantes, 526 pacientes con CRC que no habían recibido quimioterapia fueron aleatorizados al régimen FOLFOX4 o a la estrategia "stop and go", la cual consiste en el FOLFOX7 por 6 ciclos seguido de otros 12 ciclos con sLV5FU2 para luego retornar al FOLFOX7.¹⁸ Los resultados mostraron que no hubo diferencias en cuanto a la eficacia entre los dos grupos de tratamiento (PSF: 9.2 vs. 9.0 meses [$p = 0.47$], MOS: 20.7 vs. 21.4 meses [$p = 0.61$]) con menor neutropenia de grado 3/4 y neuropatía en el grupo al que se le administró el régimen FOLFOX7/sLV5FU2.

Los estudios demostraron que tanto el irinotecán como el oxaliplatino en combinación con el 5-FU/LV son tratamientos efectivos para los pacientes con cáncer colorrectal metastásico. El aspecto práctico fundamental es asegurar que los pacientes con CRC que tienen un razonable buen estado general reciban estos tres medicamentos más que debatir si el FOLFOX o el FOLFIRI deban ser administrados en primer lugar. El estudio de fase III GERCOR se llevó a cabo para analizar la mejor secuencia terapéutica del régimen FOLFIRI/FOLFOX comparado al FOLFOX/FOLFIRI.¹⁹ En ese estudio, 226 pacientes que no habían sido tratados fueron aleatorizados en una primera etapa al FOLFIRI o al FOLFOX6 y cruzados luego de la progresión. No hubo diferencias en la MOS (21.5 meses para el FOLFIRI/FOLFOX6 vs. 20.6 meses del FOLFOX6/FOLFIRI, $p = 0.99$), la PSF de la

primera etapa (8.5 meses para los que comenzaron con FOLFIRI vs.

8 meses del comparador, $p = 0.26$) o la PSF de la segunda etapa (14.6 meses para FOLFIRI/FOLFOX6 vs. 10.9 meses en el grupo FOLFOX6/FOLFIRI, $p = 0.64$).

El perfil de seguridad fue el esperado. Hubo más mucositis de grado 3-4, náuseas, vómitos y alopecia de grado 4 en los medicados con el FOLFIRI y más neutropenia de grados 3-4 y neurotoxicidad sensorial en los que recibieron el FOLFOX6.

Con el fin de brindarles a estos pacientes una alternativa a la administración intravenosa de 5-fluoruracilo y mejorar su calidad de vida, durante muchos años se desarrollaron fluoropirimidinas orales, incluidas la capecitabina, UFT (uracilo- tegafur) y el eniluracilo. Los resultados de dos grandes estudios aleatorizados multicéntricos de fase III mostraron que la combinación oral de eniluracilo y 5-FU fue inferior al bolo intravenoso de 5-FU/LV (régimen de la Clínica Mayo) en el tratamiento del CRC.^{20,21} El UFT (1:4 de tegafur en relación con el uracilo) se encuentra disponible en Europa y Asia pero no fue aprobado por la FDA a pesar de que dos grandes estudios de fase III con UFT/leucovorina (Orzel®) sugirió la no inferioridad comparada con el 5-FU/LV en bolo (régimen de la Clínica Mayo [tabla 1]) en el tratamiento del CRC.^{22,23} Solamente la capecitabina ha sido aprobada y está clínicamente disponible en los EE.UU.

La capecitabina, una fluoropirimidina oral derivada del carbamato, fue diseñada tanto para ser activada por el tumor como para ser selectiva para el tumor. La capecitabina intacta se absorbe rápidamente de la mucosa intestinal y es convertida a su forma activa, 5-FU dentro del tumor, a través de la acción de la timidina fosforilasa (TP).²⁴ Debido a que la expresión de la TP es más alta dentro del tumor que en los tejidos normales, esto resulta en la selectividad tumoral.^{25,26}

Dos grandes estudios aleatorizados de fase III llevados a cabo en Europa y EE.UU.

demonstraron que la capecitabina presenta una eficacia equivalente al régimen de la Clínica Mayo en el tratamiento del CRC, además de un perfil clínico más seguro y tolerable, aunque el síndrome mano y pie de grado 3 fue más frecuente en los pacientes tratados con este fármaco.

Dadas las ventajas de la capecitabina al poder ser administrada de forma oral sin la necesidad de la administración intravenosa, en comparación con el 5-FU en infusión, varios estudios investigaron distintas combinaciones sustituyendo la capecitabina por el 5-FU con el irinotecán (CapIri o XELIRI) o el oxaliplatino (Capox o XELOX).

Hasta el momento, los resultados con estas combinaciones fueron tomados de varios estudios de fase II disponibles.²⁹⁻³¹

Sobre la base de información limitada, parece que la asociación de capecitabina con irinotecán o con oxaliplatino es equivalente a los regímenes FOLFIRI y FOLFOX y que exhibe menor toxicidad general, excepto el síndrome mano-pie. En un estudio de fase II con XELOX llevado a cabo en 96 pacientes con CRC previamente no tratados, se obtuvieron tasas de respuesta del 55% más 31% de pacientes con enfermedad estable por más de 3 meses.²⁹ La mediana de supervivencia fue de 19.5 meses y el tiempo a la progresión (TTP) fue de 7.7 meses con sólo 7% de neutropenia. Un estudio de fase II con 52 pacientes que recibieron el régimen XELIRI mostró un perfil de seguridad y eficacia favorable con una tasa de respuesta del 61% y una tasa de control de la enfermedad (CR+PR+SD = respuesta completa + respuesta parcial + enfermedad estable) del 84%.³⁰ Al momento que estos datos fueron comunicados, la MTTP y la MOS fueron de 6.1 y 15.6 meses, respectivamente. Un estudio aleatorizado de fase II mostró cifras de supervivencia general casi idénticas (17.7 vs. 17.8 meses) con el uso secuencial de capecitabina más irinotecán y oxaliplatino como tratamiento de primera o segunda elección.³¹ Los resultados de los estudios de fase III del XELOX y XELIRI aún no han sido comunicados.

Tratamientos moleculares o biológicamente dirigidos

Después de muchos años de investigación y los avances en el descubrimiento de las características moleculares y biológicas del carcinoma se han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas para el tratamiento del CRC especialmente dirigidas hacia la angiogénesis y la traducción de señales, las cuales han demostrado un avance significativo cuando se utilizan en combinación con los agentes quimioterápicos citotóxicos.

La expresión del receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR, un miembro de la familia de receptores Erb B) se ha asociado con mal pronóstico de muchas neoplasias, incluido el CRC.³² El EGFR regula fundamentalmente la división, reparación y supervivencia de la célula tumoral a través de la unión de ligandos específicos (EGF, TGF-alfa, etc.) que activan las cascadas de transducción de señales.³³ El EGFR también está relacionado con las metástasis del cáncer. El cetuximab (Erbix®), un anticuerpo IgG1 monoclonal quimérico humanizado, se une selectivamente con el EGFR, con lo cual se bloquea la unión del ligando con el receptor y se evita la activación de la tirosina quinasa. La eficacia del cetuximab en el tratamiento del CRC fue

demostrada en un estudio de fase II llevado a cabo en 121 pacientes en los que había fracasado el tratamiento con 5-FU e irinotecán, cuyos tumores habían resultado positivos para el EGFR.³⁴ Como tratamiento de segunda elección la asociación mostró una RR del 17% y una SD del 31%. Con estos datos se llevó a cabo en Europa un gran estudio multicéntrico en donde la asociación del cetuximab/irinotecán se comparó con el cetuximab en monoterapia (en una proporción 2:1) contra el CRC positivo para el EGFR y refractarios al tratamiento con irinotecán. El estudio demostró que el cetuximab presentaba una actividad significativa cuando se lo combinaba con el irinotecán o en monoterapia en los pacientes refractarios a éste, siendo más efectiva la asociación (RR 22.9 vs. 10.8%, $p = 0.0074$, TTP 4.1 vs. 1.5 meses, $p < 0.001$). Los pacientes toleraron adecuadamente el cetuximab observándose, según lo esperado, más diarreas y neutropenia en el grupo que recibió el tratamiento combinado. Los resultados sugirieron que el cetuximab puede eludir la resistencia al irinotecán por inhibición de la EGFR, con lo cual se anula el eflujo del fármaco, se restaura la apoptosis o se modifica la actividad de reparación del ADN. Sin embargo, no hubo relación entre la eficacia del cetuximab y los niveles de EGFR en el tumor. Un estudio reciente mostró que el cetuximab es efectivo en los pacientes con CRC en los que había fracasado el tratamiento con irinotecán u oxaliplatino.³⁶ De 350 pacientes tratados, el 12% obtuvo una PR con 34% de SD por al menos 6 semanas. Dos estudios de fase II mostraron que las combinaciones de cetuximab con FOLFIRI o FOLFOX como tratamiento de primera elección fueron seguras y efectivas.^{37,38} En la actualidad se están llevando a cabo muchos estudios de fase III de evaluación de asociaciones con cetuximab como tratamientos de primera o segunda elección.

El ABX-EGF es un anticuerpo monoclonal IgG2 totalmente humano dirigido contra el EGFR, lo cual puede resultar en menos efectos colaterales reactivos comparado con los anticuerpos monoclonales quiméricos humanizados. En un análisis interino de un estudio de fase II se sugirió que la monoterapia con ABX-EGF es bien tolerada y segura en pacientes con CRC en los que había fracasado la terapia previa con 5-FU, irinotecán u oxaliplatino.³⁹ La RR fue del 10.1% con una SD del 36.5% en 148 pacientes tratados.

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es una glucoproteína difusible producido por células normales y tumorales. El VEGF es un importante regulador de la angiogénesis tanto fisiológica como patológicamente.⁴⁰ El bevacizumab (Avastin®) es un anticuerpo monoclonal recombinante humanizado dirigido contra el VEGF. En un estudio aleatorizado de fase II realizado en pacientes que no habían recibido tratamiento quimioterápico previo o que habían recibido solamente terapia adyuvante se obtuvieron aumentos de la RR y el TTP cuando el bevacizumab fue administrado asociado al 5-FU/LV (el bevacizumab fue administrado en el grupo de dosis más baja a 5 mg/kg y en el de dosis más alta a 10 mg/kg cada 2 semanas y el 5-FU/LV a dosis de 500 mg/m² para cada droga).⁴¹ La media de supervivencia fue de 21.5 meses en el grupo de bevacizumab de baja dosis y de 13.8 meses en el grupo control. El beneficio de agregar bevacizumab al 5-FU/LV fue confirmado posteriormente en otro estudio aleatorizado en pacientes a los que no se los consideró aptos para el tratamiento con irinotecán como opción terapéutica de primera línea (mayores de 65 años, estatus general ECOG1 o ECOG2, albúmina sérica < 3.5 mg/dl o irradiación previa del abdomen o pelvis).⁴² Los resultados mostraron una PFS de 9.2 meses en el grupo medicado con bevacizumab/5-FU/LV comparada a los 5.5 meses obtenidos en el grupo placebo/5-FU/LV ($p = 0.0002$) sin aumento de la toxicidad. El estudio sugiere que la asociación de 5-FU y bevacizumab podría ser considerada como tratamiento de primera elección en pacientes que no son candidatos a ser tratados con irinotecán.

En un gran estudio de fase III se mostró que cuando el bevacizumab se asocia al IFL como tratamiento de primera elección se obtienen mejorías significativas de la OS y la PFS.⁴³ La mediana de supervivencia fue de 20.3 meses en el grupo medicado con IFL/bevacizumab y de 15.6 meses en los que recibieron IFL/placebo ($p < 0.001$), la mediana de la PFS fue de 10.6 meses en el primer grupo y de 6.2 meses en el segundo ($p < 0.001$) y las tasas de respuesta fueron de 44.8 vs. 34.8% ($p = 0.004$). La hipertensión de grado 3 fue más frecuente en el grupo tratado con bevacizumab/IFL (11%) comparado con el control (2.3%), pero fue fácilmente controlada con medicación oral. Hubo 1.5% (6/403) de perforación gastrointestinal en los que recibieron bevacizumab/IFL, cuyas causas no son muy claras. El análisis de seguimiento mostró datos alentadores en cuanto a la MOS obtenida por los 97 pacientes que fueron medicados con oxaliplatino luego del primer tratamiento con bevacizumab/IFL, la cual alcanzó los 25.1 meses comparados con los 19.6 meses obtenidos por 125 pacientes que no recibieron oxaliplatino.⁴⁴ La asociación de bevacizumab con oxaliplatino (FOLFOX) ha sido comparada con la del FOLFOX únicamente como la segunda línea de tratamiento en los pacientes con CRC que habían sido previamente tratados con irinotecán en un gran estudio de fase III.⁴⁵ Un análisis interino de toxicidad mostró que la asociación entre el FOLFOX y el bevacizumab es segura y los resultados de

eficacia final serán comunicados en breve. Un ensayo del *Treatment Referral Center* (TRC-03) del *National Cancer Institute* (NCI) estudió la asociación del bevacizumab con el 5-FU/LV como terapia de tercera línea en aquellos pacientes con CRC cuya enfermedad progresó luego de haber sido medicados con los tratamientos de referencia de 5-FU/LV, irinotecán y oxaliplatino.⁴⁶ Al momento de la comunicación de los resultados, la MTTP fue de 3.5 meses, la MOS fue considerada prematura como para ser comunicada y la tasa de respuesta fue del 1 %.

El análisis de varios estudios aleatorizados mostró que no hubo aumento en la incidencia de tromboembolismo del bevacizumab cuando se asoció a los regímenes quimioterápicos estándar para el tratamiento del CRC.⁴⁷ Sin embargo, un aumento modesto de los sucesos tromboembólicos puede ser observado cuando se agrega este fármaco, especialmente en aquellos pacientes con factores de riesgo (mayores de 65 años y con eventos tromboembólicos previos).

También se han investigado pequeñas moléculas, de administración oral, inhibidoras de la EGFR-tirosina quinasa, como el gefitinib (ZD 1839, Iressa®) la cual fue estudiada como monoterapia en los pacientes con CRC como tratamiento de segunda elección, cuyos resultados aún no han sido comunicados. Un estudio de fase II que asoció este fármaco con el FOLFOX (IFOX) exhibió una eficacia prometedora con una RR confirmada del 53% en pacientes que no habían recibido quimioterapia previa y del 16% en pacientes previamente tratados.⁴⁸ Sin embargo, la toxicidad de la asociación fue superior a la observada en el FOLFOX. El erlotinib (OSI-774, Tarceva®) también fue estudiado en los pacientes con CRC tanto en monoterapia como asociado con otros agentes citotóxicos.^{49,50}

También se investigaron muchos fármacos dirigidos contra varias secuencias de la vía del VEGF, como el HuMV8 33, 2C3 (dirigido contra el ligando VEGF), el VEGF- TRAP (dirigido contra receptores solubles), SU11248, PTK787/ZK222584, ZD6474 (pequeñas moléculas dirigidas contra los receptores VEGF), angiozima (ribozimas contra los receptores VEGF) y el IMC-1121b (una anticuerpo monoclonal dirigido contra los receptores VEGF).

Se llevaron a cabo dos grandes estudios de fase III para evaluar la actividad antitumoral en el CRC del PTK787/ZK222584 en combinación al FOLFOX, tanto como terapia de primera o de segunda líneas (CONFIRM-1 y 2).

Resección quirúrgica de la metástasis y terapia sistémica

Solo la resección quirúrgica completa de las metástasis puede resultar al largo plazo en una cura posible o una supervivencia libre de enfermedad en ciertos pacientes.^{51,52} La quimioterapia prequirúrgica ha sido recientemente introducida como terapia neoadyuvante de la resección quirúrgica de la metástasis debido al aumento de la eficacia de los nuevos agentes y regímenes quimioterápicos. En algunos pacientes se han comunicado mejoría de la estadificación y respuestas histológicas completas, sujetos que inicialmente habían presentado metástasis irresecables.⁵³

El beneficio de la terapia de infusión de la arteria hepática (HAI) posresección ha sido sugerido por un estudio intergrupar estadounidense.⁵⁴ Un estudio de fase I/II mostró que la asociación del irinotecán sistémico con el HIA FUDR (fluorodeoxiuridina) como terapia adyuvante de la metastasectomía hepática es un método viable con un 89% de supervivencia a los 2 años.⁵⁵ Otro estudio de fase II mostró 80% de tasa de respuesta de la lesión hepática y 20% a la metastasectomía con la combinación de HAI más oxaliplatino sistémico en 44 pacientes con metástasis hepáticas de un cáncer colorrectal inicialmente considerado irresecable.⁵⁶ Se necesitan evaluaciones ulteriores para determinar si la asociación puede mejorar el control local y eliminar las recurrencias extrahepáticas.

Terapia adyuvante para el cáncer colorrectal

Quimioterapia adyuvante del cáncer colónico con 5-FU/LV

El objetivo de la terapia adyuvante para los pacientes con cáncer de colon localizado es erradicar las micrometástasis, con lo cual se mejora la supervivencia general luego de la resección quirúrgica curativa. Sin embargo, el papel que le cabe a la terapia adyuvante en este tipo de cáncer no estuvo determinado hasta el final de la década del '80. Un metaanálisis que incluyó alrededor de 10 000 pacientes en 25 ensayos aleatorizados fue publicado en 1988 en el *Journal of the American Medical Association*.

En los pacientes que recibieron 5-FU adyuvante se observó un ligero aumento de la supervivencia, comparados con los pacientes que no recibieron tratamiento posquirúrgico, con *odds ratio* de 0.83 (IC95% 0.70-0.98).⁵⁷ Después de transcurridos muchos años de esfuerzos y habiéndose realizado estudios importantes, la terapia de 6 a 8 meses con 5-FU/LV fue finalmente aceptada como el tratamiento adyuvante de referencia para el cáncer de colon estadio III, tanto en Europa como en EE.UU., alrededor de 1996.

El ensayo C-01 del *National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project* (NSABP) fue el primer gran estudio aleatorizado en comunicar las ventajas para la supervivencia de la quimioterapia adyuvante en el cáncer de colon.⁵⁸ El ensayo del *North Central Cancer Treatment Group* (NCC TG) sugirió el beneficio clínico de la asociación de 5-FU y levamisol (LEV), un inmunomodulador, como terapia adyuvante de los estadios II y III del cáncer de colon (de alto riesgo), observándose una reducción de la tasa de recurrencia de aproximadamente el 40% ($p = 0.003$), y un aumento de la supervivencia en un subgrupo de pacientes con enfermedad con nódulos positivos ($p = 0.03$).⁵⁹

Los resultados de un gran estudio intergrupar (INT 0035) confirmaron el beneficio de la asociación antedicha en los pacientes en estadio III, con 41% de reducción en el riesgo de recurrencia ($p < 0.0001$) y 33% de disminución de la mortalidad ($p = 0.006$) comparados con los pacientes que únicamente fueron intervenidos quirúrgicamente.^{60,61}

El NSABP C-03 mostró las ventajas de la asociación entre el 5-FU y la leucovorina (LV), un folato reducido que incrementa la actividad antitumoral del 5-FU a través del aumento de la inhibición de la timidilato sintetasa, en comparación al régimen MOF (5-FU-semustina-vincristina) en 1 081 pacientes con estadios de Duke B y C (supervivencia libre de enfermedad o DFS a los 3 años del 73% vs. 64% y una OS a los 3 años del 84% vs. 77% ($p = 0.003$)).⁶² Sobre la base de los resultados de todos estos estudios se realizó el estudio intergrupar INT-0089 para dilucidar el papel de la LV y el LEV asociado al 5-FU y la duración óptima de la quimioterapia adyuvante en el cáncer del colon. Un total de 3 759 pacientes con estadios III y II de alto riesgo fueron aleatorizados para recibir 5-FU más LEV por 12 meses, 5-FU semanal con altas dosis de LV (régimen Roswell Park [tabla 1]) por 7 a 8 meses, 5-FU con bajas dosis de LV (régimen de la Clínica Mayo) por 6 meses o la combinación de 5-FU con LEV o LV por 6 meses.^{63,64} Los resultados mostraron la equivalencia del tratamiento por 7 a 8 meses con 5-FU/LV con 1 año de 5-FU/LEV, remarcando que el LEV no es un componente obligatorio de la quimioterapia adyuvante en el cáncer de colon localizado. No se observaron diferencias significativas en cuanto a la eficacia entre los regímenes con dosis bajas o altas de LV cuando fueron combinados con 5-FU. Estos resultados han sido confirmados por varios ensayos europeos.⁶⁵⁻⁶⁸

Los regímenes más frecuentemente utilizados en los Estados Unidos son el Roswell Park y el de la Clínica Mayo. Si bien la posología del 5-FU parece no afectar su eficacia, esto no es así para las toxicidades. El régimen de la Clínica Mayo se asocia más con leucopenia y estomatitis y el Roswell Park con diarreas. Los médicos generalmente escogen el régimen que mejor cuadre a la tolerancia predicha para cada paciente en particular.

Los regímenes que utilizan el 5-FU/LV en infusión también han mostrados ser más seguros y tan efectivos como el 5-FU/LV administrado en bolo.^{69,70} Un estudio comparó al régimen de infusión LV5FU2 con el FULV en bolo (LV 200 mg/m² por 15 minutos seguido de 400 mg/m² de 5-FU por 5 días consecutivos cada 28 días), analizando la toxicidad y eficacia en pacientes con estadios II y III de cáncer colorrectal.⁶⁹ Con una mediana de seguimiento de 41 meses, no hubo diferencias significativas en la DFS o la OS entre los dos grupos de tratamiento. La toxicidad fue significativamente menor para el grupo que recibió la infusión ($p < 0.001$). Un estudio llevado a cabo en el Reino Unido comparó una infusión prolongada por 12 semanas de 5-FU (300 mg/m²/día) con el régimen de la Clínica Mayo y no mostró diferencias en la OS a los 3 años (87.95 vs. 83.2%, $p = 0.764$) con menor toxicidad ($p < 0.0001$) y mejor calidad de vida ($p < 0.001$) en el grupo medicado con la infusión prolongada.⁷⁰

Novedades en la quimioterapia adyuvante del cáncer de colon

Los recientes avances en el tratamiento del CRC han cambiado los modelos preestablecidos y, después de muchos años de investigación, las dudas referidas al beneficio de la quimioterapia adyuvante para el cáncer de colon en estadio II parecen aclararse.

Al demostrarse que la capecitabina es tan efectiva y menos tóxica que el 5-FU/LV administrado en bolo en el tratamiento del CRC, se diseñó el ensayo X-ACT para probar que la capecitabina es tan equivalente como el 5-FU/LV en cuanto a prolongar la DFS en el marco de la terapia adyuvante. Un total de 1 987 pacientes de 18 a 75 años fueron aleatorizados para recibir capecitabina en dosis de 2 500 mg/m²/día en forma oral a lo largo de 2 semanas seguido de 1 semana de descanso, o a 6 u 8 ciclos del régimen de la Clínica Mayo, observándose una ventaja en cuanto a la DFS para la capecitabina comparada al 5-FU/LV (HR 0.87 [IC95% 0.75-1.00], $p = 0.0528$) y una tendencia similar para la supervivencia global ($p = 0.0706$, HR 0.84 [IC5% 0.69-1.01]).^{71,72} La supervivencia libre de recaída (RFS) resultó también superior para la capecitabina comparada al 5-FU/LV ($p = 0.041$, HR 0.86 [IC95% 0.74-0.99]). Excepto el síndrome mano-pie, el perfil de seguridad fue generalmente favorable para la capecitabina ($p < 0.001$).

Los resultados indicaron que la capecitabina podría ser una alternativa al 5-FU/LV en la terapia adyuvante del cáncer colónico en estadio II. Es más, los resultados del NSABP C-06 mostraron que el UFT/LV fue equivalente al 5-FU/LV en bolo intravenoso para la DFS y OS a los 5 años en el tratamiento adyuvante de pacientes con cáncer de colon en estadios II y III.⁷³ Sin embargo, el UFT no se encuentra disponible en los EE.UU.

Desde que se observó que la asociación del irinotecán o el oxaliplatino con el 5-FU mejoraban significativamente los resultados del tratamiento del CRC se diseñaron estudios para definir cuál era la ventaja terapéutica adyuvante de estos regímenes al compararlos con los tratamientos con 5-FU/LV de referencia, tal el caso de C89803, V308, PETACC-3, NSABP C-07 y MOSAIC.

La mortalidad por todas las causas a los 60 días fue superior en los pacientes que recibieron IFL (16/635, 2.5%) comparada con aquellos que recibieron solamente 5-FU/LV (régimen Roswell Park) (5/628, 0.8%), según se desprende de los resultados de un análisis interino del estudio C89803, lo cual fue congruente con la toxicidad del IFL en el marco metastásico.^{74,75} Por el contrario, en el PETACC-3 (una combinación bimensual de irinotecán/5-FU/LV) no se observó aumento de las muertes exacerbadas por el tratamiento. Los resultados del C89803, el estudio de eficacia más reciente, no mostraron diferencias en cuanto a la supervivencia para el IFL en el estadio III, tanto si se analizaba la OS ($p = 0.92$) como la supervivencia libre de recaídas (*relapse free survival* (RFS) ($p = 0.84$)).⁷⁶ Sobre la base de estos resultados, el bolo semanal de IFL no debería utilizarse como terapia adyuvante en el cáncer colónico. Los resultados pendientes del PETACC-3 ayudarán a definir el papel del irinotecán en este tipo de tratamientos.

El MOSAIC es el primer estudio que demostró que la quimioterapia asociada es superior al régimen estándar con 5-FU/LV en la terapia adyuvante del cáncer de colon. El estudio comparó el FOLFOX4 con el LV5FU2 en 2 248 pacientes con estadios II y III.⁷⁷ El criterio de valoración primario del estudio fue la DFS a los 3 años. Se comunicaron neuropatías periféricas sensoriales de grado 3 en el 12.4% de los pacientes tratados con oxaliplatino, pero solamente el 1.1% de ellos presentó neuropatías residuales del mismo grado al año. El estudio demostró una DFS a los 3 años del 78.2% en el grupo que recibió FOLFOX y del 72.9% en los medicados con LV5FU2 ($p = 0.002$), lo que representó una reducción del riesgo del 23%.

Mientras estén pendientes los resultados definitivos del estudio MOSAIC, del NSABP C-07 (5-FU/LV en bolo más oxaliplatino), del PETACC-3 con irinotecán y del XELOX, se debe tener en cuenta la quimioterapia adyuvante con FOLFOX para los pacientes con cáncer de colon de riesgo elevado que fueron sometidos a cirugía curativa.

Quimioterapia adyuvante en el estadio II (Duke B) del cáncer de colon

Se ha discutido a lo largo de muchos años si la terapia adyuvante debe ser ofrecida rutinariamente a los pacientes con cáncer localizado y sin nódulos (estadio II o Duke B). El consenso general es que el beneficio de esta terapia en dicho estadio es real, especialmente para el pequeño número de pacientes con riesgo elevado para la recurrencia de la enfermedad.^{78,79} Sin embargo, la mayor parte de los estudios no han sido lo suficientemente grandes como para mostrar diferencias estadísticamente significativas.^{80,81}

Un gran estudio europeo, el QUASAR, aleatorizó 3 238 pacientes (91% con cáncer colorrectal estadio II o Duke B) a recibir 5-FU/LV u observarlos luego de la resección curativa. Los resultados confirmaron un pequeño (3% a 4%) pero definitivo beneficio en cuanto a la supervivencia con la quimioterapia adyuvante con 5-FU/LV, obteniéndose una OS a los 5 años del 80.3% vs. 77.4% ($p = 0.02$) y una tasa de recurrencia del 22.3% vs. el 26.2% ($p = 0.001$).⁸² Este beneficio también fue mostrado en el ensayo MOSAIC. Se ha sugerido que el tratamiento con FOLFOX puede mejorar la DFS a 3 años adicionales (86.6 vs. 83.9%, $p = 0.07$) comparada con el tratamiento 5-FU/LV, aunque sin diferencias estadísticamente significativas.⁴⁷ El análisis por subpoblaciones mostró reducciones del riesgo relativo aun mayores, del orden del 28% (HR 0.72 [0.48-1.08]) en aquellos pacientes con estadio II de alto riesgo, quienes posean uno o más de los siguientes factores en el examen de las muestras quirúrgicas: lesión T4, obstrucción o perforación del intestino, pobre diferenciación o menos de 10 nódulos linfáticos.

Otros aspectos relacionados

El beneficio de la quimioterapia adyuvante no disminuye con el aumento de la edad, aunque las comorbilidades de la población de ancianos pueden disminuir la supervivencia absoluta.⁸⁴⁻⁸⁶

La quimioterapia adyuvante debe ser tenida en cuenta y ofrecida a los pacientes mayores en tanto tengan un buen estado general y una expectativa de vida razonable.

Aunque por muchos años se ha investigado la posibilidad de implementar la inmunoterapia como tratamiento adyuvante, hasta el momento no se han confirmado resultados benéficos.⁸⁷⁻⁸⁹

En la actualidad se están desarrollando o diseñando muchos ensayos intergrupales de fase III para evaluar si la asociación con los nuevos agentes dirigidos (bevacizumab, cetuximab) puede extenderse a los pacientes con cáncer de colon en estadios II o III.

El NSABP C-08 analizará el agregado del bevacizumab al FOLFOX y el ensayo *Intergroup*, de los EE.UU., el papel del cetuximab en asociación con FOLFOX o FOLFIRI y el tratamiento secuencial de FOLFOX y FOLFIRI.

En resumen, debido a los avances en el desarrollo de la nueva generación de fármacos citotóxicos, agentes de blanco biológico y molecular, los resultados generales de la mayoría de los pacientes con cáncer de colon metastásico o avanzado han mejorado significativamente y la supervivencia se ha duplicado, comparada con la de muchos años atrás. Los fármacos administrados en forma oral poseen una eficacia equivalente al tratamiento adyuvante estándar con 5-FU/LV pero son más convenientes y seguros. La quimioterapia asociada entre el oxaliplatino y el 5-FU demostró ser superior al 5-FU/LV como adyuvante en el cáncer de colon estadio III y el papel que le cabe al irinotecán en este aspecto queda aún por ser dilucidado. Los ensayos clínicos del futuro deberán optimizar e individualizar las terapias teniendo en cuenta las características moleculares de los pacientes a fin de maximizar el beneficio clínico y minimizar la toxicidad.

El autor no manifiesta conflictos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Jemal A, Tiwari RC, Murray T, et al. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*. 54:8- 29, 2004.
2. Ries LA, Eisner MP, Kosary CL et al. (Eds) SEER Cancer statistic review, 1973- 1997. National Cancer Institute, Bethesda, MD, 2000.
3. Macdonald JS Adjuvant therapy of colon cancer. *CA Cancer J Clin*, 49(4), 202- 219, 1999.
4. Hedrick EE, Hurwitz H, Sarkar S, et al. Post-progression therapy (PPT) effect on survival in AVF2107, a phase III trial of bevacizumab in first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 22 (14S):249s (A3517), 2004.
5. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350:2344-2351, 2004
6. Saltz LB, Cox JV, Blanke CB, et al: Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *New Eng J Med*. 343:905-914, 2000.
7. Douillard JY, Cunningham D, Roth AD et al: Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer: a multicenter randomized trial. *Lancet*. 355:1041-1047, 2000.
8. Rothenberg ML, Oza AM, Bigelow RH, et al. Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol*. 21:2059-2069, 2003.
9. Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, et al. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22:23-30, 2004.
10. Rothenberg ML, Meropol NJ, Poplin EA, Van Cutsem E, Wadler S Mortality associated with irinotecan plus bolus fluorouracil/leucovorin: summary finding of an independent panel. *J Clin Oncol*, 19(18):3801-3807, 2001.
11. Andrea AAA, Satta F, Pavese I et al. Prevention of irinotecan (CPT-11) + 5- fluorouracil/leucovorin (FU/LV) diarrhea by oral administration of neomycin + bacitracin in first line treatment of advanced colo-rectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 22:278a (A1116), 2003.
12. Rixe O, Ortuzar W, Alvarez M, et al. Oxaliplatin, tetraplatin, cisplatin, and carboplatin: spectrum of activity in drug-resistant cell lines and in the cell lines of the National Cancer Institute's Anticancer Drug Screen panel. *Biochem Pharmacol*, 52:855-1865, 1996.
13. Vikovic E, Bekradda M Oxaliplatin: a new therapeutic option in colorectal cancer. *Semin Oncol*, 26(6):647-662, 1999.
14. Raymond E, Chaney SG, Taamma A et al. Oxaliplatin: a review of preclinical and clinical studies. *Ann Oncol*. 9:1053-1071, 1998.
15. De Braud F, Munzone E, Nole F et al. Synergistic activity of oxaliplatin and 5- fluorouracil in patients with metastatic colorectal cancer with progressive disease while on or after 5-fluorouracil. *Am J Clin Oncol*. 21:279-283, 1998.
16. De Gramont A, Figer A, Seymour M et al. Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 18:2938-2947, 2000.
17. Giacchetti S, Perpoint B, Zidani R et al. Phase III multicenter randomized trials of oxaliplatin added to chronomodulated fluorouracil-leucovorin as first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 18:136-147, 2000.
18. De Gramont A, A. Cervantes, T. Andre, et al. OPTIMOX study: FOLFOX 7/LV5FU2 compared to FOLFOX 4 in patients with advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22 (14S):251s (A3525), 2004
19. Tournigand C, Andre T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol*. 22(2):229-37, 2004.
20. Carmichael J, Popiela T, Radstone D, et al. Randomized comparative study of tegafur/uracil and oral leucovorin versus parenteral fluorouracil and leucovorin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 20(17):3617-3627, 2002
21. Douillard JY, Hoff PM, Skillings JR, et al. Multicenter phase III study of uracil/tegafur and oral leucovorin versus fluorouracil and leucovorin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 20(17):3605-3616, 2002.

22. Levin J, Schilsky R, Burris H, et al: North American phase III study of oral eniluracil (EU) plus oral 5-fluorouracil (5-FU) versus intravenous (IV) 5-FU plus leucovorin (LV) in the treatment of advanced colorectal cancer (ACC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 20:132a (A523), 2001.
23. Van Cutsem E, Sorensen J, Cassidy J, et al: International phase III study of oral eniluracil (EU) plus 5-fluorouracil (5-FU) versus intravenous (IV) 5-FU plus leucovorin (LV) in the treatment of advanced colorectal cancer (ACC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 20:132a (A522), 2001.
24. Ishitsuka H, Miwa M, Ishikawa T et al. Capecitabine: an oral available fluoropyrimidine with tumor selective activity. *Proc Am Assoc Cancer Res.* 36:A407, 1995.
25. Miwa M, Utoh M, Sawada N et al. Design of a novel oral fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer.* 34:1274-1281, 1998.
26. Schuller J, Cassidy J, Dumont E et al. Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients. *Cancer Chemother Pharmacol.* 45:291-297, 2000.
27. Hoff PM, Ansari R, Bastist G et al. Comparison of oral capecitabine versus intravenous fluorouracil plus leucovorin as first-line treatment in 605 patients with metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase III study. *J Clin Oncol.* 19(8):2282-2292, 2001.
28. Van Cutsem E, Twelves C, Cassidy J et al. Oral capecitabine compared with intravenous fluorouracil plus leucovorin in patients with metastatic colorectal cancer: results of a large phase III study. *J Clin Oncol.* 19(21):4097-4106, 2001.
29. Cassidy J, Tabernero J, Twelves C, et al. XELOX (capecitabine plus oxaliplatin): active first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 22(11):2084-2091, 2004.
30. Patt YZ, Liebmann J, Diamandidis D, et al. Capecitabine (X) plus irinotecan (XELIRI) as first-line treatment for metastatic colorectal cancer(MCRC): Final safety finding fro a phase II trial. *J Clin Oncol* 22 (14S):270s (A3602), 2003.
31. Grothey A, Jordan K, Kellner O, et al. Capecitabine/irinotecan (CapIri) and capecitabine/oxaliplatin (CapOx) are active second-line protocols in patients with advnced colorectal cancer (ACRC) agter failure of first-line combination therapyL /results of a randomized phase II /study. *J Clin Oncol* 22(14S):253s (A3534), 2004.
32. Goldstein NS, Armin M, Epidermal Growth factor receptor immunohistochemical reactivity in patients with American Joint Committee on Cancer Stage IV coln adenocarcinoma: implication of a standardized scoring system. *Cancer* 93:1331-1346, 2001.
33. Klapper LN, Kirschbaum MH, Sela M, et al. Biochemical and clinical implications of the ErbB/HER signaling network of growth factor receptors. *Adv Cancer Res.* 77:25-79, 2000.
34. Saltz L, Rubin M, Hochster H et al. Cetuximab (IMC-C225) plus irinotecan (CP- 11) is active in CPT- 11 refractory colorectal cancer (CRC) that expresses epidermal growth factor receptor (EGFR). *Proc Am Soc Clin Oncol*, 20:3a (A7), 2001.
35. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal caner. *N Engl J Med* 35:337-345, 2004.
36. Lenz HJ, Mayer RJ, Gold PL, et al. Activity of cetuximab in patients with colorectal cancer refractory to both irinotecan and oxaliplatin. *J Clin Oncol* 22(14S):247s (A3510), 2004.
37. Tabernero JM, Van Cutsem E, Sastre J, et al: An international phase II study of cetuximab in combination with oxaliplatin/5-fluorouracil (5-FU)/folinic acid (FA) (FOLFOX-4) in the first-line treatment of patients with metastatic colorectal cancer (CRC) expressing epidermal Growth factor receptor (EGFR). Preliminary results. *J Clin Oncol* 22(14S):248s(A3512), 2004
38. Rougier P, Raoul J-L, Van Laethem J-L, et al. Cetuximab + FOLFIRI as first-line treatment for metastatic colorectal CA. *J Clin Oncol* 22(14S):248s(A3513), 2004
39. Hecht JR, Patnaik A, Malik I, et al. ABX-EGF monotherapy in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): An updated analysis. *J Clin Oncol* 22(14S):247s(A3511), 2004.
40. Ferrara N, Gerber HP, LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669-676, 2003.
41. Kabbinavar F, Hurwitz HI, Fehrenbacher L et al. Phase II, randomized trial comparing bevacizumab plus fluorouracil (FU)/leucovorin (LV) with FU/LV alone in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 21:60-65, 2003.
42. Kabbinavar FF, Schulz J, McCleod M, et al. Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) to prolong progression-free survival in first-line colorectal cancer (CRC) in subjects who are not suitable candidates for first-line CPT-11. *J Clin Oncol* 22(14S):249s (A3516), 2004.
43. Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350:2335-2342, 2004.
44. Hedrick EE, Hurwitz H, Griffing S, et al. Post-progression therapy (PPT) effect on survival in AVF2107, a phase III trial of bevacizumab in first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol* 22 (14S):249s (A3517), 2004.
45. Benson AB, Catalano PJ, Meropol NJ et al. Bevacizumab (anti-VEGF) plus FOLFOX4 in previously treated advanced colorectal cancer (advCRC): An interim toxicity analysis of the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study E3200. *J Clin Oncol* 22:A975, 2003.
46. Chen HX, Mooney M, Boron M, et al. Bevacizumab (BV) plus 5-FU/Leucovorin (FU/LV) for advanced colorectal cancer (CRC) that progressed after standard chemotherapies: NCI Treatment Referral Center trial (TRC-0301). *J Clin Oncol* 22 (14S):248s(A3515), 2004.
47. Novotny WF, Holmgren E, Nelson B, et al. Bevacizumab (a monoclonal antibody to vascular endothelial growth factor) does not increase the incidence of venous thromboembolism when added to first-line chemotherapy to treat metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22(14S):252s(A3529), 2004.
48. Fisher GA, Kuo CD, Cho CD, et al. A phase II study of gefitinib in combination with FOLFOX-4 (IFOX) in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22(14S):247s(A3514), 2004
49. Oza AM, Townsley CA, Siu LL, et al. Phase II study of erlotinib (OSI-774) in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22(14S):196s (A785), 2004.
50. Meyerhardt JA, Xhu A, Enzinger PC, et al. Phase II study of capecitabine, Oxaliplatin and erlotinib in previously treated patients with metastatic colorectal cancer (MCRC). *J Clin Oncol* 22(14S):265s (A3580), 2004.
51. Goldberg RM, Fleming TR, Tangem CM et al. Surgery for recurrent colon cancer: strategies for identifying resectable recurrence and success rates after resection. *Ann Inter Med*, 129:27-35, 1998.

52. DeMatteo RM, Minnard EA, Kemeny N et al. Outcome after resection of both liver and lung metastases in patients with colorectal cancer. *Proc Am Soc Clin Oncol*, 18:249a(A958), 1999.
53. Giacchetti S, Itzhaki M, Gruia G et al. Longterm survival of patients with unresectable colorectal cancer liver metastases following infusional chemotherapy with 5-fluorouracil, leucovorin, oxaliplatin and surgery. *Ann Oncol*. 10:663-669, 1999.
54. Kemeny MM, Adak S, Gray B et al. Combined modality treatment for resectable metastatic colorectal carcinoma to the liver: surgical resection of hepatic metastases in combination with continuous infusion of chemotherapy—an intergroup study. *J Clin Oncol*. 20:1499-1505, 2002.
55. Kemeny N, Jarnagin W, Gonen M, et al. Phase I/II study of hepatic arterial therapy with floxuridine and dexamethasone in combination with intravenous irinotecan as adjuvant treatment after resection of hepatic metastases from colorectal cancer. *J Clin Oncol* 21 (17):3303-3309, 2003.
56. Leonard GD, Fong Y, Jarnagin W, et al. Liver resection after hepatic arterial infusion (HAI) plus systemic oxaliplatin (Oxal) combinations in pretreated patients with extensive unresectable colorectal liver metastases. *J Clin Oncol* 22(14S):256s(A3542), 2004
57. Buyse M, Zeleniuch-Jaquitte A, Chalmers T, et al: Adjuvant therapy of colorectal cancer-why we still don't know. *JAMA* 259:3571-3578, 1988.
58. Wolmark N, Fisher B, Colangelo L, et al: Postoperative adjuvant chemotherapy or BCG for colon cancer: results from NSABP protocol C-01. *J Natl Cancer Inst*. 80:30-36, 1988.
59. Laurie JA, Moertel CG, Fleming TR, et al. Surgical adjuvant therapy of large- bowel carcinoma: an evaluation of levamisole and the combination of levamisole and 5-fluorouracil. The North Central Cancer Treatment Group and the Mayo Clinic. *J Clin Oncol* 7:1447-1456, 1989.
60. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al: Levamisole and fluorouracil for adjuvant therapy of resected colon carcinoma. *N Engl J Med* 322:352-358, 1990.
61. Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS, et al. Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma: a final report. *Ann Intern Med*. 122:321-326, 1995.
62. Wolmark N, Rockette H, Fisher B, et al: The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: Results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol C-03. *J Clin Oncol* 11:1879-1887, 1993.
63. Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, et al: Fluorouracil (FU), leucovorin (LV), and levamisole (LEV) adjuvant therapy for colon cancer: Preliminary results of INT- 0089. *Proc Am Soc Clin Oncol* 15:211, 1996.
64. Haller DG, Catalano PJ, Macdonald JS, et al. Fluorouracil, leucovorin, and levamisole adjuvant therapy for colon cancer: Five-year final report of INT-0089. *Proc Am Soc Clin Oncol* 17:265a (A 982), 1998.
65. Taal BG, Van Tinteren H, Zoetmulder FA. Adjuvant 5FU plus levamisole in colonic or rectal cancer: improved survival in stage II and III. *Br J Cancer* 85:1437- 1443, 2001.
66. Arkenau HT, Bermann A, Rettig K, et al: 5-Fluorouracil plus leucovorin is effective adjuvant chemotherapy in curatively resected stage III colon cancer: long- term follow-up results of the adjCCA-01 trial. *Ann Oncol*. 14(3):395-9, 2003.
67. Staib L, Link KH, Beger HG. Toxicity and effects of adjuvant therapy in colon cancer: result of the German prospective, control randomized multicenter trial FOGT-1. *J Gastrointest Surg* 5:275-281, 2001.
68. QUASAR Collaborative Group. Comparison of fluorouracil with additional levamisole, higher-dose folinic acid, or both, as adjuvant chemotherapy for colorectal cancer: a randomized trial. *Lancet* 355:1588-1596, 2000.
69. Andre T, Colin P, Louvet C et al: Semimonthly versus monthly regimen of fluorouracil and leucovorin administered for 24 or 36 weeks as adjuvant therapy in stage II and III colon cancer: results of a randomized trial. *J Clin Oncol*, 21(15), 2896-2903, 2003.
70. Saini A, Norman AR, Cunningham D, et al: Twelve weeks of protracted venous infusion of fluorouracil (5-FU) is as effective as 6 months of bolus 5-FU and folinic acid as adjuvant treatment in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 88:1859-65, 2003.
71. Scheithauer W, McKendrick J, Begbie S, et al: Oral capecitabine as an alternative to i.v. 5-fluorouracil-based adjuvant therapy for colon cancer: safety results of a randomized, phase III trial. *Ann Oncol* 14:1735-1743, 2003.
72. J. Cassidy, W. Scheithauer, J. McKendrick, et al. Capecitabine (X) vs. bolus 5- FU/leucovorin (LV) as adjuvant therapy for colon cancer (the X-ACT study): efficacy results of a phase III trial. *J Clin Oncol* 22(14S):247s(A3509), 2004
73. Wolmark N, Wieand S, Lembersky B, et al. A phase III trial comparing oral UFT to FULV in stage II and III carcinoma of the colon: Result of NSABP Protocol C-06. *J Clin Oncol* 22(14S):247s(A3508), 2004
74. Rothenberg ML, Meropol NJ, Poplin EA, et al: Mortality associated with irinotecan plus bolus fluorouracil/leucovorin: summary finding of an independent panel. *J Clin Oncol*, 19(18), 3801-3807, 2001.
75. Sargent D, Niedzwiecki D, O'Connell MJ et al: Recommendation for caution with irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for colorectal cancer. *N Engl J Med*, 345, 144-146, 2001.
76. Saltz LB, Niedzwiecki D, Hollis D, et al. Irinotecan plus fluorouracil/leucovorin (IFL) versus fluorouracil/leucovorin alone (FL) in stage III colon cancer (intergroup trial CALGB C89803). *J Clin Oncol* 22(14S): 245s (A3500), 2004.
77. Andre T, Boni C, Mounedji-Boudiaf L, et al. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med* 350:2344-2351, 2004
78. Mamounas E, Wieand S, Wolmark N, et al. Comparative Efficacy of Adjuvant Chemotherapy in Patients With Dukes' B Versus Dukes' C Colon Cancer: Results From Four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Adjuvant Studies (C-01, C-02, C-03, and C-04). *J Clin Oncol* 17: 1349-1355, 1999.
79. Piedbois P: Introduction, 4th International Conference on Colorectal Cancer in Paris. *Semin Oncol* 28 (suppl 1): 1-3, 2001.
80. Marsoni S for IMPACT investigators: Efficacy of adjuvant fluorouracil and leucovorin in Stage B2 and C colon cancer. *Semin Oncol* 28 (suppl 1):14-19, 2001.
81. Benson III AB, Schrag D, Somerfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology recommendations on adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *J Clin Oncol* 22:3408-3419, 2004
82. Gray RG, Hills BR, Hills R, et al. QUASAR: A randomized study of adjuvant chemotherapy (CT) vs. observation including 3238 colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* 22(14S):245s(A3501), 2004
83. Hikish T, Boni C, Navarro M et al. FOLFOX4 as adjuvant treatment for stage II colon cancer (CC): Subpopulation data from the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* 22(14S):274s(A3619), 2004
84. Sargent DJ, Goldberg RM, Jacobson SD, et al. A pooled analysis of adjuvant chemotherapy for resected colon cancer in

elderly patients. N Engl J Med 345(15):1091-7, 2001

85. Iwashyna TJ and Lamont EB. Effectiveness of adjuvant fluorouracil in clinical practice: A population-based cohort study of elderly patients with stage III colon cancer. J Clin Oncol 20:3992-3998, 2002.
86. Schrag D, Gelfand S, Bach P, et al: Adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer: Insight from a SEER-medicare cohort. Pro Am Soc Clin Oncol 20:123a (A 488), 2001.
87. Punt CJ, Nagy A, Douillard, et al. Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: a randomised study. Lancet. 360(9334): 671-677, 2002.
88. Fields AL, Keller AM, Schwartzberg L et al. Edrecolomab (17-1A antibody) (EDR) in combination with 5-fluorouracil (FU) based chemotherapy in the adjuvant treatment of stage III colon cancer: results of a randomized North American phase III study. Proc Am Soc Clin Oncol, 21:128a (A508), 2002.
89. Haller DG: Update of clinical trials with edrecolomab: A monoclonal antibody therapy for colorectal cancer. Semin Oncol 28 (suppl 1):25-30, 2001.

EFECTO DE UN EXTRACTO DE CIANOBACTERIA EN EL CULTIVO Y CONSERVACION DE *HELICOBACTER PYLORI*



Columnista Experta de SIIC
Dra. Alba Edith Vega

Docente-Investigador en la Universidad Nacional de San Luis. Campo de especialización Microbiología.

Introducción

Helicobacter pylori es una bacteria cuya presencia en la mucosa gástrica está asociada al desarrollo de diversas enfermedades gastroduodenales. El subcultivo de este microorganismo *in vitro* es difícil de obtener, particularmente en medio líquido, debido a que requiere medios de cultivo suplementados usualmente con suero fetal bovino (SFB) y sangre o sus derivados en medio sólido.¹⁻⁴ Estos suplementos encarecen el cultivo y dificultan la posterior purificación debido a la asociación del suero con proteínas celulares y extracelulares, o la posible contaminación con virus del SFB, especialmente con el virus de la diarrea bovina.^{5,6} *Helicobacter pylori* es considerado además una bacteria frágil ya que pocas cepas resisten la conservación a temperaturas bajas o muy bajas,⁷ perdiendo tanto la infectividad como la capacidad de ser cultivadas. Se ha demostrado que durante la conservación en frío sufre una transformación de la forma bacilar viable a la cocoide, considerada como no cultivable. También se ha informado que *H. pylori* es dañado severamente durante el proceso de liofilización.⁸ Otro inconveniente que presenta la conservación de este microorganismo es la limitada viabilidad de los subcultivos. En medio sólido *H. pylori* puede soportar desde 4 subcultivos hasta un máximo de 20, dependiendo de la cepa,⁸ éste es un procedimiento que insume tiempo e incrementa el riesgo de contaminación.⁸ Los inconvenientes antes citados dificultan el establecimiento de colecciones de cepas y el estudio de este microorganismo. Se han propuesto diversos suplementos para el cultivo de *H. pylori*, entre los que se citan suero de caballo,⁴ eritrocitos lisados, hemina,³ extracto de levadura,⁴ peptona,⁴ IsoVitaleX,⁹ Vitox,² almidón,¹ ciclodextrina,⁴ sulfato ferroso más piruvato de sodio (FP) y/o mucina.¹⁰ Si bien algunos aumentan el crecimiento de *H. pylori* no reemplazan el suero o derivados de la sangre en los medios de cultivo.¹⁰ Por otra parte, existen pocos estudios de investigación sistemática sobre condiciones y medios de conservación en frío de este microorganismo. Diversos autores han propuesto para la conservación de *H. pylori* desde muestras de biopsias gástricas como de aislamientos clínicos, el uso de tripticasa de soja (TSC), caldo cisteína Albimi, caldo Brucella o leche descremada, adicionados con diferentes concentraciones de SFB, sangre equina (SE), solución de mucina al 10% o glicerol.¹¹⁻¹⁴ Recientemente se informó que los extractos de cianobacterias o algas pueden reemplazar satisfactoriamente nutrientes en el medio de cultivo, tanto de microorganismos –incrementando su viabilidad¹⁵– como del cultivo de células. Particularmente, las cianobacterias filamentosas se emplean para la obtención de productos de alto valor nutricional tales como aminoácidos, proteínas, polipéptidos y carbohidratos.¹⁵⁻¹⁷ El objetivo de nuestro estudio fue evaluar el empleo de un extracto de cianobacteria (EC) en el cultivo de *H. pylori* en reemplazo de sangre y SFB, en medios sólido y líquido, respectivamente, y la conservación en frío a diferentes temperaturas, en reemplazo de un medio citado en bibliografía, TSC-20% glicerol.

Materiales y métodos

Cepas y condiciones de aislamiento

Para los estudios de crecimiento en medio sólido y líquido con EC se emplearon 11 cepas de *H. pylori* aisladas de muestras de biopsia gástrica de pacientes adultos sintomáticos que concurren al Servicio de Gastroenterología del Complejo Sanitario San Luis y una cepa obtenida del Servicio de Microbiología del Hospital Universitario de la Princesa, Madrid, España.¹⁸ Para los ensayos de conservación en frío se utilizaron dos cepas de *H. pylori* HP788 y HP829.

En todos los estudios se empleó la cepa NCTC 11638 como cepa de referencia, gentilmente cedida por el Dr. Manuel López-Brea. El cultivo de las muestras de biopsia se realizó en agar Mueller-Hinton (AMH) adicionado con sangre de oveja al 7% (AMH-7% SO) y suplemento antibiótico (vancomicina 10 mg/l, trimetoprima 5 mg/l y polimixina B 2 500 U/l) Merck. Se incubó a 37°C en atmósfera de microaerofilia provista por una mezcla de gases (O₂ 5%, 10% CO₂ y 85% N₂) durante 7 a 10 días. Para el aislamiento primario en medio AMH-0.4% EC se tomaron muestras de biopsia gástrica de 20 pacientes dispépticos (8 mujeres y 12 hombres). El medio fue suplementado con la misma mezcla antibiótica e incubado en las mismas condiciones indicadas anteriormente. La identificación de los microorganismos se realizó por morfología de las colonias, tinción de Gram y producción de oxidasa, catalasa y ureasa.

Extracto de cianobacteria

Se obtuvo a partir de biomasa de la cianobacteria filamentosa heterocística, *Nostoc* sp. de acuerdo con Silva y col.¹⁹ La conservación del extracto se realizó a -20°C o por liofilización.

Medios y condiciones de cultivo

Cultivo en medio sólido: Se empleó EC en concentraciones de 0.4% y 0.6% en reemplazo de SO. La obtención de los inóculos se realizó a partir de cultivos de tres días en AMH-7% SO que fueron resuspendidos en caldo Mueller-Hinton (CMH) a una concentración final de 1-5 x 10⁸ ufc/ml. Un volumen de 0.1 ml de esta suspensión fue subcultivado sobre AMH-0.4% EC y AMH-0.6% EC. Se emplearon las mismas condiciones de incubación indicadas para el aislamiento primario.

Crecimiento en medio líquido:

Para el estudio del empleo de EC en reemplazo de SFB los cultivos de nueve cepas de *H. pylori*¹⁸ se iniciaron con una concentración de 1-3 x 10⁴ ufc/ml y desarrollados en erlenmeyers de 125 ml que contenían 20 ml de CMH suplementado con 0.3, 0.7 y 1% de EC; como medio de referencia se empleó CMH-5% SFB. Los cultivos fueron incubados a 37°C, durante 120 h y agitados a 200 rpm en atmósfera de microaerofilia. El recuento de los microorganismos se realizó diariamente, por duplicado, sobre AMH-5% SO. La cinética de crecimiento se caracterizó por los siguientes parámetros: período lag (h), por el método de Lodge y Hinshelwood, tiempo de generación (t_g) (h) y concentración de biomasa final (ufc/ml).²⁰

Medios y temperaturas de conservación en frío

Se empleó EC-20% G y un medio citado en bibliografía, TSC-20% G. Se ensayó la conservación en frío de *H. pylori* a tres temperaturas, 4°C, -20°C y -80°C durante 60 días, empleándose para ello 300 µl de una suspensión de 10⁸ ufc/ml obtenida a partir de un cultivo de tres días en AMH-7% SO.

Índices de recuperación (IR)

Para determinar la recuperación se realizaron recuentos de los cultivos obtenidos a los 15, 30 y 60 días en AMH-7% SO a las 48 h de incubación en las mismas condiciones descritas anteriormente. Los IR se expresaron como porcentajes, donde:

$$IR = \frac{\text{ufc/ml recuperadas}}{\text{ufc/ml suspensión inicial}} \times 100$$

Análisis estadístico

El análisis estadístico de los datos de crecimiento y conservación en frío de las cepas se realizó con

Resultados

Cultivo en medio sólido

Todas las cepas de *H. pylori* aisladas desde muestras de biopsia gástrica en AMH-5% SO fueron subcultivadas satisfactoriamente en AMH-EC, observándose un desarrollo similar en los medios a las dos concentraciones de EC (0.4% o 0.6%) ensayadas. Sin embargo, se obtuvo un menor porcentaje de aislamiento cuando se empleó AMH-0.4% EC, (30% [6/20]) respecto de los obtenidos con AMH-5% SFB (43.3% [9/20]). Este resultado podría atribuirse al mayor desarrollo de contaminantes, especialmente *Candida* spp., en AMH- 0.4% EC aun cuando se utilizó en ambos medios la misma mezcla antibiótica.¹⁸

Cultivo en medio líquido

Los resultados obtenidos en el cultivo en medio líquido suplementado con EC a concentraciones de 0.3, 0.7 y 1% demostraron un aumento significativo ($p < 0.05$) a la concentración 0.7% respecto de 0.3% en algunas cepas, pero no hubo diferencias significativas con respecto a la concentración de 1% de EC. Por lo tanto se eligió la concentración de 0.7% para los cultivos en medio líquido. No se detectaron períodos lag en las cepas estudiadas por el método de Lodge y Hinshelwood. Los tiempos de generación de las nueve cepas de *H. pylori* en CMH-0.7% EC estuvieron comprendidos entre 2.39 h a 4.62 h; mientras que en CMH-5% SFB los valores fueron 3.15 h a 4.7 h. En general se observó 35% de disminución en los tiempos de generación cuando se empleó el medio CMH-0.7% EC para todas las cepas, excepto para dos cepas y NCTC 11638, en las que los tiempos de generación fueron similares con ambos suplementos. Para siete cepas de *H. pylori* las concentraciones celulares finales obtenidas con CMH-0.7% EC fueron más altas que las obtenidas con CMH-5% SFB, pero los incrementos fueron estadísticamente significativos sólo para cuatro cepas.

Conservación en frío

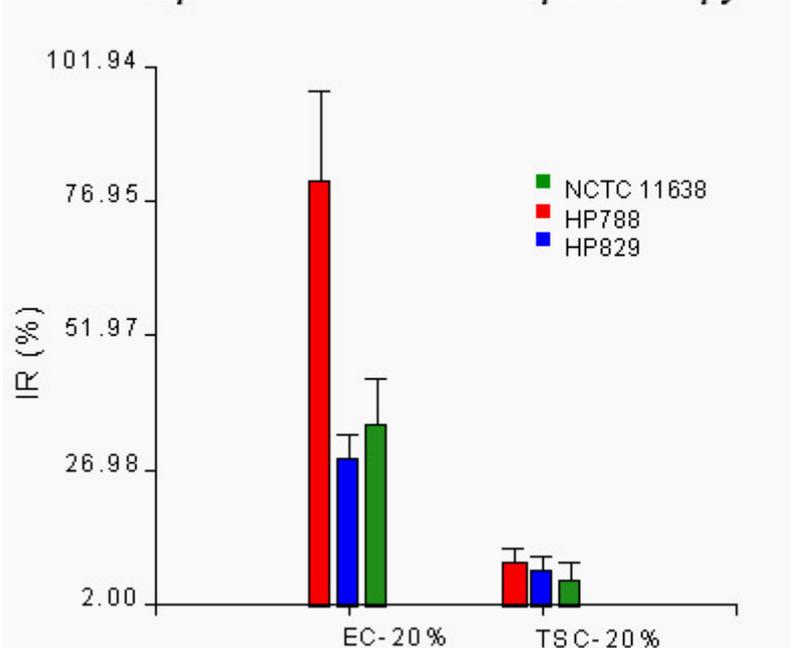
Los resultados obtenidos empleando extracto de cianobacterias para la conservación en frío de cepas de *H. pylori* fueron presentados en el Congreso Latinoamericano de Biotecnología Algal (CLABA 2004, Bs. As., 25 al 29 de octubre). La conservación a 4°C permitió la recuperación hasta los 30 días con valores IR entre 10^{-4} y 10^{-6} , dependiendo de la cepa, los IR obtenidos fueron aproximadamente el doble para EC-20% G respecto del TSC-20% G. La recuperación obtenida a -20°C a los 60 días en EC-20% G fue entre 10 y 20 veces mayor con respecto a TSC-20% G con valores de IR = 41.33 vs.

2 para la cepa HP788 y 33 vs. 3, para la cepa HP829, en EC-20% G y TSC-20% G, respectivamente. En TSC-20% G se recuperaron 2 de las 3 cepas en estudio, mientras que con EC-20% G se recuperó la totalidad de las cepas ensayadas (Tabla 1). A -80°C se observó un marcado incremento de la recuperación con el uso de EC-20% G ($p < 0.05$) en todas las cepas y períodos de conservación empleados. Los IR oscilaron entre 100% y 24.4% para EC-20% G y entre 10% y 4.8% en TSC-20% G (Figura 1).

Tabla 1. Índices de recuperación de cepas de *Helicobacter pylori* obtenidos por conservación a -20° C en los medios TSC-20%G y EC-20% G durante 60 días.

Cepas de <i>H. pylori</i>	Medios de conservación	Tiempo de conservación (días)		
		15	30	60
		IR (%)		
NCTC 11638	TSC-20%G	11	8	Sin desarrollo
	EC-20%G	11,8	9,2	1,1 x10 ⁵
HP788	TSC-20%G	10	5	2
	EC-20%G	66,7	16	41,33
HP829	TSC-20%G	11,3	6	3
	EC-20%G	33	10	33

Recuperación a -80°C de cepas de *H. pylori*



Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio demuestran que EC sustituye completamente el SFB y la sangre, en medio líquido y sólido, respectivamente, a concentraciones inferiores a las comúnmente empleadas para estos suplementos.

Además, EC-20% G puede reemplazar completamente el medio TSC-20% G citado en la bibliografía, en ensayos de conservación de *H. pylori* a bajas temperaturas.

El medio sólido suplementado con EC permitió el crecimiento de todas las cepas de *H. pylori* ensayadas, demostrando que puede reemplazar satisfactoriamente la sangre o derivados, y que puede ser empleado tanto para el cultivo de cepas adaptadas de laboratorio como para el aislamiento primario de *H. pylori*.

En este estudio se obtuvo un menor porcentaje de aislamientos con AMH-0.4% EC debido a que estuvo asociado con mayor contaminación por levaduras, esto indicaría la necesidad de ensayar

otros suplementos antibióticos cuando se emplea el medio AMH-EC en aislamiento primario. En medio líquido suplementado con EC se observaron tiempos de generación similares o significativamente menores ($p < 0.05$) con respecto al medio de referencia, siendo en general esta disminución del 35%, con excepción de tres cepas, en las que los t_g fueron similares con ambos suplementos.

Los valores obtenidos en este trabajo son menores a los informados por otros autores, lo que indica que EC permite crecer a *H. pylori* a alta velocidad.

Estos valores son similares únicamente a los informados para diferentes cepas de *H. pylori* en cultivos de medios ricos suplementados con FP y mucina.¹⁰ Además, con el suplemento EC se logró un incremento de la biomasa final en nueve de las cepas estudiadas, siendo éste significativo ($p < 0.05$) para la cepa de referencia NCTC 11638 y una cepa local. Las concentraciones finales de biomasa de *H. pylori* obtenidas en este estudio empleando EC constituyen los mayores valores informados en la bibliografía.^{3,9}

Los IR obtenidos con EC-20% G en la conservación en frío fueron superiores a los alcanzados con TSC-20% G en todas las temperaturas ensayadas, siendo marcadamente significativo ($p < 0.05$) este incremento a -80°C . Existe poca información en la bibliografía que cuantifique la recuperación de *H. pylori* en frío, la mayoría de los trabajos consultados están orientados a determinar la recuperación de las cepas pero no la cuantificación de dicha recuperación.^{8,11,21} Este trabajo es el primer informe de conservación de *H. pylori* a 4°C

por un período de 30 días. El incremento de los IR alcanzado con el empleo de EC indica que este suplemento nutricional no sólo reemplaza el SFB, la sangre o los nutrientes en el medio sino que además protege a *H. pylori* y conserva la viabilidad de este microorganismo.

Los importantes resultados obtenidos en medio suplementado con EC en el cultivo y la conservación a bajas temperaturas de *H. pylori* pueden atribuirse a la contribución de diferentes nutrientes aportados por el extracto, entre los que se encuentran 16 aminoácidos solubles (35%), proteínas crudas (45.6%), carbohidratos (1.9%), azúcares reductores (2.8%) y diferentes minerales.¹⁸

El uso de medios de cultivo que no requieran la adición de sangre o derivados que permitan un adecuado crecimiento y la obtención de altas concentraciones celulares es importante en el cultivo de *H. pylori* con el objeto de obtener antígenos, vacunas y enzimas. Además, la conservación de cultivos viables a bajas temperaturas permite el establecimiento de colecciones de cepas para un posterior estudio epidemiológico, genético o de resistencia antimicrobiana. Finalmente el uso de EC tiene la ventaja, respecto de los suplementos convencionales, de su bajo costo, fácil preparación y conservación, y además cumple con la tendencia actual de evitar el uso de productos derivados de animales.

Los autores no manifiestan conflictos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Coudron PE and Stratton CW. 1995. Factors affecting growth and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in liquid media. J. Clin. Microbiol. 33:1028- 1033.
2. Morgan DRR, Fredman CE, Depew, and WG Kraft. 1987. Growth of *Campylobacter pylori* in liquid media. J. Clin. Microbiol. 25:2123-2125.
3. Shahamat M, Mai UEH, Paszko-Kolva C y col. 1991. Evaluation of liquid media for growth of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 29:2835-2837.
4. Walsh EJ and Moran AP. 1997. Influence of medium composition on the growth and antigen expression of *Helicobacter pylori*. J. Appl. Microbiol. 83:67-75.
5. Ridpath SR and Ridpath JF. 1998. Prevalence of bovine viral diarrhoea virus genotypes and antibody against those viral genotypes in fetal bovine serum. J. Vet. Diagn. Invest. 10:135-139.
6. Weber EL. 2000. Suero Fetal Bovino: Contaminación con virus de la diarrea viral bovina. Banco Argentino de células: <http://www.abac.org.ar/suerofetalbovino/html>.
7. Ohkusa T, Hiroto M, Endo S y col. 2004. *Helicobacter pylori* is a fragile bacteria when stored at low and ultra-low temperatures. J Gastroenterol Hepatol 19:200-204.
8. Ansorg R, Von Recklinghausen G, Romarius R y col. 1991. Evaluation of techniques for isolation, subcultivation, and preservation of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 29:51-53.
9. Kitsos CM, Christian TK and Stadlander H. 1998. *Helicobacter pylori* in liquid culture: evaluation of growth rates and ultrastructure. Curr Microbiol. 37:88-93.
10. Jiang X and Doyle MP. 2000. Growth supplements for *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 38:1984-1987.
11. Han SW, Flamm R, Hachem CY y col. 1995. Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 14:349-352.

12. Liaw SJ, Teng LJ, Ho SW y col. 1998. Comparison of preservation mixtures for *Helicobacter pylori*. J Microbiol Immunol Infect 31:261-263.
13. Heep M, Scheibl K, Degrell A, Lehn N. 1999. Transport and storage of fresh and frozen gastric biopsy specimens for optimal recovery of *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol. 37:3764-3766.
14. Alarcón T, Domingo D, Prieto N and López-Brea M. 2000. Clarithromycin resistance stability in *Helicobacter pylori*: influence of the MIC and type of mutation in the 23S rRNA. J Antimicrob Chemother 46:613-616.
15. Maeda T, Tanaka K, Katsuda H et al. 1981. Cell culture method. European Patent Office. Publication number EP 0 049 632 A2.
16. Fingerhut U, Webb LE, Soeder CJ. 1984. Increased yields of *Rhizobium japonicum* by an extract of the green alga, *Scenedesmus obliquus* (276-3a). Appl Microbiol and Biotechnol. 19:358-360.
17. Pushparaj B, Pelosi E, Carlozzi P, Torzillo G. 1995. Yield and biochemical composition of a marine cyanobacterium (*Nodularia* sp) in outdoor culture. Aquatic Microbial Ecology. 9:13-16.
18. Vega AE, Cortiñas TI, Mattana CM y col. 2003. Growth of *Helicobacter pylori* using cyanobacterial extract. J Clin Microbiol.41:5384-5388.
19. Silva PG, González DM, Aguilar E, Silva HJ. 1998. Nutritional evaluation of Cyanobacterium (*Nostoc* sp.) extract in *Rhizobium* cultures. World J. Microbiol and Biotechnol. 14:223-228.
20. Pirt SJ. 1975. In Blackwell Scientific Publication (ed). Principles of microbe and cell cultivation, Oxford.
21. Shahamat M, Paszko-Kolva C, Mai UE y col. 1992. Selected cryopreservatives for long term storage of *Helicobacter pylori* at low temperatures. J Clin Pathol 45:735-736.