

Efecto de Celecoxib en una Variante Multirresistente del Tumor TA3. Una Descripción Histológica

Celecoxib Effect in a Multiresistant Variant of the TA3 Tumor. A Histological Description

Carlos Rosas C.*; Ignacio Roa*****; Mariana Sinning O.*; Marcela Fuenzalida B.* & David Lemus A.*

ROSAS, C. C.; ROA, I.; SINNING, O. M.; FUENZALIDA, B. M. & LEMUS, A. D. Efecto de celecoxib en una variante multirresistente del tumor TA3. Una descripción histológica. *Int. J. Morphol.*, 31(2):392-398, 2013.

RESUMEN: En el estudio del cáncer, se utilizan diversas líneas celulares, cada una de ellas con características propias. Una de esas líneas tumorales es la variante multirresistente a drogas del tumor TA3. Si bien, existen diversos estudios con esta línea tumoral, no existe una descripción morfológica detallada de esta, ni tampoco que se observe el efecto del Celecoxib, un inhibidor de COX-2 sobre este tejido. Se usaron 18 ratones divididos en 3 grupos, los cuales recibieron: Inoculación de PBS; inoculación de células tumorales TA3; inoculación de células tumorales + tratamiento con Celecoxib (1000 ppm), respectivamente. Los ratones fueron sacrificados y procesados histológicamente para ser teñidos con H&E, PAS y Arteta. El estudio reveló que tumor muestra una marcada heterogeneidad, algunas áreas de necrosis y una neovascularización central y periférica. Además, Celecoxib redujo significativamente la invasión tumoral en el hígado ($p < 0,05$). Otros órganos no sufrieron diferencias significativas cuando eran comparados con el grupo tratado. Los resultados son similares a descripciones parciales realizadas previamente y son comparables a otras líneas tumorales. Se cree que la vía de administración del fármaco es crítica para la interpretación de los resultados. Estos resultados son importantes para la discusión de otras investigaciones en donde Celecoxib es usado como un fármaco antiangiogénico y sirve como base para futuras investigaciones con esta línea tumoral.

PALABRAS CLAVE: Tumor; Angiogénesis; Celecoxib.

INTRODUCCIÓN

Cuando es necesario observar la actividad antitumoral de un determinado agente farmacológico, es importante observar el comportamiento *in vivo* de las células tumorales. Es por ello que muchos autores han basado sus estudios en el uso de varios tumores trasplantables (Guerrero *et al.*, 1992; Zipper *et al.*, 1995). Es así que, se han desarrollado investigaciones en la línea de células TA3, que corresponden a un adenocarcinoma mamario de crecimiento ascítico. Su variante TA3-MTX-R, tiene la característica de ser resistente a Metotrexato, un citostático que ha sido ampliamente usado como droga anticancerígena. (Guerrero *et al.*; Zipper *et al.*)

La enzima ciclooxigenasa-2 (COX-2), la cual se encuentra vinculada en la respuesta inflamatoria, sería para algunos autores la responsable del aumento en el crecimiento tumoral y su rápida proliferación. Además, existe evidencia de sobreexpresión de COX-2 en una variedad de cánceres (Cianchi *et al.*, 2001; Dempke *et al.*, 2001).

Recientes estudios confirman que pacientes que sobreexpresan COX-2 en células tumorales pancreáticas tienen peor pronóstico que aquellos que no lo hacen (Rager *et al.*, 2007; Xu *et al.*, 2008).

Celecoxib, un potente inhibidor selectivo de la COX-2, utilizado comúnmente como antiinflamatorio en enfermedades como osteoartritis y artritis reumatoide, está bajo estudios para el tratamiento de variados tumores malignos tales como cáncer colorectal, cáncer de mama, pulmón y próstata (Amrite *et al.*, 2006).

Aunque se ha reportado que otros fármacos antiinflamatorios tales como anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) han mostrado una disminución en la progresión tumoral en algunas neoplasias como cáncer de colon (Tosetti *et al.*, 2002; Zhou *et al.*, 2007; Xiao *et al.*, 2008), el Celecoxib no posee los tradicionales efectos cola-

* Laboratorio de Embriología Experimental y Molecular, Programa de Anatomía y Biología del Desarrollo (ICBM), Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Chile.

** Programa de Magister en Ciencias Biológicas y Biomédicas mención Morfología, Universidad de Chile, Chile.

*** Unidad de Histología y Embriología, Depto. de Ciencias Básicas Biomédicas, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad de Talca, Chile.

terales como daño gástrico (Wolfe *et al.*, 1999; Silverstein *et al.*, 2000; Thomson, 2001)

Si bien, el efecto de varios fármacos ha sido estudiado frente la línea tumoral TA3, la acción del Celecoxib no ha sido reportada previamente, así como una descripción histológica detallada del tumor. Es por ello que el estudio de este fármaco en un modelo *in vivo* resistencia a drogas antineoplásicas como el tumor TA3-MTX-R es importante para comprender la biología del cáncer.

MATERIAL Y METODO

Material Biológico. Para el presente estudio de utilizaron 18 ratones hembras (*Mus musculus*) cepa AJ, clínicamente sanos, con un peso promedio de 23 g y 2 meses de edad, mantenidos en el Bioterio Central de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Estos fueron distribuidos en tres grupos: Grupo 1; 6 ratones a los cuales se les inoculó 0,2 ml de suero fisiológico (im) en el miembro posterior derecho. Grupo 2; 6 ratones a los cuales se les inoculó 0,2 ml de dilución de líquido ascítico que contenía células TA3-MTX-R (im) en el miembro posterior derecho. Grupo 3; 6 ratones a los cuales se les inoculó 0,2 ml de dilución de líquido ascítico que contenía células TA3-MTX-R (im) en el miembro posterior derecho. 6 días postinoculación se les administró 1000 ppm diarias de Celecoxib en el agua de consumo. Fueron mantenidos *ad libitum*, en jaulas conservadas a temperatura ambiente y de acuerdo al protocolo aprobado por el Comité de Bioética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

Línea Tumoral. Utilizamos células tumorales TA3-MTX-R de crecimiento ascítico provenientes de una línea tumoral TA3, que es resistente a Metotrexato. (Guerrero *et al.*), en una cantidad de 0,2 mL del líquido ascítico tratado anteriormente y que presentaba 9×10^5 células tumorales.

Celecoxib. Utilizamos Celecoxib (Celebra® de Laboratorios Pfizer©) en su presentación de 10 cápsulas de 200 mg. Para la administración del fármaco se diluyó una cápsula en el agua de consumo hasta alcanzar la concentración media de 1000 ppm., de acuerdo a lo descrito por Ragel *et al.* Este procedimiento fue repetido semanalmente y se administró al grupo 3 en el agua de consumo 6 días después de la inoculación de las células tumorales y durante todo el ensayo.

Al día 19, se procedió al sacrificio de los ratones y a la extirpación de los tumores, realizando una descripción inmediata, similar a la realizada día a día. Además de las muestras de tumor, se tomaron muestras de esófago, estó-

mago, duodeno, hígado, pulmón, corazón y bazo para evaluar los efectos de la terapia y de la presencia del tumor TA3-MTX-R, de cada uno de los grupos en comparación al Grupo 1. Tanto los tumores como las muestras de los órganos fueron fijados en Formalina Tamponada al 10% por 48 horas, realizándose el procesamiento histológico necesario para obtener cortes de 5 μ m, los que fueron teñidos con H & E, Ácido Peryódico de Schiff (PAS) y Arteta.

Estimación Semicuantitativa de invasión tumoral. Para la comparación grupal de un determinado órgano se realizó una estimación semicuantitativa de un campo microscópico de acuerdo a la presencia de células tumorales usando la siguiente escala:

- 0 = Sin presencia
- + = Leve presencia
- ++ = Moderada presencia
- +++ = Abundante presencia

La estimación por grupo se realizó observando 30 campos microscópicos con la técnica de doble ciego y tabulando los datos de acuerdo a lo observado en cada uno de ellos. Se calculó el promedio, error standard y se aplicó el test de t de student.

RESULTADOS

Análisis Histológico e Histoquímico del Tumor. Al observar la zona del muslo de los ratones del Grupo 1; se pudo constatar una histología normal del tejido muscular de la zona, tanto en organización, número y forma celular.

En la muestra del muslo de los ratones del Grupo 2 y 3, se observa aumento en la celularidad, la cual invade el miembro posterior. El tumor presenta un área central y una periférica fácilmente distinguible en aumento menor. En la periferia existe la presencia de una cápsula de fibras colágenas, fibroblastos y en algunas áreas, tejido muscular desorganizado, que corresponde a las fibras musculares del muslo. Con respecto a las vainas conectivas características del tejido muscular (perimio y endomio), estas son reemplazadas por células tumorales. La zona central del tumor corresponde a áreas de alta densidad celular junto a algunos vasos sanguíneos. (Figs. 1 y 2)

Con respecto a las células que conforman el tumor, morfológicamente mostraron heterogeneidad. Existiendo células pequeñas, redondeadas u ovoides, mononucleares que asemejaban al aspecto de linfocitos. Por otra parte se observaron células de mediano a gran tamaño, de forma irre-

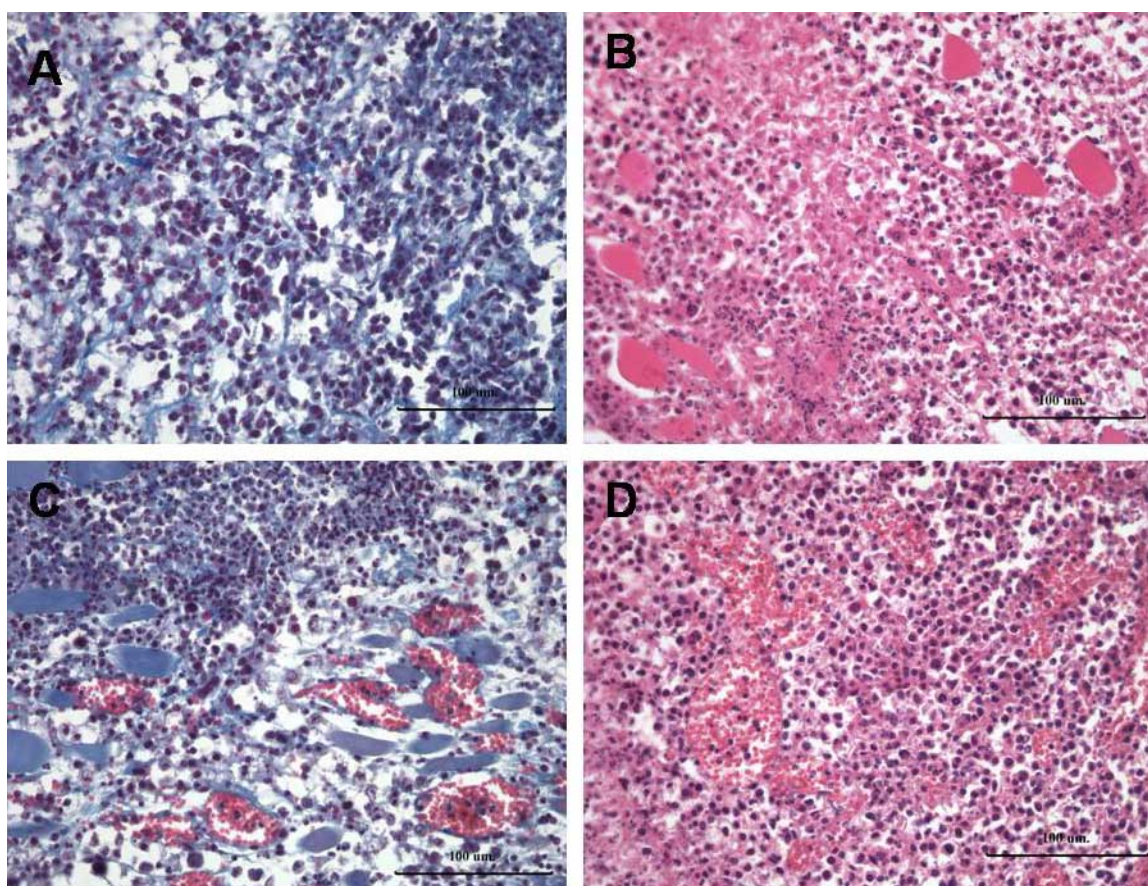


Fig. 1. Aspecto histológico del tumor TA3-MTXR. A) Área central del tumor, arteta (400x). B) Área central del tumor, H & E (400x). C) Área periférica del tumor, arteta (400x). D) Área periférica del tumor, H&E (400X). Barra 100µm.

gular, con núcleo prominente, en algunas ocasiones con nucleolo evidente. La morfología nuclear de las células tumorales fue anormal; observándose forma nuclear variable, hiperchromía y alteración en la relación N/C de hasta 1:1, con áreas de mitosis aumentada, pérdida de polaridad y presencia de células tumorales gigantes, características típicas de una anaplasia. Constatamos que una cantidad regular de células tumorales presentaban gránulos citoplasmáticos PAS positivos. Además de escasa cantidad de células de mediano tamaño, polimorfonucleares, en sitios puntuales del tumor.

Con respecto a la vascularidad del tumor, este presentó abundantes vasos sanguíneos distribuidos por todo el tumor, principalmente en la zona central. Estos fueron de pequeño calibre, tortuosos, sin capa media o adventicia y tan sólo con una capa de células endoteliales. Fueron fácilmente observados en el área peritumoral, con las técnicas de Arteta y PAS, por la coloración característica de los eritrocitos y por la presencia de glicoproteínas de membrana respectivamente.

Observamos poca presencia de fibra colágenas y una abundante sustancia amorfa, características consistentes a nuestra observación macroscópica, en la cual el tumor se presentó poco consistente y deformable.

Análisis Histológico e Histoquímico de órganos

Hígado. Histológicamente, los hígados de los ratones del Grupo 1 presentaron características normales, sin presencia de células tumorales. (Fig. 3 A)

El parénquima hepático del Grupo 2, se vio afectado dramáticamente, mostrando múltiples áreas de desplazamiento de las columnas de hepatocitos las cuales fueron reemplazadas por nidos celulares dispuestos alrededor de vasos sanguíneos en venas centrolobulillares y espacios porta. Con respecto a los sinusoides hepáticos, se pudo observar además de eritrocitos una gran cantidad de células de morfología variada, encontrando polimorfonucleares, algunos linfocitos y células tumorales. Esta invasión celular provocó desorganización de la arquitectura lobulillar típica. Este

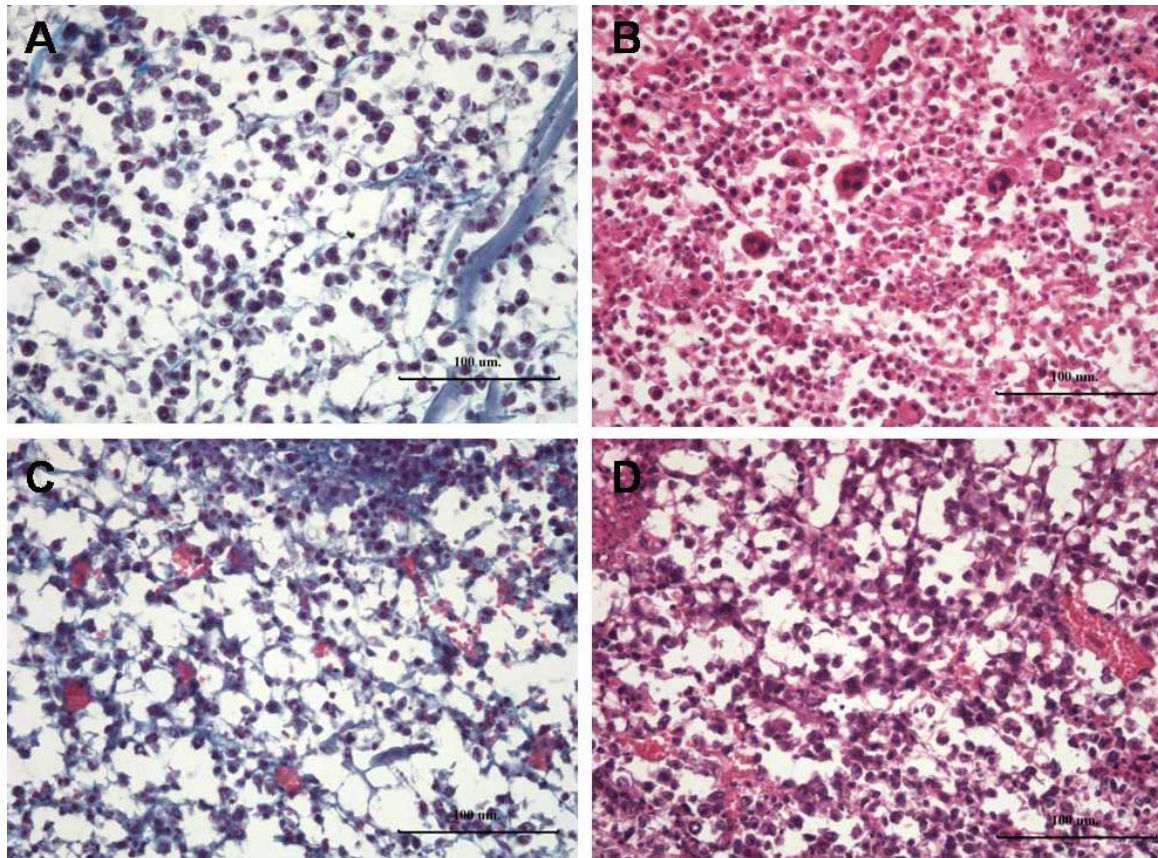


Fig. 2. Aspecto histológico del tumor TA3-MTX-R tratado con Celecoxib 1000 ppm A) Área central del tumor, arteta (400x). B) Área central del tumor, H&E (400x). C) Área periférica del tumor, Arteta (400x). D) Área periférica del tumor, H&E (400X). Barra 100 µm.

órgano fue uno de los más afectados por el proceso metastásico. (Fig. 3 C)

El Grupo 3, presentó áreas de invasión celular, exhibiendo nódulos celulares que desplazaron al parénquima hepático, reemplazando al estroma que rodeaba a estructuras vasculares y conductillos biliares de los espacios porta. La morfología celular encontrada fue variada, existiendo células polimorfonucleares, mononucleares y algunas tumorales. Sin embargo, el grado de invasión fue considerablemente menor, existiendo una diferencia estadística significativa ($p < 0,05$) cuando se compara con el Grupo 2. (Fig.3 E)

Pulmón. El parénquima pulmonar del Grupo 1 no se vio afectado por las células tumorales, presentando una histología normal. (Fig. 3 B)

En el Grupo 2 se pudo observar que el parénquima pulmonar, al igual que el hígado se vio afectado por la invasión tumoral. La población celular fue heterogénea pudién-

dose identificar con facilidad las células tumorales. La metástasis se caracterizó por la formación de nódulos celulares en forma de “bala de cañón” bien definidos que abarcaban importantes áreas de parénquima, perdiendo la forma sacular característica de los alvéolos y deformando el tejido conectivo pulmonar. Además se evidenciaron células PAS positivas y abundantes vasos sanguíneos, aparentemente formados por la angiogénesis tumoral existente en el tejido. Por su parte los vasos sanguíneos se encontraron llenos de eritrocitos y diversas células tumorales, polimorfonucleares y mononucleares. (Fig. 3 D)

Histológicamente, el pulmón de los ratones del Grupo 3, exhibieron nódulos dispersos por todo el pulmón, en donde era muy difícil visualizar parénquima pulmonar normal. Las células tumorales se visualizaban fácilmente en estos nódulos y siempre acompañadas por otros tipos de células (Fig. 3 F)

Observamos células con gránulos citoplasmáticos PAS positivos, además de las glicoproteínas de membrana

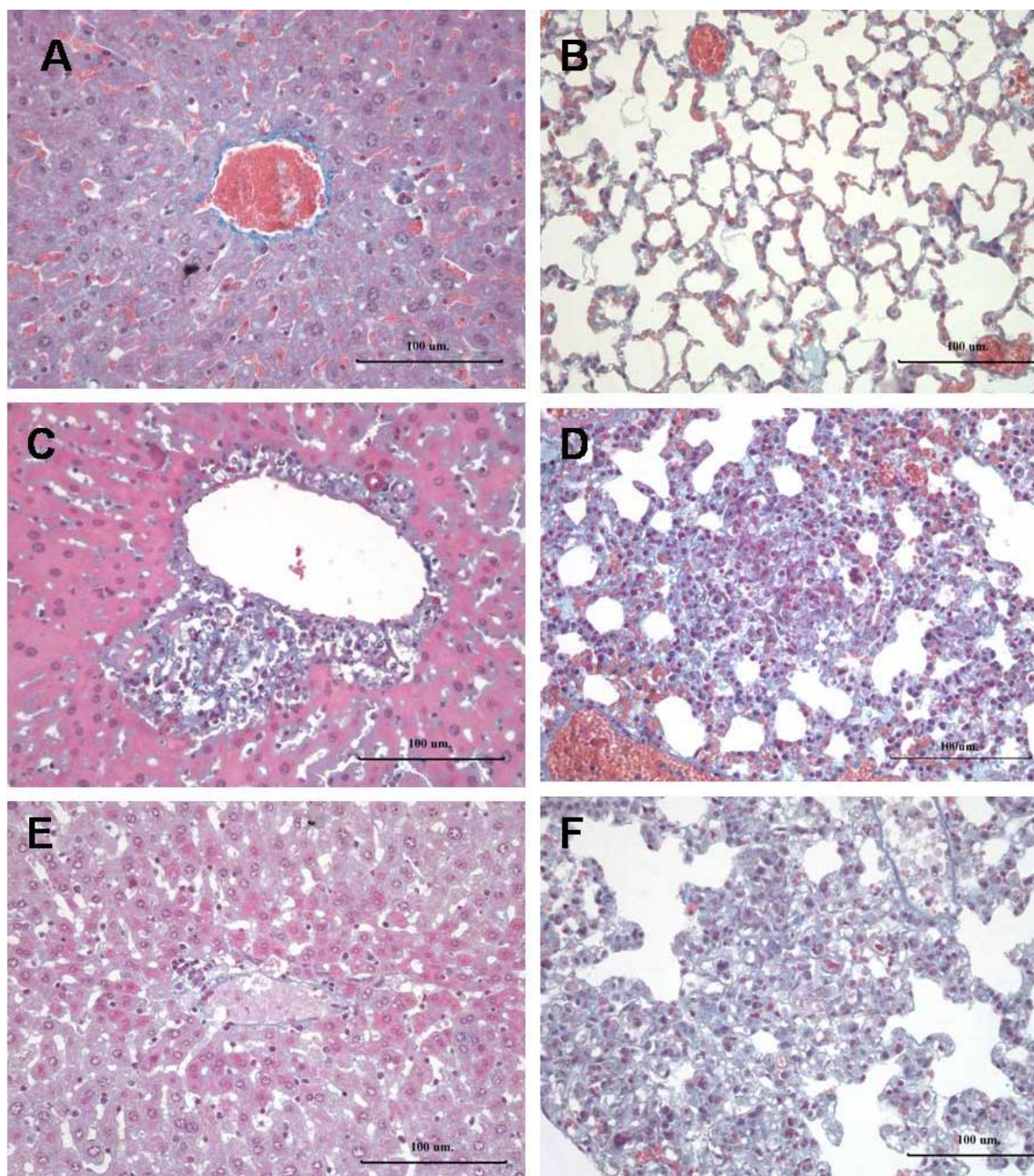


Fig. 3. Aspecto histológico del hígado y pulmón de ratones con tumor TA3-MTX-R. Grupo 1: A) Hígado, B) Pulmón. Grupo 2: C) Hígado, D) Pulmón. Grupo 3: E) Hígado, F) Pulmón. Técnica de Arteta (400x); barra 100 µm.

de los alvéolos. La invasión no se encontró restringida en un área sino que de manera desordenada. Junto a la invasión celular, se observaron numerosos capilares sanguíneos. Al realizar una comparación con el grupo 2, se puede ver que histológicamente fueron similares, no existiendo una diferencia significativa en cuanto a la invasión tumoral ($p = 0,496$).

En general, las muestras de los órganos de ratones inoculados con células tumorales, se caracterizaron por presentar una invasión celular moderada principalmente en aquellos órganos altamente vascularizados como es el caso del pulmón y el hígado. Las células más características de este proceso fueron las células mononucleares, polimorfonucleares y células tumorales. Junto al infiltrado

celular se observó una abundancia en la vascularización en sitios cercanos a los nidos celulares descritos. Por otra parte, aquellos ratones que además de las células tumorales, recibieron el tratamiento con Celecoxib, presentaron algunas características histológicas similares al Grupo 2.

Al observar las muestras de bazo, corazón, esófago, estómago y duodeno de todos los grupos, no se evidenciaron elementos morfológicos ajenos a una histología normal. Con respecto a los efectos secundarios del tratamiento no existe evidencia histológica que muestre que órganos del tubo digestivo se hayan visto afectados por la administración oral del medicamento durante el transcurso del experimento (datos no mostrados).

DISCUSIÓN

En el estudio del cáncer, se utilizan diversas líneas celulares, cada una de ellas con características propias. Una de estas es la del tumor TA3 en su variante multirresistente a drogas (Guerrero *et al.*). Si bien, existen diversos estudios en esta línea tumoral, no hay reportes de una descripción morfológica detallada de esta, ni de su efecto frente a Celecoxib, inhibidor selectivo de COX-2.

Al estudio mesoscópico y la descripción del tumor, vemos que este exhibe características similares a las descritas por Guerrero *et al.*, los cuales utilizaron tumor TA3-MTX-R, describiéndolo como un carcinoma mamario anaplásico con zonas externas de necrosis y presencia de cuerpos apoptóticos. Por su parte Farooqui *et al.*, utilizaron un carcinoma mamario del tipo SCK el cual fue implantado en ratones, estos lo describieron como altamente vascular, invasivo y productor de metástasis pulmonar.

Con respecto a la capacidad de invasión, los ratones del presente estudio mueren 15 días post- inoculación, lo cual nos permite concluir que el tumor TA3-MTX-R exhibe características similares a otros carcinomas mamarios implantables.

En cuanto al análisis histológico e histoquímico del tumor los resultados obtenidos coinciden con las descritas por Guerrero *et al.*, en cuanto al tumor TA3-MTX-R. Tanto los resultados de estos autores, así como los nuestros, revelaron anaplasia y pleomorfismo en las células tumorales.

El análisis histológico e histoquímico de órganos evidenció que el tubo digestivo no se vio afectado por el consumo de Celecoxib, lo que coincide con lo obtenido por Copelli *et al.*, en ratas. Este relata que Celecoxib no altera

la barrera de la mucosa gástrica en comparación a otros AINES, tanto en ensayos animales o humanos. Por lo cual sería factible el uso de este fármaco de manera moderada en la inhibición de la angiogénesis, sin afectar la mucosa gástrica por su uso prolongado.

Con respecto a las vías de diseminación tumoral, Kumar *et al.*, (2005) describieron que existen dos posibles: la linfática que afecta principalmente a los linfonodos periféricos y la hematogena que invade a hígado y pulmones, vías coincidentes a lo encontrado en nuestro estudio.

Ahora al analizar las metástasis vemos que el patrón de metástasis pulmonar corresponde al descrito como “bala de cañón”, los que son bien definidos, diseminados por todos los lóbulos y preferentemente en la periferia.

En el caso de la metástasis hepática, Kumar *et al.*, (2005) describieron que este órgano se ve afectado principalmente por las neoplasias de mama, pulmón y colon, en donde existen área de necrosis central, hepatomegalia y nodularidad del borde libre. Esto fue observado parcialmente en los resultados ya que si bien la línea tumoral corresponde a una línea mamaria, no se observó hepatomegalia, la nodularidad ni la necrosis central, sólo hallando una mayor invasión en la periferia de los vasos sanguíneos intrahepáticos.

La línea TA3-MTX-R es una variante multirresistente a diversas drogas antineoplásicas, principalmente al Metotrexato (MTX), un antifolato que impide la óptima disponibilidad del ácido fólico por parte de las células, evitando la síntesis de ADN y concomitante a una imposibilidad de duplicarse. Esta resistencia al MTX no afecta el mecanismo de acción de Celecoxib debido a que actúan por dos vías distintas. Esta característica puede ser extrapolada al manejo clínico de paciente con neoplasias resistentes al tratamiento con MTX, en donde podrían recibir tratamiento con Celecoxib y disminuir así la progresión tumoral.

Con estos resultados reforzamos la idea del uso de fármacos que permitan la inhibición de varias características de la progresión tumoral como es el caso de la angiogénesis y establecer así las bases para futuras investigaciones asociadas a esta línea tumoral.

AGRADECIMIENTOS

A la Sra. Irma Orellana y al Sr. Jorge Leiva, por su desinteresado apoyo técnico. Al Dr. Héctor Rodríguez, por su colaboración en las microfotografías obtenidas.

ROSAS, C. C.; ROA, I.; SINNING, O. M.; FUENZALIDA, B. M. & LEMUS, A. D. Celecoxib effect in a multiresistant variant of the TA3 tumor. A histological description. *Int. J. Morphol.*, 31(2):392-398, 2013.

SUMMARY: In the study of cancer diverse cellular lines are in use, each with its own characteristics. One of these tumor lines is the TA3 tumor variant, multi resistant to drugs. Although diverse studies exist in reference to this tumor line, there are no detailed morphological descriptions of this one, nor those that observe the effect of Celecoxib, a COX-2 tissue inhibitor. We used 18 mice divided in 3 groups that received PBS inoculation; TA3 tumor cell inoculation; cell tumor inoculation + treatment with Celecoxib (1000ppm) respectively. The mice were sacrificed and histologically processed with H & E, PAS and Arteta stain. The study revealed that tumor showed a marked heterogeneity, some areas of necrosis and central and peripheral neovascularization. Furthermore, Celecoxib significantly reduced tumor invasion in the liver ($p < 0.05$). Other organs did not show significant differences when compared with the treated group. The results are similar to partial descriptions realized in the past and are comparable to other tumor lines. It is estimated that the route of medication administration is critical for result interpretation. These results are important in the discussion of other research where Celecoxib is used as an antiangiogenic drug and serves as base for future research within this tumor line.

KEY WORDS: Tumor; Angiogenesis; Celecoxib.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Amrite, A. C.; Ayalasonmayajula, S. P.; Cheruvu, N. P. & Kompella, U. B. Single periocular injection of celecoxib-PLGA microparticles inhibits diabetes-induced elevations in retinal PGE2, VEGF, and vascular leakage. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 47(3):1149-60, 2006.
- Cianchi, F. C.; Cortesini, P.; Bechi, O.; Fantappiè, L.; Messerini, A.; Vannacci, I.; Sardi, G.; Baroni, V.; Boddi, R.; Mazzanti, & Masini, E. Up-regulation of cyclooxygenase 2 gene expression correlates with tumor angiogenesis in human colorectal cancer. *Gastroenterology*, 121:1339-47, 2001.
- Copelli, G.; Guaita, E.; Spaggiari, S. & Coruzzi, G. Gastric effects of the selective cyclooxygenase-2 inhibitor, celecoxib, in the rat. *Digestive and Liver Disease*, 36:265-70, 2004.
- Dempke, W.; Rie, C. Grothey, A.; & H. Schmoll, H. Cyclooxygenase-2: a novel target for cancer chemotherapy? *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, 127:411-7, 2001.
- Farooqui, M.; Li, Y.; Rogers, T. Poonawala, T.; Griffin, R.; Song, C & Gupta, K. COX-2 inhibitor celecoxib prevents chronic morphine-induced promotion of angiogenesis, tumour growth, metastasis, and mortality, without compromising analgesia. *British J. Cancer*, 97:1523-31, 2007.
- Gajardo, P.; Cordano, G.; Pavani, M.; Muñoz, S.; Rivera, E.; Medina, J.; Guerrero, A. & Ferreira, J. La inhibición de la respiración mitocondrial por el ester 2,6-dihidroxi-4-carboxifenoxiacetato de bis isopropilo (Carfenisop) y su papel como restaurador de la sensibilidad a fármacos antineoplásicos en el carcinoma multirresistente Ta3-MTX-R trasplantable de ratón. *Rev. Chil. Cancerología y Hematología*, 11:162-74, 2001.
- Guerrero, A.; Zipper, J. & Dabancens, A. Actividad antineoplásica ejercida por Quinacrina oral sobre tumores malignos trasplantables en ratón. *Rev. Chil. Cancerología y Hematología*, 2:119-22, 1992.
- Kumar, V. *Patología Estructural y Funcional*. 7ª ed. Editorial Elsevier Madrid, 2005.
- Ragel, B.; Jensen, R.; Gillespie, D.; Prescott, S. & Couldwell, W. Celecoxib inhibits meningioma tumor growth in a mouse xenograft model. *Cancer*, 109:588-97, 2007.
- Silverstein, F.; Faich, G.; Goldstein, J.; Simon, L.; Pincus, T.; Whelton, A.; Makuch, R.; Eisen, G.; Agrawal, N.; Stenson, W.; Burr, A.; Zhao, W.; Kent, J.; Lefkowitz, J.; Verburg, K. & Geis, G. S. Gastrointestinal Toxicity with Celecoxib v/s Nonsteroidal anti-inflammatory drugs for Osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *JAMA*, 284:1247-55, 2000.
- Thomson, A. NSAID-induced gastric damage in rats. *Can. J. Gastroenterol.*, 15:553, 2001.
- Tosetti, F.; Ferrari, N.; De Flora, S. & Albini, A. Angioprevention: angiogenesis is a common key target for cancer Chemopreventive agents. *FASEB*, 16:2-14, 2002.
- Wolfe, M.; Lichtenstein, D. & Singh, G. Gastrointestinal Toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *N. Engl. J. Med.*, 340:1888-99, 1999.
- Xiao, H.; Zhang, Q.; Lin, Y.; Reddy, B. & Yang, C. Combination of atorvastatin and celecoxib synergistically induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Int. J. Cancer*, 122:2115-24, 2008.
- Xu, X.; Xie, C.; Wang, X.; Liu, J.; Yu, Y.; Hu, H. & Guo, C. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses the growth of pancreatic cancer cells *in vitro* and *in vivo*. *Tohoku J. Exp. Med.*, 215:149-57, 2008.
- Zipper, J.; Dabances, A.; Guerrero, A. & Trujillo, V. Quinacrine Revised. *Human Reprod. Update*, 1(4):324-42, 1995.
- Zhou, Y.; Ran, J.; Tang, C.; Wu, J.; Honghua, L.; Xingwen, L.; Ning, C. & Qiao, L. Effect of Celecoxib on E-cadherin, VEGF, Microvessel Density and Apoptosis in Gastric Cancer. *Cancer Biol & Ther.*, 6:e1-7, 2007.

Dirección para correspondencia:

Carlos Rosas C.

Laboratorio de Embriología Experimental y Molecular

Facultad de Medicina, Universidad de Chile

Av. Independencia 1027

Santiago-CHILE

E-mail: crosasc@med.uchile.cl

Recibido : 04-01-2013

Aceptado: 05-04-2013