



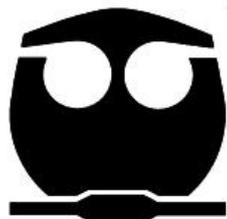
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE QUÍMICA

EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA DE
DOS CASIOPEÍNAS USANDO EL MODELO DE
XENOTRANSPLANTACIÓN
(RATÓN DESNUDO)

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A
ANA LAURA HERNÁNDEZ DE LA PAZ



MÉXICO DF

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO:

Presidente:	Prof. M. en C. Carlos Pérez Muñoz
Vocal	Prof. Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez
Secretario	Prof. M. en C. María Isabel Gracia Mora
1er. Suplente	Prof. cDra. María Elena Bravo Gómez
2º. Suplente	Prof. M. en C. Francisco Sánchez Bartéz

SITIO EN DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Unidad de Experimentación Animal

Facultad de Química, UNAM

ASESOR DEL TEMA:

M. en C. María Isabel Gracia Mora

SUPERVISOR TÉCNICO:

cDra. María Elena Bravo Gómez

SUSTENTANTE:

Ana Laura Hernández De la Paz

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México porque me ha brindado la oportunidad de desarrollarme en las mejores instalaciones y aprender de los mejores investigadores. Jamás terminaré de agradecer.

A la Facultad de Química que me ha visto crecer (profesional y personalmente) y convertirme en lo que ahora soy, siempre le estaré agradecida por haberme brindado todas las armas para enfrentarme a la vida con la frente en alto.

A los proyectos PAPIIT IN209907, CONACYT 60085, CONACYT-SALUD C01-7677 por todo los recursos proporcionados para la elaboración de esta tesis. Gracias por invertir en el futuro de México.

A la Dra. Lena Ruiz Azuara, por la confianza y el apoyo incondicional que me ha brindado desde el primer momento, gracias por permitirme formar parte de la historia de las Casiopeínas®.

A la M. en C. María Isabel Gracia Mora, gracias por su infinita sabiduría y por haberme permitido vivir esta experiencia invaluable. Mi profunda admiración.

A la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química por haberme brindado todas las facilidades para la realización de esta tesis. Este trabajo no hubiera sido posible sin su invaluable ayuda.

A Lucía Macías Rosales, por todo tu apoyo, preocupación y ayuda que me brindaste durante la realización de esta tesis. Mil Gracias.

A Francisco Sánchez Bártéz, por haber sido parte de mi formación académica y una pieza importante en la realización de este trabajo. Gracias por toda tu sabiduría y apoyo incondicional.

Al grupo de Casiopeínas (Fabiola, Juan Carlos, Miguel Ángel, Silvia) porque gracias a ustedes el aprendizaje y comprensión del universo fue mucho más divertido. Gracias por su apoyo y todo su conocimiento.

A cDra. María Elena Bravo Gómez. Toda una tesis no sería suficiente para poder agradecerle lo mucho que has hecho por mí, como maestra, supervisora y jurado pero sobre todo como mi amiga. Ni siquiera en toda la biblioteca de Alejandría existirían suficientes palabras para expresar todo mi agradecimiento y cariño. Gracias Male.

DEDICATORIA

Hace 22 años inicié este viaje, un viaje con la finalidad de brindarme las herramientas necesarias para sobrevivir en un mundo cada vez más complejo. Sin la infinita visión de dos grandes emprendedores nada de esto hubiera sido posible.....

A mis padres, porque con su ejemplo, sacrificio e infinito amor he podido llegar hasta aquí, jamás han dejado de creer en mí y de apoyarme en todos los aspectos de mi vida. Gracias porque sin ustedes nada de esto sería posible.

.....a su tiempo dos guerreros más emprendieron el viaje.....

A mis hermanos, gracias por ser mis cómplices en incontables aventuras, mis protectores en numerosas ocasiones y mis mejores aliados en cada batalla. Los quiero chaparros.

.....y claro, no todos pueden acompañarme en el viaje, pero han sabido estar conmigo en el trayecto.....

A toda mi familia, porque desde donde quiera que estén nunca han dejado de preocuparse por mí, gracias por todo su apoyo y cariño. Jamás podré agradecer todo lo que han hecho.

Después de un largo viaje llegué a un mundo, único en su especie, había guerreros provenientes de lugares desconocidos para mí y aunque todos perseguían un objetivo en común sus variantes particulares enriquecían su personalidad.....

A mis amigos de la Enah, (Bere, Chaco, Dante, David, Enah, Fifo, Ishiba, Jorge, Juliana, Malena, Nando, Olinka, a todos) porque siempre me consideraron parte de ustedes, parte de la familia que es el ЯCHAAS. Jamás podré agradecerles todo lo que han hecho por mí y todo el cariño que me han brindado pero puedo asegurarles que en mi corazón están tatuadas estas palabras: “La Enah es mi templo, la Arqueología mi religión y las Adelas mi perdición”. ЯCHAAS Vive.

Casi al mismo tiempo que llegué a este mundo, descubrí la existencia de un universo alterno, muy distinto al anterior. En este universo habitan criaturas fantásticas con poderes inimaginables y aunque al principio me negaba a creer en el poder que poseían, poco a poco pude darme cuenta que existía un vínculo poderoso entre algunas criaturas y yo.....

Daniel (Viento), el viento puede convertir una gota de agua en una suave brisa o en un poderoso huracán. Gracias porque sé que con tu amistad siempre podré ser lo que yo quiera ser. Gracias por todo.

Elías (Tierra), en numerosas ocasiones has sido tierra firme para una gota de agua perdida y me has ayudado a encontrar el camino de vuelta al mar. Gracias por tu apoyo incondicional, por estar ahí en cada locura pero sobre todo por nuestra maravillosa amistad.

Yuli (Fuego), aunque la naturaleza del fuego y el agua son distintas, juntas son capaces de forjar una poderosa espada. Jamás terminaré de agradecer a la vida tu presencia en este universo, gracias por nuestra hermandad y por todo el cariño que desde siempre me has brindado. Te quiero Fea.

Un día me di cuenta que este viaje estaba llegando al final y comencé a divisar nuevos horizontes, otros mundos que conocer y en los cuales poner en práctica mis poderes.....

A MK, (Andrés, Hugo, Ing. Zavala, Karla, Paola, a todos) porque sin su apoyo este proyecto no hubiera podido concluirse, gracias por los incontables litros de café, las horas de charla (evaluando algo) y todas las facilidades brindadas para poder llegar a este día.

Todo viajero debe tener un punto fijo, ese punto te permite ubicarte dentro del mundo, saber a dónde vas y de dónde vienes.....

A Gabriela, porque has sido la constante en todo mi viaje. Porque a tu lado he aprendido que no existen imposibles y que jamás debo darme por vencida. Esta tesis es para ti, gracias por cada momento compartido (también cuentan las siestas), por cada sacrificio realizado (incluyendo entrar a mis clases) pero sobre todo porque a lo largo de todo este viaje has sido *el amor en mi vida*. Te Quiero.

El final de esta historia todavía se encuentra en el futuro pero estoy segura que todavía faltan muchas aventuras por escribir.....



ÍNDICE

Índice		vi
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN		1
1.1	Planteamiento del problema	1
1.2	Objetivos	2
1.2.1	Objetivo general	2
1.2.2	Objetivos particulares	2
1.3	Hipótesis	3
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES		4
2.1	Cáncer	4
2.2	Tratamientos	5
2.3	Quimioterapia	7
2.3.1	Agentes ciclo-celular específicos	7
2.3.2	Agentes ciclo-celular inespecíficos	9
2.4	Metales usados en la Terapia Antitumoral	12
2.5	Casiopeínas®	16
2.5.1	Familias de Compuestos	18
2.5.2	Características de las Casiopeínas®	19
2.5.3	Casiopeínas® más estudiadas	19
2.6	Cernimientos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	24
2.7	Estudio Correlación estructura-actividad	27
2.8	Compuestos a evaluar	27
2.9	Modelos de Evaluación <i>in vivo</i> de fármacos antitumorales	28



2.9.1	Principales Modelos de Evaluación Antitumoral	29
2.9.2	El ratón desnudo como modelo en la evaluación de nuevos fármacos	31
CAPÍTULO 3. METODOLOGÍA		33
3.1	Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) de las Casiopeínas® a evaluar	33
3.1.1	Animales	33
3.1.2	Fármacos	33
3.1.3	Determinación de la DL50	34
3.2	Evaluación de la Actividad Antitumoral de las Casiopeínas®	34
3.2.1.	Animales	34
3.2.2	Fármacos	34
3.2.3	Células	35
3.2.4	Esquema de administración	35
3.2.5	Dosis	36
3.2.6	Actividad antitumoral	36
3.2.7	Retraso Específico del Crecimiento	37
3.2.8	Incremento de peso	37
3.2.9	Análisis estadístico	38
CAPÍTULO 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		39
4.1	Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) de las Casiopeínas®	39
4.2	Actividad Antitumoral de las Casiopeínas®	39
4.2.1	Volumen Tumoral Relativo	39



4.2.2	Días en Doblar Volumen Tumoral	43
4.2.3	Función Antitumoral	46
4.2.4	Retraso Específico de Crecimiento (REC)	48
4.2.5	Incremento de peso	51
CAPÍTULO 5. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES		54
REFERENCIAS		57
LISTA DE FIGURAS		
Figura 1	Ciclo celular con acción de antitumorales	7
Figura 2	Estructuras de agentes antimetabolitos	8
Figura 3	Estructuras de algunos de los productos naturales empleados como agentes antineoplásicos	9
Figura 4	Estructuras de algunos Complejos de Platino	10
Figura 5	Estructuras de algunos agentes alquilantes	11
Figura 6	Estructura química del compuesto de coordinación <i>cis</i> -diamino, dicloro platino	13
Figura 7	Mecanismo de resistencia de <i>cis</i> -DDP	15
Figura 8	Reacciones de óxido-reducción involucradas en la generación de ROS. Reacciones de Fenton/Haber Weiss	16
Figura 9	Estructura general de las Casiopeínas®	17
Figura 10	Estructura química de la Casiopeína® II-gly	20
Figura 11	Estructura química de la Casiopeína® III-ia	22
Figura 12	Protocolo de cernimiento para compuestos con actividad antitumoral establecido por el NCI	26
Figura 13	Estructura química de la Casiopeína® VIII-gly	28
Figura 14	Estructura química de la Casiopeína® III-J	28
Figura 15	Ratón Desnudo (<i>nu/nu</i>)	32



Figura 16	Volumen Relativo Tumoral	40
Figura 17	Diferencias visuales de los grupos evaluados	42
Figura 18	Diferencias visuales de los grupos Cas III-J	42
Figura 19	Diferencias visuales de los grupos evaluados bajo un esquema intermitente	43
Figura 20	Gráfica de los días en incrementar el volumen tumoral	45
Figura 21	Histograma de incremento de peso	51
Figura 22	Diferencia visual del incremento de peso	51

LISTA DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de la Familia de las Casiopeínas®	18
Tabla 2	Esquemas de administración establecidos por el NCI	26
Tabla 3	Esquema de administración empleado para la evaluación de las Casiopeínas®	35
Tabla 4	Tiempo de incrementar el volumen tumoral	44
Tabla 5	Índices de Función Antitumoral	46
Tabla 6	Índices de Retraso Específico de Crecimiento	50

ANEXOS

Anexo A	Kruskal-Wallis VRT Día 7	66
Anexo B	Kruskal – Wallis VRT Día 14	67
Anexo C	Kruskal – Wallis VRT Día 21	68
Anexo D	Intervalo de confianza Día 7	69
Anexo E	Intervalo de confianza Día 14	70
Anexo F	Intervalo de confianza Día 21	71
Anexo G	Análisis Unilateral de Varianza Incremento de Peso	72
Anexo H	Prueba de Tukey para incremento de peso	73

**LISTA DE ABREVIATURAS**

ACS	American Cancer Society
ADN	Ácido Desoxirribo Nucléico
ARN	Ácido Ribo Nucléico
CAS II-gly	Casiopeína® II-gly
CAS III-ia	Casiopeína® III-ia
CAS III-J	Casiopeína® III-J
CAS VIII-gly	Casiopeína® VIII-gly
CPC	Cinética de Proliferación Celular
DL50	Dosis Letal Media
FA	Función Antitumoral
FASE “S”	Fase de Síntesis del ciclo celular
IC50	Concentración Inhibidora Media
ICHs	Intercambio de Cromátidas Hermanas
IM	Índice Mitótico
LINFOCITOS T	Célula que interviene en la respuesta inmune, madura en el timo por ellos se nombran como “T”
NCI	National Cancer Institute
NK	Natural Killers, subpoblación de linfocitos derivados de la médula ósea, distintos de los B y T, que intervienen en la respuesta inmune
qd	Cada Día
REC	Retraso Específico de Crecimiento
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
VRT	Volumen Relativo Tumoral
VT	Volumen Tumoral



CAPÍTULO 1

1.1 Planteamiento del problema

El cáncer es una de las principales causas de mortalidad a nivel mundial siendo considerada la segunda causa de muerte sólo después de los padecimientos cardiovasculares; se estima que en 2005 murieron 7.6 millones de personas por algún tipo de cáncer, y en los próximos 10 años morirán 84 millones de personas a causa de este grupo de enfermedades. Más del 70% de las muertes por cáncer se registran en países con economías débiles, cuyos recursos para la prevención, diagnóstico y tratamiento de la enfermedad son limitados o inexistentes.

Una de las principales terapias empleadas para combatir el cáncer es la quimioterapia, éste tratamiento comprende la utilización de compuestos de origen natural o sintético con naturaleza orgánica o inorgánica que ataquen a la células cancerosas. Entre los compuestos de origen sintético e inorgánico destaca la utilización de complejos con centro metálico como es el caso de Cisplatino y el Carboplatino. Sin embargo, algunos de los conflictos a los cuales se enfrentan los pacientes con el empleo de éstos fármacos son los severos efectos secundarios observados, así como los elevados costos de los tratamientos que permiten el acceso sólo a una pequeña parte de la población. Éstos son algunos de los factores que impulsan la búsqueda constante de nuevas opciones de tratamientos contra el cáncer, la creación de nuevos fármacos que presenten actividad antitumoral y a la vez reduzcan los efectos secundarios en los pacientes mejorando así su calidad de vida. La generación de compuestos antitumorales en territorio nacional reduciría los costos en los tratamientos debido a que se eliminaría la necesidad de importación de otros fármacos, facilitando el acceso de toda la población a tratamientos efectivos y a bajo costo.

Los resultados obtenidos en el presenta trabajo contribuyen a la investigación que realiza el grupo encabezado por la Dra. Lena Ruiz Azuara en la Facultad de



Química, UNAM para la búsqueda de nuevos fármacos con actividad antitumoral y que podría ayudar en un futuro cercano a solucionar un creciente problema de salud.

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo General

Evaluar la posible actividad antitumoral de la Casiopeína® VIII-gly y Casiopeína® III-J sobre la línea tumoral de carcinoma de colon (HCT-15) recomendada por los protocolos de cernimiento internacionales empleando el modelo de xenotransplatación (Ratón Desnudo).

1.2.2 Objetivos Particulares

Determinar la Dosis Letal 50 (DL50) de la Cas VIII-gly y la Cas III-J.

Evaluar la actividad antitumoral de la Cas VIII-gly empleando dos esquemas de administración, uno crónico y un intermitente.

Evaluar la actividad antitumoral de la Cas III-J empleando dos esquemas de administración, uno crónico y un intermitente.

Calcular el índice de Función Antitumoral de cada tratamiento a fin de seleccionar a los compuestos que presenten actividad potencial como agentes antitumorales.

Calcular el índice de Retraso Específico de Crecimiento en cada tratamiento para determinar si la actividad de los compuestos permite retrasar significativamente el crecimiento tumoral.



Calcular el porcentaje de incremento de peso de los animales para estimar la toxicidad de los compuestos durante su administración.

1.3 Hipótesis

Basándonos en los resultados observados en investigaciones anteriores, se espera que la Casiopeína® VIII-gly y la Casiopeína® III-J presenten, en función del ligante secundario (glicina Vs. acetilacetato), diferentes grados de actividad antitumoral en el modelo de xenotransplatación con células de carcinoma de colon a las dosis y esquemas de administración establecidos.



CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Cáncer

El cáncer está definido como un conjunto de enfermedades caracterizadas por un crecimiento anormal de células y que se manifiesta por una reducción del control del crecimiento y la función celular así como por la capacidad de invadir otros tejidos. (1)

De acuerdo con la American Cancer Society (ACS) se estima que durante 2007 murieron 7.6 millones de personas alrededor del mundo y para 2008 se diagnosticarán 1, 437,180 nuevos casos. La ACS considera que para 2008 las neoplasias con mayor incidencia a nivel mundial en hombres serán: próstata, pulmón, colon-recto; mientras que en mujeres serán: mama, pulmón, colon-recto y cérvico-uterino. (2)

En México, entre 1922 y 2001 la proporción de muertes por cáncer pasó de 0.6 a 13.1% de las defunciones totales ocurridas en la población. (3) En 2002 el cáncer de pulmón ocupó el primer lugar de incidencia con 1.35 millones de casos seguido del de mama con 1.15 millones, colon-recto (1.02 millones), estómago (934 000) e hígado (626 000); (4) y en 2003 se destinaron cerca de \$1 769 124 750 pesos para la atención y prevención, \$1 151 114 180 pesos para la detección y \$338 573 310 pesos para la atención hospitalaria del cáncer cérvico-uterino el cual representa uno de los tipos de cáncer de mayor incidencia en mujeres mexicanas. (5)

La fuerte inversión económica que representa la atención médica de éste tipo de padecimientos hace necesaria la investigación nacional en esta área.



2.2 Tratamientos (6) (7)

Existen diversas opciones de tratamiento para combatir el cáncer, sin embargo la elección de alguno depende del diagnóstico realizado, tipo de cáncer, localización y el estadio en que se encuentre.

Algunos de los tratamientos que se emplean actualmente son:

∞ **Cirugía:** Es uno de los tratamientos contra el cáncer más usado desde la antigüedad y consiste en la remoción de tumor del órgano afectado. La cirugía es una opción viable de tratamiento generalmente en los estadios iniciales cuando el cáncer aún no se ha diseminado a otros órganos (metástasis).

∞ **Radioterapia:** Este tratamiento emplea la emisión de ondas de alta energía para la destrucción de células cancerosas, cuando las radiaciones interaccionan con estas células, producen daño al ADN, ARN, enzimas y macromoléculas celulares. La radiación ataca principalmente a células en constante reproducción, característica principal de las células tumorales; sin embargo, existen células normales de alta tasa de replicación que también pueden ser afectadas y en donde se observan los principales efectos adversos como son piel, folículos capilares, gametos sexuales y médula ósea.

∞ **Quimioterapia:** Se basa en la administración de fármacos con la finalidad de impedir la proliferación de las células tumorales; existe una gran diversidad de fármacos que actúan alterando mecanismos críticos en la reproducción celular. En la sección 2.3 Quimioterapia se explican con más detalle las características del tratamiento con agentes quimioterapéuticos.



∞ **Terapia Hormonal:** Es empleada principalmente en el tratamiento de aquellos tipos de cáncer que presentan dependencia hormonal para su desarrollo como son el de mama o de próstata, los cuales necesitan la presencia de hormonas. La terapia hormonal puede emplear fármacos que modifiquen la liberación de determinadas hormonas o su configuración química, impidiendo de esta forma a las células utilizarlas.

∞ **Terapia Biológica:** (8) Emplea métodos inmunológicos para producir un efecto citotóxico, la importancia de la terapia biológica radica en que la respuesta puede ser específica hacia los antígenos tumorales, lo que implica que no lesionan a la mayoría de las células normales que es uno de los efectos de los tratamientos antineoplásicos actuales.

El objetivo de la inmunoterapia antitumoral consiste en potenciar la débil respuesta inmune a través de la administración de anticuerpos específicos generando así una inmunización pasiva.

Los tratamientos biológicos se pueden dividir en:

- ∞ Estimulación de la respuesta inmune activa
- ∞ Inmunoterapia pasiva antitumoral

La estimulación de la respuesta inmune consiste en la administración de vacunas compuestas por células tumorales atenuadas o por antígenos tumorales.

La inmunoterapia pasiva consiste en la transferencia de linfocitos T y anticuerpos específicos de tumores, éste tipo de terapia incluye la administración de anticuerpos antitumorales, anticuerpos conjugados con fármacos (inmunotoxinas), linfocitos T y NK reactivos frente al tumor.

Este tipo de tratamientos proporcionan inmunidad rápida pero de corta duración, razón por la cual se encuentran en investigación para poder prolongar la duración de dicha respuesta.



2.3 Quimioterapia (9)

Los agentes quimioterapéuticos pueden clasificarse usando diferentes criterios, ya sea por su mecanismo de acción, por su naturaleza o por su relación con el ciclo celular, distinguiendo de esta manera los siguientes grupos:

2.3.1 Agentes ciclo-celular específicos

Son agentes que actúan en etapas específicas del ciclo celular por lo que interfieren en la proliferación celular (Figura 1).

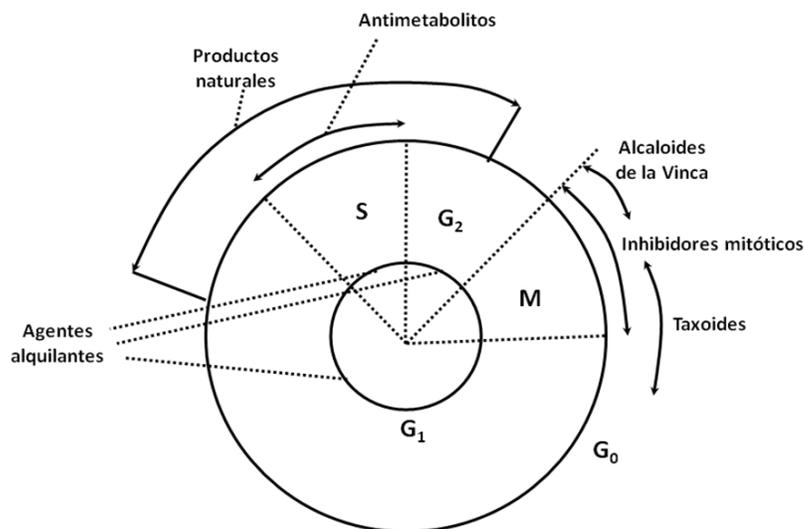


Figura 1 Ciclo celular con acción de antitumorales

Ciclo celular que muestra las etapas donde algunos agentes antineoplásicos actúan. (9)

☯ **Antimetabolitos**

Estos agentes actúan bloqueando bioquímicamente la síntesis del ADN al inhibir enzimas y procesos de transformación molecular que alteran o detienen la síntesis de nucleótidos o su traducción. Su acción se lleva a cabo durante la fase S del ciclo celular.

De ésta categoría destacan los análogos de ácido fólico (Metotrexato), antagonistas de pirimidina (5-Fluorouracilo) y análogos de purina (6-mercaptopurina) (Figura 2).

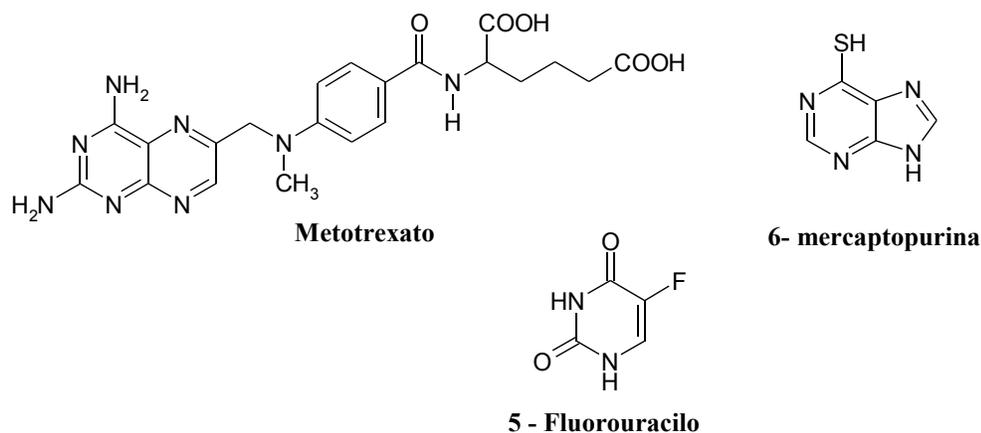


Figura 2 Estructuras de agentes antimetabolitos (9)

☯ **Hormonales**

Estos agentes no son propiamente citotóxicos; sin embargo, actúan interfiriendo o bloqueando receptores citoplasmáticos, inhibiendo la síntesis de ARN mensajero y alterando la síntesis de proteínas necesarias para la proliferación celular.

Destacan los adrenocorticoesteroides, estrógenos, andrógenos y análogos la hormona liberadora de gonadotropina.

☯ **Productos naturales**

Como su nombre lo indica son compuestos de origen natural (Figura 3) usados en la terapia antitumoral, dentro de los productos naturales citotóxicos usados clínicamente para el tratamiento de neoplasias destacan:

Alcaloides de Vinca: Son agentes que provocan la inhibición del huso mitótico uniéndose a determinadas proteínas microtubulares y por lo tanto interrumpiendo la división celular.



Taxol: Es un éster alcaloide derivado del teixo occidental (*Taxus brevifolia*) y actúa inhibiendo el huso mitótico por medio de la alteración en la polimerización de la tubulina evitando la división celular.

Podofilotoxinas: Son agentes semi-sintéticos de la podofilotoxina que actúan principalmente inhibiendo la actividad de la topoisomerasa (I y II) y bloqueando las fases S o G₂ del ciclo celular. Destacan la etoposida y la teniposida.

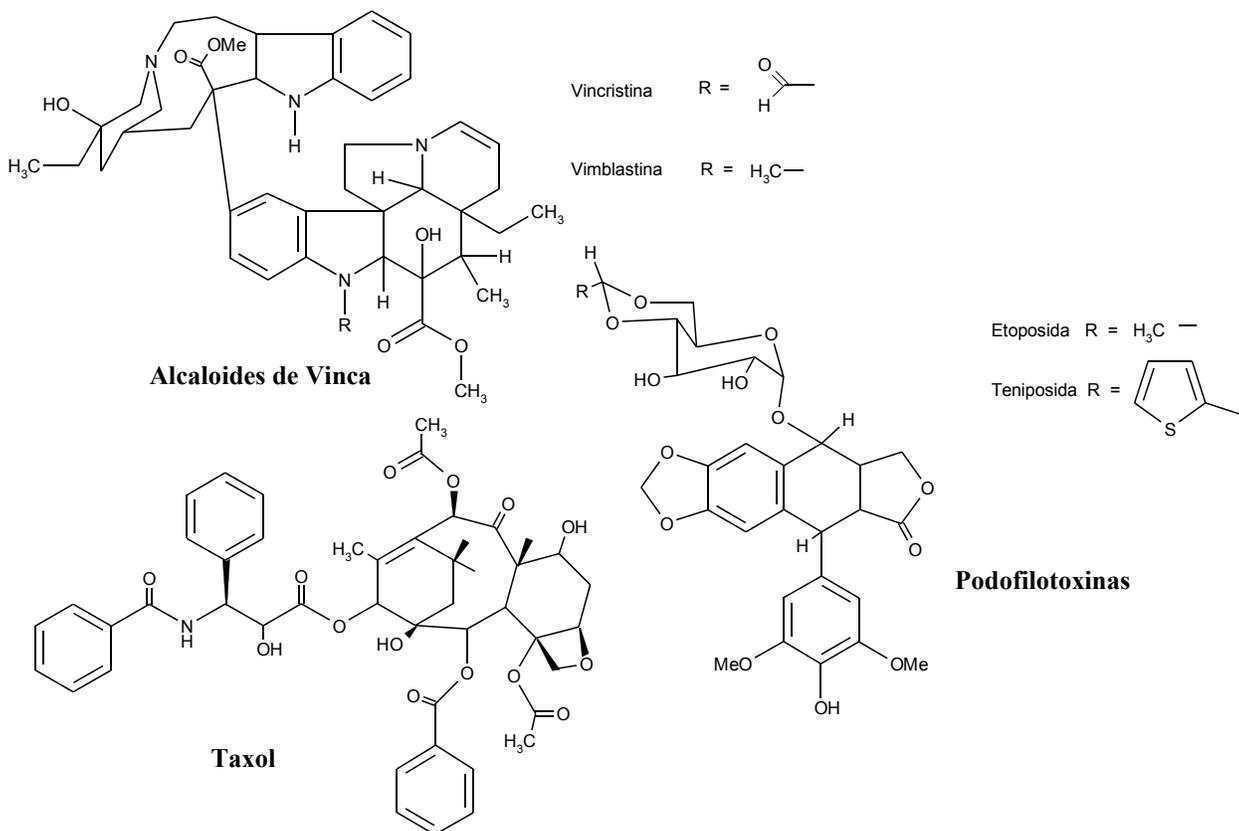


Figura 3 Estructuras de algunos de los productos naturales empleados como agentes antineoplásicos (9)

2.3.2 Agentes ciclo-celular inespecíficos

Son agentes citotóxicos que no necesariamente actúan en una etapa específica del ciclo celular.



☞ **Productos naturales**

Son compuestos obtenidos de diversas fuentes naturales, entre los que destacan:

Antibióticos antitumorales: Actúan intercalándose a las cadenas de nucleótidos lo que inhibe la síntesis de ADN y ARN, y por medio de la generación de radicales libres al escindir las cadenas de ADN. Los compuestos más representativos son las antraciclina (doxorubicina y epirubicina) y bleomicina.

Alcaloides pirrolizidínicos: Actúan por medio de la formación de entrecruzamientos con las cadenas de ADN lo que provoca la inhibición de la síntesis del material genético.

☞ **Complejos de Coordinación**

Son compuestos que presentan en su estructura química determinados metales coordinados como es el caso del cisplatino y el carboplatino (Figura 4). El mecanismo de acción del cisplatino consiste en la inhibición selectiva de la síntesis del ADN y tiene la capacidad de formar entrecruzamientos inter e intracadenas de ADN; su principal sitio de unión es el N7 de la guanina causando la formación de aductos y provocando la muerte celular.

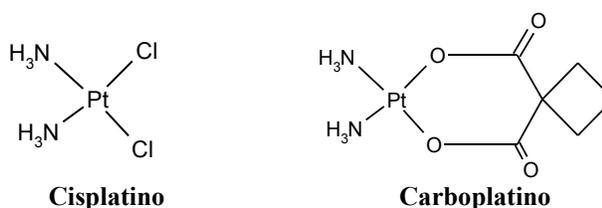


Figura 4 Estructuras de algunos Complejos de Platino



☞ **Agentes alquilantes:** Son compuestos electrófilos altamente reactivos que interaccionan con los centros nucleofílicos y funcionan debido a su capacidad de introducir un grupo alquilo en macromoléculas biológicas principalmente el ADN. Destaca la utilización de:

Mostazas nitrogenadas: Estos compuestos son considerados los pioneros en el tratamiento antitumoral ya que desde 1942 se tiene registro de su actividad. Las mostazas nitrogenadas tienen la capacidad de generar entrecruzamientos con el ADN. Su principal sitio de alquilación es el N7 de la guanina. Los compuestos más representativos son la Ciclofosfamida y la Mecloretamina (Figura 5).

Nitrosureas: Son agentes que requieren ser biotransformados para poder tener actividad antitumoral. Tienen la capacidad de formar aductos debido a la alquilación que generan en la cadena de ADN y pueden formar entrecruzamientos con el ADN, principalmente en el N1 de la deoxiguanosina y el N3 de la deoxicitocina. Algunas de las nitrosureas empleadas clínicamente son la Carmustina, Lomustina y Dacarbazina (Figura 5).

Alquilsulfonatos: Son agentes alquilantes derivados de ésteres alcanosulfónicos, muchos de estos compuestos son activos frente a diversas líneas tumorales. El compuesto Busulfan y sus homólogos son los únicos compuestos disulfónicos que han demostrado formar entrecruzamientos con el ADN (Figura 5).

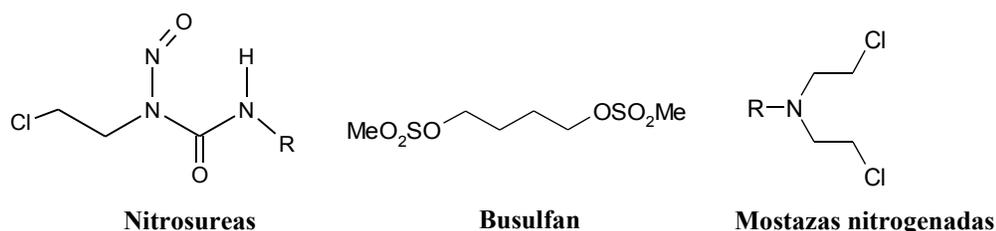


Figura 5 Estructuras de algunos agentes alquilantes (9)



2.4 Metales usados en la Terapia Antitumoral

La utilización de metales en compuestos destinados a la terapia médica no es un área de reciente descubrimiento, se tiene registro de que en 1865 Lissauer utilizó preparados de arseniato de potasio para tratar pacientes con leucemias y observó resultados positivos. (10) Sin embargo, el verdadero auge de la Bioquímica Inorgánica aplicada a la Terapéutica Médica surgió a mediados del siglo XX cuando numerosos estudios demostraron la variedad de aplicaciones de los complejos metálicos. (11)

Paul Ehrlich es considerado el pionero de la quimioterapia debido a sus estudios en células humanas destacando la clasificación de las células sanguíneas y la incorporación de preparados de arsénico en el tratamiento de la sífilis. (12)

Los metales de transición son conocidos generadores de especies reactivas de oxígeno y la presencia de dichas especies desempeña un papel importante en la respuesta citotóxica inducida por algunos complejos de coordinación, característica de utilidad en la investigación de posibles agentes antitumorales. (13)

A partir de 1979 los compuestos de Titanio despertaron interés al conocerse sus efectos como antitumorales. Otro metal que ha captado la atención de los investigadores es el Rutenio el cual ha mostrado actividad frente a algunos tumores, también se han realizado investigaciones con complejos de Mercurio, Bismuto, Antimonio, Oro, Paladio, Rodio, Plata, Platino, entre otros. (14)

En los años sesenta, Barnett Rosenberg y sus colaboradores (15) realizaron experimentos sobre la influencia de los campos eléctricos en la proliferación celular; para ello, sometieron a una población de *Escherichia coli* al campo generado por dos electrodos de platino en el seno de una disolución que contenía NH_4Cl como electrolito, los resultados mostraron que las bacterias detuvieron su división indicando que habían perdido su capacidad de replicación y después de



A pesar de que se continúa investigando el mecanismo de acción del *cis*-DDP, existen pocas dudas acerca de los efectos antitumorales debidos a su interacción con el ADN: (17) el compuesto ingresa al interior de la célula donde es activado por hidrólisis e interactúa con el ADN dando lugar a la formación de aductos que provocan modificaciones estructurales en el ácido nucléico que al no ser reparadas por el organismo traen como resultado la muerte celular por diversos mecanismos.

Existen diversos factores por los cuales algunas células no presentan sensibilidad al tratamiento con agentes antitumorales, lo que se conoce como *resistencia*, la Figura 7 plantea algunas de las principales hipótesis formuladas para explicar el fenómeno de resistencia: 1) se propone la posibilidad de que la membrana celular dificulte el acceso del compuesto al interior, 2) se plantea que la presencia de un exceso de glutatión en la célula provocaría la eliminación del compuesto antes de alcanzar el ADN y 3) la existencia de un mecanismo de reparación más efectivo que el resto de las células, lo que permitiría que los fragmentos dañados fueran reparados evitando que ocurra la apoptosis. La apoptosis es un mecanismo de muerte celular que permite controlar el número de células y así mantener la homeostasis del organismo (17) (18) (19)

Estos hechos han fomentado la búsqueda de mejores opciones terapéuticas que mantengan un alto nivel de actividad con bajos índices de toxicidad. Siguiendo el planteamiento anterior se ha generado la hipótesis de que la utilización de iones metálicos esenciales para el organismo reduciría la toxicidad observada con la utilización de otros complejos metálicos.

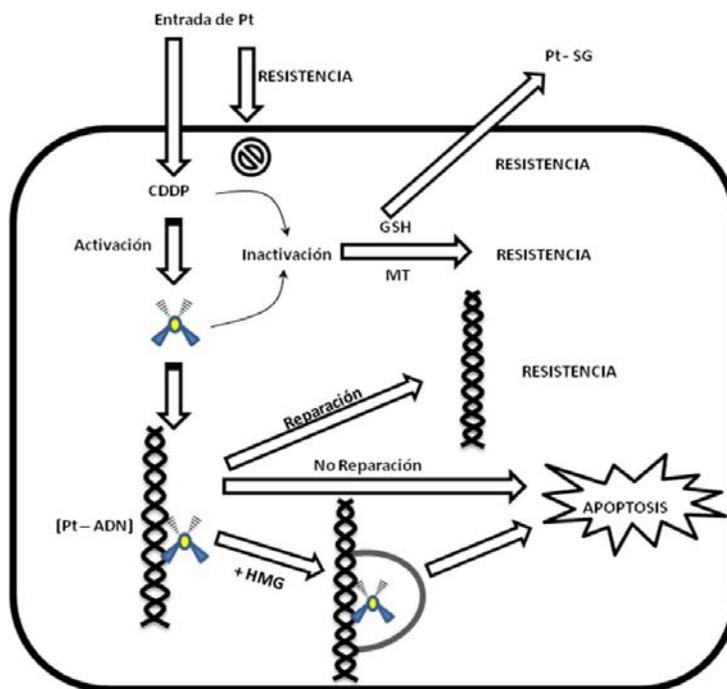


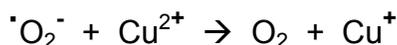
Figura 7 Mecanismo de resistencia de *cis*-DDP

El *cis*-DDP que ingresa a la célula es activado por hidrólisis e interacciona con el ADN dando lugar a diversos aductos que causan modificaciones estructurales en el ácido nucleico, las cuales, si no son reparadas por el organismo, conducen a la apoptosis. Por alguna razón, ciertas células tumorales no son sensibles a la acción de *cis*-DDP presentando resistencia al mismo. Algunas de las hipótesis generadas para explicar la resistencia al *cis*-DDP explican que es posible que las propiedades de la membrana de esas células dificulten el acceso del compuesto de platino al interior celular; en segundo término, la presencia de altas concentraciones de glutatión en las células puede favorecer que el *cis*-DDP incorporado sea eliminado antes de alcanzar al ADN. Los mismos efectos tendría la presencia de altas concentraciones de apoMT, aunque en este caso, el derivado de platino permanecería en el interior celular inactivado y finalmente, es posible que las células tumorales dispongan de un efectivo mecanismo de reparación y los fragmentos de ADN metalados sean eliminados antes de que el mecanismo de apoptosis se dispare. CDDP = *cis*-DDP; GSH = Glutatión; MT = ApoMT; Pt-ADN = Interacción del *cis*-DDP con el ADN; HMG = Proteínas del dominio HMG (grupo de alta movilidad) (17)

Uno de los iones metálicos más abundantes en la naturaleza es el cobre y una de sus principales funciones biológicas es la de ser cofactor esencial de metaloenzimas, las cuales en su mayoría están involucradas en procesos bioenergéticos. (20) Dentro de las reacciones catalizadas por estas metaloenzimas se encuentran la transferencia de electrones, transporte de oxígeno, oxigenación/oxidación de sustrato acoplado a la reducción de O_2 a H_2O_2 ó agua y la reducción de óxidos de nitrógeno. (17)



El Cobre es un metal que participa en reacciones de óxido-reducción (Figura 8) en condiciones biológicas dando como resultado la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) capaces de inducir toxicidad celular. (21)



**Figura 8 Reacciones de óxido-reducción involucradas en la generación de ROS.
Reacciones de Fenton / Haber Weiss.**

En presencia del ión superóxido(${}^{\cdot}\text{O}_2^-$) o de agentes reductores tales como el ácido ascórbico o GSH, el Cu^{2+} puede ser reducido a Cu^+ , el cual es capaz de catalizar la formación de radicales hidroxilo (OH^{\cdot}) a partir de peróxido de hidrógeno (H_2O_2). (21)

Estas propiedades son consideradas de importancia en la investigación de complejos de cobre como posibles agentes antineoplásicos y serán analizadas en la sección 2.5 Casiopeínas®.

2.5 Casiopeínas® (22)

Desde 1975 un grupo de investigadores pertenecientes a la División de Estudios de Posgrado de la Facultad de Química de la UNAM, encabezados por la Dra. Lena Ruiz Azuara inició el desarrollo de una serie de compuestos de coordinación con posible actividad antineoplásica, a los que nombró Casiopeínas®. (23) (24) (25)

Las Casiopeínas® presentan en su estructura química un centro metálico ocupado por un ión de cobre (II) el cual tiene coordinado un ligante bidentado tipo diimina (N-N) y un ligante secundario que puede ser un α -aminoacidato (N-O) o un donador tipo O-O (acetilacetonato o salicialdehidato). (23) (24) (25) (Figura 9)

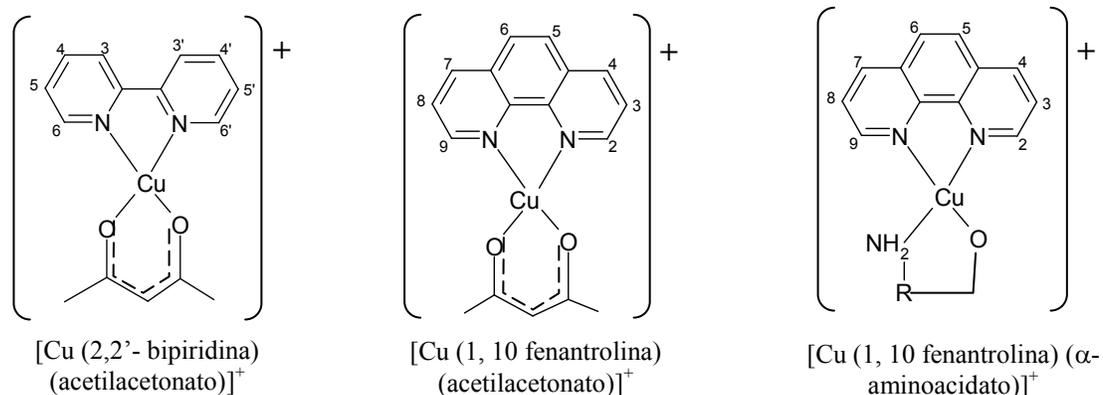


Figura 9 Estructura general de las Casiopeínas®

Algunos de los aspectos importantes en el diseño de estos compuestos de coordinación son:

Se emplea un ión Cu (II) como centro de coordinación debido a que es un metal esencial para el organismo bajo la hipótesis de que el empleo de metales esenciales reduciría la toxicidad del compuesto, aspecto que no ha sido comprobado experimentalmente. Adicionalmente se sabe que el cobre puede participar en reacciones redox involucradas en la liberación de especies reactivas de oxígeno que podrían provocar daños al ADN. (26) (13)

Estos compuestos de coordinación tienen como primer ligante una diimina, ya sea bipyridina o fenantrolina ya que se sabe que este tipo de ligante tiene la capacidad de intercalarse con el ADN. (13)

El ligante secundario puede ser un α-aminoacidato (N-O) o donador O-O y se plantea que podrían conferir diferentes grados de actividad y cierta selectividad tumoral a los compuestos debido a la variación en la hidrofobicidad que presentan.

Una vez que se tiene conocimiento de algunas de las características estructurales que contribuyen a la actividad de estos compuestos de coordinación es posible llevar a cabo una planeación en la síntesis de nuevos compuestos de coordinación con posible actividad antitumoral, mejorando la actividad de los mismos y maximizando los recursos en investigación.



2.5.1 Familias de Compuestos

Después de más de 30 años de investigación se han sintetizado aproximadamente 100 Casiopeínas® y sólo algunas de ellas han podido ser caracterizadas tanto fisicoquímica como biológicamente.

Debido a esto, fue necesario crear una nomenclatura especial para las Casiopeínas® en la que los compuestos fueron agrupados de acuerdo a características estructurales comunes generando así la siguiente clasificación (Tabla 1):

Familia	Fórmula General
Casiopeína® I	[Cu(4,7-difenil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® II	[Cu(4,7-dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® III-a	[Cu(N-N)(acac)]NO ₃
Casiopeína® III-s	[Cu(N-N)(salal)]NO ₃
Casiopeína® IV	[Cu(4,4'-dimetil-bipiridina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® V	[Cu(5-R-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® VI	[Cu(5,6-dimetil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® VII	[Cu(1,10-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® VIII	[Cu(3,4,7,8-tetrametil-fenantrolina)(O-N)]NO ₃
Casiopeína® IX	[Cu(2,2'-bipiridina)(O-N)]NO ₃

Tabla 1. Clasificación de la Familia de las Casiopeínas®
O-N: α-aminoacido; **acac:** acetilacetato; **salal:**salicilaldehidato



2.5.2 Características de las Casiopeínas®

Se han estudiado algunas de las características de las Casiopeínas® que posiblemente contribuyen a su actividad como compuestos antineoplásicos, algunas de las principales son:

☞ La utilización de aminoácidos como ligandos (N-O) facilita la interacción de la molécula con la cadena de ADN. Se han observado distintos grados de interacción con el material genético dependiendo del tipo de aminoácido empleado. (27)

☞ El tipo y cantidad de sustituyentes presentes en el ligando bidentado tipo diimina (N-N) influyen en la actividad antineoplásica que el compuesto presentará. Se ha observado que la presencia del tercer anillo aromático en el ligante bidentado influye en la actividad del compuesto. (28)

☞ Las Casiopeínas® poseen actividad citotóxica, citostática y antitumoral concomitante con el incremento de especies reactivas de oxígeno (ROS) que producen decremento en las concentraciones de glutatión intracelular. (29)

☞ Una de las principales hipótesis que se maneja del posible mecanismo de acción es que la estructura plana de las Casiopeínas® permite su interacción con el ADN mediante interacciones π - π .

2.5.3 Casiopeínas® más estudiadas

De todos los compuestos sintetizados existen algunos que han sido más estudiados, destacando los resultados obtenidos con la Casiopeína® III-ia y la Casiopeína® II-gly.



Casiopéina® II-gly

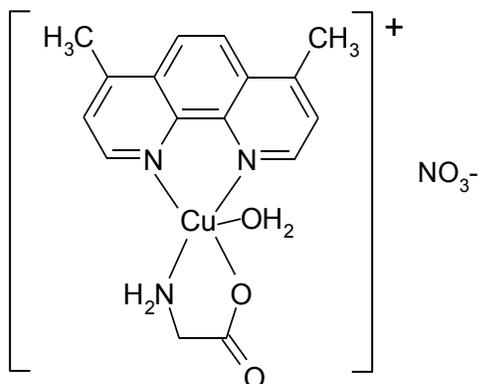


Figura 10 Estructura química de la Casiopéina® II-gly
 $[\text{Cu} (4,7\text{-dimetil} - 1,10\text{-fenantrolina})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$

La Cas II-gly (Figura 10) se presenta como una alternativa prometedora en el tratamiento del cáncer ya que ha mostrado tener efectos citotóxicos y genotóxicos en diferentes modelos, (30) así como efecto antineoplásico *in vitro* e *in vivo*. (31) (32) (33) Se ha observado que la Cas II-gly presenta actividad citotóxica de modo gradual dependiente de la dosis frente a Glioma C6, así como también se ha comprobado que la apoptosis celular provocada por la presencia del compuesto puede ser dependiente o independiente de la activación del mecanismo de caspasas. (34)

La Cas II-gly ha sido evaluada en sistemas *in vitro* utilizando células HeLa donde se ha demostrado que interfiere tanto en la cadena de transferencia de electrones como en la fosforilación oxidativa de la mitocondria; (35) se ha observado también su capacidad para inducir la fragmentación del ADN y apoptosis generando así una reducción significativa en la población celular. (36)

Un aspecto importante en el funcionamiento de la Cas II-gly es que los rangos de genotoxicidad y citotoxicidad observados se ven potenciados cuando el cobre es reducido en presencia de agentes tales como el ácido ascórbico por lo que se propone que el posible mecanismo de acción del compuesto sea mediante la



generación de especies reactivas de oxígeno que provocan daño al ADN. (37)

Dentro de los estudios *in vivo* realizados utilizando la Cas II-gly destaca la investigación de sus efectos genotóxicos en distintos órganos de ratones administrando 50% de la DL50 (4.4 mg/Kg); los datos obtenidos en el experimento mostraron que existe una disminución en la viabilidad de las células del corazón, hígado, bazo, riñón y testículo así como también se observó la inducción de daño al ADN reflejado en un incremento en la longitud de los cometas, dichos resultados indican que estos compuestos pueden inducir genotoxicidad y citotoxicidad *in vivo*. (31) Cuando se compara el efecto genotóxico y citotóxico del cis-DDP a una dosis de 4mg/Kg contra la Cas II-gly (9.0, 7.0, 4.4 ó 3.3 mg/Kg) se puede observar que tanto en tratamientos agudos como subcrónicos la Cas II-gly no presenta daño genotóxico mediante la inducción de micronúcleos en organismos adultos, mientras que cis-DDP presenta una inducción de micronúcleos en todos los grupos. Cis-DDP fue el único compuesto que mostró un efecto citotóxico bien definido tanto en organismos adultos como individuos en desarrollo. (38)

Finalmente, como parte de los estudios clínico-patológicos encaminados a establecer el riesgo que representa la utilización de la Cas II-gly como agente terapéutico en pacientes con cáncer, se han realizado estudios sobre la caracterización y tratamientos de los efectos tóxicos agudos asociados al empleo del compuesto, el estudio se realizó empleando perros a los cuales se les administró una dosis letal (DL99) de la Cas II-gly y se observó que la muerte fue ocasionada por edema pulmonar. En un intento por prolongar la vida del individuo se administró un antagonista de receptores beta-adrenérgicos e hipotensor con actividad captadora de radicales libres; a pesar de que esta acción no evitó la muerte del individuo si logró prolongar su tiempo de vida por lo que el empleo de compuestos captadores de radicales libres se presenta como una posible herramienta para prevenir o atenuar los efectos adversos observados a altas dosis de Cas II-gly. (39)



Casiopéina® III-ia

Estudios *in vitro* han mostrado que la Cas III-ia (Figura 11) provoca reducción en la viabilidad celular de la línea tumoral HCT-15 así como también inducción de necrosis y apoptosis de modo gradual dependiente de la dosis. (40) Al evaluar la actividad antitumoral de la Cas III-ia (0.01, 0.1, 1.0 y 10.0 $\mu\text{g/mL}$) contra el *cis*-DDP a las mismas concentraciones frente a las líneas tumorales MCF-7, HeLa y SK-LU-1 se observó que la Cas III-ia presenta una actividad citotóxica mayor que el *cis*-DDP en las tres líneas tumorales. Es importante destacar que *cis*-DDP no es el fármaco de elección para el tratamiento de carcinomas mamarios mientras que Cas III-ia induce un 80% de células en apoptosis, cuando se agrega activación metabólica no induce citotoxicidad en ésta línea celular. (32)

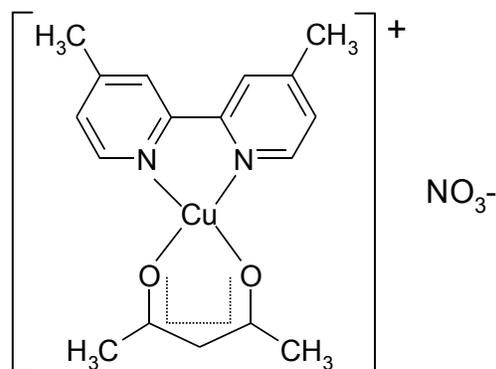


Figura 11 Estructura química de la Casiopéina® III-ia
[Cu (4,4'-dimetil -2,2'-bipiridina)(acetilacetonato)]NO₃

La apoptosis generada por la administración del compuesto se presenta mediada por la activación de Bax, lo que genera la activación de mecanismos dependientes de caspasas. (40)

Al comparar el efecto genotóxico y citotóxico inducido por la Cas III-ia (9.0, 7.0, 4.4 ó 3.3 mg/Kg) y el *cis*-DDP (4 mg/Kg) se observó que los organismos adultos tratados con la Cas III-ia no presentan daño genotóxico mediante la inducción de micronúcleos mientras que el *cis*-DDP presenta un incremento en la inducción de



micronúcleos en organismos adultos. Se observó que tanto la Cas III-ia como el cis-DDP inducen un efecto feto-letal en el tratamiento subcrónico. (38)

La hipótesis sobre el mecanismo de acción de la Cas III-ia sugiere que la generación de radicales libres que causan daño oxidativo a la célula ocurre en el citosol y la reducción del cobre en presencia de ácido ascórbico incrementaría el daño oxidativo; sin embargo, los resultados obtenidos al estudiar el daño oxidativo citosólico empleando dihidrorrodamina 123 proponen que el daño que provoca la apoptosis ocurre en un compartimento distinto al citosólico. (29)

La Cas III-ia ha sido evaluada en modelos *in vivo* utilizando tumores humanos xenotransplantados en ratones desnudos (*nu/nu*) donde se comprobó su actividad frente a líneas tumorales como HeLa y PC-3. (41)

Se han realizado estudios sobre los efectos secundarios observados durante la administración aguda de la Cas III-ia en la cual se observó, al igual que al administrar la Cas II-gly que el principal efecto provocado es paro cardiaco debido, posiblemente, al exceso de radicales libres presentes por lo que la terapia paliativa sugerida es la administración de captadores de radicales libres previo al consumo del compuesto. (39)

También se han realizado evaluaciones de estabilidad acelerada (42) a la Cas III-ia siguiendo las normatividades establecidas por la Secretaría de Salud con la finalidad de proporcionar evidencia documental de la calidad del fármaco, dicha información constituye uno de los requisitos a cumplir para el registro de un medicamento como fármaco nuevo en México. (43)

Para que todos estos estudios se lleven a cabo es necesario realizar un procedimiento previo de cernimiento de los compuestos que permita enfocar los recursos a aquellos que presentan potencial antitumoral. A continuación se



explicará el proceso de cernimiento realizado para la selección de los compuestos.

2.6 Cernimientos *in vitro* e *in vivo*

El proceso de descubrimiento de nuevos fármacos involucra la identificación de compuestos con posible actividad farmacológica, síntesis, caracterización, selección y evaluación con fines terapéuticos. Una vez que el compuesto ha mostrado su funcionalidad comienza el desarrollo del medicamento y finalmente es evaluado en humanos. (44)

Las evaluaciones de un compuesto se dividen en 2 fases: (45)

- **Fase Pre-Clínica:** Involucra estudios *in vitro* y evaluaciones *in vivo* empleando diversos modelos animales. Se evalúan diversas dosis, esquemas y vías de administración con la finalidad de obtener información relativa a la actividad, toxicidad y farmacocinética del compuesto.
- **Fase Clínica:** Se divide a su vez en 4 etapas en las cuales el compuesto ya es evaluado en humanos, para cada etapa es necesario un determinado número de pacientes y condiciones de salud determinadas. Si un medicamento cumple satisfactoriamente con las fases I, II y III es aprobado para su uso a nivel clínico; la fase IV es un estudio post-aprobatorio que permite seguir de cerca los efectos a largo plazo del uso de este producto.

La evaluación *in vitro* constituye el primer paso dentro del proceso de cernimiento de compuestos con probable actividad farmacológica. (46) En estas evaluaciones se emplean diversas líneas celulares lo que permite determinar la sensibilidad a los agentes con potencial antitumoral, una de sus ventajas es que es posible realizar una evaluación *in vitro* aún cuando la cantidad de compuesto disponible para la experimentación es limitada. Este tipo de pruebas proveen de información sobre citotoxicidad, genotoxicidad y la actividad citostática del compuesto.



Dentro de las evaluaciones que pueden realizarse para el cernimiento y evaluación de nuevos fármacos destacan: (47)

- ✓ Evaluación de la actividad citostática, citotóxica y genotóxica en cultivos de linfocitos humanos determinando factores como Concentración Inhibidora Media (IC50), Apoptosis, Índice Mitótico (IM), Cinética de Proliferación Celular (CPC) e Intercambio de Cromátidas Hermanas (ICHs).
- ✓ Evaluación de la actividad antineoplásica en diversas líneas tumorales murinas y humanas de diferente estirpe celular.
- ✓ Evaluación de actividad, apoptosis y daño histológico tanto a nivel macro y microscópicos en modelos animales isotransplantados y xenotransplantados.
- ✓ Evaluación de la toxicología preclínica de diversos fármacos

Existen una gran variedad de modelos animales disponibles para la evaluación de nuevos agentes con potencial antineoplásico: el modelo animal permite estudiar la farmacología, toxicología, inmunología y métodos bioquímicos involucrados en el mecanismo de acción básico de los agentes antitumorales.

Dependiendo del tipo de fármaco a evaluar se han desarrollado protocolos de evaluación específicos para cada tipo de compuestos. El protocolo (Figura 12) a seguir para el estudio de compuestos con posible actividad antineoplásica ha sido elaborado por el *Developmental Therapeutics Program* (DTP) perteneciente al *National Cancer Institute* (NCI) y establece un cernimiento por fases de evaluación. (Tabla 2) (48) (49)

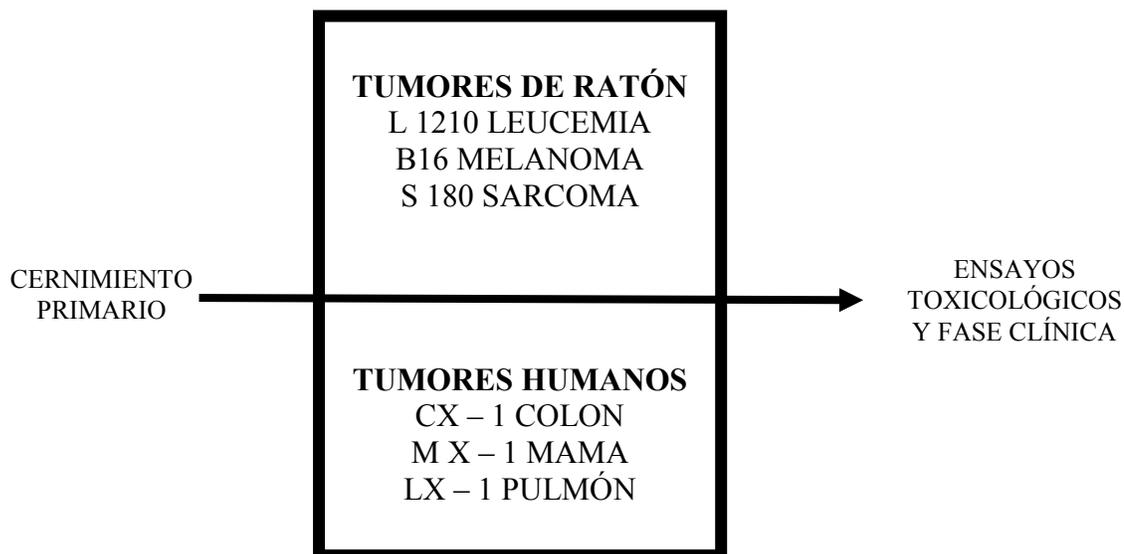


Figura 12 Protocolo de cernimiento para compuestos con actividad antitumoral establecido por el NCI (48) (49)

Modelo	Vía de Administración	Esquema de Administración
A. Pre-cernimiento <i>In vivo</i>		
3PS31 – P388 Leucemia	Intraperitoneal	qd x1, qd x 5
B. Tumores Murinos Trasplantados		
3B131 – B16 Melanoma	Intraperitoneal	qd x 1, qd x 9
3CD72 – CD8F1 Adenocarcinoma mamario	Intraperitoneal	qd 7, 7x8, 7x15, 7x 22 y 7x29
3CDJ2 – CD8F1 Adenocarcinoma mamario	Intraperitoneal	Tratamiento único en estadio específico
3C872 – Carcinoma Colon 38	Intraperitoneal	qd 7x2, 7x9
3LE31 – L1210 Leucemia	Intraperitoneal	qd x 1, qd x 9
3LL39 – Carcinoma de Pulmón de Lewis	Intraperitoneal	qd x 1, qd x 9
C. Tumores Humanos Xenotransplantados		
3C2G5 – CX-1 Adenocarcinoma de Colon	Subcutáneo	qd 4x1, 4x5, 4x9 y 4x13
3LKG5 – LX – 1 Carcinoma de Pulmón	Subcutáneo	qd 4x1, 4x5 y 4x9
3MBG5 – MX – 1 Carcinoma Mamario	Subcutáneo	qd 4x1, 4x5 y 4x9

Tabla 2 Esquemas de admon. establecidos por el NCI
Esquemas para el Cernimiento de Compuestos con posible Actividad Antineoplásica. (48) qd: cada día



2.7 Estudio Correlación Estructura - Actividad (28)

Los estudios correlación estructura-actividad (QSAR) que se han realizado dentro del grupo de investigación se han enfocado en estudiar, principalmente, la influencia de los sustituyentes en el ligante diimina y del ligante secundario (*acetilacetato* y *glicinato*) sobre las propiedades fisicoquímicas del compuesto, arrojando resultados importantes que permiten seleccionar a los compuestos más activos para su posterior evaluación en modelos animales. Entre los resultados más importantes podemos destacar los siguientes:

- ❖ Se demostró que la presencia de los tres anillos aromáticos de la fenantrolina es una característica necesaria para mantener la actividad antiproliferativa de estos complejos de coordinación.
- ❖ Se encontró que los complejos más activos son aquellos con sustituyentes electrodonadores e hidrofóbicos en la diimina aromática.
- ❖ Se evaluó la influencia del segundo ligante sobre la actividad biológica de los complejos y se observó que cuando el segundo ligante es acetilacetato la actividad citotóxica es ligeramente mayor que cuando se coloca un glicinato.

Los resultados obtenidos de los estudios QSAR han permitido conocer las características estructurales necesarias para que los compuestos presenten una mayor actividad citotóxica, reduciendo así la cantidad de cernimientos *in vitro* e *in vivo* en busca de los complejos activos.

2.8 Compuestos a evaluar

Los estudios QSAR realizados dentro del grupo de investigación en Casiopeínas® han permitido mejorar la selección de los compuestos que serán evaluados tanto *in vitro* como *in vivo*, seleccionando compuestos que se predice sean los más activos.



Así, se seleccionaron los 2 compuestos que serán evaluados en el presente trabajo para determinar su posible actividad antitumoral *in vivo*.

Casiopeína® VIII-gly

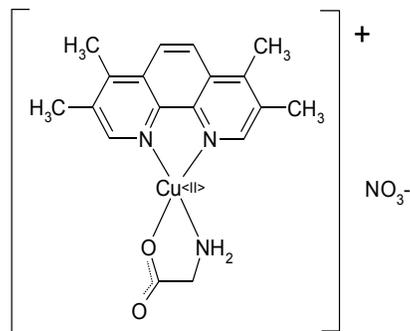


Figura 13 Estructura química de la Casiopeína ®VIII-gly

Fórmula: $[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetrametil-1,10-tenantrolina})(\text{glicinato})]\text{NO}_3$ (Figura 13)

Peso Molecular: 453.90 g/mol

Casiopeína® III-J

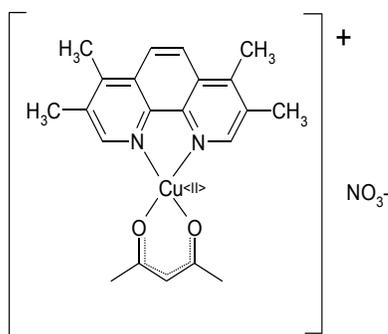


Figura 14 Estructura química de la Casiopeína ® III-J

Fórmula: $[\text{Cu}(3,4,7,8\text{-tetrametil-1,10-phenantrolina})(\text{acetilacetato})]\text{NO}_3$ (Figura 14)

Peso Molecular: 478.99 g/mol

2.9 Modelos de Evaluación *in vivo* de fármacos antitumorales (50) (51)

La evaluación pre-clínica es considerada uno de los factores más importantes en el desarrollo de tratamientos antitumorales debido a que proveen información relevante sobre los posibles resultados dentro del área clínica.



La utilización de roedores como modelos de evaluación de fármacos representa una de las herramientas más ampliamente utilizadas en diversas áreas de la investigación; sin embargo, un gran número de científicos han mostrado cierto escepticismo sobre los límites a los cuales es posible extrapolar los resultados obtenidos a los esperados en los pacientes humanos.

Los modelos animales utilizados en la evaluación de fármacos antitumorales proveen información importante para el diseño y desarrollo tanto de los mismos fármacos como de los esquemas de tratamiento. Dentro de la información obtenida podemos destacar:

- ❖ Detección de resistencia de las líneas tumorales a determinados agentes antitumorales.
- ❖ Dosis a la cual se observa actividad antitumoral.
- ❖ Vía de administración más efectiva para el tratamiento.
- ❖ Esquema de administración por medio del cual el fármaco muestra tener actividad.

La elección del modelo de evaluación a utilizar está determinada por el objetivo que se pretenda alcanzar en la investigación.

2.9.1 Principales Modelos de Evaluación Antitumoral (52) (53)

Modelo de Tumores Primarios Trasplantados

Es el modelo más sencillo y económico, se basa en la teoría de que existe una identidad antigénica entre el tumor (murino) y el huésped (ratón) lo que permite un mejor desarrollo del tumor implantado reduciendo las posibilidades de rechazo por parte del huésped.



Algunas de las limitaciones del modelo es que el crecimiento del tumor puede suceder a una velocidad distinta a la que se observa naturalmente en un tumor humano, el huésped no experimenta los efectos sobre la salud que experimentaría con un tumor espontáneo.

Este modelo es utilizado principalmente como modelo de crecimiento para evaluar posibles agentes antitumorales.

Modelo de Tumores Metastásicos Trasplantados

Uno de los principales retos a los cuales se enfrentan la terapéutica médica es el evitar la diseminación de los tumores hacia otros tejidos o zonas anatómicas. La habilidad de un tumor para generar metástasis incrementa la complejidad de los tratamientos, este modelo permite obtener información sobre dicho fenómeno.

Dentro de éste modelo existen dos variantes:

➤ ***Modelo Metastásico Experimental***

En éste modelo se implantan nódulos metastásicos en zonas anatómicas comúnmente invadidas por los tumores metastásicos que, al crecer, generan una metástasis en el huésped.

➤ ***Modelo Metástasico Espontáneo***

Es uno de los modelos de evaluación más complejos debido a que depende de factores genéticos, bioquímicos y de salud del huésped. Es un modelo altamente variable y requiere de un lapso de tiempo relativamente alto para que el tumor se desarrolle. El proceso metastásico ocurre espontáneamente una vez que el tumor primario ha sido implantado. Este modelo presenta gran similitud con las patologías humanas debido a que se trata de un tumor primario que evoluciona a un proceso metastásico, por lo que se puede emplear para evaluar compuestos enfocados a la prevención de la invasión tumoral.



Modelo de Tumores Autónomos Primarios

En este modelo, el tumor aparece y crece dentro del huésped; los individuos son difíciles de trabajar debido a que existen diferencias en los tiempos en que los tumores crecen en cada uno y a pesar de que los costos de mantenimiento de los roedores son altos, existe la ventaja de que los individuos son sometidos a lo largo del experimento a los efectos característicos del cáncer.

Modelo de Xenotrasplante de Tumores Humanos en Ratones Atímicos

En el modelo de xenotrasplante los ratones presentan una marcada, aunque no absoluta, supresión en linfocitos T debida a una falta de capacidad de madurar dichas células del sistema inmune, característica que permite el crecimiento progresivo de algunos tumores de líneas ajenas a las de su especie. Al emplear este modelo, los tratamientos pueden ser evaluados directamente contra neoplasias humanas proporcionando resultados cercanos a los esperados a nivel clínico.

2.9.2 El ratón desnudo como modelo en la evaluación de nuevos fármacos

El descubrimiento de mutaciones en el ratón se ha convertido en una de las herramientas de mayor aplicación en el área de la investigación clínica. A lo largo del siglo XX se han descrito más de 1000 mutaciones (54) (entre espontáneas e inducidas) que son de gran valor para la medicina experimental. Una de estas mutaciones fue la descrita por primera vez en 1966 en Glasgow, Escocia y nombrada como mutación *nude* (*nu*) debido a que presentaban una característica fenotípica de carencia de pelaje en los individuos (Figura 15), aunque no fue sino hasta 1968 que se descubrió que la mutación homocigota *nude* (*nu/nu*) presentaba además una actividad atímica debido a que los individuos mantenían un timo rudimentario lo cual limitaba las funciones del sistema inmune teniendo únicamente la generación de un número reducido de linfocitos T maduros.



Figura 15 Ratón Desnudo (*nu/nu*)

Se observa la característica fenotípica de falta de pelaje.
Foto tomada de Revista Química Viva (55)

Dichas características llevaron a la conclusión de que los ratones desnudos (*nu/nu*) poseen las propiedades necesarias para ser empleados como modelos para el estudio de tejidos alo y xenotrasplantados debido al bajo índice de rechazo de los implantes realizados. (55) El hecho de que los ratones desnudos acepten el trasplante de tejidos humanos (tumores) se ha convertido en uno de los descubrimientos más importantes que han contribuido al avance en el estudio de los agentes antitumorales. (56)

El NCI ha desarrollado protocolos que permiten la utilización de ratones desnudos para la evaluación de fármacos con posible actividad antineoplásica; por lo que se decidió seguir el Protocolo de Evaluación de Adenocarcinoma de Colon Humano Xenotrasplantado Subcutáneamente para la evaluación de las Casiopeínas® en el presente trabajo y de esta manera contribuir a las evaluaciones a realizar dentro de la fase 1 preclínica. (48)



CAPÍTULO 3 METODOLOGIA

3.1. Determinación de la Dosis Letal 50 (DL50) de las Casiopeínas® a evaluar.

3.1.1. Animales

Se emplearon 50 ratones Hsd:ICR (CD-1®) machos de 6 semanas de edad con un peso corporal de 25 ± 2 g. Los animales se mantuvieron en la Unidad de Experimentación Animal, Facultad de Química, UNAM (UNEXA) bajo las siguientes condiciones: extracción-inyección forzada de aire de 18 recambios/hora, temperatura de $23 \pm 1^\circ\text{C}$, humedad relativa de 45-55%, y ciclos de luz-oscuridad de 12/12 horas. La alimentación consistió en alimento fórmula para roedores Harlan Teklad Global Diet (Madison, Wisconsin) 2018S y agua estéril *ad libitum*.

3.1.2. Fármacos

Los compuestos que se evaluaron son la Casiopeína® VIII -gly [Cu (3,4,7,8-tetrametil-1,10 fenantrolina) (glicinato)]NO₃ (Cas VIII-gly) y la Casiopeína® III-J [Cu (3,4,7,8-tetrametil-1,10 fenantrolina) (acetilacetato)]NO₃ (Cas III-J), proporcionadas por la cDra. María Elena Bravo adscrita al Departamento de Química Inorgánica y Nuclear (UNAM, México) y fueron disueltas en agua estéril y administradas inmediatamente. (Figura 13 y 14)

3.1.3. Determinación de la DL50

Los ratones fueron distribuidos al azar en 5 grupos de evaluación (uno para cada dosis) y colocados en cajas independientes, se administraron los compuestos por vía intraperitoneal con una dosis única. Las dosis empleadas para la evaluación de los fármacos fueron: 7, 8, 9, 10 y 11 mg/Kg. Estudios previos (datos no publicados) proporcionan información relativa al valor de DL50 de los compuesto, por lo que se decidió cerrar el marco de evaluación a dichas aproximaciones y



disminuir de esta manera el número de evaluaciones a realizar. A las 24 horas de la administración se realizó el conteo de los ratones para determinar el número de individuos sobrevivientes en cada grupo y los sobrevivientes observados por 14 días. Los resultados fueron analizados por un ajuste sigmoïdal en una gráfica dosis-respuesta cuantales (57) obteniendo así la DL50 de cada compuesto.

3.2. Evaluación de la Actividad Antitumoral de las Casiopeínas®

Para realizar la evaluación de los compuestos se empleó el protocolo de evaluación de Carcinoma Humano de Colon Xenotransplantado Subcutáneamente. (48)

3.2.1. Animales

Se emplearon 46 ratones Hsd:Athymic Nude (nu/nu) (Harlan México, S.A. de C.V.) de 6 semanas de edad con un peso corporal de 24 ± 3 g, los cuales se mantuvieron en aisladores y en condiciones asépticas en la UNEXA. El cuarto donde se encontraban los ratones cuenta con sistema de extracción-inyección forzada de aire con 18 recambios/hora, a temperatura de 23 ± 1 °C y humedad relativa de 45-55%, con ciclo de luz-oscuridad de 12/12 horas. La alimentación consistió en alimento estéril fórmula para roedores Harlan Teklad Global Diet (Madison, Wisconsin) 2018S y agua estéril *ad libitum*.

Los individuos se identificaron con muescas en las orejas y se distribuyeron al azar en grupos de evaluación de 6 individuos por grupo para los grupos experimentales (Casiopeínas®) y 11 individuos para los grupos control positivo y negativo.

3.2.2. Fármacos

En el grupo control negativo se administró agua estéril y en el grupo control positivo se usó el *cis*-diamino dicloro platino (II) (CDDP) (*Alfa Aesar*, Ward Hill, MA), que también fue disuelto en agua estéril y administrado inmediatamente.



3.2.3. Células

La línea tumoral HCT-15 (Adenocarcinoma colorectal) fue adquirida en *American Type Cell Collection* (ATCC) (American Tissue Culture Collection, Rockville, MD). Las células se mantuvieron en proliferación en el laboratorio de cultivos de tejidos de la UNEXA según los protocolos. (58) (59)

3.2.4. Esquema de administración

Tratamiento	Dosis	Esquema
Control negativo (agua destilada) (n = 11)	10 mg/Kg	qd 7 x 4
CasVIII - gly (n=6)	1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ Equivalente a 0.74 mg/Kg	qd 21
Cas VIII – gly (n=6)	3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ Equivalente a 1.48 mg/Kg	qd 4 X 6
Cas III – J (n=6)	1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ Equivalente a 0.78 mg/Kg	qd 21
Cas III – J(n=6)	3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ Equivalente a 1.56 mg/Kg	qd 4 X 6
CDDP (n=11)	13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ Equivalente a 4 mg / Kg	qd 7 X 4

Tabla 1 Esquema de administración empleado para la evaluación de las Casiopeínas®
n: número de individuos por grupo; qd: cada día

Para evaluar la actividad de los compuestos se emplearon dos esquemas de administración: uno intermitente, en el que los compuestos son administrados cada 4 días en 6 ocasiones (qd 4x6) empleando una dosis de 3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ ($^{2}/_{10}$ de la DL50) y otro esquema crónico en el que se realizó una administración diaria durante 21 días (qd 21) a una dosis de 1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ ($^{1}/_{10}$ de la DL50).

Tanto el control negativo como el compuesto empleado como control positivo (CDDP) se administraron cada 7 días en 4 ocasiones (qd 7x4).



3.2.5. Dosis

Se decidió administrar $1/10$ y $2/10$ de la DL50 de las Casiopeínas® debido a que es la primera evaluación *in vivo* usando el modelo de xenotransplatación que se realiza con estos compuestos; por lo anterior, se consideró que al administrar una dosis 8 a 10 veces menor a la DL50 de las Casiopeínas® se evitaría la muerte de los individuos por toxicidad aguda del compuesto y permitiría observar la posible respuesta biológica.

Con la finalidad de comparar la actividad antitumoral entre ambas Casiopeínas® se decidió administrar ambos compuestos a la misma dosis molar, tomando como referencia $1/10$ de la DL50 de la Cas VIII – gly debido a que su DL50 es la más baja indicando mayor toxicidad.

El CDDP se administró en la dosis recomendada para su evaluación en modelos *in vivo* (4 mg/Kg qd 7x4).

3.2.6. Actividad antitumoral

Para determinar la actividad antitumoral de los compuestos se inocularon 2.5×10^6 células de carcinoma de colon HCT-15 subcutáneamente en el flanco izquierdo inferior de los animales de experimentación. Una vez que el tumor alcanzó un tamaño de 3 mm de diámetro se dio inicio al tratamiento indicando este día como “Día 0”.

Los animales se pesaron y los tumores se midieron a lo largo y ancho tres veces a la semana usando calibradores. Posteriormente, las medidas se convirtieron en volumen tumoral (cm^3) usando la siguiente fórmula: (40)

$$[\text{largo (cm)} \times \text{ancho}^2 (\text{cm}^2) \times \pi] / 6 \dots \dots \dots (1)$$

Con los volúmenes tumorales se calcularon los volúmenes relativos tumorales (VRT):



$$\text{VRT} = (\text{Vol. día } x) / (\text{Vol. día } 0) \times 100 \dots\dots\dots(2)$$

Usando las medias de los volúmenes relativos tumorales (VRT) se calculó la función antitumoral (FA) del compuesto en los días 7, 14 y 21.

$$\text{FA} = (\text{VRT}_{\text{tratado}}) / (\text{VRT}_{\text{testigo}}) \times 100 \dots\dots\dots(3)$$

Para considerar que el fármaco posee actividad antineoplásica el valor de FA debe ser menor a 42

3.2.7. Retraso Específico del Crecimiento

Con los volúmenes tumorales calculados a lo largo del experimento se construyó una poligonal graficando el volumen tumoral de cada ratón contra el tiempo. Posteriormente, se realizó una regresión exponencial de la gráfica obteniendo la ecuación de la línea.

Se duplicó el valor de volumen inicial de cada animal y se interpolaron los valores para determinar el tiempo en que cada tumor alcanzó el doble de su volumen.

Considerando los días promedio que demora el tumor en duplicar su tamaño (D) en los distintos grupos, se calculó el retraso específico de crecimiento:

$$\text{REC} = (D_{\text{tratado}} - D_{\text{testigo}}) / (D_{\text{testigo}}) \dots\dots\dots(4)$$

Para considerar que el fármaco posee potencial antineoplásico el valor de REC debe ser mayor o igual a 2.

3.2.8. Incremento de Peso

El porcentaje del incremento de peso del individuo se utilizó como indicador de la toxicidad del compuesto calculándose de la siguiente forma:

$$[(\text{Peso Día } x / \text{Peso Día } 0) - 1] \times 100 \dots\dots\dots(5)$$

El experimento terminó 24 horas después de la última administración y los ratones



se sacrificaron en cámara de CO₂.

3.2.9. Análisis estadístico (60)

Los datos de VRT obtenidos para evaluar la función antitumoral se analizaron con la prueba de Kruskal-Wallis debido a que el comportamiento de los valores no cumplen con los requisitos establecidos para aplicar un análisis unilateral de la varianza (ANOVA); es decir, los datos arrojados por las distintas poblaciones no siguen una distribución normal con variancias iguales por lo que se decidió utilizar una alternativa no paramétrica al análisis unilateral de la varianza para probar la hipótesis de parámetros de ubicación iguales dicha prueba es conocida como análisis unilateral de la variancia por jerarquías de Kruskal-Wallis. (61). Posteriormente se empleó el cálculo del coeficiente *phi* para la obtención del intervalo de confianza, lo que permite establecer los tratamientos entre los cuales se ha establecido que existe diferencia.

El incremento de peso corporal fue analizado mediante un Análisis Unilateral de la Varianza debido a que el comportamiento de la información sigue una distribución normal y una vez establecida la existencia de diferencias entre las medias de las poblaciones se procedió a realizar una prueba de Tukey la cual permite conocer los tratamientos entre los que existe diferencia.

Se empleó un nivel de significancia de 0.05



CAPÍTULO 4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Determinación de las Dosis Letales 50 (DL50) de las Casiopeínas®.

Se obtuvieron las DL50 de la Cas VIII-gly y la Cas III-J cuyos valores son 16.45 $\mu\text{mol/Kg}$ y 18.89 $\mu\text{mol/Kg}$ respectivamente. Los valores de DL50 indican que la Cas VIII-gly muestra una toxicidad *in vivo* ligeramente mayor que la Cas III-J. Este resultado podría sugerir que el tipo de ligante secundario influye en la toxicidad del compuesto. Una vez obtenida la DL50, se decidió emplear para la evaluación de la actividad antitumoral las dosis de 1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ para el esquema crónico (qd 21) y 3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ para el esquema intermitente (qd 4x6); estos valores corresponden a $1/10$ y $2/10$ de la DL50 de Cas VIII-gly el cual fue el compuesto mas tóxico.

4.2. Actividad Antitumoral de las Casiopeínas®

4.2.1. Volumen Tumoral Relativo

A continuación se presentan los valores de volumen tumoral relativo calculados a los días 7 (A), 14 (B) y 21 (C) de evaluación (Figura 16).

En la gráfica A se observa que la Cas VIII-gly (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6) alcanzó un VRT mayor al que presentó el control negativo; sin embargo, no existe diferencia estadísticamente significativa entre ambos grupos (Anexo D). El grupo tratado con CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4) mostró un VRT significativamente menor al control negativo ($\alpha=0.05$). En el Anexo D se observa que existe diferencia significativa entre ambos grupos tratados con Cas VIII-gly y CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4); esta relación indica que las Casiopeínas® muestran valores de VRT significativamente mayores ($\alpha=0.05$) a los obtenidos por CDDP. Debido a que no existe diferencia significativa entre los grupos tratados con Casiopeína® y el control negativo se puede concluir que CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4) es el único grupo que muestra actividad antitumoral al día 7 de evaluación.

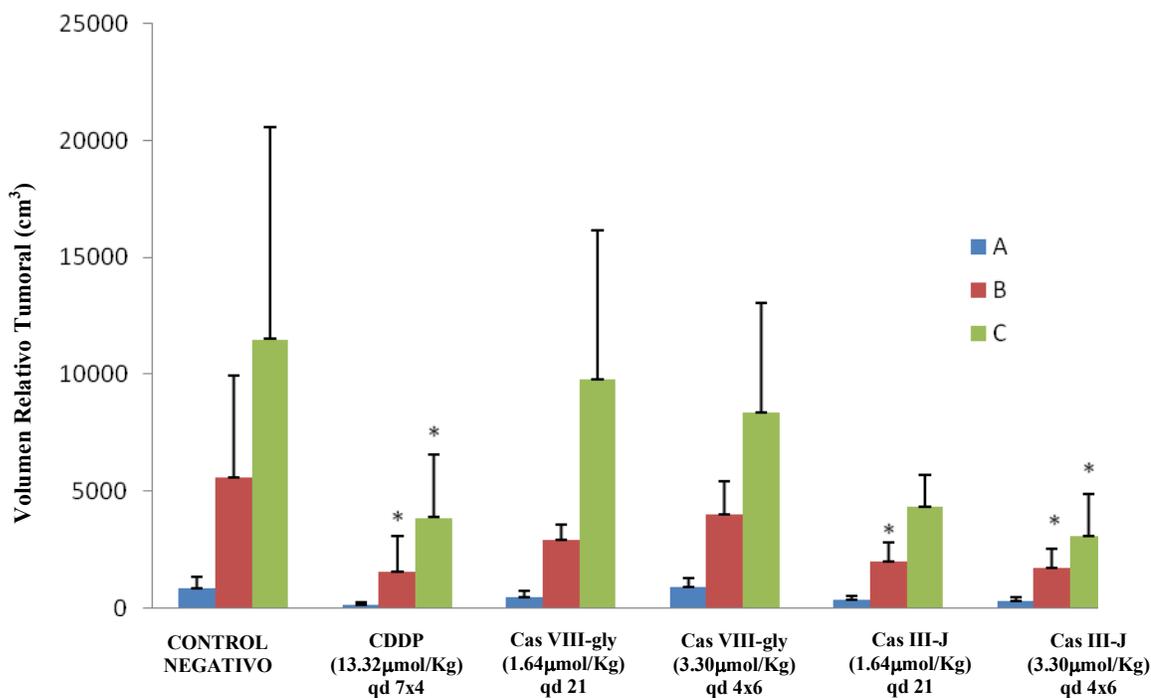


Figura 1 Volumen Relativo Tumoral

El volumen relativo tumoral de cada tratamiento fue determinado a los días 7 (A), 14 (B) y 21 (C)

En la gráfica B, la cual muestra el VRT al día 14 de evaluación, se observa que el tratamiento con CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4) mantiene un VRT significativamente menor ($\alpha=0.05$) al control negativo; así mismo el grupo Cas III-J (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6) presenta también un VRT significativamente menor al control negativo ($\alpha=0.05$) (Anexo E). Estas diferencias sugieren que la Cas III-J (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6) da indicios de tener actividad como agente antitumoral; sin embargo, el tiempo que tarda en comenzar a mostrar este efecto es mayor que con CDDP. Por el contrario, Cas VIII-gly (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6) nuevamente no muestra diferencia con respecto al control negativo. Este resultado sugiere que esta última Casiopeína® no muestra actividad antitumoral al día 14 de evaluación al esquema y dosis empleadas (Anexo A).

Finalmente, la gráfica C que representa los VRT obtenidos al día 21 de experimentación muestra que el grupo de CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4) mantiene su actividad como agente antitumoral ($\alpha=0.05$); y se observa que los grupos Cas



III-J (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 21) y (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6) presentan también VRT menores al control negativo; no obstante, la diferencia es solo estadísticamente significativa ($\alpha=0.05$) para el esquema de dosificación 3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6 (Anexo F).

El compuesto Cas VIII-gly (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 21 y 3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6) no mostró diferencia significativa ($\alpha=0.05$) al comparar contra el control negativo en ninguno de los días de corte para la evaluación.

Los VRT obtenidos a lo largo del experimento por Cas III-J (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6) y CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4) sugieren que ambos compuestos mostraron actividad antitumoral; así mismo, no existe diferencia significativa entre estos dos grupos, aspecto que sugiere que la magnitud de la actividad antitumoral que presentan ambos compuestos es similar en estos esquemas de tratamiento ($\alpha=0.05$) (Anexo F).

En la figura 17 se muestran las diferencias visuales entre los distintos grupos evaluados tomadas al día 21 de experimentación.

La figura 18 permite comparar visualmente al grupo Cas III-J a ambas dosis y esquemas de administración frente a CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4) y el control negativo al día 21 de la evaluación.

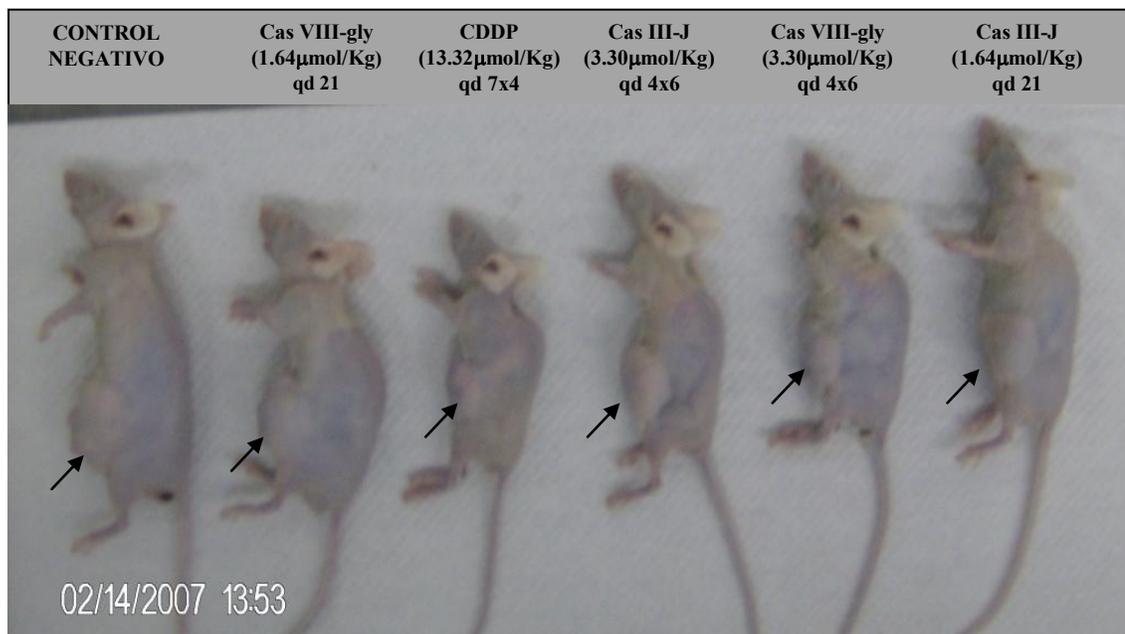


Figura 2 Diferencias visuales de los grupos evaluados

No se observan diferencias entre los grupos control negativo, Cas VIII-gly (1.64 μ mol/Kg qd 21) y Cas VIII-gly (3.30 μ mol/Kg qd 4x6). El grupo CDDP (13.32 μ mol/Kg qd 7x4) presenta diferencias visuales con respecto al control negativo además de presentar una pérdida de peso apreciable. El grupo Cas III-J (1.64 μ mol/Kg qd 21) muestra diferencia en volumen tumoral con respecto al control negativo aunque los resultados no son comparables a los obtenidos por CDDP (13.32 μ mol/Kg qd 7x4). El grupo Cas III-J (3.30 μ mol/Kg qd 4x6) muestra diferencia en volumen tumoral al observado en el control negativo, el volumen tumoral no es comparable al alcanzado por CDDP (13.32 μ mol/Kg qd 7x4) pero se puede apreciar que la pérdida de peso del ratón es menor a la observada en el tratamiento con CDDP (13.32 μ mol/Kg qd 7x4)

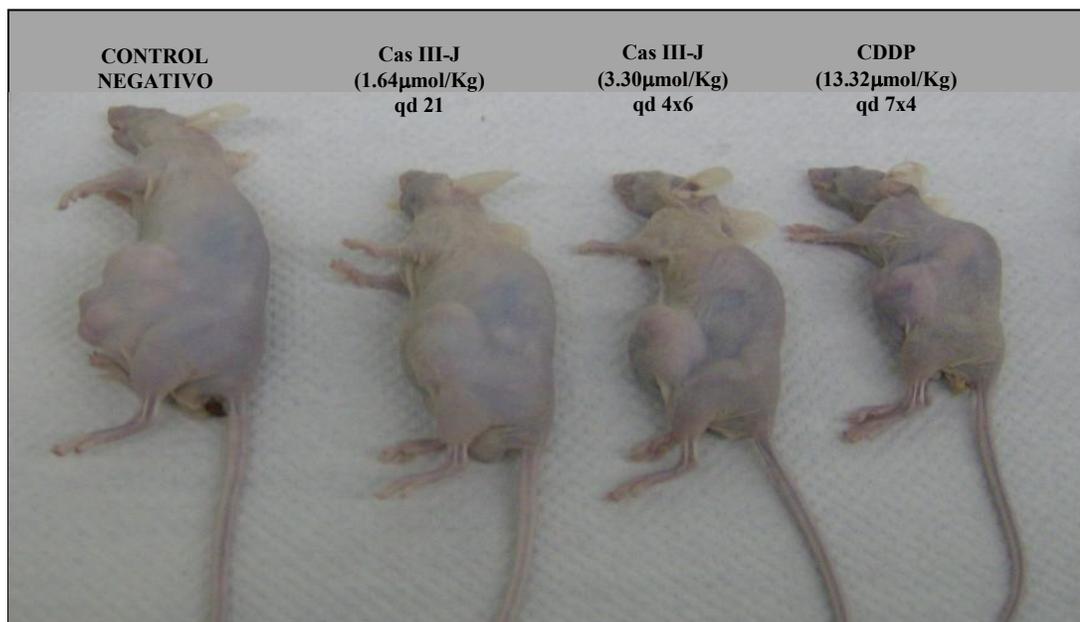


Figura 3 Diferencias visuales de los grupos Cas III-J

El control negativo presenta el volumen tumoral más alto de los cuatro grupos. El grupo CDDP muestra el menor volumen tumoral aunque también es apreciable una pérdida de peso corporal significativa ($\alpha=0.05$); este factor está relacionado con la toxicidad del compuesto. Los individuos administrados con Cas III-J presentan un volumen tumoral menor al de control negativo siendo más apreciable la diferencia en el grupo Cas III-J (3.30 μ mol/Kg qd 4x6); sin embargo, la pérdida de peso observada con la administración de Cas III-J no es significativa ($\alpha=0.05$).

Facultad de Química, UNAM



En la figura 19 se presentan las diferencias visuales entre ambas Casiopeínas® al día 21 de evaluación cuando fueron tratados bajo un esquema de administración intermitente.

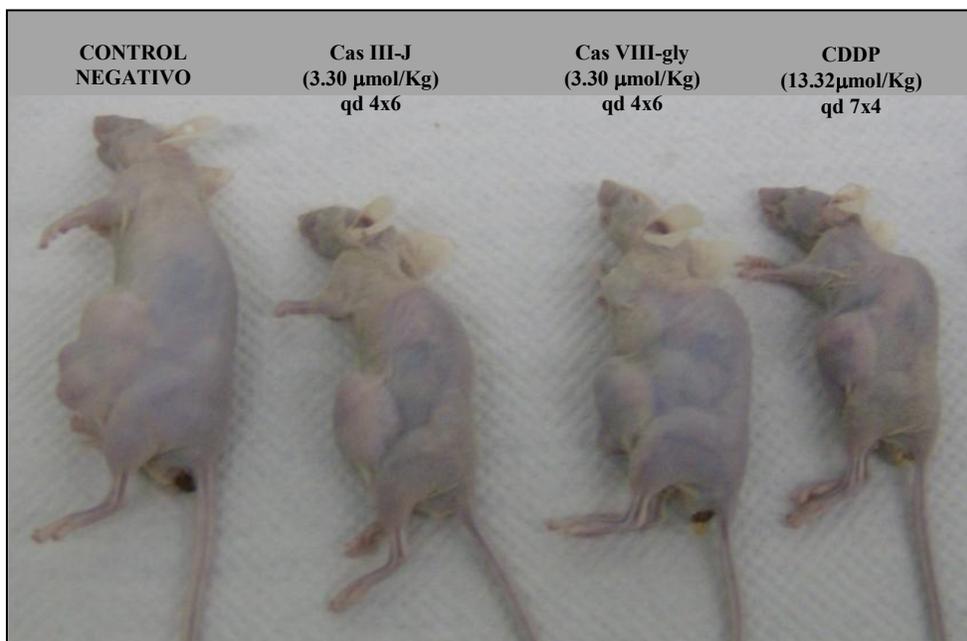


Figura 4 Diferencias visuales de los grupos evaluados bajo un esquema intermitente.

El grupo CDDP (13.32 μmol/Kg qd 7x4) muestra el menor volumen tumoral y la mayor pérdida de peso corporal. El grupo Cas III-J (3.30 μmol/Kg qd 7x4) muestra menor volumen tumoral que el control negativo y la pérdida de peso no es significativa ($\alpha=0.05$). La Cas VIII-gly (3.30 μmol/Kg qd 4x6) no muestra diferencias estadísticamente significativas frente al control negativo y, tampoco se observa una pérdida de peso importante, lo cual indica la baja actividad y toxicidad que el compuesto presenta en este esquema de tratamiento.

4.2.2. Días en Doblar Volumen Tumoral

En la tabla 4 se reportan los valores del tiempo evaluado en días que tarda cada grupo en duplicar su volumen tumoral, solamente el CDDP muestra un retraso considerable con respecto a control. Debido a que el tiempo de duplicación del volumen tumoral es un evento temprano en el desarrollo de este experimento, y que el efecto antitumoral de un fármaco podría no ser inmediato, se decidió hacer un análisis completo del tiempo en el cual los tumores incrementan su volumen con la finalidad de poder determinar el momento en el cual se hace evidente la actividad antitumoral del compuesto. Para ello se tabuló el tiempo necesario en días para cuadruplicar, sextuplicar y octuplicar el volumen tumoral (Tabla 4).

El tiempo en el que un tumor incrementa su volumen está relacionado con la



cantidad de células tumorales presentes en el organismo y su velocidad de replicación. La administración de un agente citotóxico reducirá la cantidad de células tumorales capaces de replicarse, por lo que la cantidad de células tumorales hijas será menor con respecto a un control negativo, y por lo tanto, el tiempo en el que un tumor incrementa su volumen será mayor.

TIEMPO EN INCREMENTAR VOLUMEN TUMORAL				
GRUPO	DÍAS EN DUPLICAR VT	DÍAS EN CUADRUPLICAR VT	DÍAS EN SEXTUPLICAR VT	DÍAS EN OCTUPLICAR VT
CONTROL NEGATIVO	3.14 ± 1.17	5.90 ± 1.68	7.52 ± 2.02	8.67 ± 2.27
CDDP (13.32 μmol/Kg qd 7x4)	8.71 ± 3.16	12.55 ± 3.86	14.79 ± 4.33	16.39 ± 4.68
CAS VIII-GLY (1.64 μmol/Kg qd 21)	3.29 ± 1.01	5.87 ± 1.20	7.38 ± 1.32	8.45 ± 1.24
CAS VIII-GLY (3.30 μmol/Kg qd 4x6)	3.35 ± 0.61	5.93 ± 0.90	7.44 ± 1.10	8.52 ± 1.24
CAS III-J (1.64 μmol/Kg qd 21)	4.80 ± 1.56	7.74 ± 2.10	9.46 ± 2.43	10.68 ± 2.66
CAS III-J (3.30 μmol/Kg qd 4x6)	5.59 ± 1.25	8.88 ± 1.95	10.80 ± 2.46	12.17 ± 2.84

Tabla 1 Tiempo en incrementar el volumen tumoral

Se encuentran reportados los días que los distintos grupos evaluados duplican, cuadruplican, sextuplican y octuplican su volumen tumoral con respecto al día 0 (inicio del tratamiento). VT: Volumen tumoral

En la figura 20 es posible apreciar que los valores de tiempo para incrementar el volumen tumoral del control negativo y Cas VIII- gly, a las dos dosis y bajo ambos esquemas de administración, se encuentran superpuestos. Esta tendencia indica que Cas VIII-gly no presenta actividad antitumoral en ninguno de los esquemas de dosificación empleados.

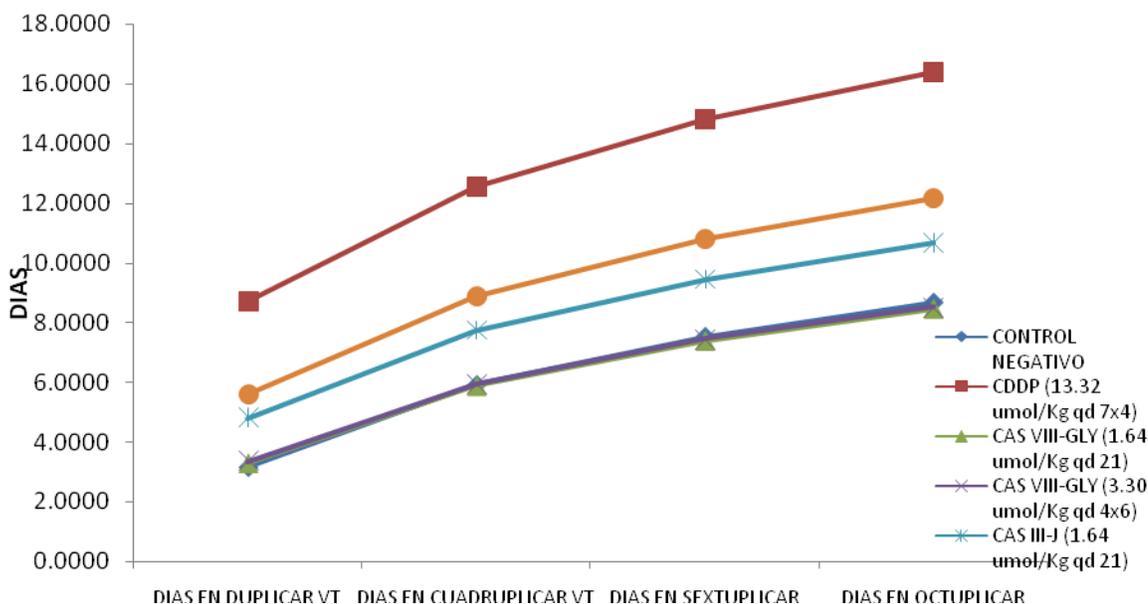


Figura 5 Gráfica de los días en incrementar el volumen tumoral

CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4) se presenta como el tratamiento que tarda más tiempo en incrementar el volumen tumoral lo que confirma su actividad. La Cas III-J (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 21 y 3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6) también presentan diferencias con respecto a la curva del control negativo lo que sugiere que poseen actividad como agentes antitumorales.

El grupo CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4) muestra un aumento en el tiempo que tarda el volumen tumoral en incrementar con respecto al control negativo desde el inicio del experimento, lo que contribuye a corroborar su actividad como agente antitumoral. Por otra parte en los grupos administrados con Cas III-J 1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 21 y 3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ (qd 4x6) este aumento es ligero al inicio del experimento y se comienza a hacer más evidente con el paso del tiempo, siendo el esquema 3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6 el más efectivo para retrasar el crecimiento tumoral. Esto podría sugerir que Cas III-J presenta actividad antitumoral frente a HCT—15 pero su mecanismo de acción es distinto al del CDDP y la magnitud del efecto es dosis dependiente.



4.2.3. Función Antitumoral

La tabla 5 muestra los valores de función antitumoral obtenidos a los días 7, 14 y 21 de evaluación. El índice de función antitumoral determina la capacidad de un compuesto para reducir el volumen tumoral con respecto al volumen tumoral alcanzado por el control negativo al día de evaluación. El protocolo de evaluación establece que para que un compuesto sea considerado potencial agente antitumoral su índice de función antitumoral debe ser inferior a 42.

COMPUESTO	FUNCIÓN ANTITUMORAL		
	DÍA 7	DÍA 14	DÍA 21
CONTROL NEGATIVO	100	100	100
CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 7x4	20.5	28.3	33.7
Cas VIII-gly (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 21	57.2	52.3	85.0
Cas VIII-gly (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 4x6	106.0	71.6	72.9
Cas III - J (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 21	42.9	35.7	37.6
Cas III - J (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 4x6	37.8	30.7	26.8

Tabla 2 Índices de Función Antitumoral
Los índices fueron calculados al día 7, 14 y 21 de tratamiento

El grupo CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4) presenta valores de función antitumoral que comprueban su actividad como agente antitumoral; de acuerdo a los resultados reportados, el grupo tratado con CDDP alcanza un índice de 20.5 desde el día 7 de evaluación.

El grupo Cas VIII-gly evaluado a las dosis 1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 21 y 3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6 presentaron valores de función antitumoral superiores a 42 desde el día 7 y hasta el 21, esto indica que el compuesto no posee actividad antitumoral en la línea HCT-15 a las dosis y esquemas de administración evaluados.



La Cas III-J mostró resultados favorables en la evaluación de la función antitumoral, al evaluarse a una dosis de $3.30 \mu\text{mol/Kg}$ empleando el esquema intermitente (qd 4x6) se observó a partir del día 7 que la función antitumoral es menor a 42 (37.8), este valor indica que la Cas III-J se muestra activa frente a la línea tumoral HCT-15. Los índices de función antitumoral obtenidos tanto al día 14 como al día 21 también son menores a 42, presentando al final del experimento un índice de función antitumoral de 26.8. Estos resultados confirman la actividad antitumoral de la Casiopeína III-J en la línea tumoral HCT-15 empleando un esquema de administración intermitente. Considero importante resaltar que Cas III-J fue administrada a una dosis molar cuatro veces menor que CDDP y presenta un valor de función antitumoral favorable para ser considerado agente antitumoral. Esto no indica que sea más activo que CDDP debido a que para realizar dicha comparación es necesario evaluar ambos compuestos bajo las mismas condiciones de dosis y esquema de administración; sin embargo, estos resultados con respecto a la actividad antitumoral de este compuesto, del cual posiblemente se requiera de una dosis mucho menor que de CDDP para alcanzar el mismo efecto.

Este mismo compuesto, Cas III-J, evaluada a una dosis de $1.64 \mu\text{mol/Kg}$ bajo un esquema crónico de administración (qd 21) obtiene un índice de función antitumoral de 42.9 al día 7 de evaluación, justo por encima del límite de acuerdo con los protocolos de evaluación. La aplicación estricta del protocolo hace concluir que Cas III-J ($1.64 \mu\text{mol/Kg}$ qd 21) no posee actividad antitumoral; sin embargo conforme avanza el experimento los valores de función antitumoral al día 14 y 21 mejoran y se concluye que Cas III-J ($1.64 \mu\text{mol/Kg}$ qd 21) posee actividad antitumoral en la línea HCT-15 con valores de función antitumoral de 35.7 y 37.6.

De esta forma, se comprueba que la Cas III-J en ambos esquemas de tratamiento tiene actividad antitumoral en la línea HCT-15, obteniendo mejores resultados con el empleo de un esquema de tratamiento intermitente.



En el modelo de relación estructura actividad publicado por Bravo y cols. (2008), predice un ligero incremento de actividad citotóxica sobre la línea tumoral HCT-15 para aquellos compuestos que tienen como segundo ligante acetilacetato en vez de glicinato; lo cual coincide con los resultados obtenidos en este trabajo para el índice de función antitumoral de Cas III-J en comparación con Cas VIII-gly, cuya diferencia estructural es el cambio del ligante secundario acetilacetato por glicinato.

4.2.4. Retraso Específico de Crecimiento (REC)

Los valores de REC calculados a partir de los días en incrementar volumen tumoral en cada grupo son presentados en la Tabla 6

De acuerdo al protocolo de evaluación el índice de retraso específico de crecimiento debe cumplir con un valor mínimo de 2 para probar que el compuesto posee potencial como antitumoral. Este valor indica que un compuesto es capaz de demorar por lo menos tres veces más que el control negativo el volumen tumoral (duplicar, cuadruplicar, sextuplicar u octuplicar).

En la tabla 6 se observa que ningún tratamiento cumple con el índice de retraso específico de crecimiento lo que podría indicar que no poseen actividad como antitumoral incluyendo el grupo tratado con CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4). Este grupo es el que presentó el índice REC más alto con un valor de 1.7693, lo que significa que incrementó 2.77 veces el tiempo en que duplica su volumen tumoral; sin embargo, aunque es un agente antitumoral con actividad comprobada, no alcanzó el índice requerido por los protocolos para ser considerado potencial agente antitumoral. Este resultado genera dudas acerca de la utilidad del índice REC para evaluar adecuadamente la actividad antitumoral, ya que con frecuencia, el grupo de trabajo obtiene valores REC por debajo del límite de 2 establecido por el protocolo (datos sin publicar). A pesar de que el valor obtenido para CDDP es siempre cercano a 2, la aplicación estricta del protocolo implicaría no continuar el



desarrollo de un agente tan reconocido como el CDDP. Es por esta razón que se considera que la función antitumoral es un criterio más adecuado para la toma de decisiones con respecto a un agente con potencial antitumoral.

Por otra parte los grupos de animales administrados con Cas VIII-gly (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 21 y 3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6) presentaron índices de REC similares al control negativo, que en suma con los resultados de FA indican nuevamente que la Casiopeína® VIII-gly no posee actividad antitumoral en la línea HCT-15 en estos esquemas de tratamiento.

El grupo Cas III-J (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6) mostró un índice de retraso específico de crecimiento de 0.78, este valor indica que la Casiopeína® logró incrementar 1.78 veces el tiempo en duplicar su volumen tumoral con respecto al control negativo; mientras que en un esquema de tratamiento 1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 21 se obtuvo un índice REC 0.53, es decir, este grupo incrementó su tiempo de duplicación tumoral 1.53 veces con respecto al control negativo. En ninguno de los dos esquemas de tratamiento se alcanzó el REC requerido para considerar a Cas III-J como potencial agente antitumoral según lo establecido por el protocolo de cernimiento; sin embargo, debido a los resultados inconsistentes de REC para el CDDP considero que la Cas III-J posee actividad como agente antitumoral de acuerdo al criterio de función antitumoral.



GRUPO	REC (D2)	REC (D4)	REC (D6)	REC (D8)
CONTROL NEGATIVO	0	0	0	0
CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg qd } 7 \times 4$)	1.7693	1.1243	0.9665	0.8903
Cas VIII-gly (1.64 $\mu\text{mol/Kg qd } 21$)	0.0466	-0.0059	-0.0187	-0.0249
Cas VIII-gly (3.30 $\mu\text{mol/Kg qd } 4 \times 6$)	0.0662	0.0049	-0.0101	-0.0174
Cas III-J (1.64 $\mu\text{mol/Kg qd } 21$)	0.5274	0.3105	0.2575	0.2319
Cas III-J (3.30 $\mu\text{mol/Kg qd } 4 \times 6$)	0.7799	0.5038	0.4363	0.4037

Tabla 3 Índices de Retraso Específico de Crecimiento

Se decidió realizar un análisis del tiempo que los grupos demoran en cuadruplicar, sextuplicar y octuplicar su volumen tumoral con la finalidad de evaluar si existen diferencias en los índices obtenidos. Es importante señalar que aunque el volumen que se está estudiando es mayor, se mantiene el requisito de un valor mínimo de 2 para considerar que un compuesto posee actividad antitumoral debido a que se guarda la misma relación entre los tratamientos.

En la tabla 6 es posible apreciar que los índices de REC van decreciendo conforme el volumen tumoral en estudio se incrementa, esta tendencia indica que conforme avanza el experimento los compuestos van disminuyendo el tiempo en que incrementan su volumen tumoral y se observa que los tratamientos llegan a presentar índices de REC iguales o menores al control negativo.

Dicho comportamiento podría deberse a que conforme avanza el experimento, el número de células tumorales capaces de replicarse se incrementa y el compuesto mantiene su actividad antitumoral a lo largo de la evaluación; por lo tanto, si el agente antitumoral no tuvo la capacidad de actuar sobre una cantidad significativa de células tumorales al inicio del tratamiento (aspecto que se vería reflejado en los



días en duplicar su volumen tumoral) no podrá limitar el crecimiento tumoral posteriormente. Una vez realizado el análisis de los valores de REC considero que este índice es un criterio muy estricto, el cual no determina con confiabilidad la capacidad antitumoral de un compuesto frente a una determinada línea debido a que únicamente explica el efecto inmediato de un agente antitumoral y existe la posibilidad de que los compuestos manifiesten el efecto posteriormente. Tal es el caso del CDDP, del cual se sabe es un conocido agente antitumoral; sin embargo, no alcanza el límite establecido por el protocolo de evaluación.

4.2.5. Incremento de Peso

A continuación se presentan los valores de incremento de peso corporal para cada grupo evaluado a los días 5, 15 y 21. (Figura 21)

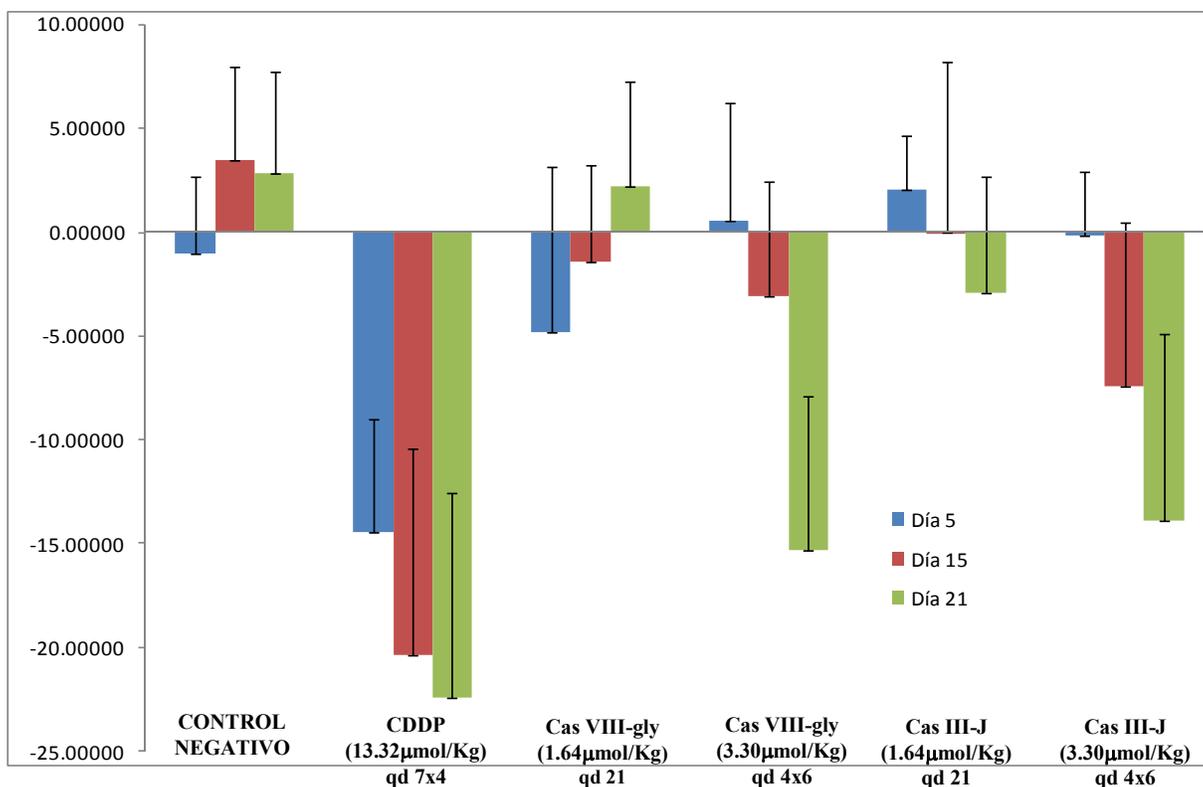


Figura 6 Histograma de incremento de peso.
Se determinó el porcentaje de incremento de peso al día 5, 15 y 21



A nivel clínico se maneja que si un individuo pierde más del 5% de su peso corporal en los primeros 5 días de administración de un compuesto antitumoral, se considera que el compuesto es tóxico; por lo que se emplearon los datos de peso registrados a los días 5, 15 y 21 para realizar un estimado de la toxicidad que presentan los compuestos.

El anexo G permite observar que a pesar de que el control negativo mostró una pérdida de peso los primeros 5 días de evaluación al día 21 del experimento se observa una ganancia de peso de aproximadamente 3%.

El grupo CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4) presentó una pérdida significativa ($\alpha=0.05$) de peso corporal, el día 5 de evaluación los individuos habían perdido el 14.0 % de su peso y para el día 21 el 22% lo que indica una alta toxicidad del compuesto (Figura 21). Realizando un análisis comparativo con los resultados publicados por Carvallo (40) se observa que en el presente trabajo la pérdida de peso es mayor, sin embargo, en ambos análisis se llega a la conclusión de que CDDP se muestra como un agente altamente tóxico.

La Cas VIII-gly (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 21) presenta un decremento en el peso corporal de aproximadamente el 5% al día 5 de evaluación; y conforme el experimento se fue desarrollando se comienza a observar una ganancia de peso hasta alcanzar el 5% al día 21 de evaluación, comportamiento que es muy similar al control negativo. Esto indica que la toxicidad de la Cas VIII-gly a una dosis de 1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ empelando un esquema de administración crónico es mínimo, aunque también hay que considerar que su actividad como agente antitumoral es nula en estas condiciones.

La Cas VIII-gly (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6) mostró una ganancia de peso que no es significativa ($\alpha=0.05$) a los 5 días de iniciado el experimento, y al día 21 de administración, los individuos perdieron el 15% del peso corporal. En la figura 22 es posible apreciar la disminución del peso al compararlo con el control negativo;



sin embargo, también se puede apreciar que ningún tratamiento se acerca al nivel de pérdida de peso presentada por CDDP ($13.32 \mu\text{mol/Kg}$).

La Cas III-J ($1.64 \mu\text{mol/Kg}$ y $3.30 \mu\text{mol/Kg}$) mostró una ganancia de peso inicial no significativa ($\alpha=0.05$) al día 5 en ambos esquemas de administración; mientras que, al día 21 de experimentación se registró una pérdida del 3% y el 13% para los esquemas $1.64 \mu\text{mol/Kg}$ qd 21 y $3.30 \mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6 respectivamente. Estos resultados indican que el tratamiento crónico con este compuesto es menos tóxico, aunque es necesario considerar que la actividad antitumoral es también menor cuando se manejan estas condiciones.

La pérdida de peso mostrada empleando Cas III-J a $3.30 \mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6 no alcanza un nivel de toxicidad alto y mantiene una buena actividad antitumoral, por lo que se considera una propuesta interesante. La figura 22 muestra los ratones a los que se les administró Cas III-J y es posible apreciar que la pérdida de peso reportada para el esquema $3.30 \mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6 es considerable aunque no se equipara a la observada en CDDP ($13.32 \mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4).

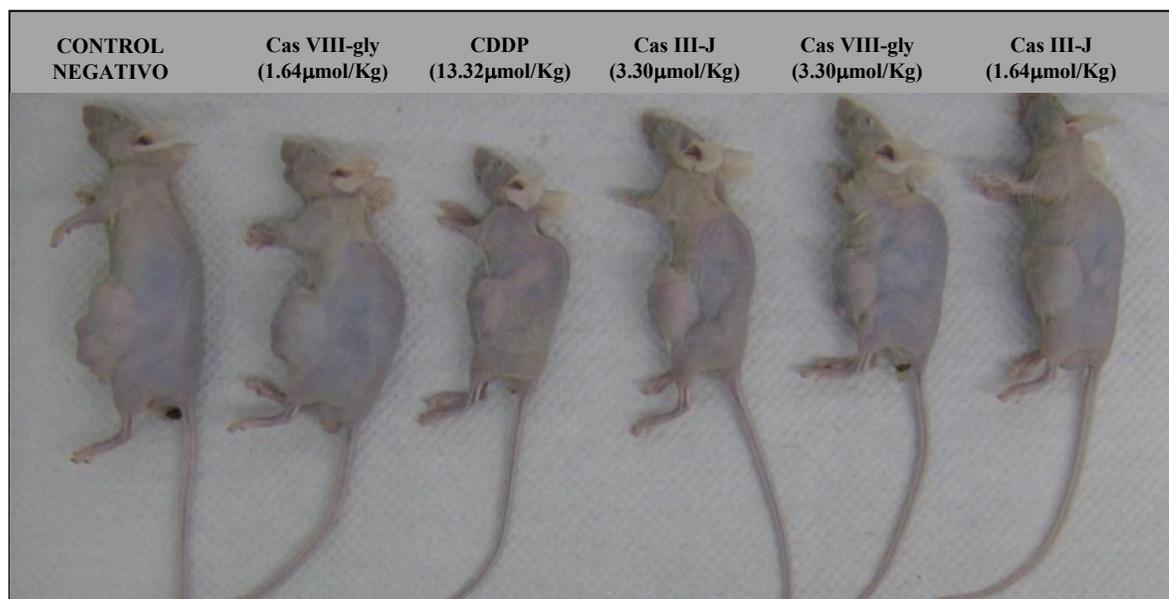


Figura 7 Diferencia visual del incremento de peso

Imagen que muestra la ganancia de peso corporal de los ratones al día 21 de la evaluación. El grupo CDDP muestra el mayor decremento en el peso corporal, seguido por Cas VIII-gly ($3.30 \mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6) y por Cas III-J $3.30 \mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6).



CAPÍTULO 5

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se llevó a cabo la evaluación de la actividad antitumoral de los compuestos Casiopeína® VIII-gly ([Cu (3,4,7,8- tetrametil-1,10 fenantrolina) (glicinato)]NO₃) y Casiopeína® III-J ([Cu(3,4,7,8-tetrametil-1,10-fenantrolina)(acetilacetionato)]NO₃) empleando el modelo de xenotrasplante tumoral (Ratón Desnudo *nu/nu*).

El compuesto CDDP, evaluado a una dosis de 13.32 mmol/Kg qd 7x4, obtuvo valores de FA que cumplen cómodamente con el requisito establecido en los protocolos de evaluación; sin embargo, no obtuvo el REC requerido para ser considerado agente antitumoral a pesar de ser el medicamento de elección a nivel clínico para el tratamiento de Carcinoma de Colon. Esta contradicción, en conjunto con los resultados obtenidos en otros estudios realizados por el grupo de trabajo (datos no publicados), en donde se observa el mismo comportamiento, cuestionan la utilidad del empleo de REC para evaluar la actividad antitumoral de un compuesto. Por otra parte, la pérdida de peso corporal obtenida por CDDP fue significativamente mayor que la observada en el control negativo lo que indica que es un compuesto altamente tóxico.

Con respecto a la Casiopeína® III-J, ésta presentó actividad antitumoral a las dosis de 1.64 μmol/Kg qd 21 y 3.30 μmol/Kg qd 4x6 frente a la línea tumoral HCT-15; cumpliendo con los valores de función antitumoral requeridos por los protocolos de evaluación. A pesar de que la Cas III-J no obtuvo el valor REC necesario para ser considerado un agente con potencial antitumoral según lo establecido por los protocolos de evaluación; se considera que este índice no es completamente confiable para determinar la actividad antitumoral de un compuesto debido a que está limitado a un efecto inmediato sobre las células tumorales y es un valor muy estricto. Por otra parte, se observó que la pérdida de peso corporal debida a la administración del compuesto no es significativa con



respecto al control negativo, pero si existe diferencia significativa con respecto a la pérdida observada en el grupo tratado con CDDP 13.32 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 7x4. Debido a lo anterior se concluye que aunque la Cas III-J es un compuesto tóxico, el nivel de toxicidad que genera CDDP es significativamente mayor.

La Casiopeína® VIII-gly no mostró tener actividad antitumoral bajo ninguno de los esquemas evaluados (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 21 y 3.30 $\mu\text{mol/Kg}$ qd 4x6). Los valores de función antitumoral obtenidos sugieren que la evaluación del compuesto a una dosis y esquema distintos podría mejorar la actividad antitumoral del compuesto. Adicionalmente se sugiere que la Cas VIII-gly sea evaluada en líneas tumorales de distinta estirpe con la posibilidad de que el compuesto muestre actividad antitumoral en otra línea tumoral más sensible a su efecto.

Se encontró que al evaluar las Casiopeínas® con un esquema de administración intermitente se obtuvieron mejores resultados de actividad antitumoral que al emplear un esquema de administración crónico. Razón por la cual, se sugiere para evaluaciones posteriores, el empleo de un esquema de administración intermitente (qd 4x6).

Con los resultados presentados en este trabajo podemos concluir que la Casiopeína® VIII-gly, que mostró ser la Casiopeína® más tóxica, no mostró actividad antitumoral frente a la línea HCT-15 (Carcinoma de Colon) bajo ninguno de los esquemas de administración crónico o intermitente. Por el contrario la Casiopeína® III-J presentó actividad antitumoral frente a la línea HCT-15, mostrando mejores resultados con el empleo de un esquema intermitente.

De esta manera podemos concluir que la Cas III-J es más activa que Cas VIII-gly tanto en un esquema de administración crónico como intermitente. Estos resultados coinciden con los trabajos publicados previamente. (28) Así Casiopeína III-J se presenta como una opción viable en el tratamiento del Carcinoma de Colon al presentar un nivel bajo de toxicidad comparada con el compuesto empleado



actualmente y buena actividad antitumoral la cual es dosis dependiente.

El índice de Retraso Específico de Crecimiento constituye uno de los valores establecidos por los protocolos de cernimiento necesario para determinar la potencial actividad antitumoral de los compuestos evaluados; sin embargo, al realizar un análisis de la información que este índice proporciona podemos apreciar que la finalidad de determinar el valor de REC es evaluar la actividad antitumoral que los compuestos presentan en los primeros días de la evaluación. Por lo tanto se sugiere que el índice REC sea empleado como un estimador de la actividad antitumoral de los compuestos a corto plazo y no como un requisito de los mismos para ser considerados potenciales agentes antitumorales.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **King, J.B.R.** Cancer Biology. Singapore : Pearson Prentice Hall, 2000. Vol. 2a. Ed.
2. **American Cancer Society.** Cancer Facts & Figures 2008. Atlanta, E.U.A. : s.n., 2008.
3. **Malignas, Registro Hospitalario de Neoplasias.** La situación epidemiológica del cáncer en México. *Secretaría de Salud.* México, D.F. : Dirección General de Epidemiología, 2002. Vol. 1a. Ed.
4. **Rizo Ríos, P.,** Registro Hospitalario de Cancer. Compendio de Cáncer 2000-2004. México : Cancerología, 2007. Vol. 2.
5. **Ávila Cahuana L., et al.,.** Cuentas nacionales en salud reproductiva y equidad de género. México, D.F. : Secretarías de Salud, 2005.
6. **Consultants International Cancer,** Tratamientos del cáncer. USA : s.n., 2007.
7. **National Cancer Institute.** Lo que usted necesita saber de cáncer. *www.cancer.gov.* USA : Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE UU, 2007.
8. **Abbas A.K., Lichtman, AH.,** Inmunología celular y molecular. Madrid, España : Editorial Elsevier, 2004. Vol. 5a. Edición.
9. **Vera, L., et al.,.** Cancer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular nao específicos que interagem com a ADN: uma introducao. Brasil : Quim Nova, 2005. Vol. 28, 1.
10. **Lissauer.** Berliner klinische Wochenschrift. 1865.
11. **Ficker, SC.** Metal compounds in cancer therapy. USA : Chapman & Hall, 1996. Vol. Cap. 1 y 2.
12. **Fresquet, J.I.,.** Historia de la quimioterapia. Valencia, España : Instituto de Historia de la Ciencia y Documentación, 2004.
13. **Ruili, H.,.** Anticancer metal compounds in NCI's tumor-screening database: Putative mode of action. USA : Biochemical pharmacology, 2005. Vol. 69.
14. **Keppler, B.K., et al.,.** Metal complexes in cancer chemotherapy. Weinheim : VCH, 1993. Vol. 13.



15. **Hughes, M.N.,** The inorganic chemistry of biological processes. USA : John Wiley & sons, 1981.
16. **Rosenberg, B.,** s.l. : Nature, 1969. Vol. 222.
17. **Casas, S.,** Química Bioinorgánica. España : Editorial Síntesis, 2001.
18. **Raff, M.C.** Social controls on cell survival and cell death. *Nature*. USA : s.n., 1992. Vol. 356, p. 397 - 400.
19. **Steller, H.** Mechanisms and genes of cell suicide. *Science*. USA : s.n., 1995. Vol. 267, p. 1445 - 1449.
20. **Kenneth, T., et al.,** Bioinorganic Chemistry of Copper. USA : Chapman & Hall, Inc., 1993.
21. **IUPAC** Compendium of chemical terminology,. USA : s.n., 1997. Vol. 69, 1274.
22. **Ruiz-Azuara, L.** Título de Marca: Casiopeína Reg. 407543 Registro No. 18801-120579 y No. 18802-120580. *Dirección general de invenciones, marcas y desarrollo tecnológico (SECOFI)*. 1992, 2002.
23. **Ruiz-Azuara, L.,** Preparation of new mixed copper aminoacidate complexes from phenylate phenanthrolines to be used as "anticancerigenic" agents. USA : s.n., 1992.
24. **Ruiz-Azuara, L.** Process to obtain new mixed copper aminoacidate complexes from phenylatephenanthroline to be used as anticancerigenic agents. s.l. : United States Patent, 1992.
25. **Ruiz-Azuara, L.** Copper amino acidate diimine nitrate compounds and their methyl derivatives and a process for preparing them. s.l. : United States Patent, 1996.
26. **Gaetke, L., et al.,** Copper toxicity, oxidative stress and antioxidant nutrients. 2003. Vol. 189.
27. **Tamotsu, S., et al.,** Structural dependence of aromatic ring stracking and related weak interactions in ternary amino acid-copper (II) complexes and its biological implication. USA : Inorg. Chem., 1997. Vol. 36.
28. **Bravo Gómez, M.E., et al.,** QSAR study of copper (II) mixed chelates [Cu(N-N)(acetylacetonate)]NO₃ and [Cu(N-N)(glycinate)]NO₃ (Casiopeínas) employing as biologic response their antiproliferative



- activity on different human tumor lines. México : UNAM, 2008.
29. **Alemón Medina, R., et al.,**. Induction of oxidative damage by copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas). México : Cancer Chemother Pharmacol, 2007. Vol. 60, 2. p. 219-28.
30. **Sanchez, BF, Gracia, MF, Roldan, RE, Ruiz, AL.** Determinación de la capacidad genotóxica, citotóxica y citostática de las Casiopeínas I-gly, II-gly y III-ia en linfocitos humanos en cultivo, medula ósea y linfocitos de sangre periférica de ratón. Querétaro, Qro. : 2o. Congreso Nacional de Química Médica, 2006.
31. **Cermeño-García, J.R., Rodríguez-Mercado, JJ y Altamirano-Lozano, MA.** Estudio del efecto genotóxico inducido in vivo por la Casiopeína II-gly y por la Casiopeína III. Querétaro, México : 2o. Congreso Nacional de Química Médica, 2006.
32. **Barrón Sosa, L., et al.,**. Influencia del metabolismo en la actividad antiproliferativa y apoptótica del quelato mixto de cobre Casiopeína III-ia en tres líneas tumorales y en linfocitos humanos. Querétaro, México : 2o. Congreso Nacional de Química Médica, 2006.
33. **Gracia-Mora, I, Ruiz-Ramírez, L, Tinoco-Méndez, M, Márquez-Quñones, A, Romero-De Lira, M, Marín-Hernández, A, Macías-Rosales, M, Bravo-Gómez, ME.** Knight's move in the periodic table, from copper to platinum, novel antitumor mixed chelate copper compounds, Casiopeinas, evaluated by an in vitro human and murine cancer cell line panel. *Met. Based Drug.* 2001. Vol. 8, p. 19-28.
34. **Trejo-Solís, C, Palencia G, Zuñiga S, Rodríguez-Rodón A, Osorio-Rico, L, Sánchez-Torres L, Gracia-Mora, I, Márquez-Rosado, L, Sánchez-Moreno J.** Cas II-gly induces apoptosis in glioma C6 cells in vitro and in vivo through caspase-dependent and caspase-independent mechanisms. México : Neoplasia, 2005. Vol. 7, 6. p. 563-574.
35. **Marín-Hernández, A, Gracia-Mora, I, Ruiz-Ramírez, L, Moreno-Sánchez, R.** Toxic effects of copper-based antineoplastic drugs (Casiopeínas) on mitochondrial functions. México : Biochem. Pharmacol., 2003. Vol. 65, p. 1979-1989.



36. **Alemón-Medina, R., et al.,** Casiopeína II-gly induced cytotoxicity to HeLa cells depletes the levels of reduced glutathione and is prevented by dimethyl sulfoxide. México : Toxicol In Vitro, 2008. Vol. 22, 3. p. 710-5.
37. **Rivero-Müller, A., et al.,** Mixed chelated copper complex, Casiopeína II-gly, binds and degrades nucleic acids: A mechanism of cytotoxicity. México : Chemico-Biol, Int, 2007.
38. **García-Rodríguez, MC, Pérez-Flores G, Santiag-Moreno, Y, Altamirano-Lozano M.** Estudio de los efectos genotóxicos y citotóxicos del cisplatino en ratones adultos y en el desarrollo embrionario y fetal, comparados con las Casiopeínas II-gly y III-ia (Un nuevo grupo de agentes antineoplásicos). Querétaro, México : 2o. Congreso de Química Médica, 2006.
39. **Leal García, M, Sumano López, H, García Ortuño, LE, Gracia Mora, I, Ruiza Azuara L.** Assessment of acute respiratory and cardiovascular toxicity of Casiopeínas in anaesthetized dogs. México : Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology, 2007. Vol. 101.
40. **Carvallo-Chaigneau, F., et al.,** Cas III-ia induce apoptosis in HCT-15 a través de mecanismos dependientes de caspasas in vitro y tiene efectos antiproliferativos in vivo. México : Biometals, 2008. Vol. 21, 1. p.17-28.
41. **Carvallo-Chaigneau, F., et al.,** El Ratón Desnudo (nu/nu) como modelo de evaluación de fármacos antitumorales. México : UNAM, 2001.
42. **Sáenz Chuc, J, Moreno Esparza, R, Bravo Gómez, ME, Ruiz Azuara, L.** Estudios de estabilidad para Casiopeína II-gly y Casiopeína III-ia. Querétaro, México : 2o. Congreso Nacional de Química Médica, 2006.
43. **Secretaría de Salud.** NOM-073-SSA1-1993, Estabilidad de Medicamentos. MÉXICO : s.n., 1993.
44. **Monge, A.** Evolución de los métodos de búsqueda y descubrimiento de fármacos. Introducción a la química farmacéutica. España : Mc Graw Hill, 2001. Vol. 2a. Edición.
45. **Collichio, F, Griggs, J y Rosenblatt, J.** Conceptos básicos sobre el desarrollo de los fármacos y los ensayos clínicos. Enfoque multidisciplinario para médicos y estudiantes. España : Elsevier Science,



2003. Vol. 8a. Edición.
46. **Verderame, M.,** Handbook of chemotherapeutical agents. USA : CRC Press, Inc, 2000. Vol. II.
 47. **Tinoco Méndez, M., et al.,** Modelos de evaluación biológica in vitro e in vivo. Querétaro, México : 2o. Congreso Nacional de Química Médica, 2006.
 48. **National Cancer Institute.** Principal in vivo cancer models 1976-1982 and activity criteria for drug testing. USA : Cancer chemotherapy reports, 1972. Vol. 3, 2.
 49. **Geran, G, MacDonanld y Abbott.** Protocols for in vivo screening systems. USA : National Cancer Institute, 1987.
 50. **Gallagher, R., et al.,** Tumor immunobiology: A practical approach. USA : Oxford University Press, 1993.
 51. **Herzig, M y G, Christofori.** Recent advances in cancer research: mouse models of tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica acta.* 2002. Vol. 1602, p.97-113.
 52. **Houghton, J.A., et al.,** In rodent tumour models in experimental cancer therapy. New York, USA : R.F. Kallman, 1987.
 53. **Kallman, E.G.** Rodent tumor models: The future of cancer therapy. *Vet. Clin. of North Am.* USA : Small An. Prac., 1990. Vol. 20, p. 1055-1073.
 54. **Benavides, F., et al.,** Modelos murinos de enfermedades humanas. Buenos Aires, Argentina : Medicina, 2001. Vol. 61, 2.
 55. **Carbone, C., et al.,** El ratón nude (nu/nu) como modelo animal de inmunodeficiencia. s.l. : Revista Química Viva, 2006. Vol. Año 5, 1.
 56. **Boven, E, Winograd B, Berger D, Dumont D, Braakhois J.** Phase II preclinical drug screening in human tumor xenografts: A first european multicenter collaborative study. *Cancer Research.* 1992. Vol. 52, p. 5940-5947.
 57. **Microcal Origin 6.0.** *Microcal software, Inc.*
 58. **American Type Culture Collection.** Catalogue of cell lines and hybridomas. USA : s.n., 1992. Vol. 7a. Ed.
 59. **Evans, V.J. y Briant, J.C.** Advances in tissue culture at the National



- Cancer Institute. *Tissue Culture*. USA : C.V. Ramakrishnan (The Hague), 1965. p. 145-167.
60. **Wayne, D.** Bioestadística. Base para el análisis de las ciencias de la salud. México, D.F. : Editorial Limusa, 2002. Vol. 4a. Edición.
61. **Kruskal, W.H. y Wallis, W.A.** Use of ranks in one-criterion analysis of variance. *Journal of the american statistical association*. USA : s.n. Vol. 47, p. 583-621.
62. **De Vizcaya, RA, Rivero MA, Ruiz RL, Kass GE, Kelland RM, Dobrota M.** Induction of apoptosis by a novel copper-based anticancer compound, Casiopeina II in L1210 murine leukemia and CH-1 human ovarian carcinoma cells. *Toxicology in vitro*. USA : s.n., 2000. Vol. 14, p. 1-5.
63. **Secretaría de Salud.** NOM-073-SSA1-1990 con fines de registro de un medicamento como fármaco nuevo en México. México : Secretaría de Salud, 1990.



PRUEBAS ESTADISTICAS

Para la evaluación de la función antitumoral se realizó un análisis estadístico denominado Kruskal-Wallis, dicha prueba se emplea cuando las poblaciones de las cuales se extraen las muestras no siguen una distribución normal con varianzas iguales, por lo que esta prueba es considerada un análisis unilateral no paramétrico para probar la relación que existe entre las medias de las poblaciones.

La aplicación de la prueba comprende los siguientes pasos:

1. Las observaciones de cada tratamiento se combinan en una sola serie de tamaño " n " y se clasifican en orden ascendente. Las observaciones, posteriormente, se sustituyen por jerarquías desde 1 (asignada a la observación menor) hasta n (que corresponde a la observación mayor).
2. Las jerarquías asignadas a las observaciones de cada tratamiento se suman por separado.
3. Se calcula la estadística de prueba " H ".
4. Se obtiene el valor de significancia de la prueba consultando las tablas correspondientes.
5. Se aplica la regla de decisión estadística la cual dicta que existirá diferencia entre las medias de los tratamientos si el valor calculado para la prueba es tan grande que la probabilidad de obtener un valor mayor o igual, es menor o igual que el nivel de significación α .



Una vez que se ha comprobado la existencia de diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos se procede a determinar los tratamientos entre los que se presenta dicha diferencia. Esto es posible al realizar el cálculo del intervalo de confianza empleando el coeficiente $\hat{\phi}$.

Se decidió emplear un contraste ortogonal (a) de 0 y 1 para obtener los contrastes de todos los tratamientos.

Empleando la media de las jerarquías obtenidas de la prueba de Kruskal – Wallis para cada tratamiento se calcula el coeficiente $\hat{\phi}$ para cada uno de los contrastes que se desean probar:

$$\hat{\phi} = \bar{R}_1 - \bar{R}_2 \dots\dots\dots(1)$$

Se calcula la varianza que presenta el coeficiente $\hat{\phi}$ al emplear la siguiente ecuación:

$$Var(\hat{\phi}) = \frac{N(N+1)}{12} \sum_{k=1}^K \frac{a_k^2}{n} \dots\dots\dots(2)$$

Donde:

a = contraste correspondiente (0 ó 1)

N = tamaño de la población en estudio.

Con estos datos, se cálculo el intervalo confianza para cada contraste, como sigue:

$$\hat{\phi} \pm \sqrt{\chi_{K-1, 0.95}^2} \sqrt{Var \hat{\phi}} \dots\dots\dots(3)$$



Donde:

$\hat{\phi}$ = coeficiente *phi*

$\sqrt{\chi_{K-1, 0.95}^2}$ = raíz cuadrada del valor de tablas para el número de observaciones y con el nivel de significancia establecido

$\sqrt{Var\hat{\phi}}$ = raíz cuadrada del valor de la varianza calculado

La decisión estadística consiste en que para asegurar que dos grupos son estadísticamente diferentes entre sí, el intervalo de confianza no debe involucrar el cero (0).



ANEXO A

KRUSKAL – WALLIS VRT DIA 7

DATOS SUSTITUÍDOS POR JERARQUIAS					
CONTROL NEGATIVO	CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 7x4	CAS VIII-GLY (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 21	CAS VIII-GLY (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$) qd4X6	CAS III-J (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$) qd21	CAS III-J (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$) qd4X6
37	7	17	33	29	25
16	5	35	38	19	6
34	22	23	31	24	15
40	2	28	32	11	27
21	1	18	20	10	9
36	4	13	39		14
26	8				
30	12				
	3				

R=	240	64	134	193	93	96	
PROM=	30	7.111	22.333	32.166	18.6	16	TOTAL
R ² /n=	7200	455.111	2992.666	6208.166	1729.8	1536	20121.744

PRUEBA ESTADÍSTICA

H= 14.221

DECISIÓN ESTADÍSTICA

<i>g.l.</i>	α	χ^2	CONCLUSIÓN
5	0.005	0.412	HAY DIFERENCIA
	0.025	0.831	HAY DIFERENCIA
	0.05	1.145	HAY DIFERENCIA



ANEXO B

KRUSKAL – WALLIS VRT DIA 14

DATOS SUSTITUIDOS POR JERARQUIAS					
CONTROL NEGATIVO	CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 7x4	CAS VIII-GLY (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 21	CAS VIII-GLY (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$) qd4X6	CAS III-J (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$) qd21	CAS III-J (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$) qd4X6
39	8	22	31	16	14
15	5	25	33	19	9
35	32	27	29	20	23
40	1	28	36	26	17
38	3	24	11	6	2
37	4	13	34		18
10	30				
21	12				
	7				

R=	235	102	139	174	87	83	
PROM=	29.375	11.333	23.166	29	17.4	13.833	TOTAL
R ² /n=	6903.125	1156	3220.166	5046	1513.8	1148.166	18987.258

PRUEBA ESTADÍSTICA

H= 6.31538908

DECISIÓN ESTADÍSTICA

<i>g.l.</i>	PROBABILIDAD	χ^2	CONCLUSIÓN
5	0.005	0.412	HAY DIFERENCIA
	0.025	0.831	HAY DIFERENCIA
	0.05	1.145	HAY DIFERENCIA



ANEXO C

KRUSKAL – WALLIS VRT DIA 21

DATOS SUSTITUIDOS POR JERARQUIAS					
CONTROL NEGATIVO	CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 7x4	CAS VIII-GLY (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 21	CAS VIII-GLY (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$) qd4X6	CAS III-J (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$) qd21	CAS III-J (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$) qd4X6
36	9	19	28	16	13
27	5	22	25	24	7
32	30	29	21	14	23
39	2	38	37	12	11
26	6	20	10		1
34	15	35	33		3
17	31				
18	8				
	4				

R=	229	110	163	154	66	58	
PROM=	28.625	12.222	27.167	25.667	16.5	9.667	TOTAL
R ² /n=	6555.125	1344.444	4428.167	3952.667	1089	560.667	17930.069

PRUEBA ESTADÍSTICA

H= 8.1956

DECISIÓN ESTADÍSTICA

<i>g.l.</i>	PROBABILIDAD	χ^2	CONCLUSIÓN
5	0.005	0.412	HAY DIFERENCIA
	0.025	0.831	HAY DIFERENCIA
	0.05	1.145	HAY DIFERENCIA



ANEXO D

INTERVALO DE CONFIANZA DIA 7

CONTRATE	ESTIMADOR (phi)	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	DIFERENCIA
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CDDP}$	22.8889	8.7975	36.9803	3
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CAS VIII-GLY qd 21}$	7.6667	-6.4248	21.7581	
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CAS VIII-GLY qd 4X6}$	-2.1667	-16.2581	11.9248	
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CAS III-J qd 21}$	11.4000	-2.6914	25.4914	
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CAS III-J qd 4X6}$	14.0000	-0.0914	28.0914	
$\check{R}_{CDDP} - \check{R}_{CAS VIII-GLY qd 21}$	-15.2222	-28.5077	-1.9367	3
$\check{R}_{CDDP} - \check{R}_{CAS VIII-GLY qd 4X6}$	-25.0556	-38.3411	-11.7700	3
$\check{R}_{CDDP} - \check{R}_{CAS III-J qd 21}$	-11.4889	-24.7744	1.7966	
$\check{R}_{CDDP} - \check{R}_{CAS III-J qd 4X6}$	-8.8889	-22.1744	4.3966	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY qd 21} - \check{R}_{CAS VIII-GLY qd 4X6}$	-9.8333	-26.1047	6.4380	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY qd 21} - \check{R}_{CAS III-J qd 21}$	3.7333	-12.5380	20.0047	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY qd 21} - \check{R}_{CAS III-J qd 4X6}$	6.3333	-9.9380	22.6047	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY qd 4X6} - \check{R}_{CAS III-J qd 21}$	13.5667	-2.7047	29.8380	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY qd 4X6} - \check{R}_{CAS III-J qd 4X6}$	16.1667	-0.1047	32.4380	
$\check{R}_{CAS III-J qd 21} - \check{R}_{CAS III-J qd 4X6}$	2.6000	-15.2244	20.4244	

3 – Significancia ($\alpha=0.05$)



ANEXO E

INTERVALO DE CONFIANZA DIA 14

CONTRATE	ESTIMADOR (phi)	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	DIFERENCIA
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CDDP}$	18.0417	3.9502	32.1331	3
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CAS VIII-GLY qd 21}$	6.2083	-7.8831	20.2998	
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CAS VIII-GLY qd 4X6}$	0.3750	-13.7164	14.4664	
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CAS III-J qd 21}$	11.9750	-2.1164	26.0664	
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CAS III-J qd 4X6}$	15.5417	1.4502	29.6331	3
$\check{R}_{CDDP} - \check{R}_{CAS VIII-GLY qd 21}$	-11.8333	-25.1189	1.4522	
$\check{R}_{CDDP} - \check{R}_{CAS VIII-GLY qd 4X6}$	-17.6667	-30.9522	-4.3811	3
$\check{R}_{CDDP} - \check{R}_{CAS III-J qd 21}$	-6.0667	-19.3522	7.2189	
$\check{R}_{CDDP} - \check{R}_{CAS III-J qd 4X6}$	-2.5000	-15.7855	10.7855	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY qd 21} - \check{R}_{CAS VIII-GLY qd 4X6}$	-5.8333	-22.1047	10.4380	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY qd 21} - \check{R}_{CAS III-J qd 21}$	5.7667	-10.5047	22.0380	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY qd 21} - \check{R}_{CAS III-J qd 4X6}$	9.3333	-6.9380	25.6047	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY qd 4X6} - \check{R}_{CAS III-J qd 21}$	11.6000	-4.6714	27.8714	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY qd 4X6} - \check{R}_{CAS III-J qd 4X6}$	15.1667	-1.1047	31.4380	
$\check{R}_{CAS III-J qd 21} - \check{R}_{CAS III-J qd 4X6}$	3.5667	-14.2577	21.3911	

3 – Significancia ($\alpha=0.05$)



ANEXO F
INTERVALO DE CONFIANZA DIA 21

CONTRATE	ESTIMADOR (phi)	LIMITE INFERIOR	LIMITE SUPERIOR	DIFERENCIA
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CDDP}$	16.4028	2.3114	30.4942	S
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CAS VIII-GLY \text{ qd } 21}$	1.4583	-12.6331	15.5498	
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CAS VIII-GLY \text{ qd } 4X6}$	2.9583	-11.1331	17.0498	
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CAS III-J \text{ qd } 21}$	12.1250	-1.9664	26.2164	
$\check{R}_{TEST} - \check{R}_{CAS III-J \text{ qd } 4X6}$	18.9583	4.8669	33.0498	S
$\check{R}_{CDDP} - \check{R}_{CAS VIII-GLY \text{ qd } 21}$	-14.9444	-28.2300	-1.6589	S
$\check{R}_{CDDP} - \check{R}_{CAS VIII-GLY \text{ qd } 4X6}$	-13.4444	-26.7300	-0.1589	S
$\check{R}_{CDDP} - \check{R}_{CAS III-J \text{ qd } 21}$	-4.2778	-17.5633	9.0077	
$\check{R}_{CDDP} - \check{R}_{CAS III-J \text{ qd } 4X6}$	2.5556	-10.7300	15.8411	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY \text{ qd } 21} - \check{R}_{CAS VIII-GLY \text{ qd } 4X6}$	1.5000	-14.7714	17.7714	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY \text{ qd } 21} - \check{R}_{CAS III-J \text{ qd } 21}$	10.6667	-5.6047	26.9380	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY \text{ qd } 21} - \check{R}_{CAS III-J \text{ qd } 4X6}$	17.5000	1.2286	33.7714	S
$\check{R}_{CAS VIII-GLY \text{ qd } 4X6} - \check{R}_{CAS III-J \text{ qd } 21}$	9.1667	-7.1047	25.4380	
$\check{R}_{CAS VIII-GLY \text{ qd } 4X6} - \check{R}_{CAS III-J \text{ qd } 4X6}$	16.0000	-0.2714	32.2714	
$\check{R}_{CAS III-J \text{ qd } 21} - \check{R}_{CAS III-J \text{ qd } 4X6}$	6.8333	-13.0949	26.7616	

S – Significancia ($\alpha=0.05$)



ANEXO G

ANÁLISIS UNILATERAL DE VARIANZA INCREMENTO DE PESO

Tabla para el análisis de la variancia				
Fuente de variación	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado medio	Razón de la variancia
Entre muestras	70009.45	5	14001.89	262.45
Dentro de las muestras	1867.28	35	53.35	
Total	71876.73	40		

Significancia	Prueba F	Decisión estadística
0.005	3.99	hay diferencia
0.01	3.51	hay diferencia
0.05	2.45	hay diferencia
0.1	2	hay diferencia



ANEXO H

PRUEBA DE TUKEY PARA INCREMENTO DE PESO

DIFERENCIAS ENTRE LAS MEDIAS DE LAS MUESTRAS						
	CONTROL NEGATIVO	CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 7x4	CAS VIII-GLY (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 21	CAS VIII-GLY (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 4X6	CAS III-J (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 21	CAS III-J (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 4X6
CONTROL NEGATIVO	⊖	18.7603	1.4272	11.6644	5.9865	3.6199
CDDP (13.32 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 7x4		⊖	20.1875	7.0958	24.7468	8.4574
CAS VIII-GLY (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 21			⊖	13.0916	4.5593	11.7300
CAS VIII-GLY (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 4X6				⊖	17.6509	1.3616
CAS III-J (1.64 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 21					⊖	16.2894
CAS III-J (3.30 $\mu\text{mol/Kg}$) qd 4X6						⊖

PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES $\alpha=0.05$		
HIPÓTESIS	HSD*	DECISION ESTADISTICA
$H_0: \mu_{\text{TESTIGO}} = \mu_{\text{CDDP}}$	12.10886033	hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{TESTIGO}} = \mu_{\text{CAS VIII-GLY qd 21}}$	13.98210754	no hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{CDDP}} = \mu_{\text{CAS VIII-GLY qd 21}}$	13.98210754	hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{TESTIGO}} = \mu_{\text{CAS VIII-GLY qd 4X6}}$	13.98210754	no hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{CDDP}} = \mu_{\text{CAS VIII-GLY qd 4X6}}$	13.98210754	no hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{CAS VIII-GLY qd 21}} = \mu_{\text{CAS VIII-GLY qd 4X6}}$	13.98210754	no hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{TESTIGO}} = \mu_{\text{CAS III-J qd 21}}$	15.31663141	no hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{CDDP}} = \mu_{\text{CAS III-J qd 21}}$	15.31663141	hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{CAS VIII-GLY qd 21}} = \mu_{\text{CAS III-J qd 21}}$	15.31663141	no hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{CAS VIII-GLY qd 4X6}} = \mu_{\text{CAS III-J qd 21}}$	15.31663141	hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{TESTIGO}} = \mu_{\text{CAS III-J qd 4X6}}$	13.98210754	no hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{CDDP}} = \mu_{\text{CAS III-J qd 4X6}}$	13.98210754	no hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{CAS VIII-GLY qd 21}} = \mu_{\text{CAS III-J qd 4X6}}$	13.98210754	no hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{CAS VIII-GLY qd 4X6}} = \mu_{\text{CAS III-J qd 21}}$	15.31663141	no hay diferencia
$H_0: \mu_{\text{CAS III-J qd 21}} = \mu_{\text{CAS III-J qd 4X6}}$	13.98210754	hay diferencia