



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

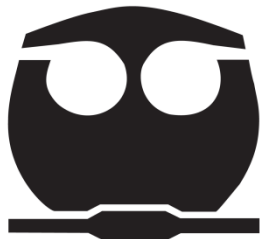
**“EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTINEOPLÁSICA DE DOS
NUEVOS COMPUESTOS DE COORDINACIÓN EN UN MODELO
MURINO DE ISOTRANSPLANTACIÓN (MELANOMA B16)”**

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

ERICK ALEXANDRO VICENTE ALVAREZ



MÉXICO, D.F.

2012.



Universidad Nacional
Autónoma de México



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: **Profesor:** Atonatiu Edmundo Gómez Martínez

VOCAL: **Profesor:** María Isabel Gracia Mora

SECRETARIO: **Profesor:** Francisco Hernández Luis

1er. SUPLENTE: **Profesor:** José Fausto Rivero Cruz

2º SUPLENTE: **Profesor:** María Elena Bravo Gómez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, FACULTAD DE QUIMIA, CONJUNTO “E”, UNIDAD DE EXPERIMENTACIÓN ANIMAL UNEXA.

ASESOR DEL TEMA: **MARÍA ISABEL GRACIA MORA** .
(nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: **FRANCISCO SÁNCHEZ BARTÉZ** .
(nombre y firma)

SUSTENTANTE: **ERICK ALEXANDRO VICENTE ALVAREZ** .
(nombre y firma)

A mi Madre:

Gracias Madre porque siempre has sido mi ejemplo a seguir en la vida y gracias a ti y a tu gran amor que me has brindado he podido llegar hasta donde hoy me encuentro.

También te doy las gracias Madre porque siempre has creído en mí y más porque siempre has estado ahí para apoyarme en todo lo que siempre he querido hacer en lo que llevo de mi corta vida, aunque espero que sea muy larga a tu lado y que nunca me dejes solo.

Podría escribir millones de hojas tratando de decirte porque eres alguien tan importante y valioso en mi vida y dándote las gracias por todo el cariño que me has dado sobre todo por lo que hemos vivido como familia junto a mi Padre al cual le agradezco el haberme dado la vida y su cariño.

Solo quiero que sepas que te AMO y le doy gracias a la vida y a Dios por haberme dado una magnifica Madre, así mismo quiero que sepas que no sabría qué hacer si no te tengo a mi lado.

Te AMO MADRE nunca lo olvides y gracias por darme la vida a mí y a mis hermanos.

A mis hermanos:

Gracias hermanos por que siempre han estado a mi lado apoyándome ya sea cuando hacemos travesuras o cuando hay que pelearnos jajaja sobre todo cuando jugamos futbol.

También quiero que sepan los que los AMO y que los admiro porque hemos sabido salir adelante a pesar de todo lo que hemos vivido de niños y todos los problemas que hemos tenido que afrontar, pero lo mejor es que hemos podido salir adelante como familia.

A ti Ricardo quiero que sepas que te agradezco por todo lo que hemos vivido juntos en estos más de 20 años, risas, llantos, alegrías pleitos etc. y aunque suene muy gay te AMO y le doy gracias Dios por haberme mandado un hermano como tú.

A ti Fabiola la más pequeña de la familia, quiero que sepas que también te AMO y que con tu nacimiento has llegado a darle más alegría a nuestras vidas y quiero que sepas que estoy muy agradecido por todo tu apoyo, ocurrencias y alegría que le has dado a mi vida.

Agradecimientos:

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser mi segunda casa desde mis mejores años de juventud dentro del Colegio de Ciencias y Humanidades Plantel Sur, hasta mis años dentro de la Facultad de Química, en donde me di cuenta que no todo en la vida es el libertinaje.

Así mismo le agradezco a la UNAM porque me ha dado la oportunidad de desarrollarme como persona y como ser humano, así de como haber conocido a grandes amigos dentro de la misma estancia.

A la Facultad de Química que me ayudo a crecer en lo personal y darme las bases para salir adelante profesionalmente.

A la M. en C Isabel Gracia Mora, por el apoyo incondicional que me ha brindado desde el primer día que llegue a la UNEXA hasta el día de hoy, así mismo por la confianza que me ha otorgado para poder llevar a cabo el proyecto de esta tesis ya que sin su apoyo y el de toda la comunidad dentro del Bioterio nada de esto hubiera sido posible.

Al DR. Francisco Sánchez Bártéz (Mi Prof.), gracias por su conocimiento que me ha transmitido y sobre todo gracias por su amistad que me ha otorgado durante este tiempo dentro del Bioterio, así como fuera de este y algún día quisiera saber la mitad de lo que usted sabe.

A Marisol (alias Soledad) y a Mabel (mi equipo) les agradezco por todo el apoyo y el conocimiento que me han brindado sobre el cuidado y manejo de los animales de laboratorio, así mismo agradecerles su confianza que me han otorgado para formar parte de su EQUIPO de trabajo y sobre todo gracias por su gran amistad y cariño que me han dado y gracias Soledad por ser como una madre postiza para mi y por todos los consejos que haz brindado para poder salir adelante a pesar de

todo y a ti Mabel por ser la fundadora del Equipo del que siempre Sol quiso ser parte. No olviden que las quiero mucho y gracias por todo su apoyo y consejos que me dieron en el momento más difícil de mi vida.

A ti Mónica Sánchez (pechan) muchas gracias por siempre apoyarme en las buenas y malas en los años que estuviste a mi lado, ya que sin ese apoyo tal vez hoy día no estaría donde me encuentro. Una vez más gracias y te deseo lo mejor estés donde estés.

A ti Lidia gracias por tu amistad y todo el apoyo y ayuda que me brindaste para que el trabajo en las células se hiciera más ameno, así como por todos los consejos que me brindaste.

A ti Lucy gracias por tu amistad y sobre todo por alegrar mis días al subir las escaleras del Bioterio y ver tu linda cara.

Al resto de la comunidad de la UNEXA, Nidia Barragán, Liliana Mejía, Luis Romero y Héctor Rico, gracias por su apoyo y su amistad que han brindado.

A la Unidad de Experimentación Animal de la Facultad de Química por haberme brindado todas las facilidades y comodidades para la realización de este trabajo.

A toda mi familia, ABUELA, abuelo, tíos, primos ya que cada uno de ustedes me han brindado su apoyo y cariño para poder llegar hasta este día saludos y no olviden que los quiero.

Por ultimo quiero brindar su apoyo a la Red de Desarrollo de Fármacos y Métodos Diagnostico (REDFARMED) por el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

ÍNDICE.

| | |
|---|-----|
| Introducción. | 1. |
| Antecedentes. | 5. |
| 1. El cáncer. | 7. |
| 2. Tratamientos Antineoplásicos. | 10. |
| 3. Quimioterapia del cáncer. | 13. |
| 4. Uso del ratón como modelo experimental de enfermedad. | 18. |
| 5. Línea tumoral Melanoma B16F10. | 21. |
| Hipótesis y Objetivos. | 22. |
| Hipótesis. | 22. |
| Objetivos. | 22. |
| Material y Métodos. | 23. |
| 1. Compuestos. | 23. |
| 2. Metodología <i>in vitro</i> . | 24. |
| 2.1.- Descongelamiento de línea celular. | 24. |
| 2.2.- Obtención del cultivo stock a confluencia. | 24. |
| 2.3.- Tripsinización. | 24. |
| 2.4.- Cuantificación de células. | 25. |
| 2.5.- Ensayo de inhibición de la proliferación celular. | 25. |
| 2.6.- Tinción con Sulforrodamina-B y lectura. | 26. |
| 3. Metodología <i>in vivo</i> . | 27. |
| 3.1.- Animales. | 27. |
| 3.2.- Determinación de la Dosis Letal 50 (DL ₅₀). | 27. |

| | |
|--|-----|
| 3.3.- Línea tumoral murina Melanoma B16F10. | 28. |
| • Descongelamiento de la línea tumoral murina. | 28. |
| • Cuantificación de células. | 28. |
| • Incubación. | 29. |
| • Tripsinización. | 29. |
| • Propagación. | 30. |
| • Implante. | 30. |
| 3.4.- Trasplante tumoral. | 30. |
| 3.5.- Evaluación antineoplásica. | 31. |
| 3.6.- Tratamiento de resultados y análisis estadístico. | 33. |
| 3.6.1.- Porcentaje de incremento en peso (%IP). | 33. |
| 3.6.2.- Índice de Sobrevida (Increased Life Span, ILS). | 34. |
| 3.6.3.-Análisis estadístico en función del incremento en peso. | 34. |
| 3.6.4.- Tratados/Control (T/C). | 36. |
| 3.6.5.- Análisis de supervivencia (Log-Rank). | 36. |
| Resultados y Discusión. | 38. |
| 1. Determinación Concentración Inhibitoria 50 (IC ₅₀). | 38. |
| 2. Determinación Dosis Letal 50 (DL ₅₀). | 38. |
| 3. Evaluación Biológica. | 39. |
| ▪ T/C calculado con el peso promedio al día 5, 10 y 15. | 40. |
| ▪ Porcentaje de incremento en peso. | 41. |
| ▪ Análisis en función del incremento en peso. | 42. |
| ▪ Día promedio de muerte. | 43. |
| ▪ Índice de sobrevida. | 44. |
| ▪ Log-Rank. | 45. |

| | |
|-----------------------------------|-----|
| Conclusiones. | 47. |
| ▪ Conclusiones. | 47. |
| Anexos. | 48. |
| Curva de crecimiento C57BL/6NHsd. | 48. |
| Pruebas Estadísticas. | 49. |
| Referencias. | 66. |

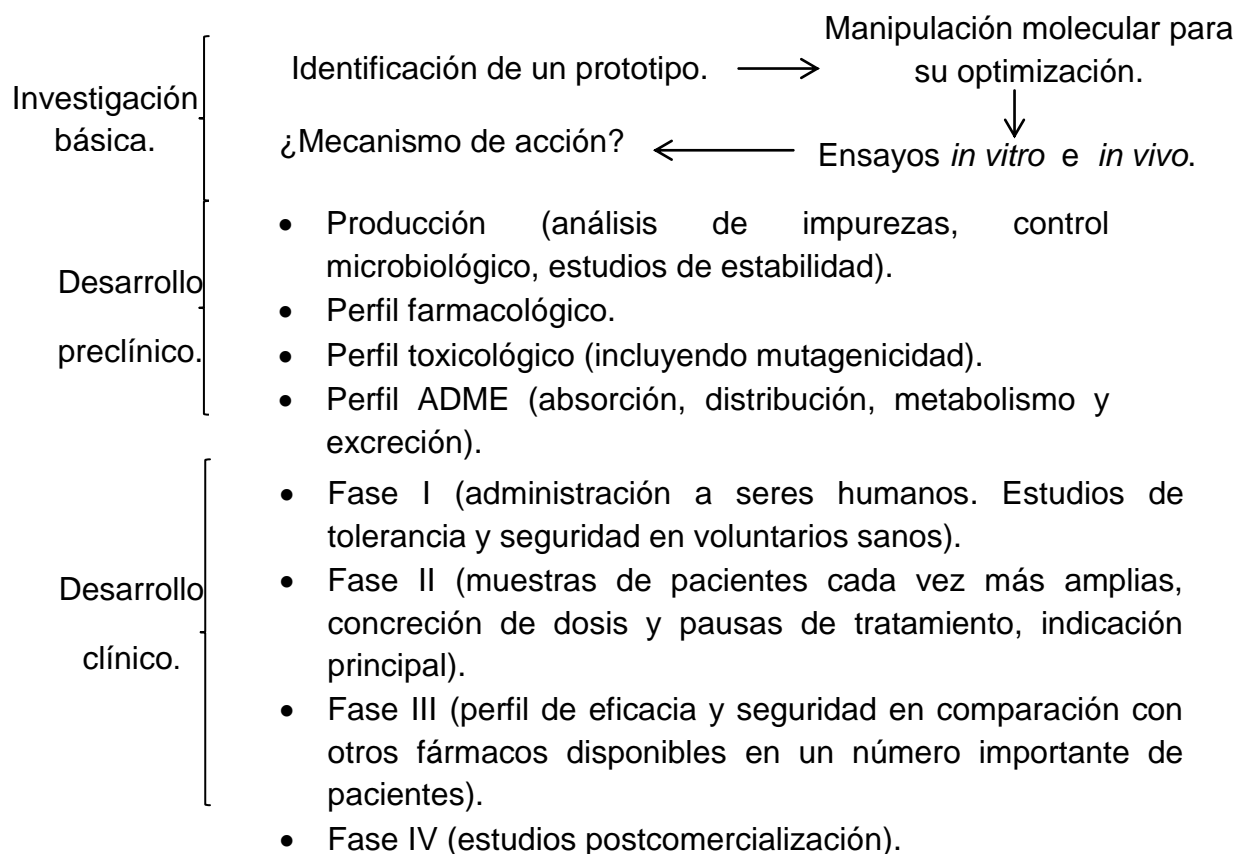
INTRODUCCIÓN

El **Cáncer** es un término que se usa para designar enfermedades en las que células anormales se dividen sin control y pueden invadir otros tejidos. Las células cancerosas pueden diseminarse a otras partes del cuerpo por el sistema sanguíneo y por el sistema linfático. El cáncer no es sólo una enfermedad sino muchas enfermedades. Hay más de 200 diferentes tipos de cáncer, el cual no toma en cuenta el sexo, edad, raza, situación económica ni condición física (1).

Al igual que en el mundo, en México existe una necesidad creciente por lograr tener un servicio adecuado a la demanda de salud en pacientes con esta enfermedad.

Dentro de las formas de tratamiento contra el cáncer tenemos a la quimioterapia como una opción clave y a menudo exitosa; sin embargo, en nuestro país la necesidad de importación de estos productos y su costo muy elevado hace poco accesible esta opción a un gran número de pacientes, además de que existen un gran número de tipos de cáncer que se consideran incurables y otros tantos se tornan refractarios a los tratamientos quimioterapéuticos, por lo que el desarrollo y la incorporación de la búsqueda de nuevos fármacos adquiere prioridad.

Las etapas del desarrollo de un nuevo fármaco son:



El origen y desarrollo de estos nuevos fármacos puede ser a partir de (2,3):

- Productos naturales.
- Síntesis de nuevas moléculas, las cuales pueden clasificarse a su vez en compuestos orgánicos y compuestos inorgánicos.
- Variaciones estructurales de fármacos ya conocidos.
- El descubrimiento de efectos inesperados en la aplicación terapéutica de fármacos conocidos.

En la actualidad existen pocos fármacos de origen inorgánico a base de platino para el tratamiento del cáncer, el cisplatino, carboplatino, nedaplatino, lobaplatino, heptaplatino y el oxaliplatino; sin embargo existen otros que actualmente se

encuentran en ensayos clínicos como son el satraplatino, picoplatino y el lipopaltino (4).

Durante la última década algunos derivados de benzimidazol, incluyendo aquellos que contienen sustituyentes tales como tiazol, éster, grupos carboxilo, alquilo y amina; han demostrado tener un importante poder antibacteriano y antifungicida.

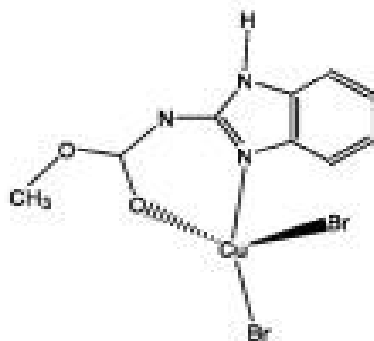
Además, de que se han empleado contra enfermedades parasitarias y han demostrado tener la actividad antiviral y antitumoral.

Recientemente, se informó sobre la actividad estructural, antibacteriana y antineoplásica de una serie de derivados de benzimidazol.

Por lo cual, en el grupo de trabajo de la Dra. Noráh Barba Behrens de la Facultad de Química, se ha llevado a cabo la síntesis de compuestos de origen inorgánico con sustituyentes derivados de benzimidazol; tal como el compuesto NBOB3 el cual fue utilizado en el presente trabajo para evaluar su actividad antineoplásica. Dicho compuesto está conformado por metil benzimidazol carbamato (cmbz) y cobre II como centro metálico.

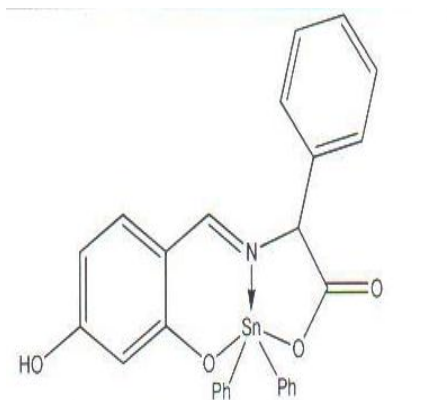
El compuesto NBOB3 se sintetiza mezclando Bromuro de Cobre (II) en etanol y posteriormente añadiendo una solución de acetato de etilo de metilbenzimidazol. Posteriormente la solución se lleva a reflujo durante 8 horas, y después de una semana el compuesto se muestra como un polvo verde en forma de precipitado.

Figura 1.- Estructura del compuesto NBOB3.



Así mismo el Dr. José Norberto Farfán García ha sintetizado compuestos de origen inorgánico que conforman la familia NK, de la cual se tomó el compuesto NK82, para observar si dicho compuesto presenta actividad antineoplásica en un modelo murino de isotransplatación Melanoma B16.

Figura 2.- Estructura del compuesto NK82.



Algunos compuestos de estas familias han demostrado tener actividad antineoplásica en ensayos *in vitro* basada en protocolos internacionales con lo cual es necesario y justificado el seguir evaluando su actividad y selectividad tumoral, para continuar así con el desarrollo de fármacos antineoplásicos en nuestro país (5, 6).

ANTECEDENTES

Mundialmente, el cáncer es una de las principales causas de mortalidad. Se le atribuyen 7,9 millones de defunciones ocurridas durante el 2010. Los principales tipos de cáncer con mayor defunción son:

- pulmonar (1.4 millones);
- gástrico (740 000);
- hepático (700 000);
- colorrectal (610 000).

Más del 30% de los diferentes tipos de cáncer podrían evitarse modificando o evitando los siguientes factores de riesgo (7,8):

- el consumo de tabaco;
- la inactividad física;
- el exceso de peso o la obesidad;
- el consumo de bebidas alcohólicas;
- la infección por el virus del papiloma humano;
- la contaminación del aire de las ciudades;
- el humo generado en la vivienda por la quema de combustibles sólidos.

En México la Secretaría de Salud (SSa) reporta que del ingreso hospitalario por cáncer en 2008, la leucemia tuvo mayor presencia (8.7%) seguida del cáncer de mama (5.8%), de cuello de útero (3.3%) y ovario (2.1%). La leucemia afecta principalmente a los hombres (15.1%), mientras que el cáncer de mama a las mujeres (8.4%).

Cuadro 1.- Distribución porcentual de egresos hospitalarios por tipo de tumor maligno por sexo.

| Tipo de tumor maligno | Hombres | Mujeres | Tipo de tumor maligno | Hombres | Mujeres |
|-----------------------|---------|---------|-----------------------|---------|---------|
| Leucemias | 15.2 | 5.6 | Estomago | 3.1 | 1.1 |
| Mama | 0.4 | 8.3 | Colon | 3.2 | 1.2 |
| Cuello del útero | 0 | 4.8 | Recto y ano | 2.0 | 0.7 |
| Ovario | 0 | 3.1 | Hígado | 1.9 | 0.8 |
| Pulmón | 4.1 | 1.0 | Vejiga | 2.2 | 0.4 |
| Próstata | 6.0 | 0 | Páncreas | 1.5 | 0.7 |
| Melanoma y piel | 0.6 | 0.3 | Otros | 58.7 | 72.1 |


Fuente: Ssa. DGIS (2008). Proceso INEGI.

El cáncer de mama es una de las patologías asociadas al envejecimiento, al retraso en el inicio de la vida reproductiva y a los estilos de vida; además, representa un problema de salud pública, debido al incremento gradual y sostenido de dicha enfermedad, así como al costo de su tratamiento. Según la Organización Mundial de la Salud (OMS), el cáncer de mama afecta al 16% de la población femenina que padeció algún tipo de cáncer (9, 10).

La OMS estima que el cáncer podría cobrar la vida de 10.3 millones de personas en el mundo para 2020, afectando a 6.7 millones de personas cada año. En nuestro país la tasa de defunción por tumores aumentó, de 1998 a 2008, la tasa de mortalidad por cáncer se incrementó, pasando de 57.7 a 66.6% por cada 100 mil habitantes; entre las mujeres, el crecimiento fue de 59.6 a 66.7% por cada 100 mil habitantes, mientras que entre los hombres, de 55.6 a 66.5% por cada 100 mil habitantes.

Finalmente, de acuerdo con la defunciones por tumores malignos en 2008, entre los hombres, el mayor porcentaje de lesiones malignas fue en la próstata (8.1%), seguido por los tumores asociados al consumo de tabaco: tráquea, bronquios y pulmón (7.0%); y entre las mujeres, el cáncer de mama (7.6%), seguido por los tumores malignos de ovarios (6.4%) (11).

Cuadro 2.- Distribución porcentual de las principales causas de muerte por tumores malignos para cada sexo.

| | | Tumores malignos | |
|--|-----|----------------------------|-----|
|  | 1.6 | Encéfalo | 1.4 |
| | 1.2 | Laringe | 0.2 |
| | 7.0 | Traque, bronquios y pulmón | 3.6 |
| | 0.0 | Mama | 7.6 |
| | 3.7 | Hígado | 4.3 |
| | 2.7 | Páncreas | 3.0 |
| | 4.7 | Estomago | 4.0 |
| | 1.0 | Vías urinarias | 0.6 |
| | 8.1 | Próstata/Ovarios | 6.4 |
| | 0.0 | Cuello del útero | 2.7 |
| | 3.3 | Colon | 3.1 |
| | 3.2 | Leucemia | 2.7 |
| | 1.9 | Linfoma no Hodgkin | 3.1 |
| | | | |

Fuente: Ssa. DGIS (2008). Proceso INEGI.

1. El cáncer

La palabra cáncer se utiliza para agrupar aproximadamente 200 enfermedades que se caracterizan por un crecimiento anormal de células, situación que es transmitida a células hijas y que se manifiesta por una reducción del control del crecimiento y la función celular.

Los tipos de cáncer se pueden agrupar en categorías más amplias. Las categorías principales de cáncer son (1):

- Carcinoma: cáncer que empieza en la piel o en tejidos que revisten o cubren los órganos internos.
- Sarcoma: cáncer que empieza en hueso, en cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén.
- Leucemia: cáncer que empieza en el tejido en el que se forma la sangre, como la médula ósea, y causa que se produzcan grandes cantidades de células sanguíneas anormales y que entren en la sangre.
- Linfoma y mieloma: cáncer que empieza en las células del sistema inmunitario.
- Cáncer del sistema nervioso central: cáncer que empieza en los tejidos del cerebro y de la médula espinal.

Aunque existen muchas causas que originan estos padecimientos, se pueden agrupar en los siguientes grupos:

- predisposición genética,
- factores ambientales (ocupacionales, dieta, fármacos, contaminantes),
- factores ambientales interaccionando con predisposiciones genéticas,
- factores desconocidos.

Como ejemplos del primer grupo tenemos al retinoblastoma, el neuroblastoma, el cáncer de mama por mutaciones en los genes BRCA1 y BRCA2 (12).

Dentro del tercer grupo encontramos al xeroderma pigmentoso, una condición genética caracterizada por una deficiencia en los mecanismos de reparación de las rupturas de ADN provocadas por la exposición a la luz ultravioleta.

Aquellos padecimientos cancerosos donde no se ha determinado la participación de factores genéticos o ambientales, se clasifican dentro de causas desconocidas.

El segundo y el cuarto grupo, probablemente son los responsables del 60% al 90% de todos los tipos de cáncer. Los factores ambientales involucran, en este

contexto, no solamente al agua, al aire o al suelo, sino también alimentos, bebidas, estilos de vida, exposición ocupacional, fármacos, y prácticamente todas las interacciones de los individuos con su medio ambiente. Esta definición implica que una buena parte de los trastornos cancerosos, podrían ser prevenidos al evitar exponerse a agentes que presenten la potencialidad de producirlos.

Los carcinógenos son un tipo de agentes que exhiben un efecto adverso específico en seres humanos. Se han dividido en tres grupos que son: sustancias químicas, agentes físicos y agentes biológicos.

Dentro de los agentes físicos se encuentran los rayos X y la luz UV; con respecto a los agentes biológicos podemos citar, entre otros al virus Epstein Barr que provoca el linfoma de Burkitt, las infecciones por el virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por papilomavirus humanos (PVH), los cuales son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios (13).

El cáncer se puede clasificar en: neoplasia benigna o neoplasia maligna.

Cuadro 3.- Clasificación de tumores.

| Tumor benigno. | Tumor Maligno. |
|-------------------------------------|--|
| Encapsulado | No encapsulado |
| No invasivos | Invasivos |
| Poca división celular | Divisiones celulares comunes |
| Altamente diferenciados | Poco diferenciados |
| Crecimiento lento | Crecimiento rápido |
| Escasa anaplasia | Presentan anaplasia |
| No hay metástasis | Hay metástasis |
| Material genético estable | Inestabilidad en el material genético |
| Poca secreción de proteasas | Alta secreción de proteasas |
| Requiere de factores de crecimiento | No requiere de factores de crecimiento |

El desarrollo neoplásico consta de tres etapas: la iniciación, la promoción y la progresión.

La iniciación es el conjunto de eventos que da lugar a la pérdida de la inhibición del crecimiento celular por contacto de células contiguas. El iniciador principalmente es un electrófilo, el cual se une covalentemente al ADN para provocar un cambio mutagénico, pero es permanente y hereditario; la acción del iniciador es irreversible.

La promoción se refiere a la perpetuación del daño celular. La función esencial del agente promotor es completar el proceso carcinogénico suscitado por el iniciador.

Generalmente los promotores no son electrófilos y no se tienen evidencias de que se unan covalentemente a macromoléculas. La acción de los promotores es reversible en una etapa inicial y usualmente se requieren varias exposiciones a dichos promotores.

La etapa de progresión requiere el escape de la célula tumoral a los factores de defensa del organismo lo que implica la libertad mitótica sin límite (14).

2. Tratamientos antineoplásicos

Hoy día existen diferentes modalidades para el tratamiento de las enfermedades neoplásicas malignas: la cirugía, la radiación y la quimioterapia; sin embargo, hay otras alternativas, como la crioterapia, terapia biológica y la hipertermia, por citar algunas (15, 16).

La crioterapia que se refiere al uso controlado de temperaturas lo suficientemente bajas para producir un daño tisular severo y la congelación puede ser el método más efectivo para destruir el tejido neoplásico (17).

La terapia biológica (a veces llamada inmunoterapia o terapia modificadora de la respuesta biológica) es aquella donde se utiliza al sistema inmune del cuerpo para combatir el cáncer o para minimizar los posibles efectos secundarios causados por los tratamientos del cáncer. Los modificadores de la respuesta biológica (MRB) existen naturalmente en el cuerpo y se pueden producir en el laboratorio. Los MRB alteran la interacción entre las defensas inmunes del cuerpo y las células cancerosas para reforzar, dirigir o restaurar la capacidad del cuerpo de combatir la enfermedad.

La terapia biológica incluye (1):

- Interferones.- Son un tipo de citosinas que actúan directamente contra las células cancerosas al hacer más lento su crecimiento. Hay tres tipos de interferones: el interferón alfa, el interferón beta y el interferón gama; el interferón alfa es el tipo más ampliamente utilizado en el tratamiento del cáncer. La Food and Drug Administration (FDA) ha aprobado el uso del interferón alfa para el tratamiento de leucemia de células pilosas, el melanoma, la leucemia mieloide crónica y el sarcoma de Kaposi relacionado con el SIDA.
- Interleucinas.- La interleucina-2 (IL-2 o aldesleucina) estimula el crecimiento y la actividad de muchas células inmunes, como los linfocitos, que pueden destruir las células cancerosas. La FDA ha aprobado la IL-2 para el tratamiento de cáncer metastático de riñón y de melanoma metastático.
- Anticuerpos monoclonales.- Estos reaccionan con antígenos específicos de cáncer lo que mejora la respuesta inmune del paciente. También pueden programarse para que actúen contra los factores de crecimiento de las células y así dificultar el crecimiento de las células cancerosas. El Rituximab y la Trastuzumab son ejemplos de anticuerpos monoclonales que han sido aprobados por la FDA, el Rituximab se usa para el tratamiento del linfoma no Hodgking y la Trastuzumab se utiliza para tratar cáncer de seno metastático.

- Factores estimulantes de colonias.- Llamados algunas veces factores de crecimiento hematopoyético, en general no afectan directamente las células del tumor; más bien, estimulan las células madre de la médula ósea para que se dividan y se conviertan en leucocitos, plaquetas y glóbulos rojos. Algunos ejemplos de factores estimulantes de colonias son el G-CSF y el GM-CSF los cuales aumentan el número de leucocitos reduciendo así el riesgo de infección en los pacientes que reciben quimioterapia. La eritropoyetina la cual aumenta el número de glóbulos rojos y la interleucina-11 que ayuda al cuerpo a crear plaquetas.

La cirugía se emplea en la prevención, diagnóstico, tratamiento local, eliminación de la masa tumoral, preservación de la función de los órganos y rehabilitación. Los principales objetivos de la cirugía son la curación de pacientes con enfermedad localizada y lograr el control local de la enfermedad de modo que se puedan usar otras terapias en los sitios de diseminación. En general las probabilidades de que un procedimiento quirúrgico sea exitoso depende la extirpación total del tumor (18).

La hipertermia se basa en aumentar la temperatura de todo el cuerpo o solamente de ciertas regiones que presentan crecimiento tumoral. Existe evidencia de que la parte interna de un tumor presenta un pH bajo, poca disponibilidad de oxígeno, por lo tanto su inactivación es más rápida cuando existe un aumento de temperatura corporal o local. Por otra parte se ha visto que el calor acentúa los efectos de radiación y de muchos agentes quimioterapéuticos (19, 20).

La radiación es una forma física del tratamiento del cáncer, sin embargo destruye tanto células neoplásicas como sanas al ser absorbida, ya que daña directamente al ADN. Hoy en día existen tres formas de aplicar la radiación (21, 22):

- A. Sistémica: en la cual los elementos radiactivos se introducen en el torrente sanguíneo para que lleguen a las células tumorales mediante los procesos

fisiológicos normales, por ejemplo, el uso de anticuerpos monoclonales radio marcados administrados por vía intravenosa para localizar y destruir el tumor en cualquier sitio.

- B. Braquiterapia: consiste en el uso de fuentes de radiación encapsuladas que se implantan directamente en los tejidos o cavidades corporales; también se denomina terapia intersticial y terapia intracavitaria.
- C. Teleterapia: consiste en el uso de haces de rayos X, rayos gamma o partículas generadas a distancia del paciente y dirigidas a los sitios del organismo donde se encuentra el tumor.

3. Quimioterapia del cáncer

La quimioterapia constituye un tratamiento sistémico para el tratamiento del cáncer y sus metastásis. En sus inicios los hombres trataban los tumores con la aplicación directa de mezclas que contenían cáusticos, ácidos, alcaloides (tales como la belladona, aconita y cicuta), metales y sus sales de cobre, mercurio, antimonio, plomo, zinc, arsénico, etcétera (22).

Entre los principales fármacos utilizados en la quimioterapia encontramos (23):

- Agentes alquilantes: Actúan directamente sobre el ADN al incorporar grupos alquilo que dan lugar a la formación de puentes inter o intracuaternarios responsables de la alteración funcional del ADN dando como resultado la muerte celular. A este grupo pertenecen la ciclofosfamida, Mecloretamina, mitomicina C. Principalmente son utilizados en las leucemias, el cáncer de pulmón, linfomas de Hodgkin y no Hodgkin.
- Antimetabolitos: Estos fármacos inhiben la acción de las enzimas relacionadas con la síntesis de purinas y pirimidinas, lo que resulta en la depleción celular de éstas y en la alteración de la síntesis de ácidos nucleicos. Entre estos se encuentran: análogos de pirimidinas (5-fluorouracilo, gemcitabina), análogos de purinas (6-mercaptopurina). Se

utilizan para el tratamiento del cáncer de mama, cáncer colorrectal, cáncer de páncreas, cáncer de vejiga.

- Agentes que interaccionan con las topoisomerasas: Las topoisomerasas son enzimas que desempeñan un papel fundamental en los procesos de replicación, transcripción y reparación del ADN. Modifican la estructura terciaria de doble hélice del ADN sin alterar la secuencia de nucleótidos. En humanos se han identificado tres tipos de topoisomerasas (I, II y III). Se incluyen en este grupo los siguientes fármacos: antraciclinas (adriamicina, daunorrubicina, análogos de adriamicina [4-epirubicina, idarrubicina], doxorubicinas liposomales, mitoxantrona), epipodofilotoxinas (etopósido, tenipósido), derivados de la camptotecina (irinotecan, topotecan), actinomicina D, amsacranina. Estos fármacos son utilizados principalmente el cáncer de ovario, endometrio, gástrico, de pulmón y de cérvix.
- Agentes que interaccionan con los microtúbulos: Los microtúbulos son polímeros proteicos que están presentes en el citoplasma de las células y son necesarios para su viabilidad, ya que forman parte del huso mitótico que permite la migración de los cromosomas durante la mitosis, previamente a la división celular. Además participan en otras acciones celulares como el transporte, la secreción, locomoción, adhesión, mantenimiento de la forma. Los agentes quimioterápicos que interaccionan con los microtúbulos son: alcaloides de la vinca (vincristina, vinblastina), taxanos (paclitaxel, docetaxel y los nuevos taxanos), análogos de las epotilonas. Son utilizados en el cáncer de ovario, próstata y gástrico.
- Derivados de platino: Forman enlaces covalentes con la guanina y adenina del ADN. La mayoría de estas uniones son intracatenarias, aunque también pueden ser intercatenarias. Los fármacos más importantes de este grupo son: cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Se utilizan para el tratamiento del cáncer de pulmón, cáncer de vejiga, tumores germinales, cáncer de ovario, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de esófago, cáncer de estómago, el Oxaliplatino es un análogo de tercera generación del cisplatino. Su mecanismo de acción es similar al de éste, pero además se une a proteínas

nucleares y citoplasmáticas. Su principal indicación es el tratamiento del cáncer colorrectal.

Hoy día, a pesar de que los quimioterapéuticos han encontrado un lugar importante en el combate del cáncer, su toxicidad es elevada y muchos tumores son totalmente refractarios.

La nefrotoxicidad del cisplatino, por ejemplo, ha sido bien conocida desde que fue utilizado en los primeros años de la década del 70. Su acción se debe a su afinidad y unión, por enlaces covalentes, con la base del ADN. Aproximadamente el 25% de la dosis administrada por vía intravenosa es excretada por el cuerpo en las primeras 24 horas; de esta porción, el 90% se excreta por filtración glomerular en la orina y el 10% por la bilis. La toxicidad renal es por dosis acumulativa. El medicamento es particularmente tóxico sobre las mitocondrias tubulares y se ha observado daño renal tanto agudo como crónico (24).

Es necesaria la búsqueda y desarrollo de nuevos agentes que tengan mejores características que las de los existentes.

Entre las características ideales que se pretenden encontrar en fármacos de origen inorgánico son (25):

- Ausencia de resistencia-cruzada al cisplatino.
- Un espectro más amplio de actividad, particularmente en áreas clínicas donde el cisplatino no ha demostrado efectos terapéuticos significativos.
- Disminución de efectos eméticos, nefrotoxicidad, ototoxicidad y anemia.
- Sinergismo en terapias combinadas.
- Bajo potencial oncogénico.

El principal propósito de instituciones como el “Cancer Chemotherapy National Service Center” del “National Cancer Institute” es seleccionar compuestos que sean activos en la práctica clínica mediante el uso de programas preclínicos de cernimiento.

Fundamentalmente un sistema de cernimiento debe tener contar las siguientes características:

- Debe ser capaz de identificar a un agente como de interés potencial.
- Debe ser cuantitativo en la determinación de la actividad del agente en el sistema en el cual haya sido ensayado.
- Debe discernir si el compuesto merece más desarrollo o es conveniente detener el estudio de esa molécula.
- Debe ser confiable y significativo para la clínica.

Tomando en cuenta estas características los protocolos de evaluación proponen las siguientes etapas para la evaluación del potencial antineoplásico.

- Cernimiento primario

Prueba inicial: en esta etapa se debe demostrar que las moléculas candidatas tienen alguna actividad biológica deseable. Esto puede involucrar un efecto citostático o citotóxico *in vitro* o *in vivo*. En esta etapa la prueba debe ser finalizada si el agente que se evalúa no satisface adecuadamente los criterios de actividad.

Confirmación de la actividad: en este punto se debe determinar si la actividad observada es reproducible y es suficiente en magnitud para continuar el estudio.

Para lograr esto se deben llevar a cabo pruebas en donde los requerimientos para actividad sean progresivamente incrementados.

- Cernimiento secundario

Esta segunda etapa se caracteriza detalladamente al fármaco en el sistema de prueba inicial, es decir, se determina una relación detallada de dosis-respuesta y la influencia de diferentes esquemas de tratamiento, rutas de administración y vehículos.

- Cernimiento terciario

Esta fase corresponde a la investigación clínica; que es donde se debe acumular toda la información necesaria sobre las características farmacológicas y toxicológicas de los fármacos previos al inicio de las fases clínicas de investigación.

En general se requiere implementar métodos para el control analítico de la pureza del compuesto, estudios de solubilidad en soluciones fisiológicas aceptables, formulaciones tentativas, pruebas de estabilidad suero-plasma, pruebas de hemoaglutinación o actividad hemolítica, pruebas de daño local al tejido.

- Fase clínica

Una vez demostrado que un compuesto cumple con todas las características de actividad farmacológica necesaria y su toxicidad es aceptable y se ha reunido suficiente información confiable y reproducible sobre sus propiedades, entonces puede ser sometido a las pruebas clínicas (26).

La etapa de evaluación clínica comprende tres fases, en cada una de ellas se deben obtener resultados satisfactorios para continuar con la siguiente (27):

- Fase I: en esta se estudia la toxicología y dosis óptimas en pacientes terminales con cáncer.
- Fase II: en esta etapa se estudia si la actividad antitumoral es significativa, así mismo se efectúan análisis estadísticos evaluando el riesgo-beneficio y se identifica el espectro tumoral.
- Fase III: aquí se compara la actividad del fármaco evaluado y su espectro con otros fármacos y tratamientos establecidos. Si satisface las características requeridas o mejora para cierta clase de neoplasias algunas propiedades como; actividad, costo, toxicología de los tratamientos existentes entonces será incluida en el régimen terapéutico.

- Fase IV: esta se refiere a la vigilancia continua de la seguridad del nuevo medicamento en las condiciones reales de uso en un gran número de pacientes. Toda la información recopilada durante esta fase, debe ser transmitida a las agencias regulatorias, la SSA a través de la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS), tienen la responsabilidad de asegurar que los nuevos medicamentos son eficaces y seguros en el uso clínico cotidiano.

4. Uso del ratón como modelo experimental

Las ventajas del ratón sobre otros animales experimentales son (28):

- De fácil cuidado y mantenimiento, por su pequeño tamaño.
- Bajos costos de manutención.
- Eficacia reproductiva.
- Al tratarse de un mamífero, una gran parte de sus procesos bioquímicos son similares al hombre (aunque no hay que perder de vista que no se trata de un humano en miniatura).
- Existe una gran cantidad de líneas genéticamente definidas, como las consanguíneas y congénicas, además de cientos de mutaciones y un gran número de arreglos cromosómicos disponibles.
- Es un animal que posee sistemas eficientes de cultivo de células embrionarias pluripotenciales, lo que permite la realización de mutaciones dirigidas (ratones knock-out constitutivos y condicionales).
- Capacidad para manipular la información genética dentro de la célula y de transmitirla a la línea germinal.

Así mismo han ayudado a predecir la toxicidad, el metabolismo, la distribución en tejidos y compartimientos de un fármaco, así mismo siendo utilizados para evaluar eficacia y escalar la dosis en estudios de Fase I y proporcionar ambientes tumorales que imiten situaciones clínicas.

Por lo anterior el diseño de modelos apropiados es necesario para el descubrimiento de la nueva generación de fármacos anticancerígenos y el valor de estos dependerá de su éxito para predecir una respuesta clínica.

Las cepas singénicas han sido de invaluable utilidad en el avance del estudio del cáncer y en inmunología. La mayoría de los fármacos antitumorales se han desarrollado en ratones singénicos, en los cuales es posible trasplantar un tumor de un animal a otro ya que no rechazan el implante, siempre y cuando posean el mismo haplotipo.

En general los métodos para evaluar la actividad antineoplásica *in vivo* pueden dividirse en modelos espontáneos y trasplantables.

Los trasplantes se pueden clasificar de acuerdo a tres criterios independientes:

- I. El primero tiene en cuenta la naturaleza del tejido trasplantado. De esta forma se habla de injerto o trasplante de piel, de riñón, de córnea o cardíaco, etc.
- II. El segundo criterio depende del sitio elegido para la inserción del trasplante en el receptor. Podemos hablar de trasplantes ortotópicos, cuando la re inserción se realiza en un tejido de la misma naturaleza que el injerto y de trasplantes heterotópicos, cuando el injerto se implanta en un tejido diferente al de origen.
- III. El tercer criterio de clasificación se establece a partir del grado de similitud existente entre el donante y el receptor. Si el injerto proviene de una especie diferente a la del receptor (por ejemplo, cerdo-hombre), el trasplante recibe el nombre de xenotrasplante o heterotrasplante. Si el donante es de la misma especie que el receptor, pero no se encuentran emparentados genéticamente, hablamos de un trasplante alogénico o aloinjerto. Si el injerto proviene de un donante genéticamente idéntico al receptor, situación que se da entre las líneas consanguíneas de animales de laboratorio, se le denomina trasplante singénico o isogénico.

Lo modelos de tumoración espontánea o inducida, probablemente nunca serán capaces de reemplazar a los modelos con tumores trasplantables debido al tiempo que involucra su producción, su biología individual y su heterogeneidad interna; además de que los modelos de tumoración espontánea sólo una fracción de los tumores inducidos se desarrollan, estos son medibles sólo en la etapa tardía y su patrón metastático no es uniforme, por lo que la respuesta que muestran a la terapia generalmente es pobre.

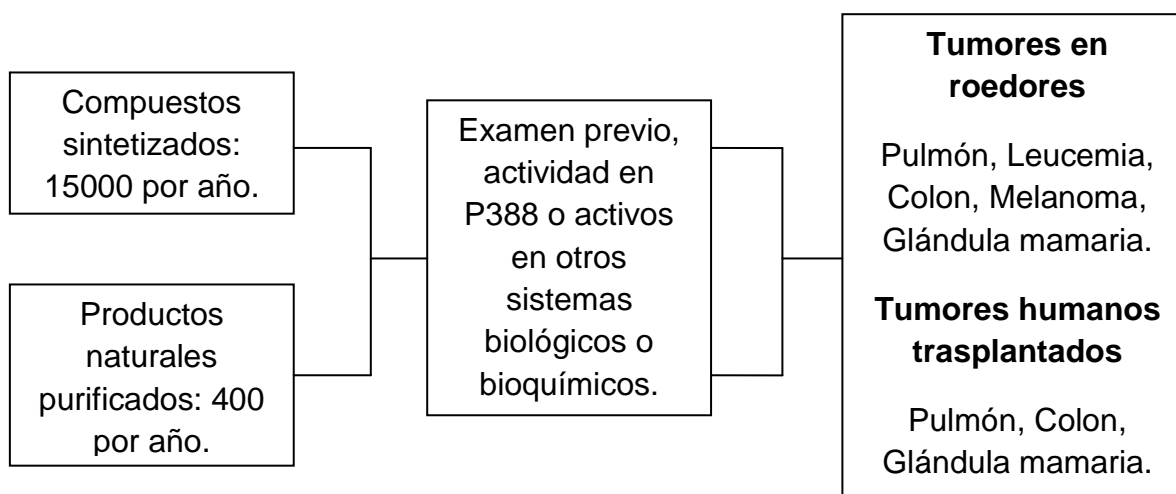
Lo anterior hace que los modelos de tumoración espontánea carezcan de un valor cuantitativo cuando se intenta establecer una respuesta frente a la dosificación de un compuesto.

Sin embargo obtener el máximo de utilidad de tumores trasplantables requiere la apreciación de ciertos principios biológicos básicos de trasplante, como son las técnicas involucradas en el trasplante de un hospedero a otro, la interpretación de los resultados y el cómo se aplican a la etiología y crecimiento de una neoplasia (29).

En el presente trabajo se utilizó el modelo de isotransplante de la línea celular Melanoma B16F10 en ratones de la cepa C57BL/6NHsd, esta cepa de ratones tiene la característica de ser singénica y homocigota, así mismo de incluir la región del complejo mayor de histocompatibilidad H-2^b. Su expectativa de vida es de 1000 días como máximo, con un promedio de 827 días para machos y 818 días para hembras (29, 30, 31).

El empleo de esta clase de animales que son genéticamente idénticos ofrece la ventaja de reducir al máximo la variabilidad genética entre individuos dándole mayor confiabilidad a los experimentos en los cuales sean usados. Además dado su haplotipo H-2^b, se garantiza el crecimiento de la línea tumoral Melanoma B16, de esta manera el efecto antitumoral puede ser atribuido solamente al fármaco (32).

Para esto se lleva a cabo un programa de cernimiento de actividad para fármacos antineoplásicos, tal como se muestra en el siguiente cuadro (33):



Se toma la decisión de continuar sólo si se demuestra que el compuesto o fármaco estudiado tiene efecto anticancerígeno contra uno de los tumores que se encuentran dentro del panel. Se recomienda la evaluación tanto *in vivo* como *in vitro* para conocer mejor la actividad antineoplásica del fármaco o compuesto.

5. Lineal tumoral Melanoma B16F10

La línea tumoral Melanoma B16F10, es tumorigénica y no metastásica en ratones singénicos de la cepa C57BL/6 y en los híbridos: CB6F1/NHsd y D2B6F1. Esta línea se desarrolló espontáneamente en la piel de la base de la oreja de un ratón de la cepa antes mencionada. Esta línea cuenta con características ectodérmicas y endodérmicas y su haplotipo es H-2^b. El Melanoma crece de células pigmentadas (melanocitos) en la capa exterior de la piel y en membranas mucosas (epidermis) (29, 34, 35, 36).

En experimentos previos con esta línea tumoral, se encontró que en ratones machos C57BL/6NHsd inoculados subcutáneamente con Melanoma B16F10 (1×10^6 células) tiene un promedio de vida de 25 días después de la inoculación y un porcentaje de incremento en peso al día de la muerte alrededor del 20% (19, 30).

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

Los compuestos NK82 y NBOB3 mostrarán una actividad antitumoral en el melanoma B16F10 tanto en cultivo como en ratones isotransplantados y será posible determinar su toxicidad aguda.

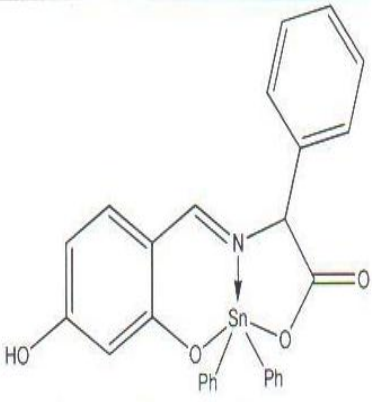
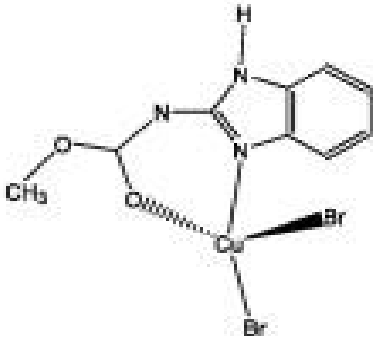
OBJETIVOS

- a) Determinar la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de NK82 en la línea celular Melanoma B16F10.
- b) Determinar la concentración inhibitoria 50 (IC_{50}) de NBOB3 en la línea celular Melanoma B16F10.
- c) Determinar la Dosis Letal media (DL_{50}) de NK82 administrada por vía intraperitoneal en ratones exogámicos de la estirpe Hsd:ICR.
- d) Determinar la DL_{50} de NBOB3 administrada por vía intraperitoneal en ratones Hsd:ICR.
- e) Evaluar la actividad antineoplásica de los 2 compuestos de coordinación *in vivo* en el modelo isotrasplatación murino Melanoma B16F10 a diferentes dosis y tratamientos.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Compuestos

Cuadro 4.- características de los compuestos utilizados.

| Compuesto | NK82 | NBOB3 |
|---------------------------|---|--|
| Estructura |  |  |
| Nombre IUPAC | 6-Aza-11-Hidroxi-1,3-dioxo-2,2,5-trifenil-2-estanabenzociclona-4-uno | Bromuro de 2-metil benzimidazol carbonato |
| Fórmula Condensada | $C_{27} H_{21} NO_4 Sn$ | $[Cu(2cmbz)Br_2] \cdot 1.5H_2O$ |
| Peso Molecular | 441.56 g/mol | 542.16 g/mol |
| Vehículo | 5% de Dimetilsulfóxido 95% de Carboximetil Celulosa al 0.4% | 3% de Alcohol Etílico 97% de agua estéril de uso Inyectable |

En el cuadro de arriba se muestra la forma en que se utilizó cada uno de los compuestos para su administración en el desarrollo para la evaluación de la actividad antineoplásica y la determinación de la DL₅₀.

2.- Metodología *in vitro*

2.1.- Descongelamiento de línea celular

Las células se encuentran originalmente en criotubos que se sacan del ultracongelador y se introducen en baño María a 37° C. En la campana de flujo laminar se prepara un tubo con 10 mL de medio High Glucose (GIBCO), en cuanto se observa el descongelamiento, se pasa la suspensión celular al tubo ya preparado y se centrifuga durante 5 minutos a 1500 rpm, el sobrenadante se desecha y el paquete celular se resuspende en 1 mL de medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino al 10%, aminoácidos, antibióticos, antifúngicos y se procede a la siembra en las botellas de cultivo.

2.2.- Obtención del cultivo stock a confluencia

Las células después de haber sido lavadas se colocaron en botellas de cultivo de 25 cm², con 5 mL de medio de cultivo adicionado con 10% de suero fetal bovino, este cultivo se incubó a 37° C ± 2° C y 5% de CO₂. Se revisó diariamente el cultivo para estimar el porcentaje de confluencia, cambiando el medio de cultivo cada 48 horas. Al tener el cultivo entre el 80 y 90% de confluencia se procedió a la tripsinización.

2.3.- Tripsinización

Una vez que se obtuvo el cultivo Stock a confluencia se aspiró el medio de cultivo de la caja, se lavó con 5 mL de PBS estéril, se aspiró, se adicionaron 3 mL de PBS-EDTA y 2 mL de la solución de Tripsina, se agitó hasta que al microscopio se observaron las células desprendidas de la superficie y disgregadas. Se detuvo la reacción de la Tripsina adicionando 5 ml de PBS-Albúmina estéril, esta suspensión se colocó en un tubo de polipropileno de 15 mL y se procedió a centrifugar a 1500

rpm durante 5 minutos. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en 1 ml de medio de cultivo.

2.4.- Cuantificación de Células

En un tubo de microfuga de 1.5mL se colocaron 20 μ L de la suspensión de células y 80 μ L de solución de azul tripano, se mezcla perfectamente y se transfirieron cuidadosamente a las dos secciones de la cámara de Neubauer. Se colocó el hematocitómetro en el microscopio óptico utilizando el objetivo de 10X, y se contó el número de células, teñidas y no teñidas por mm^2 , para que el conteo sea más preciso se recomienda que la cuenta sea de entre 100 y 500 células por mm^2 , la cuenta se repitió en las otras secciones y después se hicieron los cálculos correspondientes a la viabilidad y a el número de células por mL de suspensión.

$$\text{Cantidad de células} = X \times 5 \times 10000 = \frac{\text{células}}{\text{mL}}$$

Donde X, es el promedio de las células en los 4 cuadrantes, 5 es el factor de dilución y 10000 es el volumen de la cámara en μ L.

2.5.- Ensayo de Inhibición de la Proliferación Celular

Una vez cuantificadas las células, se sembraron las células en las placas de 96 pozos de la siguiente manera: se preparó una dilución celular de 10^6 células/mL del cual se agregó un volumen de 20 μ l a cada pozo con 100 μ L de medio suplementado, para tener 20,000 células/pozo.

Se incubó a 37°C y 5% de CO_2 por 24 horas para que se recuperaran de la tripsinización. Al término de las 24 horas se aspiró el medio y se adicionaron 90 μ L de medio con SFB y 10 μ L de cada una de las concentraciones de fármacos tal como se muestra en la tabla 4. Los fármacos se agregaron inmediatamente después de preparadas las disoluciones para evitar la degradación de los compuestos, y se dejó en incubación por 24 horas. Al término de la incubación se aspiró el medio y se fijaron las células con 100 μ L de ácido tricloroacético al 10%

durante una hora a 4° C. Se lavaron 5 veces con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente (37).

Cuadro 5.- Dosis utilizadas para obtener el IC₅₀.

| Compuesto | Dosis [µg/mL] |
|----------------|----------------------|
| Cisplatino | 5, 10, 15, 20. |
| Ciclofosfamida | 20, 40, 60, 80, 100. |
| NK82 | 1, 3, 6, 9, 12. |
| NBOB3 | 5, 10, 15, 20. |

Los compuestos: cisplatino y ciclofosfamida se utilizaron como controles positivos.

2.6.- Tinción con Sulforrodamina-B y Lectura

Se adicionaron 100 µL de la solución de Sulforrodamina B al 0.4 % (preparada en ácido acético al 1%) a cada uno de los pozos con células, y se dejó en incubación durante 30 minutos a temperatura ambiente. Después se lavaron 4 veces con ácido acético al 1%. El colorante celular se solubilizó con 100 µL de Tris base 10 mM (pH 10.5) durante 5 minutos y con agitación mecánica suave.

Finalmente el colorante celular se leyó en un lector de microplacas a 564 nm y se determinó la capacidad para inducir el 50% de inhibición de la capacidad proliferativa. Se consideró la proliferación celular máxima (100%) de los cultivos control, para este análisis se empleó el programa SP SS 16.0.

Figura 3.- Lectura de placas para determinación de la Cl_{50} .



3.- Metodología *in vivo*

3.1.- Animales

Para el estudio de la actividad antineoplásica se emplearon 40 machos de la cepa singénica C57BL/6NHsd con peso promedio de 25 ± 2 g de 6-7 semanas de edad.

3.2.- Determinación de la Dosis Letal 50 (DL_{50})

Para el ensayo de la dosis letal 50 (DL_{50}) se emplearon 60 ratones Hsd:ICR machos con un peso promedio de 24 ± 1 g y 5 semanas de edad.

Se seleccionaron 5 dosis dentro de un intervalo donde se esperaba encontrar la DL_{50} . La mortalidad de los animales se evaluó a las 24 horas de la administración y posteriormente se mantuvieron en observación durante un periodo de 14 día, al finalizar el estudio los animales que sobrevivieron se sacrificaron en la cámara de CO_2 (38).

La determinación de la Dosis Letal 50 (DL_{50}) se llevó a cabo considerando sólo aquellos animales que murieron durante las 24 horas posteriores a la administración de los compuestos NK82 y NBOB3.

La DL₅₀ hizo posible el diseño de la evaluación antineoplásica de los compuestos a estudiar empleando dosis iniciales que no comprometieran el ensayo por toxicidad aguda del compuesto.

3.3.- Línea tumoral murina Melanoma B16F10

Para el estudio de la evaluación antineoplásica se empleó la línea tumoral murina Melanoma B16F10.

- Descongelamiento de la línea tumoral murina

La línea tumoral murina Melanoma B16F10 se encontraba almacenada en un criotubo a -70°C (ultracongelador Revco) la cual fue descongelada en un baño María a 37°C.

Posteriormente en la campana de flujo laminar se vertió contenido del criotubo en un tubo estéril de propileno preparado previamente con 10 mL de medio DMEM y se centrifugó por cinco minutos a 1500 rpm.

El sobrenadante obtenido se desechó y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de medio DMEM High Glucose (GIBCO) suplementado con Suero Fetal Bovino (GIBCO) al 10%, aminoácidos esenciales, antibióticos y antifúngicos al 1%.

- Cuantificación de células

En un tubo de microcentrífuga de 1.5 mL, se colocaron 80 µL de azul tripano, y se adicionaron 20 µL de la suspensión celular, posteriormente se transfirió una alícuota de 20 µL a una de las secciones de la Cámara de Neubauer.

Posteriormente se llevó a cabo el conteo de células en cada uno de los cuatro cuadrantes de la cámara de Neubauer con ayuda de un microscopio óptico; la cantidad de células por mililitro de suspensión celular se calculó empleando la siguiente relación:

$$\text{Cantidad de células} = X \times 5 \times 10000 = \frac{\text{células}}{\text{mL}}$$

Donde X, es el promedio de las células en los 4 cuadrantes, 5 es el factor de dilución y 10000 es el volumen de la cámara en μL .

- Incubación

Bajo condiciones estériles dentro una campana de flujo laminar Clase II se adicionaron 15 mL del medio de cultivo RPMI (GIBCO) suplementado en una caja de cultivo estéril de 25 mL; posteriormente se adicionó una alícuota de la suspensión de células que contenía 600000 células. La caja se incubó a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de CO_2 .

El medio de cultivo se cambió cada 48 horas hasta que el cultivo celular alcanzó un 80% de confluencia, momento cuando el parecido morfológico y fisiológico de las células es mayor al modelo celular de origen.

- Tripsinización

Alcanzado el 80% de confluencia, bajo condiciones de estériles, se aspiró el medio de cultivo y se adicionaron 3 mL de la solución tripsina-EDTA al 0.25% (GIBCO). Posteriormente se incubó la caja por 5 minutos a una temperatura de 37°C y una atmósfera de 5% de CO_2 para que la tripsina destruyera la matriz extracelular.

Transcurrido los 5 minutos se agitó suavemente la caja de cultivo para facilitar el desprendimiento de las células y se adicionaron 9 mL de la mezcla nutritiva de F-12 (HAM) para detener la actividad de la tripsina. La suspensión de células se transfirió a un tubo estéril de propileno de 15 mL y se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm. Después se aspiró el sobrenadante y se adicionó 1 mL de medio RPMI no suplementado para resuspender las células y así continuar con el siguiente paso.

- Propagación

Las células resuspendidas en el paso anterior se incubaron en cajas de cultivo nuevas, hasta observar confluencia, posteriormente se repitió el proceso de tripsinización y cuantificación (métodos anteriormente descritos).

Una vez conocido el número de células por mL se llevó a cabo una dilución con solución HAM para obtener una concentración de 1×10^6 células/mL.

- Implante

El implante celular se realizó utilizando una vía subcutánea en la región inguinal de ratones C57BL/6NHsd, tomando en cuenta que cada ratón recibiera 10^6 células. Los animales inyectados permanecieron en observación durante un periodo de 15 días, tiempo en el cual el tumor se hace visible y es posible realizar el trasplante de ratón a ratón.

Con este tipo de preservación la línea celular tiene una viabilidad en condiciones genéticas adecuadas para experimentar de 3-4 meses (36, 39).

3.4.- Trasplante tumoral

El trasplante de Melanoma B16F10 se llevó a cabo por inoculación subcutánea en la región inguinal de los animales de experimentación.

Forma de preparación del inóculo:

- Se extrajo un gramo de masa tumoral del ratón, evitando los bordes con la finalidad de obtener células viables, el cual se lavó con PBS (REPROQUIFIN) estéril, y posteriormente se colocó en una caja Petri con 10 mL de PBS.

- La masa tumoral fue disgregada con ayuda de un bisturí estéril, esta suspensión celular se filtró utilizando una gasa estéril y se homogenizó mediante agitación en un agitador de toque (vortex).
- Se cuantifica un implante de 1×10^6 células /mL (metodología descrita anteriormente) para inocular por vía subcutánea a cada uno de los ratones a utilizar en el ensayo de actividad antineoplásica.

3.5.- Evaluación antineoplásica

La evaluación de la actividad antineoplásica de los compuestos a estudiar se llevó a cabo siguiendo los protocolos internacionales de evaluación descritos por el NCI (40).

Para realizar este ensayo se emplearon 40 ratones de la cepa C57BL/6NHsd, los cuales fueron alojados bajo condiciones ambientales controladas dentro de la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA) de la Facultad de Química, UNAM cumpliendo con la NOM 062-200-1999.

Posteriormente se formaron 8 grupos con 5 ratones cada uno, cada grupo se separó en diferentes jaulas y los animales fueron pesados y marcados de forma permanente en la oreja con una numeración del 1-40.

El esquema de tratamiento para cada uno de los grupos utilizados se presenta en la siguiente tabla:

Cuadro 6.- Esquema de tratamientos utilizados.

| Grupo | Compuesto | Esquema de Tratamiento | Dosis empleada |
|-------|--------------------------|--------------------------------------|----------------|
| 1 | Ciclofosfamida (control) | Crónico qd 1-9 | 50 mg/kg |
| 2 | Agua (testigo) | qd 1-9 | 0.5 ml |
| 3 | NK82 | Intermitente qd 3x4 Días 1,4,7,10 | 7 mg/kg |

| | | | |
|---|-------|--------------------------------------|------------|
| 4 | NK82 | Intermitente qd 4x3 Días 1,5,9 | 9.33 mg/kg |
| 5 | NK82 | Crónico qd 1-9 | 3.11 mg/kg |
| 6 | NBOB3 | Intermitente qd 3x4 Días 1,4,7,10 | 5 mg/kg |
| 7 | NBOB3 | Intermitente qd 4x3 Días 1,5,9 | 6.66 mg/kg |
| 8 | NBOB3 | Crónico qd1-9 | 2.22 mg/kg |

qd 4x3.- una administración cada 4 días, con un total de 3 administraciones

qd 3x4.- una administración cada 3 días, con un total de 4 administraciones

El grupo 1 o control esta conformado por individuos que recibieron el inóculo tumoral y tratamiento con Ciclofosfamida en su presentación comercial (Genoxal®) en una dosis de 50 mg/kg. Este fármaco tiene actividad antineoplásica conocida, así mismo sirve para validar el método de evaluación.

El grupo 2 o testigo esta conformado por ratones que recibieron el inóculo tumoral y no recibieron tratamiento alguno. De esta forma se pudo evaluar la evaluación del tiempo de vida y el incremento en peso de condiciones normales de desarrollo tumoral.

Los grupos tres, cuatro y cinco están conformados por individuos que recibieron el inóculo tumoral y tratamiento con el compuesto nombrado NK82. Los grupos seis, siete y ocho están conformados por ratones que recibieron el inóculo tumoral y un tratamiento con el compuesto nombrado NBOB3 en dosis correspondientes al 13, 17.5 y 5.82 % de las dosis letal 50 del compuesto.

Con estos tratamientos evaluamos si los compuestos NK82 y NBOB3 tienen alguna acción que altere el crecimiento tumoral y por tanto retrasan el día de muerte con respecto a los animales del grupo testigo negativo.

Las soluciones se prepararon a una concentración adecuada para cada uno de los tratamientos, de tal forma que la dosis administrada a cada ratón estuviese

contenida en un volumen no mayor a 0.5 mL. Después de los días de administración de cada tratamiento los ratones permanecieron en observación hasta su muerte.

Las variables de respuesta que se registraron a lo largo de la evaluación fueron el peso corporal (diario) y día de muerte. Con estos datos se evaluó el potencial de actividad del NK82 y NBOB3 mediante cálculos matemáticos y estadísticos.

3.6.- Tratamiento de resultados y análisis estadístico

Para poder evaluar la actividad antineoplásica de los tratamientos con NK82 y NBOB3, es necesario emplear un análisis estadístico, para poder concluir con un determinado grado de confianza si los tratamientos empleados dentro de este experimento fueron eficaces o no. A continuación se describe el tratamiento matemático efectuado para cada uno de los datos obtenidos.

3.6.1.- Porcentaje de incremento de peso (%IP)

Este parámetro es calculado con el peso corporal diario de los individuos pertenecientes a cada grupo. Se considera que todo incremento en el peso corporal de los individuos con respecto a su peso inicial es debido al incremento del tumor. El incremento en peso está definido de la siguiente forma:

$$\% IP = \frac{Xy - X0}{Xy} * 100\%$$

Donde:

X₀: peso corporal promedio al día 0.

X_y: peso corporal promedio al día y.

y: cualquier día durante el tiempo de ensayo.

3.6.2.- Índice de sobrevida (Increased Life Span, ILS)

Llamamos sobrevida al retardo en el día de muerte con respecto al grupo testigo de al menos un día. El índice de sobrevida se calcula de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$ILS = 100 * \frac{\text{Mediana del tiempo de vida del grupo T}}{\text{Mediana del tiempo de vida del grupo C}} - 100$$

Donde:

T = grupo X (puede ser cualquiera de los grupos tratados).

C = grupo control.

El criterio de aceptación por parte del National Cancer Institute y la “American Association for Cancer Research” para considerar la evaluación efectiva en cuanto a la actividad antineoplásica para esta línea celular es obtener un ILS \geq a 25.

3.6.3.- Análisis estadístico en función del incremento en peso

Para realizar los resultados en función del porcentaje de incremento en peso se emplea una prueba de análisis de varianza (ANDEVA) para el día 1, 5 y el día 15 del experimento, se escogen estos días debido a que posterior a estas fechas ya no se cuenta con la población muestral completa.

Se considera al porcentaje de incremento en peso como un índice para poder evaluar el crecimiento tumoral y la toxicidad del compuesto utilizado.

Y se cuantifica con el objeto de analizar si existen diferencias significativas entre el crecimiento tumoral de un grupo con respecto a otro a un día en específico, de esta misma forma también es posible evaluar si el tratamiento está dando un buen resultado.

Para realizar la ANDEVA se construye la siguiente tabla:

| Fuente de variación. | Suma de cuadrados (SC). | Grados de libertad (GL). | Cuadrado de la media (CM). | Razón de varianza (F calculada). |
|----------------------|---|--------------------------|----------------------------|----------------------------------|
| Tratamientos. | $\sum_{j=1}^k n_j (X_{.j} - X_{..})^2$ | k-1 | SC trat /GL trat | CM trat/CM error |
| Error. | $\sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^{n_j} (X_{ij} - X_{.j})^2$ | N-k | SC erro/GL error | |
| Total. | $\sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^{n_j} (X_{ij} - X_{..})^2$ | N-1 | | |

El valor crítico F se obtiene de manera directa al utilizar el programa estadístico SPSS 16.0.

ANDEVA nos dice si al menos uno de los tratamientos es diferente, sin embargo para saber cuál de ellos es el diferente es necesario realizar un análisis de comparaciones múltiples de medias mediante la prueba de Tukey, por medio de la cual se comparan todas las parejas de grupos posibles y se determina cuál de ellas presenta diferencias estadísticamente significativas en sus medidas de incremento en peso.

La prueba de Tukey utiliza un solo valor con el cual se comparan todas las diferencias. Este valor llamado DVS (diferencia verdaderamente significativa), está dada por la expresión:

Donde α es el nivel de significación elegido, κ el número de medias en el experimento, N el número total de observaciones en el experimento, n el número de observaciones en el tratamiento, CM_{error} el cuadrado medio del error de la tabla de ANDEVA y q , que se obtiene consultando tablas de Tukey con α , κ , y N- κ .

Se calculan todas las diferencias posibles entre las parejas de medias y cualquier diferencia que proporcione un valor absoluto que exceda de la DVS se considera como significativa.

3.6.4.- Tratados/Control (T/C)

Este parámetro se puede evaluar tanto en peso como en sobrevida. Definido como:

$$\frac{T}{C} = \frac{X_t}{X_c} * 100$$

Donde:

X_t = Promedio en peso o sobrevida del grupo t.

X_c = Promedio en peso corporal o sobrevida del grupo testigo.

3.6.5.- Análisis de sobrevivencia

Para realizar este estudio es necesario definir la fecha de comienzo y la fecha de finalización del seguimiento, con la que se calcularán posteriormente los tiempos de sobrevivencia de los sujetos de experimentación.

El tiempo de sobrevivencia se define entonces como el transcurrido desde la fecha de comienzo del seguimiento hasta la fecha de último contacto con el sujeto de experimentación.

Existen distintos procedimientos que permiten estimar curvas de sobrevida, aunque quizás uno de los más populares en la investigación clínica sea el método de Kaplan-Meier. Es un método no paramétrico, con muy pocas restricciones; de hecho, lo único que supone es que los sujetos censurados se habrían comportado del mismo modo que los seguidos hasta que se produjo el evento (lo que se conoce por “censura no informativa”).

Para aplicar este método se ordenan de menor a mayor todos los tiempos de sobrevivencia observados, anotando para cada uno de ellos el número de muertes y censuras producidas. Para cada periodo de tiempo se calcula la probabilidad de sobrevivir, y la función de Kaplan-Meier es “la probabilidad de sobrevivencia individual acumulada a lo largo del tiempo”.

Sin embargo el método más común de comparar tiempos de supervivencia de grupos independientes es la prueba Log-Rank. Esta es una prueba de hipótesis donde la hipótesis nula asumida es que los grupos que se comparan tienen igual supervivencia. El principio de la prueba Log-Rank es dividir el tiempo de supervivencia (41, 42, 43).

El valor de probabilidad (p) para rechazar o aceptar la hipótesis nula se obtiene de manera directa al utilizar el programa estadístico SPSS 16.0.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Determinación Concentración Inhibitoria 50 (CI₅₀)

En el siguiente cuadro se observa que las concentraciones inhibitorias obtenidas por los compuestos NBOB3 Y NK82 utilizados son menores que las de los fármacos Cisplatino y Ciclofosfamida.

Cuadro 7.- Resultados obtenidos del CI₅₀.

| Compuesto | Límite inferior [μM] | IC ₅₀ [μM] | Límite superior [μM] |
|----------------|----------------------|-----------------------|----------------------|
| Cisplatino | 63.31 | 73.92 | 93.21 |
| Ciclofosfamida | 211.74 | 239.88 | 277.21 |
| NK82 | 10.22 | 12.06 | 14.28 |
| NBOB3 | 35.61 | 41.68 | 52.94 |

2. Determinación Dosis Letal 50 (DL₅₀)

Las dosis utilizadas y los resultados obtenidos para la determinación de la DL₅₀ del compuesto NBOB3 se muestran en la siguiente tabla.

Cuadro 8.- Resultados obtenidos post-administración (24h).

| Dosis (mg/kg) | Animales Administrados | Animales Muertos |
|---------------|------------------------|------------------|
| 25 | 5 | 0 |
| 30 | 5 | 1 |
| 35 | 5 | 2 |
| 40 | 5 | 3 |
| 45 | 5 | 4 |
| 50 | 5 | 4 |

En el siguiente cuadro se muestra el resultado de la dosis letal 50 (DL₅₀) obtenida para el compuesto NBOB3 por vía intraperitoneal (IP) en ratones machos Hsd:ICR.

Cuadro 9. – Valor de la DL₅₀ del compuesto NBOB3.

| DL ₅₀ (mg/kg de peso) de NBOB3 | | Intervalo de confianza (α=0.05) | |
|--|------------------|------------------------------------|-----------------|
| Vía de administración | DL ₅₀ | Límite inferior | Límite Superior |
| Intraperitoneal | 38.038 | 32.159 | 44.910 |

En el siguiente cuadro se muestran las dosis utilizadas para la determinación de la dosis letal 50 del compuesto NK82.

Cuadro 10.- Resultados obtenidos post-administración (24 h).

| Dosis (mg/kg) | Animales Administrados | Animales Muertos |
|---------------|------------------------|------------------|
| 5 | 5 | 0 |
| 15 | 5 | 0 |
| 25 | 5 | 0 |
| 50 | 5 | 0 |
| 75 | 3 | 0 |
| 100 | 3 | 0 |
| 120 | 3 | 0 |
| 240 | 3 | 1 |

Sin embargo, como se observa en el cuadro anterior, la dosis máxima utilizada fue de 240 mg/kg debido a que a dosis superiores a esta, al tratar de disolver el compuesto este formaba pequeños cristales, los cuales no hacían posible la administración del mismo.

3. Evaluación Biológica

Los resultados obtenidos de esta evaluación muestran la gráfica de incremento en peso, día promedio de muerte a índice de sobrevivencia. Los análisis estadísticos realizados se muestran en el anexo A y B.

- T/C calculado con el día promedio de muerte y el peso promedio al día 1, 5 y 15.

Se observa que para los valores de T/C para el día 1 son cercanos a 100 ± 6.0 lo cual nos indica que los grupos son homogéneos en cuanto al peso al inicio del experimento, ya que la evaluación de la actividad antineoplásica, está basada en la relación existente entre el incremento de peso corporal y del crecimiento tumoral.

Al día 5 no se observa ningún aumento en el valor de T/C ya que sólo se observa un aumento mínimo del 0.6 con respecto al día 1.

En cambio al día 15 ya se observa el aumento en el valor de T/C lo cual es resultado del aumento en peso por la masa tumoral. Sin embargo los valores de T/C para el grupo control van disminuyendo conforme pasan los días, lo que indica que de cierta forma es el grupo en el que el crecimiento tumoral es más lento.

Así mismo, en los resultado de T/C calculados con el índice de supervivencia se observa una gran diferencia entre el grupo control y el del tratado con NBOB3 en una dosis de 5 mg/kg de más del 35% con lo cual nos damos cuenta de que este tratamiento provoca un efecto tóxico en los animales, ya que dichos animales se mueren antes que los del testigo.

Cuadro 11.- T/C de peso promedio al día 1, 5 y 15.

| Día de evaluación | Control positivo | NK82 [3.11mg/kg] | NK82 [7mg/kg] | NK82 [9.33mg/kg] | NBOB3 [2.22mg/kg] | NBOB3 [5mg/kg] | NBOB3 [6.66mg/kg] |
|-------------------|------------------|------------------|---------------|------------------|-------------------|----------------|-------------------|
| 1 | 104.7 | 105.5 | 106 | 100.5 | 102.7 | 106 | 105.7 |
| 5 | 101.5 | 102.1 | 104.5 | 98.5 | 100.4 | 102.9 | 106.6 |
| 15 | 99.9 | 106.3 | 108 | 104.9 | 109.5 | 114.4 | 115.8 |

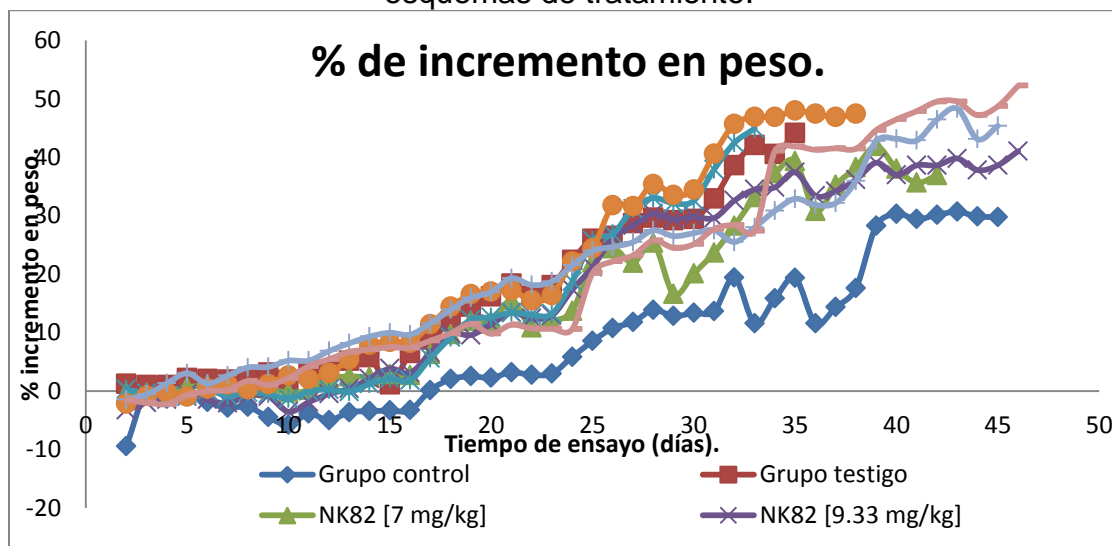
Cuadro 12.- T/C del día de muerte de los diferentes esquemas de tratamiento.

| Control positivo | NK82 [3.11mg/kg] | NK82 [7mg/kg] | NK82 [9.33mg/kg] | NBOB3 [2.22mg/kg] | NBOB3 [5mg/kg] | NBOB3 [6.66mg/kg] |
|------------------|------------------|---------------|------------------|-------------------|----------------|-------------------|
| 118.18 | 93.10 | 81.53 | 109.43 | 101.56 | 75.92 | 156.09 |

- Porcentaje de incremento en peso

La gráfica muestra que el incremento en peso del grupo testigo se da de forma semejante que el del tratamiento con NK82 y NBOB3; sin embargo el peso corporal de los animales que recibieron el tratamiento con Ciclofosfamida desciende durante los días de administración. Posteriormente a este periodo, empiezan a recuperar peso y a incrementarlo de forma gradual, pero sin alcanzar el desarrollo tumoral de los otros siete tratamientos.

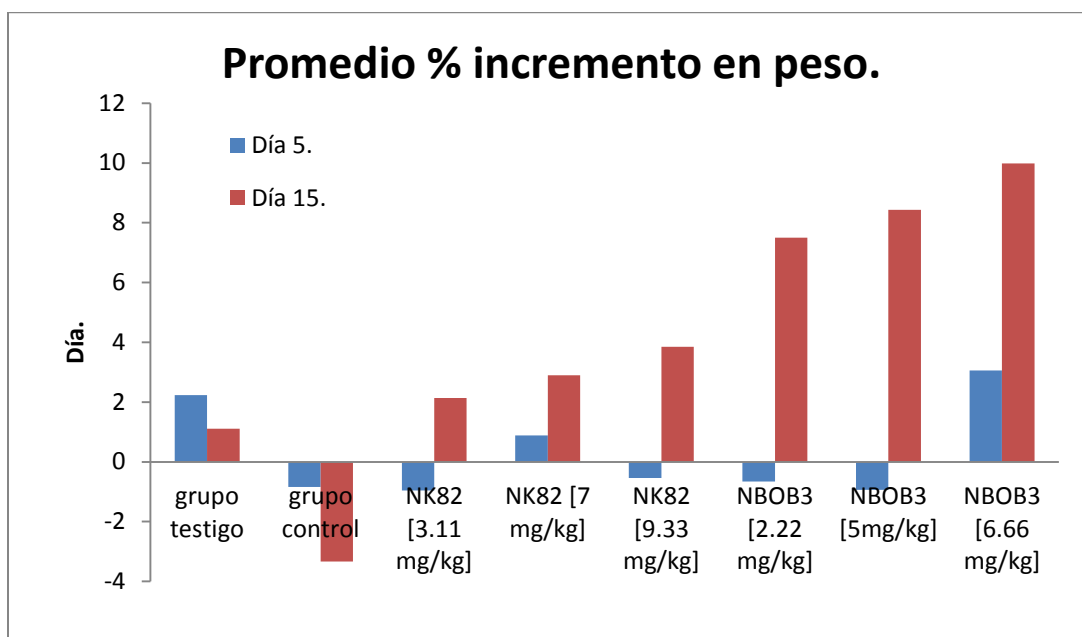
Gráfico 1.- Porcentaje de incremento en peso corporal de los diferentes esquemas de tratamiento.



- Análisis en función del incremento en peso

En este apartado se muestran los valores de incremento de peso corporal para cada grupo evaluado a los días 5 y 15.

Gráfico 2.- Histograma de promedio del porcentaje de incremento en peso para los días 5 y 15.



Se observa que al día 5 existe un decremento en el peso corporal promedio en el grupo control al cual fue administrado con Ciclofosfamida, dos grupos de NK82 con dosis de 9.33 y 3.11 mg/kg; así como dos grupos del tratamiento con NBOB3 en dosis de 5 y 2.22 mg/kg lo cual probablemente se deba a efectos de la administración de los compuestos.

Para el día 15 de evaluación la diferencia entre las medias de porcentaje de incremento en peso son muy notorias ya que en los tratamientos con NBOB3 en las tres diferentes dosis hay un aumento de más del 7-8% con respecto al control negativo, mientras que los animales administrados con NK82 no tienen un aumento mayor del 3% con respecto al mismo grupo testigo.

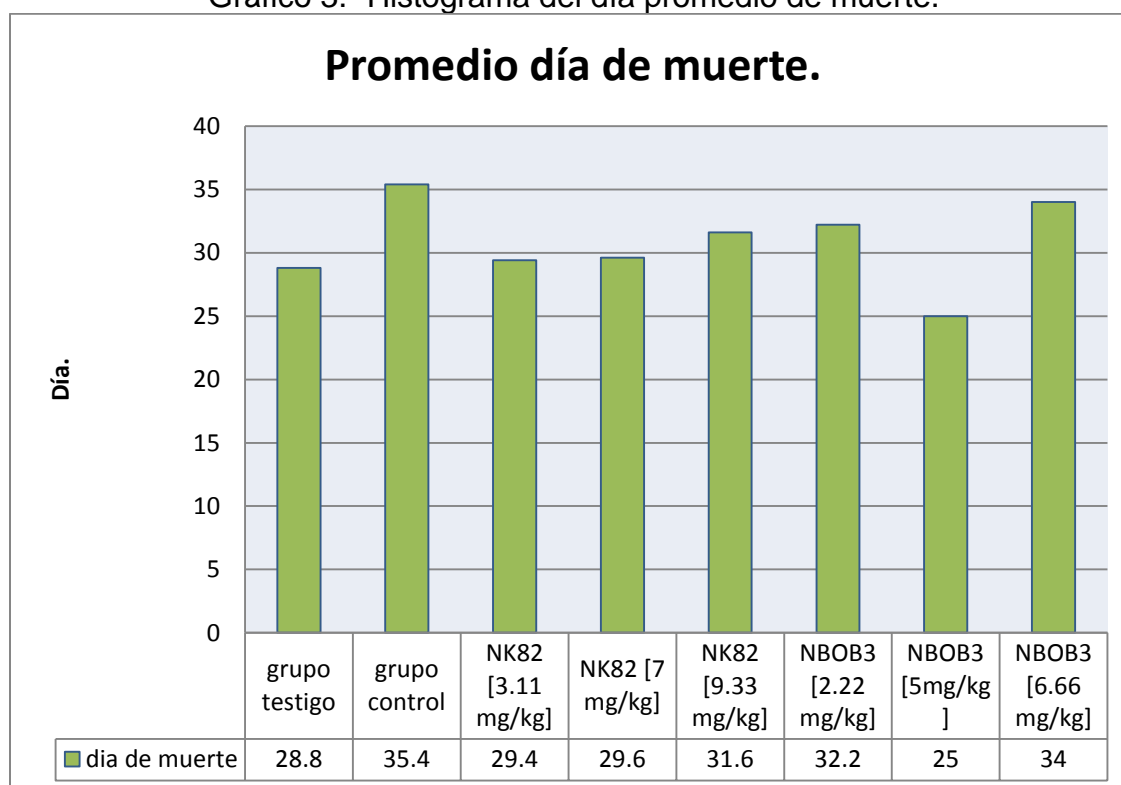
Sin embargo el grupo control sigue mostrando una disminución en el porcentaje de incremento de peso respecto al grupo testigo (animales administrados con agua), este probablemente se deba al efecto antineoplásico de la Ciclofosfamida.

- Día promedio de muerte

En la gráfica se muestra que existen diferencias en la fecha promedio de muerte de los diferentes grupos pero con un máximo de 10 días de diferencia entre ellos, así mismo se observa que el grupo tratado con NBOB3 en una dosis de [5mg/kg] muestra el valor más bajo del día promedio de muerte y el índice de sobrevivencia.

También podemos observar que el grupo utilizado como control tiene el mayor valor del día promedio de muerte lo cual era de esperar ya que estos animales fueron administrados con Ciclofosfamida; un fármaco ya aprobado para combatir el cáncer.

Gráfico 3.- Histograma del día promedio de muerte.



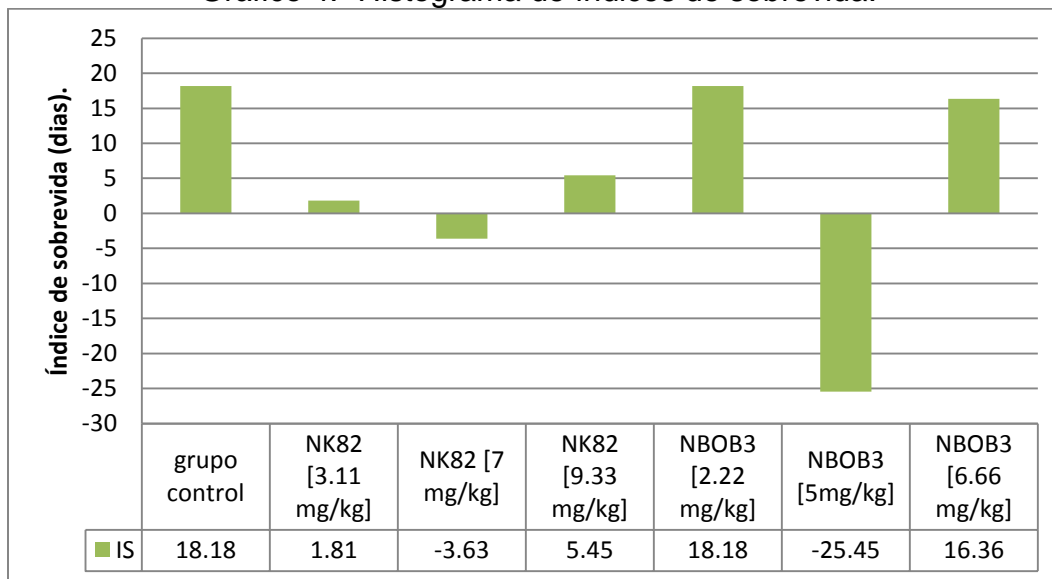
- Índice de sobrevida

En el siguiente gráfico se observa que el grupo control y el administrado con NBOB3 en una dosis de 5 mg/kg en un tratamiento qd 4x3 muestran índices de sobrevida negativos, lo cual era de esperar por parte del grupo testigo ya que en este tratamiento no se administra nada que pueda interactuar con las células tumorales; sin embargo en el grupo de NBOB3 en dosis de 5 mg/kg muestra el menor índice de sobrevida (-25.45) lo cual se debe a un efecto toxico producido por parte del compuesto en los animales probablemente debido a que los animales todavía no metabolizan ni eliminan el compuesto y ya se está llevando la siguiente administración.

El grupo tratado con Ciclofosfamida y el grupo administrado con NBOB3 en una dosis de 6.66 mg/kg tienen el mismo índice de sobrevida (18.18), si bien este no cumple con el requisito de los protocolos internacionales ($ILS \geq 25$) para poder pasar a una evaluación secundaria, aun así hay que poner atención en este compuesto ya que obtuvo el mismo resultado de la Ciclofosfamida siendo este un fármaco ya aprobado por la "Food and Drug Administration" para combatir las células tumorales.

Los resultados en la prueba de ANDEVA, demuestran que existe diferencia en los tratamientos utilizados. Sin embargo con los resultados obtenidos en la prueba de Tukey podemos observar que el grupo o tratamiento 7, donde se utilizó en compuesto NBOB3 en una dosis de 6.66 mg/kg es el que demuestra mayor diferencia a los otros grupos utilizados en el experimento.

Gráfico 4.- Histograma de índices de sobrevida.



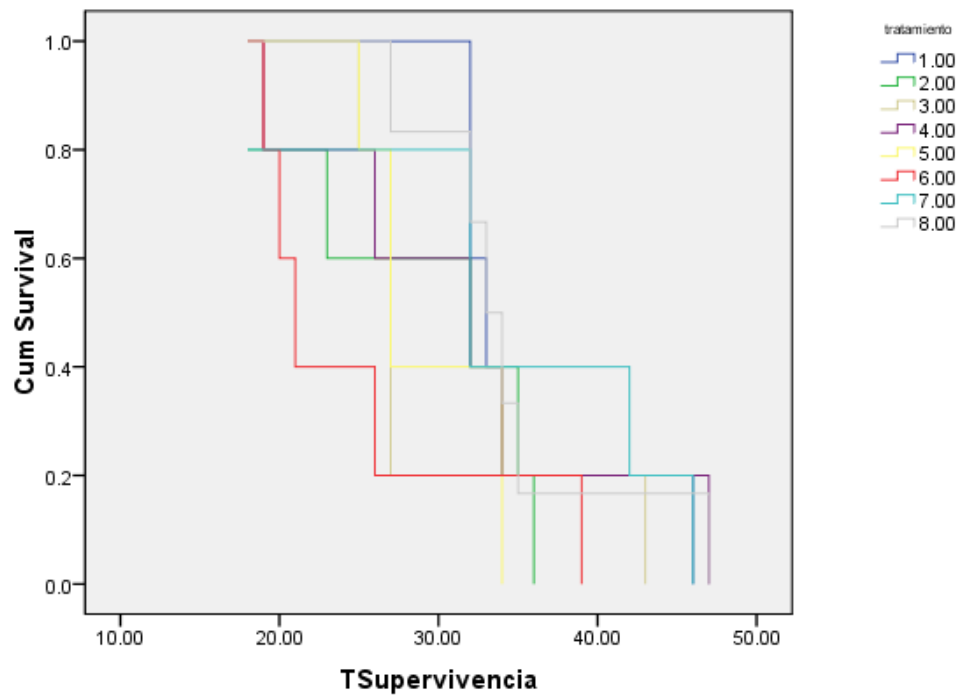
- Log-Rank

Como podemos apreciar hay una separación entre las curvas de sobrevivencia de cada grupo, sin embargo se observa que la del grupo control tiene una mayor sobrevivencia, sin embargo el test estadístico Log Rank nos presenta una probabilidad de $\rho = 0.497$ la cual permite rechazar la hipótesis nula (H_0), con lo cual podemos decir que existen diferencias estadísticamente significativas en la sobrevivencias de los diferentes tratamientos. Cabe destacar que en este apartado todos los tratamientos se compararon con el grupo testigo.

Cuadro 13.- Cálculo de probabilidad Log Rank.

| Comparaciones globales | | | |
|-------------------------------|----------|--------------------|--------|
| | χ^2 | Grados de libertad | ρ |
| Log Rank (Mantel-Cox) | 6.376 | 7 | .497 |

Survival Functions



Tratamientos.- 1) Grupo control , 2) Grupo testigo, 3) NK83 4x3, 4) NK82 3x4, 5) NK82 1-9, 6) NBOB3 4x3, 7) NBOB3 3x4 y 8) NBOB3 1-9.

CONCLUSIONES

Si bien en un sentido estricto para todos los compuestos no se obtuvo un índice de sobrevida mayor al valor mínimo requerido por el “National Cancer Institute” (≥ 25), cabe destacar la actividad del fármaco NBOB3.

Dicho compuesto obtuvo los mejores resultados utilizando un tratamiento intermitente (1, 5 y 9) y un tratamiento crónico (1-9), estos resultados son alentadores para seguir con el estudio de este compuesto, tanto en sus propiedades farmacológicas (nuevos esquemas de tratamiento, mecanismo de acción, etc.) como en sus propiedades toxicológicas (dosis letal media, NOAEL; LOAEL, etc.)

Sin embargo hay que tener en cuenta que será necesario completar el panel de evaluación ya que es necesario que el compuesto demuestre actividad sólo en uno de los tumores isotransplantados para considerarlo candidato a más estudios.

La dosis de 5mg/kg en un esquema de 3x4 resulta tóxica, no obstante es pertinente mencionar que la mayoría de los agentes quimioterapéuticos tienen un margen terapéutico muy pequeño por lo que se sugiere evaluar otras dosis y esquemas de tratamiento.

Así mismo debe considerarse evaluar estas mismas dosis en los diferentes modelos murinos de isotransplatación sugeridos por el National Cancer Institute: Sarcoma S180 y Leucemia L1210.

Así mismo con el compuesto NK82 no se logró obtener la dosis letal media ni resultados satisfactorios al evaluar la actividad antineoplásica con las dosis y tratamientos utilizados, sin embargo es recomendable ensayar dosis mayores y hasta 240 mg/kg.

ANEXOS

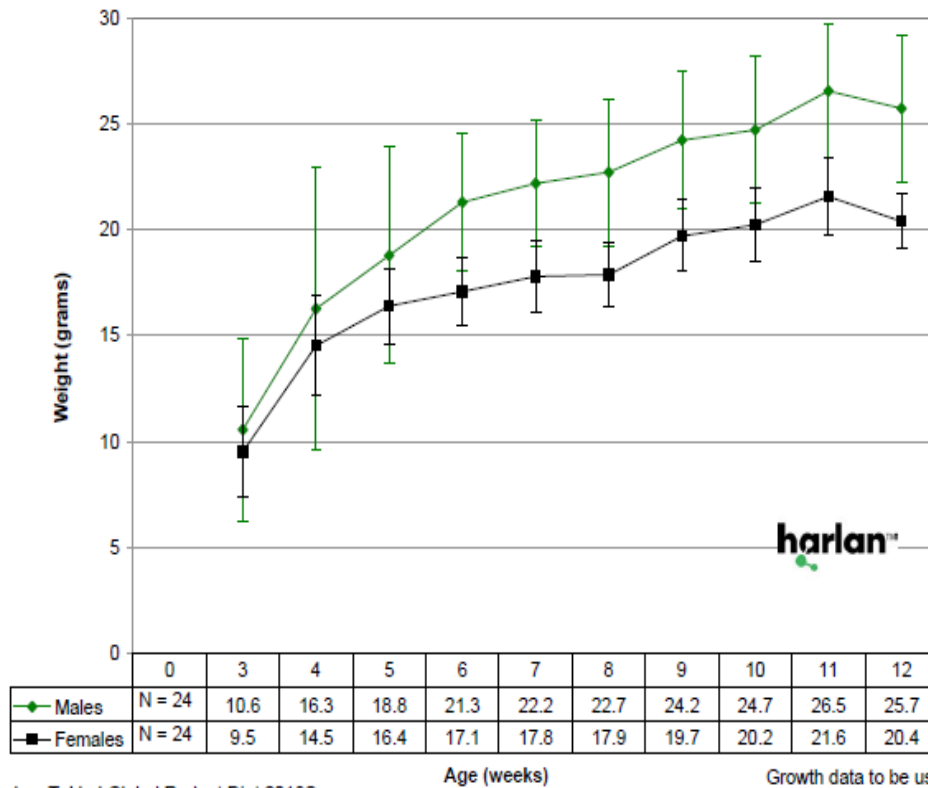
CURVA DE CRECIMIENTO

C57BL/6NHsd

Harlan Laboratories Inc., USA
Barrier 217, Indianapolis, IN
2006

C57BL/6NHsd

Cage floor space: 120.75 in²
Cage density: 24



Maintained on Teklad Global Rodent Diet 2018S
(18% protein)

Growth data to be used as a guideline only.
Data can be subject to differences in maintenance of mice.
Growth chart includes mean \pm 2 SD's representing population distribution.

PRUEBAS ESTADISTICAS

- **Análisis de concentración inhibitoria 50**

- Cisplatino.

| Límites de confianza | | | | | | | |
|----------------------|--------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|
| | Probabilidad | 95% Límites de confianza para dosis | | | 95% Límites de confianza en log(dosis) ^b | | |
| | | Estimado | Límite inferior | Límite superior | Estimado | Límite inferior | Límite superior |
| PROBIT ^a | 0.01 | 2.334 | 1.280 | 3.353 | .368 | .107 | .525 |
| | 0.02 | 3.039 | 1.820 | 4.148 | .483 | .260 | .618 |
| | 0.03 | 3.593 | 2.273 | 4.751 | .555 | .357 | .677 |
| | 0.04 | 4.075 | 2.687 | 5.263 | .610 | .429 | .721 |
| | 0.05 | 4.514 | 3.077 | 5.722 | .655 | .488 | .758 |
| | 0.06 | 4.925 | 3.453 | 6.146 | .692 | .538 | .789 |
| | 0.07 | 5.317 | 3.818 | 6.545 | .726 | .582 | .816 |
| | 0.08 | 5.693 | 4.177 | 6.927 | .755 | .621 | .841 |
| | 0.09 | 6.059 | 4.532 | 7.295 | .782 | .656 | .863 |
| | 0.1 | 6.416 | 4.883 | 7.653 | .807 | .689 | .884 |
| | 0.15 | 8.134 | 6.624 | 9.373 | .910 | .821 | .972 |
| | 0.2 | 9.822 | 8.371 | 11.105 | .992 | .923 | 1.046 |
| | 0.25 | 11.547 | 10.122 | 12.984 | 1.062 | 1.005 | 1.113 |
| | 0.3 | 13.352 | 11.856 | 15.127 | 1.126 | 1.074 | 1.180 |
| | 0.35 | 15.276 | 13.573 | 17.625 | 1.184 | 1.133 | 1.246 |
| | 0.4 | 17.357 | 15.305 | 20.545 | 1.239 | 1.185 | 1.313 |
| | 0.45 | 19.641 | 17.097 | 23.959 | 1.293 | 1.233 | 1.379 |
| | 0.5 | 22.181 | 18.999 | 27.970 | 1.346 | 1.279 | 1.447 |
| | 0.55 | 25.050 | 21.065 | 32.728 | 1.399 | 1.324 | 1.515 |
| | 0.6 | 28.345 | 23.358 | 38.453 | 1.452 | 1.368 | 1.585 |
| 0.65 | 32.207 | 25.959 | 45.476 | 1.508 | 1.414 | 1.658 | |
| 0.7 | 36.847 | 28.989 | 54.320 | 1.566 | 1.462 | 1.735 | |
| 0.75 | 42.609 | 32.634 | 65.849 | 1.629 | 1.514 | 1.819 | |
| 0.8 | 50.090 | 37.210 | 81.642 | 1.700 | 1.571 | 1.912 | |
| 0.85 | 60.483 | 43.334 | 104.954 | 1.782 | 1.637 | 2.021 | |
| 0.9 | 76.678 | 52.458 | 144.055 | 1.885 | 1.720 | 2.159 | |
| 0.91 | 81.200 | 54.931 | 155.518 | 1.910 | 1.740 | 2.192 | |
| 0.92 | 86.415 | 57.749 | 169.011 | 1.937 | 1.762 | 2.228 | |
| 0.93 | 92.538 | 61.012 | 185.210 | 1.966 | 1.785 | 2.268 | |

| | | | | | | | |
|---------------------------------------|------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|
| | 0.94 | 99.889 | 64.873 | 205.150 | 2.000 | 1.812 | 2.312 |
| | 0.95 | 108.989 | 69.572 | 230.535 | 2.037 | 1.842 | 2.363 |
| | 0.96 | 120.745 | 75.526 | 264.414 | 2.082 | 1.878 | 2.422 |
| | 0.97 | 136.949 | 83.543 | 312.980 | 2.137 | 1.922 | 2.496 |
| | 0.98 | 161.904 | 95.524 | 391.659 | 2.209 | 1.980 | 2.593 |
| | 0.99 | 210.787 | 117.970 | 557.806 | 2.324 | 2.072 | 2.746 |
| a. Factor de heterogeneidad utilizado | | | | | | | |
| b. Logaritmo base = 10 | | | | | | | |

➤ Ciclofosfamida

| Límites de confianza | | | | | | | |
|----------------------|--------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|
| | Probabilidad | 95% Límites de confianza para dosis | | | 95% Límites de confianza en log(dosis) ^b | | |
| | | Estimado | Límite inferior | Límite superior | Estimado | Límite inferior | Límite superior |
| PROBIT ^a | 0.01 | 9.833 | 5.365 | 14.245 | .993 | .730 | 1.154 |
| | 0.02 | 12.311 | 7.221 | 17.093 | 1.090 | .859 | 1.233 |
| | 0.03 | 14.198 | 8.716 | 19.196 | 1.152 | .940 | 1.283 |
| | 0.04 | 15.806 | 10.039 | 20.952 | 1.199 | 1.002 | 1.321 |
| | 0.05 | 17.248 | 11.260 | 22.503 | 1.237 | 1.052 | 1.352 |
| | 0.06 | 18.577 | 12.413 | 23.917 | 1.269 | 1.094 | 1.379 |
| | 0.07 | 19.828 | 13.518 | 25.233 | 1.297 | 1.131 | 1.402 |
| | 0.08 | 21.018 | 14.590 | 26.477 | 1.323 | 1.164 | 1.423 |
| | 0.09 | 22.163 | 15.636 | 27.665 | 1.346 | 1.194 | 1.442 |
| | 0.1 | 23.272 | 16.662 | 28.809 | 1.367 | 1.222 | 1.460 |
| | 0.15 | 28.485 | 21.645 | 34.129 | 1.455 | 1.335 | 1.533 |
| | 0.2 | 33.448 | 26.572 | 39.162 | 1.524 | 1.424 | 1.593 |
| | 0.25 | 38.391 | 31.580 | 44.213 | 1.584 | 1.499 | 1.646 |
| | 0.3 | 43.448 | 36.729 | 49.498 | 1.638 | 1.565 | 1.695 |
| | 0.35 | 48.728 | 42.045 | 55.223 | 1.688 | 1.624 | 1.742 |
| | 0.4 | 54.330 | 47.532 | 61.609 | 1.735 | 1.677 | 1.790 |
| | 0.45 | 60.362 | 53.202 | 68.903 | 1.781 | 1.726 | 1.838 |
| | 0.5 | 66.952 | 59.097 | 77.372 | 1.826 | 1.772 | 1.889 |
| 0.55 | 74.262 | 65.309 | 87.329 | 1.871 | 1.815 | 1.941 | |
| 0.6 | 82.507 | 71.987 | 99.176 | 1.916 | 1.857 | 1.996 | |
| 0.65 | 91.992 | 79.342 | 113.491 | 1.964 | 1.900 | 2.055 | |
| 0.7 | 103.171 | 87.677 | 131.163 | 2.014 | 1.943 | 2.118 | |
| 0.75 | 116.763 | 97.449 | 153.660 | 2.067 | 1.989 | 2.187 | |
| 0.8 | 134.016 | 109.421 | 183.611 | 2.127 | 2.039 | 2.264 | |

| | | | | | | |
|---------------------------------------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|
| 0.85 | 157.369 | 125.042 | 226.332 | 2.197 | 2.097 | 2.355 |
| 0.9 | 192.619 | 147.663 | 294.957 | 2.285 | 2.169 | 2.470 |
| 0.91 | 202.256 | 153.684 | 314.502 | 2.306 | 2.187 | 2.498 |
| 0.92 | 213.271 | 160.492 | 337.229 | 2.329 | 2.205 | 2.528 |
| 0.93 | 226.078 | 168.315 | 364.145 | 2.354 | 2.226 | 2.561 |
| 0.94 | 241.292 | 177.488 | 396.786 | 2.383 | 2.249 | 2.599 |
| 0.95 | 259.897 | 188.545 | 437.640 | 2.415 | 2.275 | 2.641 |
| 0.96 | 283.596 | 202.395 | 491.098 | 2.453 | 2.306 | 2.691 |
| 0.97 | 315.713 | 220.794 | 565.927 | 2.499 | 2.344 | 2.753 |
| 0.98 | 364.108 | 247.818 | 683.475 | 2.561 | 2.394 | 2.835 |
| 0.99 | 455.879 | 297.175 | 920.580 | 2.659 | 2.473 | 2.964 |
| a. Factor de heterogeneidad utilizado | | | | | | |
| b. Logaritmo base = 10 | | | | | | |

➤ Nk82.

| Límites de confianza | | | | | | | |
|----------------------|--------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|
| | Probabilidad | 95% Límites de confianza para dosis | | | 95% Límites de confianza en log(dosis) ^b | | |
| | | Estimado | Límite inferior | Límite superior | Estimado | Límite inferior | Límite superior |
| PROBIT ^a | 0.01 | .302 | .141 | .502 | -.520 | -.850 | -.299 |
| | 0.02 | .423 | .215 | .666 | -.374 | -.668 | -.177 |
| | 0.03 | .524 | .281 | .797 | -.281 | -.552 | -.099 |
| | 0.04 | .615 | .343 | .912 | -.211 | -.465 | -.040 |
| | 0.05 | .700 | .403 | 1.018 | -.155 | -.394 | .008 |
| | 0.06 | .783 | .463 | 1.118 | -.106 | -.334 | .048 |
| | 0.07 | .863 | .523 | 1.214 | -.064 | -.282 | .084 |
| | 0.08 | .941 | .583 | 1.307 | -.026 | -.235 | .116 |
| | 0.09 | 1.019 | .643 | 1.399 | .008 | -.192 | .146 |
| | 0.1 | 1.096 | .704 | 1.488 | .040 | -.153 | .173 |
| | 0.15 | 1.484 | 1.021 | 1.928 | .171 | .009 | .285 |
| | 0.2 | 1.887 | 1.370 | 2.375 | .276 | .137 | .376 |
| | 0.25 | 2.319 | 1.757 | 2.848 | .365 | .245 | .455 |
| | 0.3 | 2.790 | 2.190 | 3.363 | .446 | .341 | .527 |
| | 0.35 | 3.313 | 2.676 | 3.940 | .520 | .427 | .596 |
| | 0.4 | 3.898 | 3.219 | 4.601 | .591 | .508 | .663 |
| | 0.45 | 4.563 | 3.829 | 5.376 | .659 | .583 | .730 |
| | 0.5 | 5.328 | 4.512 | 6.305 | .727 | .654 | .800 |
| 0.55 | 6.222 | 5.282 | 7.445 | .794 | .723 | .872 | |

| | | | | | | |
|---------------------------------------|--------|--------|---------|-------|-------|-------|
| 0.6 | 7.283 | 6.161 | 8.869 | .862 | .790 | .948 |
| 0.65 | 8.571 | 7.184 | 10.688 | .933 | .856 | 1.029 |
| 0.7 | 10.176 | 8.406 | 13.071 | 1.008 | .925 | 1.116 |
| 0.75 | 12.245 | 9.919 | 16.306 | 1.088 | .996 | 1.212 |
| 0.8 | 15.049 | 11.886 | 20.931 | 1.178 | 1.075 | 1.321 |
| 0.85 | 19.138 | 14.632 | 28.088 | 1.282 | 1.165 | 1.449 |
| 0.9 | 25.895 | 18.949 | 40.788 | 1.413 | 1.278 | 1.611 |
| 0.91 | 27.857 | 20.162 | 44.650 | 1.445 | 1.305 | 1.650 |
| 0.92 | 30.157 | 21.566 | 49.267 | 1.479 | 1.334 | 1.693 |
| 0.93 | 32.906 | 23.220 | 54.904 | 1.517 | 1.366 | 1.740 |
| 0.94 | 36.274 | 25.214 | 61.974 | 1.560 | 1.402 | 1.792 |
| 0.95 | 40.537 | 27.693 | 71.167 | 1.608 | 1.442 | 1.852 |
| 0.96 | 46.191 | 30.912 | 83.740 | 1.665 | 1.490 | 1.923 |
| 0.97 | 54.233 | 35.380 | 102.307 | 1.734 | 1.549 | 2.010 |
| 0.98 | 67.131 | 42.318 | 133.556 | 1.827 | 1.627 | 2.126 |
| 0.99 | 93.967 | 56.085 | 203.412 | 1.973 | 1.749 | 2.308 |
| a. Factor de heterogeneidad utilizado | | | | | | |
| b. Logaritmo base = 10 | | | | | | |

➤ NBOB3

| Límites de confianza | | | | | | | |
|----------------------|--------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|
| | Probabilidad | 95% Límites de confianza para dosis | | | 95% Límites de confianza en log(dosis) ^b | | |
| | | Estimado | Límite inferior | Límite superior | Estimado | Límite inferior | Límite superior |
| PROBIT ^a | 0.01 | 1.860 | .918 | 2.826 | .270 | -.037 | .451 |
| | 0.02 | 2.493 | 1.362 | 3.571 | .397 | .134 | .553 |
| | 0.03 | 3.001 | 1.749 | 4.145 | .477 | .243 | .618 |
| | 0.04 | 3.451 | 2.109 | 4.638 | .538 | .324 | .666 |
| | 0.05 | 3.866 | 2.456 | 5.084 | .587 | .390 | .706 |
| | 0.06 | 4.259 | 2.796 | 5.498 | .629 | .447 | .740 |
| | 0.07 | 4.636 | 3.131 | 5.890 | .666 | .496 | .770 |
| | 0.08 | 5.001 | 3.464 | 6.266 | .699 | .540 | .797 |
| | 0.09 | 5.359 | 3.797 | 6.631 | .729 | .579 | .822 |
| | 0.1 | 5.710 | 4.131 | 6.987 | .757 | .616 | .844 |
| | 0.15 | 7.429 | 5.834 | 8.706 | .871 | .766 | .940 |
| | 0.2 | 9.157 | 7.619 | 10.446 | .962 | .882 | 1.019 |
| | 0.25 | 10.956 | 9.480 | 12.343 | 1.040 | .977 | 1.091 |
| | 0.3 | 12.872 | 11.376 | 14.541 | 1.110 | 1.056 | 1.163 |
| | 0.35 | 14.944 | 13.274 | 17.172 | 1.174 | 1.123 | 1.235 |

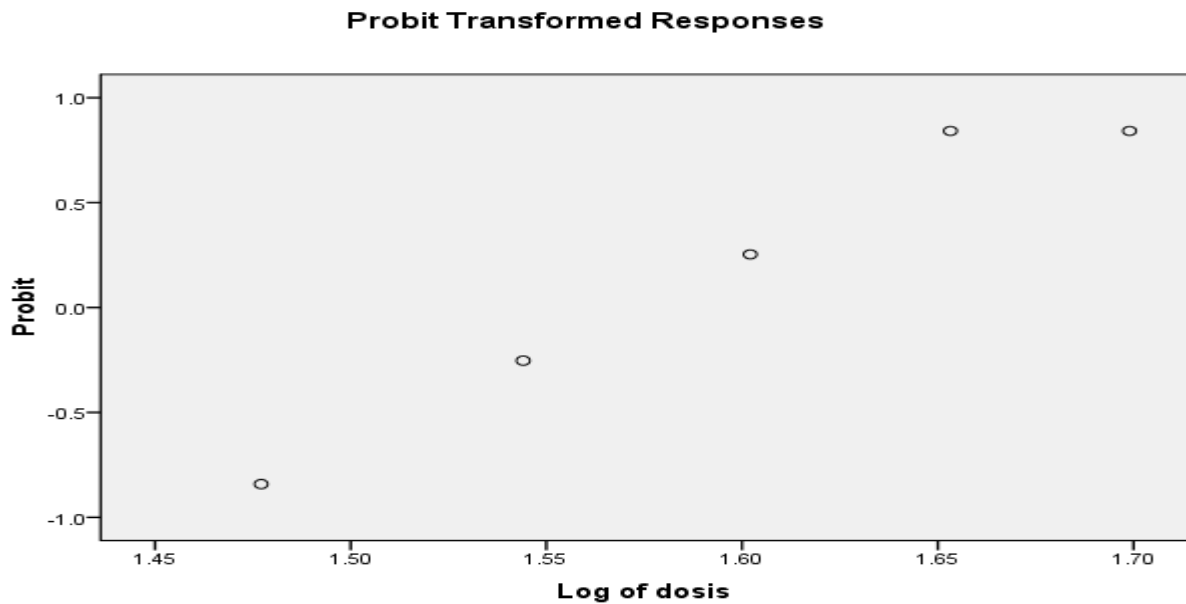
| | | | | | | |
|---------------------------------------|---------|---------|---------|-------|-------|-------|
| 0.4 | 17.219 | 15.193 | 20.341 | 1.236 | 1.182 | 1.308 |
| 0.45 | 19.748 | 17.184 | 24.140 | 1.296 | 1.235 | 1.383 |
| 0.5 | 22.600 | 19.310 | 28.703 | 1.354 | 1.286 | 1.458 |
| 0.55 | 25.864 | 21.638 | 34.225 | 1.413 | 1.335 | 1.534 |
| 0.6 | 29.663 | 24.244 | 41.003 | 1.472 | 1.385 | 1.613 |
| 0.65 | 34.178 | 27.233 | 49.488 | 1.534 | 1.435 | 1.694 |
| 0.7 | 39.681 | 30.752 | 60.395 | 1.599 | 1.488 | 1.781 |
| 0.75 | 46.619 | 35.034 | 74.937 | 1.669 | 1.544 | 1.875 |
| 0.8 | 55.780 | 40.480 | 95.349 | 1.746 | 1.607 | 1.979 |
| 0.85 | 68.754 | 47.876 | 126.337 | 1.837 | 1.680 | 2.102 |
| 0.9 | 89.448 | 59.093 | 180.129 | 1.952 | 1.772 | 2.256 |
| 0.91 | 95.317 | 62.170 | 196.257 | 1.979 | 1.794 | 2.293 |
| 0.92 | 102.130 | 65.693 | 215.426 | 2.009 | 1.818 | 2.333 |
| 0.93 | 110.186 | 69.796 | 238.679 | 2.042 | 1.844 | 2.378 |
| 0.94 | 119.935 | 74.678 | 267.636 | 2.079 | 1.873 | 2.428 |
| 0.95 | 132.112 | 80.661 | 304.987 | 2.121 | 1.907 | 2.484 |
| 0.96 | 148.006 | 88.302 | 355.599 | 2.170 | 1.946 | 2.551 |
| 0.97 | 170.191 | 98.689 | 429.499 | 2.231 | 1.994 | 2.633 |
| 0.98 | 204.913 | 114.400 | 552.086 | 2.312 | 2.058 | 2.742 |
| 0.99 | 274.571 | 144.371 | 820.252 | 2.439 | 2.159 | 2.914 |
| a. Factor de heterogeneidad utilizado | | | | | | |
| b. Logaritmo base = 10 | | | | | | |

- **Análisis de dosis letal 50 de NBOB3**

| Recuento de células y residuos | | | | | | | |
|--------------------------------|--------|-------|---------------------|---------------------|--------------------|----------|--------------|
| | Numero | dosis | Numero de pacientes | Respuesta observada | Respuesta esperada | Residual | Probabilidad |
| PROBIT | 1 | 1.398 | 5 | 0 | .214 | -.214 | .043 |
| | 2 | 1.477 | 5 | 1 | .827 | .173 | .165 |
| | 3 | 1.544 | 5 | 2 | 1.833 | .167 | .367 |
| | 4 | 1.602 | 5 | 3 | 2.908 | .092 | .582 |
| | 5 | 1.653 | 5 | 4 | 3.772 | .228 | .754 |
| | 6 | 1.699 | 5 | 4 | 4.343 | -.343 | .869 |

| Límites de confianza | | | | | | | |
|----------------------|--------------|-------------------------------------|-----------------|-----------------|---|-----------------|-----------------|
| | Probabilidad | 95% Límites de confianza para dosis | | | 95% Límites de confianza en log(dosis) ^b | | |
| | | Estimado | Límite inferior | Límite superior | Estimado | Límite inferior | Límite superior |
| PROBIT | 0.01 | 21.557 | 7.417 | 27.550 | 1.334 | .870 | 1.440 |
| | 0.02 | 23.041 | 8.934 | 28.764 | 1.362 | .951 | 1.459 |
| | 0.03 | 24.034 | 10.049 | 29.573 | 1.381 | 1.002 | 1.471 |
| | 0.04 | 24.810 | 10.976 | 30.205 | 1.395 | 1.040 | 1.480 |
| | 0.05 | 25.459 | 11.790 | 30.735 | 1.406 | 1.072 | 1.488 |
| | 0.06 | 26.025 | 12.529 | 31.198 | 1.415 | 1.098 | 1.494 |
| | 0.07 | 26.532 | 13.213 | 31.615 | 1.424 | 1.121 | 1.500 |
| | 0.08 | 26.994 | 13.854 | 31.997 | 1.431 | 1.142 | 1.505 |
| | 0.09 | 27.421 | 14.463 | 32.352 | 1.438 | 1.160 | 1.510 |
| | 0.1 | 27.820 | 15.046 | 32.686 | 1.444 | 1.177 | 1.514 |
| | 0.15 | 29.535 | 17.692 | 34.159 | 1.470 | 1.248 | 1.534 |
| | 0.2 | 30.974 | 20.073 | 35.464 | 1.491 | 1.303 | 1.550 |
| | 0.25 | 32.263 | 22.310 | 36.721 | 1.509 | 1.348 | 1.565 |
| | 0.3 | 33.467 | 24.452 | 38.009 | 1.525 | 1.388 | 1.580 |
| | 0.35 | 34.623 | 26.518 | 39.395 | 1.539 | 1.424 | 1.595 |
| | 0.4 | 35.757 | 28.503 | 40.951 | 1.553 | 1.455 | 1.612 |
| | 0.45 | 36.889 | 30.390 | 42.760 | 1.567 | 1.483 | 1.631 |
| | 0.5 | 38.038 | 32.159 | 44.910 | 1.580 | 1.507 | 1.652 |
| | 0.55 | 39.222 | 33.795 | 47.497 | 1.594 | 1.529 | 1.677 |
| | 0.6 | 40.464 | 35.305 | 50.617 | 1.607 | 1.548 | 1.704 |
| | 0.65 | 41.789 | 36.715 | 54.384 | 1.621 | 1.565 | 1.735 |
| | 0.7 | 43.232 | 38.066 | 58.959 | 1.636 | 1.581 | 1.771 |
| | 0.75 | 44.845 | 39.411 | 64.605 | 1.652 | 1.596 | 1.810 |
| | 0.8 | 46.713 | 40.816 | 71.790 | 1.669 | 1.611 | 1.856 |
| | 0.85 | 48.987 | 42.381 | 81.441 | 1.690 | 1.627 | 1.911 |
| | 0.9 | 52.008 | 44.296 | 95.750 | 1.716 | 1.646 | 1.981 |
| | 0.91 | 52.765 | 44.755 | 99.605 | 1.722 | 1.651 | 1.998 |
| | 0.92 | 53.600 | 45.252 | 103.981 | 1.729 | 1.656 | 2.017 |
| 0.93 | 54.533 | 45.800 | 109.031 | 1.737 | 1.661 | 2.038 | |
| 0.94 | 55.595 | 46.412 | 114.978 | 1.745 | 1.667 | 2.061 | |
| 0.95 | 56.831 | 47.113 | 122.178 | 1.755 | 1.673 | 2.087 | |
| 0.96 | 58.318 | 47.940 | 131.241 | 1.766 | 1.681 | 2.118 | |
| 0.97 | 60.200 | 48.965 | 143.345 | 1.780 | 1.690 | 2.156 | |
| 0.98 | 62.796 | 50.344 | 161.236 | 1.798 | 1.702 | 2.207 | |
| 0.99 | 67.117 | 52.565 | 194.193 | 1.827 | 1.721 | 2.288 | |

a. Logaritmo base = 10.



▪ **Análisis estadístico en función del incremento en peso (%IP)**

Para analizar los resultados en función del porcentaje de incremento en peso se emplea una prueba de Análisis de Varianza (ANDEVA) para los días 5, 10 y 15 del experimento.

- Análisis del día 5

| ANDEVA día 5 | | | | | |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------|------|------------|
| | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado de la media | F | Sig (0.05) |
| Tratamientos | 84.027 | 7 | 12.004 | 5.11 | .001 |
| Error | 75.162 | 32 | 2.349 | | |
| Total | 159.189 | 39 | | | |

| Múltiple comparación | | | | | | | |
|--|-------|---------|-------------------------------|--------------------|---------|----------------------------|-----------------|
| Variable dependiente : incremento en peso | | | | | | | |
| | (I) | (J) | Diferencia de medias (I-J) | Error Estándar. | Sig. | 95% Intervalo de confianza | |
| | trata | trata | | | | Límite inferior | Límite superior |
| Tukey HSD | 1 | 2 | -3.06800 | .99890 | .073 | -6.3037 | .1677 |
| | | 3 | -1.51600 | .99890 | .792 | -4.7517 | 1.7197 |
| | | 4 | -.30000 | .99890 | 1.000 | -3.5357 | 2.9357 |
| | | 5 | .12600 | .99890 | 1.000 | -3.1097 | 3.3617 |
| | | 6 | .10400 | .99890 | 1.000 | -3.1317 | 3.3397 |
| | | 7 | -3.90600* | .99890 | .009 | -7.1417 | -.6703 |
| | | 8 | -.52000 | .99890 | .999 | -3.7557 | 2.7157 |
| | | 2 | 1 | 3.06800 | .99890 | .073 | -.1677 |
| | 3 | | 1.55200 | .99890 | .773 | -1.6837 | 4.7877 |
| | 4 | | 2.76800 | .99890 | .138 | -.4677 | 6.0037 |
| | 5 | | 3.19400 | .99890 | .055 | -.0417 | 6.4297 |
| | 6 | | 3.17200 | .99890 | .058 | -.0637 | 6.4077 |
| | 7 | | -.83800 | .99890 | .989 | -4.0737 | 2.3977 |
| | 8 | | 2.54800 | .99890 | .211 | -.6877 | 5.7837 |
| | 3 | | 1 | 1.51600 | .99890 | .792 | -1.7197 |
| | | 2 | -1.55200 | .99890 | .773 | -4.7877 | 1.6837 |
| | | 4 | 1.21600 | .99890 | .921 | -2.0197 | 4.4517 |
| | | 5 | 1.64200 | .99890 | .721 | -1.5937 | 4.8777 |
| | | 6 | 1.62000 | .99890 | .734 | -1.6157 | 4.8557 |
| | | 7 | -2.39000 | .99890 | .279 | -5.6257 | .8457 |
| | | 8 | .99600 | .99890 | .972 | -2.2397 | 4.2317 |
| | | 4 | 1 | .30000 | .99890 | 1.000 | -2.9357 |
| | 2 | | -2.76800 | .99890 | .138 | -6.0037 | .4677 |
| | 3 | | -1.21600 | .99890 | .921 | -4.4517 | 2.0197 |
| | 5 | | .42600 | .99890 | 1.000 | -2.8097 | 3.6617 |
| | 6 | | .40400 | .99890 | 1.000 | -2.8317 | 3.6397 |
| | 7 | | -3.60600* | .99890 | .020 | -6.8417 | -.3703 |
| | 8 | | -.22000 | .99890 | 1.000 | -3.4557 | 3.0157 |
| | 5 | | 1 | -.12600 | .99890 | 1.000 | -3.3617 |
| | | 2 | -3.19400 | .99890 | .055 | -6.4297 | .0417 |
| | | 3 | -1.64200 | .99890 | .721 | -4.8777 | 1.5937 |
| | | 4 | -.42600 | .99890 | 1.000 | -3.6617 | 2.8097 |
| 6 | | -.02200 | .99890 | 1.000 | -3.2577 | 3.2137 | |

| | | | | | | | | |
|--|---|---|-----------|----------|--------|---------|---------|--------|
| | 6 | 7 | -4.03200* | .99890 | .007 | -7.2677 | -7.7963 | |
| | | 8 | -.64600 | .99890 | .998 | -3.8817 | 2.5897 | |
| | 6 | 1 | -.10400 | .99890 | 1.000 | -3.3397 | 3.1317 | |
| | | 2 | -3.17200 | .99890 | .058 | -6.4077 | .0637 | |
| | | 3 | -1.62000 | .99890 | .734 | -4.8557 | 1.6157 | |
| | | 4 | -.40400 | .99890 | 1.000 | -3.6397 | 2.8317 | |
| | | 5 | .02200 | .99890 | 1.000 | -3.2137 | 3.2577 | |
| | | 7 | -4.01000* | .99890 | .007 | -7.2457 | -.7743 | |
| | | 8 | -.62400 | .99890 | .998 | -3.8597 | 2.6117 | |
| | | 7 | 1 | 3.90600* | .99890 | .009 | .6703 | 7.1417 |
| | 2 | | .83800 | .99890 | .989 | -2.3977 | 4.0737 | |
| | 3 | | 2.39000 | .99890 | .279 | -.8457 | 5.6257 | |
| | 4 | | 3.60600* | .99890 | .020 | .3703 | 6.8417 | |
| | 5 | | 4.03200* | .99890 | .007 | .7963 | 7.2677 | |
| | 6 | | 4.01000* | .99890 | .007 | .7743 | 7.2457 | |
| | 8 | | 3.38600* | .99890 | .035 | .1503 | 6.6217 | |
| | 8 | | 1 | .52000 | .99890 | .999 | -2.7157 | 3.7557 |
| | | 2 | -2.54800 | .99890 | .211 | -5.7837 | .6877 | |
| | | 3 | -.99600 | .99890 | .972 | -4.2317 | 2.2397 | |
| | | 4 | .22000 | .99890 | 1.000 | -3.0157 | 3.4557 | |
| | | 5 | .64600 | .99890 | .998 | -2.5897 | 3.8817 | |
| | | 6 | .62400 | .99890 | .998 | -2.6117 | 3.8597 | |
| | | 7 | -3.38600* | .99890 | .035 | -6.6217 | -.1503 | |
| | *. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05 | | | | | | | |

| Incremento en peso. | | | | | |
|---------------------|-------|---|----------------------------------|--------|------|
| | trata | N | Subconjunto para $\alpha = 0.05$ | | |
| | | | 1 | 2 | 3 |
| Tukey HSD | 5 | 5 | -.9680 | | |
| | 6 | 5 | -.9460 | | |
| | 1 | 5 | -.8420 | | |
| | 4 | 5 | -.5420 | | |
| | 8 | 5 | -.3220 | | |
| | 3 | 5 | .6740 | .6740 | |
| | 2 | 5 | 2.2260 | 2.2260 | |
| | 7 | 5 | | 3.0640 | |
| | Sig. | | | .055 | .279 |
| Tukey B | 5 | 5 | -.9680 | | |

| | | | | | |
|--|---|---|--------|--------|--------|
| | 6 | 5 | -.9460 | | |
| | 1 | 5 | -.8420 | | |
| | 4 | 5 | -.5420 | -.5420 | |
| | 8 | 5 | -.3220 | -.3220 | |
| | 3 | 5 | .6740 | .6740 | .6740 |
| | 2 | 5 | | 2.2260 | 2.2260 |
| | 7 | 5 | | | 3.0640 |

- Análisis día 10

| ANDEVA día 10 | | | | | |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------|-------|------|
| | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado de la media | F | Sig |
| Tratamientos | 423.814 | 7 | 60.545 | 7.869 | 0.00 |
| Error | 246.199 | 32 | 7.694 | | |
| Total | 670.013 | 39 | | | |

| Múltiple comparación | | | | | | | |
|--|-----------|-----------|----------------------------|-----------------|---------|----------------------------|-----------------|
| Variable dependiente : incremento en peso | | | | | | | |
| | (I) trata | (J) trata | Diferencia de medias (I-J) | Error Estándar. | Sig. | 95% Intervalo de confianza | |
| | | | | | | Límite inferior | Límite superior |
| Tukey HSD | 1 | 2 | -7.66600* | 1.75428 | .003 | -13.3486 | -1.9834 |
| | | 3 | -5.52000 | 1.75428 | .062 | -11.2026 | .1626 |
| | | 4 | -2.22800 | 1.75428 | .903 | -7.9106 | 3.4546 |
| | | 5 | -4.46400 | 1.75428 | .214 | -10.1466 | 1.2186 |
| | | 6 | -7.08600* | 1.75428 | .007 | -12.7686 | -1.4034 |
| | | 7 | -10.98200* | 1.75428 | .000 | -16.6646 | -5.2994 |
| | | 8 | -7.93200* | 1.75428 | .002 | -13.6146 | -2.2494 |
| | | 2 | 1 | 7.66600* | 1.75428 | .003 | 1.9834 |
| | 3 | 2.14600 | 1.75428 | .919 | -3.5366 | 7.8286 | |
| | 4 | 5.43800 | 1.75428 | .069 | -.2446 | 11.1206 | |
| | 5 | 3.20200 | 1.75428 | .608 | -2.4806 | 8.8846 | |
| | 6 | .58000 | 1.75428 | 1.000 | -5.1026 | 6.2626 | |
| | 7 | -3.31600 | 1.75428 | .567 | -8.9986 | 2.3666 | |

| | | | | | | | |
|---|----------|--------|-----------|-----------|---------|----------|---------|
| | 3 | 8 | -2.26600 | 1.75428 | 1.000 | -5.9486 | 5.4166 |
| | | 1 | 5.52000 | 1.75428 | .062 | -.1626 | 11.2026 |
| | | 2 | -2.14600 | 1.75428 | .919 | -7.8286 | 3.5366 |
| | | 4 | 3.29200 | 1.75428 | .576 | -2.3906 | 8.9746 |
| | | 5 | 1.05600 | 1.75428 | .999 | -4.6266 | 6.7386 |
| | | 6 | -1.56600 | 1.75428 | .985 | -7.2486 | 4.1166 |
| | | 7 | -5.46200 | 1.75428 | .067 | -11.1446 | .2206 |
| | | 8 | -2.41200 | 1.75428 | .862 | -8.0946 | 3.2706 |
| | 4 | 1 | 2.22800 | 1.75428 | .903 | -3.4546 | 7.9106 |
| | | 2 | -5.43800 | 1.75428 | .069 | -11.1206 | .2446 |
| | | 3 | -3.29200 | 1.75428 | .576 | -8.9746 | 2.3906 |
| | | 5 | -2.23600 | 1.75428 | .902 | -7.9186 | 3.4466 |
| | | 6 | -4.85800 | 1.75428 | .139 | -10.5406 | .8246 |
| | | 7 | -8.75400* | 1.75428 | .000 | -14.4366 | -3.0714 |
| | | 8 | -5.70400* | 1.75428 | .049 | -11.3866 | -.0214 |
| | | 5 | 1 | 4.46400 | 1.75428 | .214 | -1.2186 |
| | 2 | | -3.20200 | 1.75428 | .608 | -8.8846 | 2.4806 |
| | 3 | | -1.05600 | 1.75428 | .999 | -6.7386 | 4.6266 |
| | 4 | | 2.23600 | 1.75428 | .902 | -3.4466 | 7.9186 |
| | 6 | | -2.62200 | 1.75428 | .805 | -8.3046 | 3.0606 |
| | 7 | | -6.51800* | 1.75428 | .016 | -12.2006 | -.8354 |
| | 8 | | -3.46800 | 1.75428 | .512 | -9.1506 | 2.2146 |
| | 6 | | 1 | 7.08600* | 1.75428 | .007 | 1.4034 |
| | | 2 | -.58000 | 1.75428 | 1.000 | -6.2626 | 5.1026 |
| | | 3 | 1.56600 | 1.75428 | .985 | -4.1166 | 7.2486 |
| | | 4 | 4.85800 | 1.75428 | .139 | -.8246 | 10.5406 |
| | | 5 | 2.62200 | 1.75428 | .805 | -3.0606 | 8.3046 |
| | | 7 | -3.89600 | 1.75428 | .367 | -9.5786 | 1.7866 |
| | | 8 | -.84600 | 1.75428 | 1.000 | -6.5286 | 4.8366 |
| | | 7 | 1 | 10.98200* | 1.75428 | .000 | 5.2994 |
| | 2 | | 3.31600 | 1.75428 | .567 | -2.3666 | 8.9986 |
| | 3 | | 5.46200 | 1.75428 | .067 | -.2206 | 11.1446 |
| 4 | 8.75400* | | 1.75428 | .000 | 3.0714 | 14.4366 | |
| 5 | 6.51800* | | 1.75428 | .016 | .8354 | 12.2006 | |
| 6 | 3.89600 | | 1.75428 | .367 | -1.7866 | 9.5786 | |
| 8 | 3.05000 | | 1.75428 | .663 | -2.6326 | 8.7326 | |
| 8 | 1 | | 7.93200* | 1.75428 | .002 | 2.2494 | 13.6146 |
| | 2 | .26600 | 1.75428 | 1.000 | -5.4166 | 5.9486 | |

| | | | | | | |
|---|---|----------|---------|-------|---------|---------|
| | 3 | 2.41200 | 1.75428 | .862 | -3.2706 | 8.0946 |
| | 4 | 5.70400* | 1.75428 | .049 | .0214 | 11.3866 |
| | 5 | 3.46800 | 1.75428 | .512 | -2.2146 | 9.1506 |
| | 6 | .84600 | 1.75428 | 1.000 | -4.8366 | 6.5286 |
| | 7 | -3.05000 | 1.75428 | .663 | -8.7326 | 2.6326 |
| *. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05 | | | | | | |

| Incremento en peso. | | | | | | |
|---------------------|-------|---|----------------------------------|---------|---------|--------|
| | trata | N | Subconjunto para $\alpha = 0.05$ | | | |
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Tukey HSD | 1 | 5 | -5.7660 | | | |
| | 4 | 5 | -3.5380 | -3.5380 | | |
| | 5 | 5 | -1.3020 | -1.3020 | -1.3020 | |
| | 3 | 5 | -.2460 | -.2460 | -.2460 | -.2460 |
| | 6 | 5 | | 1.3200 | 1.3200 | 1.3200 |
| | 2 | 5 | | 1.9000 | 1.9000 | 1.9000 |
| | 8 | 5 | | | 2.1660 | 2.1660 |
| | 7 | 5 | | | | 5.2160 |
| | Sig. | | | .062 | .069 | .512 |
| Tukey B | 1 | 5 | -5.7660 | | | |
| | 4 | 5 | -3.5380 | -3.5380 | | |
| | 5 | 5 | -1.3020 | -1.3020 | -1.3020 | |
| | 3 | 5 | | -.2460 | -.2460 | |
| | 6 | 5 | | 1.3200 | 1.3200 | 1.3200 |
| | 2 | 5 | | | 1.9000 | 1.9000 |
| | 8 | 5 | | | 2.1660 | 2.1660 |
| | 7 | 5 | | | | 5.2160 |

- Análisis día 15

| ANDEVA día 15 | | | | | |
|---------------------|-------------------|--------------------|----------------------|-------|-------|
| | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Cuadrado de la media | F | Sig |
| Tratamientos | 556.061 | 7 | 79.437 | 3.078 | 0.014 |
| Error | 825.845 | 32 | 25.808 | | |
| Total | 1381.906 | 39 | | | |

| Múltiple comparación | | | | | | | |
|------------------------|-------|----------|----------------------------|-----------------|----------|----------------------------|-----------------|
| Variable dependiente : | | | | | | | |
| incremento en peso | | | | | | | |
| | (I) | (J) | Diferencia de medias (I-J) | Error Estándar. | Sig. | 95% Intervalo de confianza | |
| | trata | trata | | | | Límite inferior | Límite superior |
| Tukey HSD | 1 | 2 | -4.36600 | 3.21295 | .869 | -14.7737 | 6.0417 |
| | | 3 | -6.14600 | 3.21295 | .553 | -16.5537 | 4.2617 |
| | | 4 | -7.10200 | 3.21295 | .372 | -17.5097 | 3.3057 |
| | | 5 | -5.39200 | 3.21295 | .700 | -15.7997 | 5.0157 |
| | | 6 | -8.59200 | 3.21295 | .168 | -18.9997 | 1.8157 |
| | | 7 | -13.23400* | 3.21295 | .005 | -23.6417 | -2.8263 |
| | | 8 | -10.26400 | 3.21295 | .055 | -20.6717 | .1437 |
| | 2 | 1 | 4.36600 | 3.21295 | .869 | -6.0417 | 14.7737 |
| | | 3 | -1.78000 | 3.21295 | .999 | -12.1877 | 8.6277 |
| | | 4 | -2.73600 | 3.21295 | .988 | -13.1437 | 7.6717 |
| | | 5 | -1.02600 | 3.21295 | 1.000 | -11.4337 | 9.3817 |
| | | 6 | -4.22600 | 3.21295 | .886 | -14.6337 | 6.1817 |
| | | 7 | -8.86800 | 3.21295 | .142 | -19.2757 | 1.5397 |
| | | 8 | -5.89800 | 3.21295 | .602 | -16.3057 | 4.5097 |
| | 3 | 1 | 6.14600 | 3.21295 | .553 | -4.2617 | 16.5537 |
| | | 2 | 1.78000 | 3.21295 | .999 | -8.6277 | 12.1877 |
| | | 4 | -.95600 | 3.21295 | 1.000 | -11.3637 | 9.4517 |
| | | 5 | .75400 | 3.21295 | 1.000 | -9.6537 | 11.1617 |
| | | 6 | -2.44600 | 3.21295 | .994 | -12.8537 | 7.9617 |
| | | 7 | -7.08800 | 3.21295 | .375 | -17.4957 | 3.3197 |
| | | 8 | -4.11800 | 3.21295 | .899 | -14.5257 | 6.2897 |
| | 4 | 1 | 7.10200 | 3.21295 | .372 | -3.3057 | 17.5097 |
| | | 2 | 2.73600 | 3.21295 | .988 | -7.6717 | 13.1437 |
| | | 3 | .95600 | 3.21295 | 1.000 | -9.4517 | 11.3637 |
| | | 5 | 1.71000 | 3.21295 | .999 | -8.6977 | 12.1177 |
| | | 6 | -1.49000 | 3.21295 | 1.000 | -11.8977 | 8.9177 |
| | | 7 | -6.13200 | 3.21295 | .555 | -16.5397 | 4.2757 |
| | | 8 | -3.16200 | 3.21295 | .974 | -13.5697 | 7.2457 |
| 5 | 1 | 5.39200 | 3.21295 | .700 | -5.0157 | 15.7997 | |
| | 2 | 1.02600 | 3.21295 | 1.000 | -9.3817 | 11.4337 | |
| | 3 | -.75400 | 3.21295 | 1.000 | -11.1617 | 9.6537 | |
| | 4 | -1.71000 | 3.21295 | .999 | -12.1177 | 8.6977 | |

| | | | | | | | |
|---|---|---|-----------|---------|-------|----------|---------|
| | | 6 | -3.20000 | 3.21295 | .972 | -13.6077 | 7.2077 |
| | | 7 | -7.84200 | 3.21295 | .257 | -18.2497 | 2.5657 |
| | | 8 | -4.87200 | 3.21295 | .793 | -15.2797 | 5.5357 |
| | 6 | 1 | 8.59200 | 3.21295 | .168 | -1.8157 | 18.9997 |
| | | 2 | 4.22600 | 3.21295 | .886 | -6.1817 | 14.6337 |
| | | 3 | 2.44600 | 3.21295 | .994 | -7.9617 | 12.8537 |
| | | 4 | 1.49000 | 3.21295 | 1.000 | -8.9177 | 11.8977 |
| | | 5 | 3.20000 | 3.21295 | .972 | -7.2077 | 13.6077 |
| | | 7 | -4.64200 | 3.21295 | .830 | -15.0497 | 5.7657 |
| | | 8 | -1.67200 | 3.21295 | .999 | -12.0797 | 8.7357 |
| | 7 | 1 | 13.23400* | 3.21295 | .005 | 2.8263 | 23.6417 |
| | | 2 | 8.86800 | 3.21295 | .142 | -1.5397 | 19.2757 |
| | | 3 | 7.08800 | 3.21295 | .375 | -3.3197 | 17.4957 |
| | | 4 | 6.13200 | 3.21295 | .555 | -4.2757 | 16.5397 |
| | | 5 | 7.84200 | 3.21295 | .257 | -2.5657 | 18.2497 |
| | | 6 | 4.64200 | 3.21295 | .830 | -5.7657 | 15.0497 |
| | | 8 | 2.97000 | 3.21295 | .981 | -7.4377 | 13.3777 |
| | 8 | 1 | 10.26400 | 3.21295 | .055 | -.1437 | 20.6717 |
| | | 2 | 5.89800 | 3.21295 | .602 | -4.5097 | 16.3057 |
| | | 3 | 4.11800 | 3.21295 | .899 | -6.2897 | 14.5257 |
| | | 4 | 3.16200 | 3.21295 | .974 | -7.2457 | 13.5697 |
| | | 5 | 4.87200 | 3.21295 | .793 | -5.5357 | 15.2797 |
| | | 6 | 1.67200 | 3.21295 | .999 | -8.7357 | 12.0797 |
| | | 7 | -2.97000 | 3.21295 | .981 | -13.3777 | 7.4377 |
| *. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05 | | | | | | | |

| Incremento en peso. | | | | |
|---------------------|-------|---|----------------------------------|--------|
| | trata | N | Subconjunto para $\alpha = 0.05$ | |
| | | | 1 | 2 |
| Tukey HSD | 1 | 5 | -3.2520 | |
| | 2 | 5 | 1.1140 | 1.1140 |
| | 5 | 5 | 2.1400 | 2.1400 |
| | 3 | 5 | 2.8940 | 2.8940 |
| | 4 | 5 | 3.8500 | 3.8500 |
| | 6 | 5 | 5.3400 | 5.3400 |
| | 8 | 5 | 7.0120 | 7.0120 |
| | 7 | 5 | | 9.9820 |
| | Sig. | | | .055 |

| | | | | |
|---------|---|---|---------|--------|
| Tukey B | 1 | 5 | -3.2520 | |
| | 2 | 5 | 1.1140 | 1.1140 |
| | 5 | 5 | 2.1400 | 2.1400 |
| | 3 | 5 | 2.8940 | 2.8940 |
| | 4 | 5 | 3.8500 | 3.8500 |
| | 6 | 5 | 5.3400 | 5.3400 |
| | 8 | 5 | | 7.0120 |
| | 7 | 5 | | 9.9820 |

- Análisis del día promedio de muerte y el índice de sobrevivencia

| | Ciclofosfamid [50 mg/kg] | control negativo | NK82 [7 mg/kg] | NK82 [9.33 mg/kg] | NK82 [3.11 mg/kg] | NBOB3 [5mg/kg] | NBOB3 [6.66 mg/kg] | NBOB3 [2.22 mg/kg] |
|------------------------|--------------------------|------------------|----------------|-------------------|-------------------|----------------|--------------------|--------------------|
| Día | 32 | 18 | 25 | 19 | 25 | 19 | 18 | 27 |
| Día | 32 | 23 | 26 | 26 | 27 | 20 | 32 | 32 |
| Día | 33 | 32 | 27 | 32 | 27 | 21 | 32 | 33 |
| Día | 34 | 35 | 27 | 34 | 34 | 26 | 42 | 34 |
| Día promedio de muerte | 35.4 | 28.8 | 29.6 | 31.6 | 29.4 | 25 | 34 | 32.2 |
| ILS | 18.18 | | -3.63 | 5.45 | 1.81 | -25.45 | 16.36 | 18.18 |

- Análisis estadístico en función del peso con la prueba log-Rank

| Resumen de procesamiento | | | | |
|--------------------------|---------|--------------|-----------|------------|
| tratamiento | Total N | N de eventos | Censurado | |
| | | | N | Porcentaje |
| 1 | 5 | 5 | 0 | .0% |
| 2 | 5 | 5 | 0 | .0% |
| 3 | 5 | 5 | 0 | .0% |
| 4 | 5 | 5 | 0 | .0% |

| | | | | |
|-------|----|----|---|-----|
| 5 | 5 | 5 | 0 | .0% |
| 6 | 5 | 5 | 0 | .0% |
| 7 | 5 | 5 | 0 | .0% |
| 8 | 6 | 6 | 0 | .0% |
| total | 41 | 41 | 0 | .0% |

| Tabla de sobrevivencia | | | | | | | |
|------------------------|--------|--------|------------------------|----------------|-------------------------|--------------------------|---|
| tratamiento | Tiempo | Estado | Proporción acumulativa | | N de eventos acumulados | N de los casos restantes | |
| | | | Estimado | Error estándar | | | |
| 1 | 1 | 32.000 | 1.00 | . | . | 1 | 4 |
| | 2 | 32.000 | 1.00 | .600 | .219 | 2 | 3 |
| | 3 | 33.000 | 1.00 | .400 | .219 | 3 | 2 |
| | 4 | 34.000 | 1.00 | .200 | .179 | 4 | 1 |
| | 5 | 46.000 | 1.00 | .000 | .000 | 5 | 0 |
| 2 | 1 | 18.000 | 1.00 | .800 | .179 | 1 | 4 |
| | 2 | 23.000 | 1.00 | .600 | .219 | 2 | 3 |
| | 3 | 32.000 | 1.00 | .400 | .219 | 3 | 2 |
| | 4 | 35.000 | 1.00 | .200 | .179 | 4 | 1 |
| | 5 | 36.000 | 1.00 | .000 | .000 | 5 | 0 |
| 3 | 1 | 25.000 | 1.00 | .800 | .179 | 1 | 4 |
| | 2 | 26.000 | 1.00 | .600 | .219 | 2 | 3 |
| | 3 | 27.000 | 1.00 | . | . | 3 | 2 |
| | 4 | 27.000 | 1.00 | .200 | .179 | 4 | 1 |
| | 5 | 43.000 | 1.00 | .000 | .000 | 5 | 0 |
| 4 | 1 | 19.000 | 1.00 | .800 | .179 | 1 | 4 |
| | 2 | 26.000 | 1.00 | .600 | .219 | 2 | 3 |
| | 3 | 32.000 | 1.00 | .400 | .219 | 3 | 2 |
| | 4 | 34.000 | 1.00 | .200 | .179 | 4 | 1 |
| | 5 | 47.000 | 1.00 | .000 | .000 | 5 | 0 |
| 5 | 1 | 25.000 | 1.00 | .800 | .179 | 1 | 4 |
| | 2 | 27.000 | 1.00 | . | . | 2 | 3 |
| | 3 | 27.000 | 1.00 | .400 | .219 | 3 | 2 |
| | 4 | 34.000 | 1.00 | . | . | 4 | 1 |
| | 5 | 34.000 | 1.00 | .000 | .000 | 5 | 0 |
| 6 | 1 | 19.000 | 1.00 | .800 | .179 | 1 | 4 |
| | 2 | 20.000 | 1.00 | .600 | .219 | 2 | 3 |
| | 3 | 21.000 | 1.00 | .400 | .219 | 3 | 2 |
| | 4 | 26.000 | 1.00 | .200 | .179 | 4 | 1 |

| | | | | | | | |
|---|---|--------|------|------|------|---|---|
| | 5 | 39.000 | 1.00 | .000 | .000 | 5 | 0 |
| 7 | 1 | 18.000 | 1.00 | .800 | .179 | 1 | 4 |
| | 2 | 32.000 | 1.00 | . | . | 2 | 3 |
| | 3 | 32.000 | 1.00 | .400 | .219 | 3 | 2 |
| | 4 | 42.000 | 1.00 | .200 | .179 | 4 | 1 |
| | 5 | 46.000 | 1.00 | .000 | .000 | 5 | 0 |
| 8 | 1 | 27.000 | 1.00 | .833 | .152 | 1 | 5 |
| | 2 | 32.000 | 1.00 | .667 | .192 | 2 | 4 |
| | 3 | 33.000 | 1.00 | .500 | .204 | 3 | 3 |
| | 4 | 34.000 | 1.00 | .333 | .192 | 4 | 2 |
| | 5 | 35.000 | 1.00 | .167 | .152 | 5 | 1 |
| | 6 | 47.000 | 1.00 | .000 | .000 | 6 | 0 |

| Medias y medianas de tiempo de sobrevivencia | | | | | | | | |
|---|----------|------------------------|----------------------------|--------------------|----------|------------------------|----------------------------|--------------------|
| tratami ento | Media | | | | Mediana | | | |
| | Estimado | Error Estánd ar. | 95% intervalo de confianza | | Estimado | Error Estánd ar. | 95% intervalo de confianza | |
| | | | Límite inferior | Límite superior | | | Límite inferior | Límite superior |
| 1 | 35.400 | 2.676 | 30.155 | 40.645 | 33.000 | 1.095 | 30.853 | 35.147 |
| 2 | 28.800 | 3.541 | 21.859 | 35.741 | 32.000 | 9.859 | 12.676 | 51.324 |
| 3 | 29.600 | 3.370 | 22.994 | 36.206 | 27.000 | .447 | 26.123 | 27.877 |
| 4 | 31.600 | 4.654 | 22.478 | 40.722 | 32.000 | 6.573 | 19.118 | 44.882 |
| 5 | 29.400 | 1.913 | 25.650 | 33.150 | 27.000 | 1.095 | 24.853 | 29.147 |
| 6 | 25.000 | 3.701 | 17.745 | 32.255 | 21.000 | 1.095 | 18.853 | 23.147 |
| 7 | 34.000 | 4.858 | 24.478 | 43.522 | 32.000 | 7.668 | 16.970 | 47.030 |
| 8 | 34.667 | 2.716 | 29.343 | 39.990 | 33.000 | 1.225 | 30.600 | 35.400 |
| Total | 31.146 | 1.246 | 28.705 | 33.588 | 32.000 | 2.253 | 27.584 | 36.416 |
| a. La estimación se limita al tiempo de sobrevivencia mayor sin censura | | | | | | | | |

REFERENCIAS

1. - Portal de internet del National Cancer Institute: <http://www.cancer.gov/>
2. - Avendaño López C. Introducción a la Química Farmacéutica. Mc Graw Hill, 2^{da} edición, 2004.
3. - Ruiz-Ramírez L. Naturaleza Química y Clasificación de los Agentes Quimioterapéuticos. Cáncer y Quimioterapia (memorias). México, D.F, 1992. Pp. 13-20, Sociedad Química de México, Facultad de Química, Instituto Nacional de Cancerología. México, 1992.
4. - La situación de los fármacos de platino en la clínica y en ensayos clínicos, *Transacciones Dalton*, 2010, 39, 8113-8127.
5. - Sánchez, G. Obdulia, Barba, B. Noráh. Cytotoxic activity, X-ray crystal structures and spectroscopic characterization of cobalt (II), copper (II) and zinc (II) coordination compounds with 2-substituted benzimidazoles, *Journal of Biochemistry*, 2009.
6. - Farfán Norberto, Gracia M Isabel. New pentacoordinated Schiff-base diorganotin (IV) complexes derived from nonpolar side chain α -amino acids. *Journal Organometallic Chemistry*, 2010.
7. - Organización Mundial de la Salud (2008). La lucha contra el cáncer tiene que ser una prioridad del desarrollo. Documento revisado el 23 de diciembre de 2010.
8. - Organización Mundial de la Salud (2009). Salud de la mujer. Nota descriptiva No.334, Noviembre de 2009. Documentos revisado el 6 de enero de 2011.
9. - Organización Mundial de la Salud [OMS] (2011). Cáncer. Nota descriptiva No. 297. Documento revisado el 7 de enero de 2011.
10. - Secretaría de Salud [SSA] (2008). Programa de Acción específico 2007-2012. Cáncer de mama. Documento revisado el 7 de enero de 2011.
11. - Organización Mundial de la Salud [OMS] (2011). Cáncer. Nota descriptiva No. 297. Documento revisado el 7 de enero de 2011.
12. - Portal de internet de Salud Publica de México. <http://bvs.insp.mx>

13. - Portal de internet de la Organización Mundial de la Salud.
<http://www.who.int/es/>
14. - Lessner Howar E., Oncología Médica. Editorial EL Manual Moderno, S. A., 1980.
15. - Balls, M. Riddell, R. J. And Worden, A. N. Animals and Alternatives in Toxicity. Academic Press, London, 1993.
16. - Terán, P. M. A. Objetivo de los Centros Oncológicos en México. *Cancerología*, 45 (1): 8-10 (1999).
17. - Barragry, T. B. Veterinary Drug Therapy. Lea & Febiger, U. S. A., 1994.
18. - Rivera, H. M. Determinación de la dosis letal 50 (DL₅₀) de la Casiopeina III E en rata y ratón por vía intraperitoneal. Tesis de Licenciatura. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. UNAM, México, 1999.
19. - Bravo, M. E. Evaluación Antineoplásica de Compuestos de Coordinación de cobre (Casiopeina) en Modelo Tumoral Murino. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM, México, 1998.
20. - Thompson, J. M. and Gorman, N. T. Hypertemia and Radiation in the Management of Canine Tumors. *J. Small Anim. Pract.*, 28: 457-477 (1987).
21. - Booth, N. H y Mc Donald, L. E. Farmacología y Terapéutica Veterinaria. Vol. I y II, Edit. Acribia, España, 1988.
22. - William, N. K. Medicina Interna I. 2ª. ed. Médica Panamericana, Philadelphia, 1992.
23. - Portal de internet de la Sociedad Española de Oncología Médica.
24. - Hernán V. A y William R. M. Fundamentos de Medicina Nefrología. 4ª. ed., Corporación para Investigaciones Biológicas. Pp. 573-574. 2003.
25. - Estapé Rodríguez, J., Diagnóstico de extensión y estrategia terapéutica. *Revista Oncología Médica*. 2008.20, Pp1141-1144.
26. - Goodman, G. A. y Rall, T. W. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. 8ª. ed., Panamericana, México, 1991.
27. - Geran, Greenberg, Macdonald and Abolt. Protocols for in vivo Screening Systems. National Cancer Institute, 1987.

28. - Benavides J., Guénet L. Manual de genética de roedores de laboratorio. Principios básicos y aplicaciones. Primera edición 2007.
29. - Kallman Robert. F. Rodent Tumor Models in Experimental Cancer Therapy. Pergamon Press, 1987.
30. - U.S. Food and Drug Administration <http://www.fda.gov/>.
31. - De la Rosa, M. E. and Gracia, M. I. Mutagenic Activity of Casiopeina in Drosophila. Xxth. EEMS Meeting. York, Inglaterra. 1990, 22-27. Academic Press, U.S.A. 1990.
32. - Foster M and Thomson L. Histocompatibility relations of mouse melanoma B16-Genetics. Pp. 64-221, 1970.
33. - De Vita, V. T. and Rosenberg, S. A.: Cancer Principles & Practice of Oncology, Lippincott Company, 1993.
34. - Mendelsohn J. Principios de la neoplasias. En: Harrison, Isselbacher, Wilson, Brawnwald, Fauci and Kasper. Principios de Medicina Interna. Interamericana. Mc, Graw-Hill. Madrid, 1996.
35. - Mayet C. M. Cernimiento Antineoplásico de Nuevos Compuestos de Coordinación Empleando el Modelo Tumoral Murino Melanoma B16. Tesis de licenciatura. Q.F.B. Facultad de Ciencia Químicas, Universidad Veracruzana, 1991.
36. - Foster, H. Small, H. The mouse in biomedical research. Academic Press, 1981.
37. - Betanzos Lara Soledad, Barrón Sosa Lidia, Isabel Gracia Mora. Cytotoxic copper (II), cobalt (II), and nickel (II) coordination compounds of clotrimazole. Journal OF Inorganic Biochemistry. 2012.
38. - Shetty Akhila J. Shyamjith. Acute toxicity studies and determination of median lethal dose. Current Science, Vol. 93. 2007.
39. - V. Riley. Seattle and Wash. Genetic and Immunologic Aproches to Transplantable Mouse Melanomas. 1973. Vol. I Pp. 390-398.
40. - Geran. Greenberg. Macdonald, and Abbot. Methods of development of new anticancer drugs. National Cancer Institute. 1978.

41. - Altman DG. Practical statistics for medical research. London: Chapman & Hall; 1991.
42. - Armitage P, Berry G. In: Statistical methods in medical practice. Oxford: Blackwell Scientific Publication; 1994.p. 477-81.
43. - Delhumeau C, Kaplan DA. Meier Survival Analysis.