



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE  
ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

**“Evaluación de la actividad antineoplásica de los  
compuestos de coordinación NK82 y NBOB3 en  
un modelo tumoral murino de isotransplatación:  
Melanoma B16”**

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE BIÓLOGO

PRESENTA  
LUIS ALBERTO ROMERO GONZALEZ

DIRECTOR DE TESIS  
MARISOL RIVERA HUERTA

MEXICO, D.F.2014





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:** M. en C. María Eugenia I. Heres y Pulido

**Vocal:** Dr. Federico Ávila Moreno

**Secretario:** M. en C. Marisol Rivera Huerta

**1° Suplente:** Dr. Beatriz Vázquez Cruz

**2° Suplente:** M. en C. Francisco Sánchez Bartz

**Sitio donde se desarrolló el tema: Universidad Nacional  
Autónoma de México, Facultad de Química, Conjunto “E”, Unidad  
de Experimentación Animal UNEXA**

**Asesor del Tema:** M. en C. Marisol Rivera Huerta

**Supervisor Técnico:** M. en C. María Isabel Gracia Mora

**Sustentante:** Luis Alberto Romero González

# Indice

Resumen .....	1
Introducción.....	3
Marco teórico.....	4
Cáncer.....	4
Epidemiología .....	7
Etiología.....	11
Carcinogénesis .....	12
Clasificación.....	14
Metástasis .....	14
Tratamiento del cáncer.....	16
Clasificación de los tratamientos.....	18
Quimioterapia.....	21
Historia de la quimioterapia contra el cáncer .....	22
Farmacos quimioterapeúticos.....	26
Desarrollo de fármacos.....	30
Uso de modelos animales.....	35
Modelo de evaluación antineoplásica: Melanoma B16.....	37
Compuestos de coordinación .....	38
Hipótesis .....	40
Objetivos .....	40
Objetivo General .....	40
Objetivos Particulares .....	40
Materiales y Métodos .....	41
Resultados y discusión .....	55
Conclusiones.....	65
Anexos .....	67
Bibliografía.....	112

# Resumen

A nivel mundial el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardíacas seguida por las enfermedades respiratorias y la diabetes; en el 2008 se le atribuyeron 7.6 millones de muertes. En México, durante el 2011 fue la tercera causa de muerte con 71,350 defunciones. Actualmente es posible reducir y controlar la incidencia del cáncer aplicando estrategias de base científica destinadas a la prevención de la enfermedad así como a la detección temprana y al tratamiento de estos enfermos. Es por esto que actualmente existe un gran número de centros e institutos de investigación enfocados a la creación de nuevos fármacos capaces de curar o controlar el cáncer de forma más eficaz y reduciendo los costos en cuanto a la obtención y/o producción de estos, siendo así más accesibles para la población que padece esta enfermedad. Hoy en día existen en el mercado una gran variedad de fármacos antineoplásicos de diferente naturaleza y muchos más que están en proceso de desarrollo, basados en la necesidad de encontrar compuestos con mayor eficacia y menos efectos secundarios. En general, una vez identificada la acción biológica de una sustancia y para que ésta pueda ser evaluada en humanos y posteriormente aprobada para su comercialización es necesario realizar primero una serie de estudios preclínicos; es por esto que se han desarrollado diversos modelos de tumores en ratones como el de Melanoma B16 el cual se utilizó en el presente trabajo para evaluar la actividad antineoplásica de los compuestos de coordinación de origen inorgánico a base de estaño (NK82) y cobre (NBOB3) sintetizados por el Dr. José Norberto Farfán García y la Dra. Noráh Barba Beherens respectivamente, en ratones de la cepa CB6F1/Hsd. Se cree que si estos compuestos de coordinación NK82 y NBOB3 han presentado ya actividad *in vitro* en diversas líneas celulares entonces mostrarán actividad antineoplásica en los modelos murinos propuestos por el NCI, por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar su actividad antineoplásica en el modelo tumoral murino de isotrasplatación con Melanoma B16F10 en ratones de la cepa CB6F1:Hsd. Este estudio se llevó a cabo siguiendo el protocolo internacional establecido por el National Cancer Institute, Se utilizaron 80 ratones hembras de la cepa singénica CB6F1:Hsd que fueron inoculadas con la línea

tumoral de Melanoma B16F10, y separados en ocho grupos para que cada grupo recibiera un tratamiento diferente ya sea agua inyectable, ciclofosfamida, y los compuestos NK82 y NBOB3 de forma crónica e intermitente. La evaluación de la actividad antineoplásica se realizó mediante la obtención de los índices T/C, el porcentaje de incremento de peso, el índice de supervivencia, y analizados estadísticamente mediante ANDEVA, el método de Kaplan-Meier y la prueba de Log-Rank utilizando el programa estadístico SPSS 16.0. Los resultados nos muestran durante los primeros días del experimento el nivel toxicidad que tuvo cada tratamiento y después un aumento de peso en la mayoría de los ratones debido a la formación de la masa tumoral. Los controles que se usaron en este ensayo se comportaron como se esperaba, el grupo de ciclofosfamida obtuvo los valores indicados por el protocolo. En general el grupo tratado con 3.8 mg/kg de NK82 de forma intermitente fue el que presentó un resultado menos favorable ya que su incremento de peso fue mayor y una supervivencia menor, incluso que la del control negativo. El grupo que se trató de forma crónica con NK82 presenta una supervivencia hasta el día 60 en que terminó el estudio y obtuvo valores de T/C e ILS que están dentro del rango de eficacia aceptado por el NCI para el modelo utilizado. Estos resultados fueron confirmados por las pruebas estadísticas que indican diferencias significativas entre los tratamientos. Por lo tanto se propone modificar los tratamientos que no presentaron los resultados esperados y continuar con las pruebas de los que sí fueron favorables.

# Introducción

La posibilidad de prescribir un medicamento conlleva un largo y complejo proceso de investigación y desarrollo que es llevado a cabo por un grupo multidisciplinario de científicos que incluye químicos, biólogos, toxicólogos, médicos, farmacólogos, bioquímicos y científicos de la computación. En promedio, el desarrollo de un nuevo fármaco dura 12-15 años y significa una inversión cercana a los US\$ 600 millones antes que sea aprobado para su comercialización (1).

Actualmente la industria farmacéutica es de gran importancia a nivel económico y social en todo el mundo ya que está destinada a satisfacer las necesidades de la gente creando, desarrollando e innovando nuevos fármacos para la cura o prevención de enfermedades.

Las enfermedades cardíacas, el cáncer, las enfermedades respiratorias y la diabetes son las principales causas de mortalidad en el mundo siendo responsables del 60% de las muertes; estas enfermedades son consideradas como crónicas-degenerativas pues, por lo general, son de progresión lenta y hacen que el paciente pierda poco a poco funciones fisiológicas importantes. Esto lleva al deterioro en la calidad de vida del paciente (2).

A nivel mundial el cáncer es la segunda causa de muerte después de las enfermedades cardíacas seguida por las enfermedades respiratorias y la diabetes; en el 2008 se le atribuyeron 7.6 millones de muertes (3). En México, durante el 2011 fue la tercera causa de muerte con 71,350 defunciones (4). Estos datos son de gran relevancia para el sector salud ya que los tratamientos destinados a controlar y curar dicha enfermedad representan un gran costo para la sociedad. Es por esto que actualmente existe una gran maquinaria de investigación biomédica, apoyada por los grandes consorcios, destinada a la mejora de los tratamientos que existen actualmente y a la búsqueda de nuevas alternativas altamente eficaces para tratar el cáncer (5).

Un gran número de centros e institutos de investigación que están enfocando sus recursos a la creación de nuevos fármacos capaces de curar o controlar el cáncer de una mejor forma y reduciendo los costos en cuanto a la obtención y/o producción de los fármacos que existen actualmente, lo que significaría también una disminución en el costo de venta y mayor accesibilidad para los gobiernos y la población que padece esta enfermedad.

# Marco teórico

## Cáncer

Cáncer es el término usado para designar a un grupo de enfermedades que pueden afectar a cualquier parte del cuerpo. También conocidas como tumores o neoplasias malignas (3).

La característica de esta enfermedad es la multiplicación de células anormales las cuales se dividen a una velocidad mayor de la que en condiciones normales estas crecerían, y que puede invadir tejidos adyacentes y expandirse a otros órganos por el torrente sanguíneo y por el sistema linfático formando nuevos tumores. (6)

En condiciones normales las células del cuerpo crecen y se dividen en una forma controlada para producir más según sean necesarias (Figura 1). Cuando éstas envejecen o se dañan, comúnmente mueren por un proceso conocido como apoptosis.



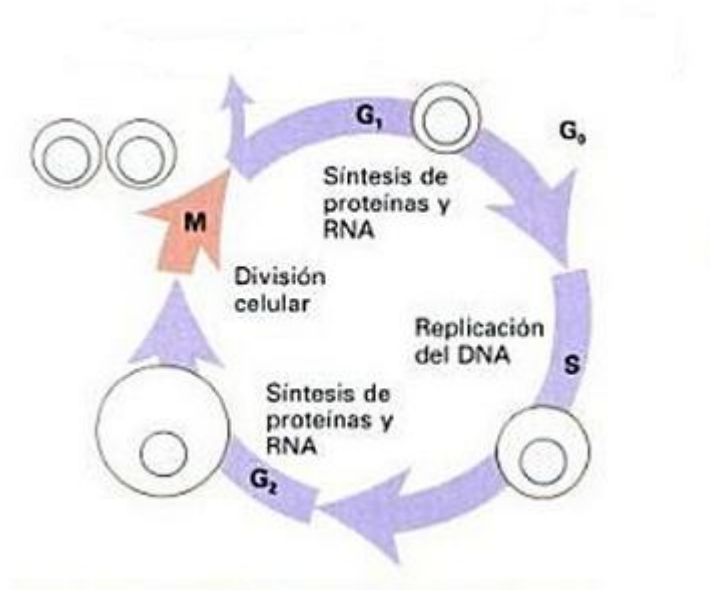


Fig. 1 - Fases del ciclo celular. Proceso mediante el cual las células se crecen y se dividen para formar nuevas células (7).

La apoptosis es un proceso fisiológico de eliminación celular estrechamente regulado y caracterizado por una secuencia de cambios morfológicos bien definidos:

contracción celular

condensación de la cromatina

fragmentación nuclear y celular

formación de cuerpos apoptóticos, que son engullidos por las células fagocíticas próximas antes de que se pierda la integridad de la membrana (8).

Sin embargo, algunas veces este proceso puede alterarse si el material genético de una célula sufre mutaciones que afectan el crecimiento y su división normal. Cuando esto sucede, las células no mueren cuando deberían morir y células nuevas se forman cuando el cuerpo no las necesita. Las células que se crean en exceso forman una masa anormal de tejido que es lo que se conoce como neoplasia o tumor (Figura 2). Sin embargo, algunos tipos de cáncer no forman tumores. Por ejemplo, la leucemia que es un cáncer de la médula ósea y de la sangre (6).

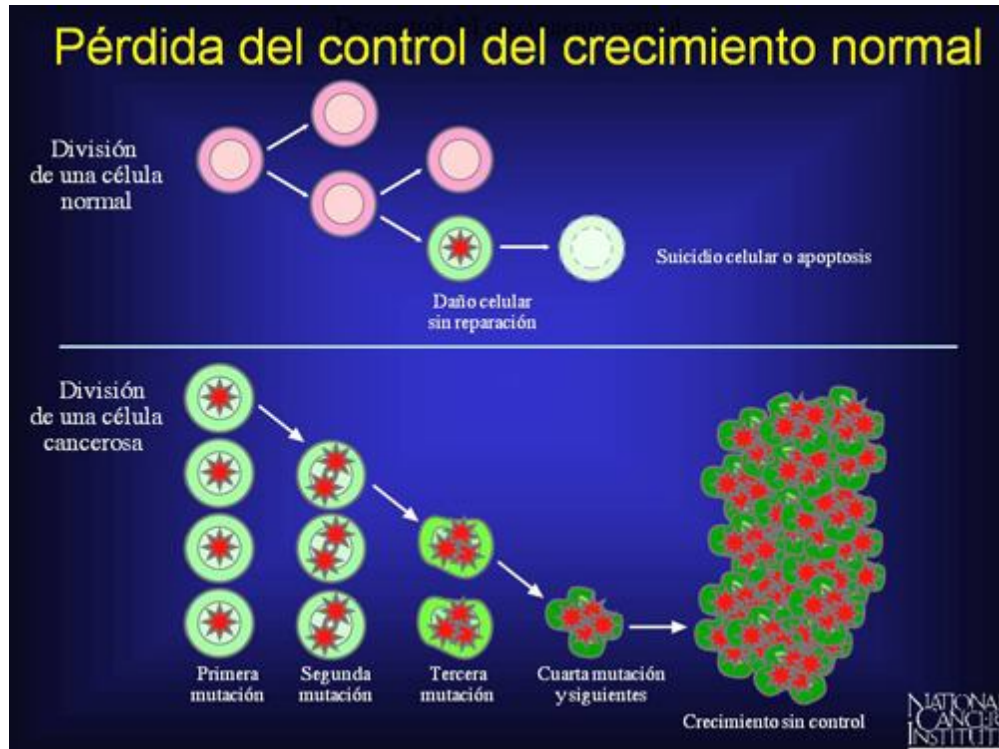


Fig. 2 - Pérdida del control del crecimiento de una célula normal al transformarse en una célula cancerosa (6).

No todos los tumores son cancerosos; puede haber tumores benignos y tumores malignos.

Tumores benignos: no son cancerosos, se encuentran encapsulados y pueden extirparse y, en la mayoría de los casos, no vuelven a aparecer. Las células de los tumores benignos no se diseminan a otras partes del cuerpo.

Tumores malignos: son cancerosos, las células de estos tumores pueden invadir tejidos cercanos y diseminarse a otras partes del cuerpo.

# Epidemiología

El cáncer es una de las principales causas de muerte a escala mundial y puede llegar a afectar a cualquier persona (Figura 3). Según la OMS se estimaron 12.4 millones de casos de cáncer en el 2008 y 7.6 millones de muertes (aproximadamente un 13% del total) a nivel mundial, y se prevé que estas cifras aumenten en todo el mundo y que para el 2030 la incidencia llegue a 26.4 millones de casos de cáncer y 17.0 millones de muertes al año debido a esta enfermedad (9).

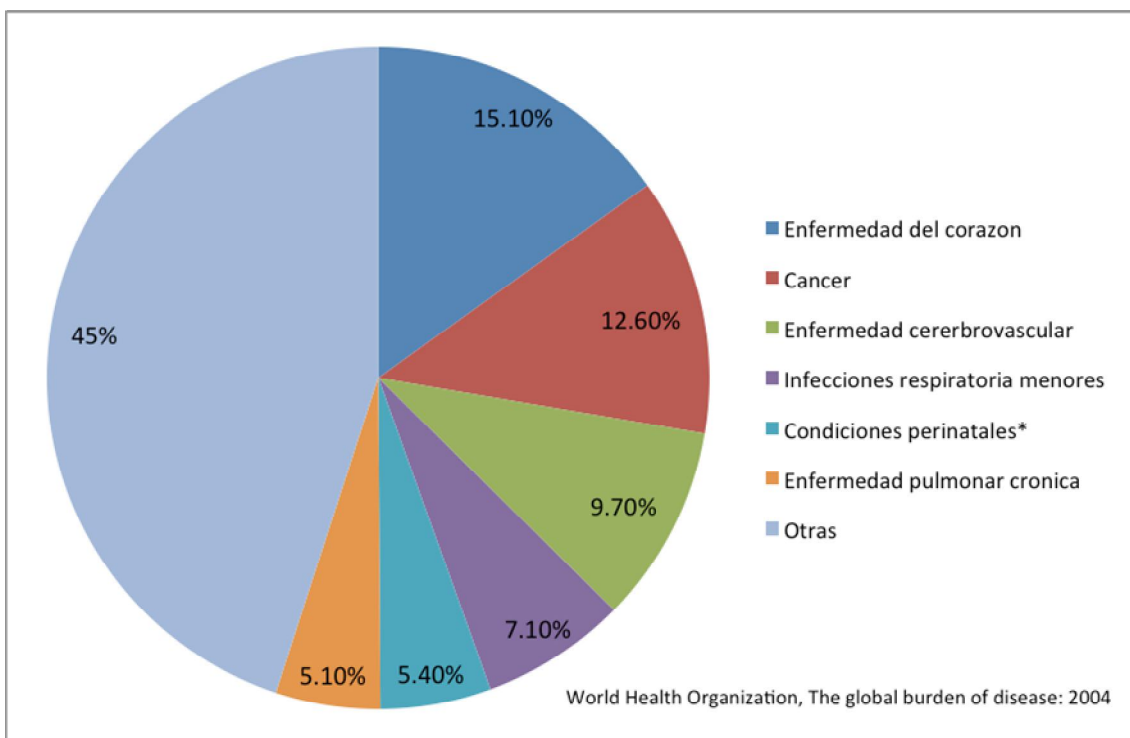


Fig. 3 - Principales causas de muerte a nivel mundial, 2004. (Total: 58,772,000) (10).

Aproximadamente un 70% de las muertes por cáncer registradas en 2008 se produjeron en países de ingresos bajos y medios (Figura 4, 7 y 8).

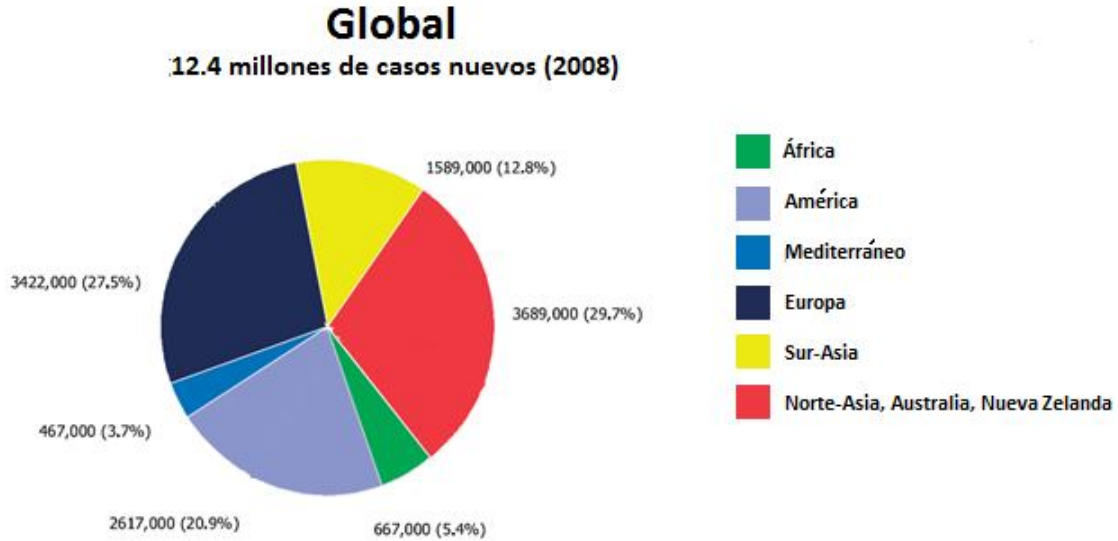


Fig. 4 - Distribución de la incidencia mundial de cáncer por regiones de la OMS 2008 (9)

Los tipos de cáncer más frecuentes son diferentes en el hombre y en la mujer, varían también entre cada país y a nivel mundial.

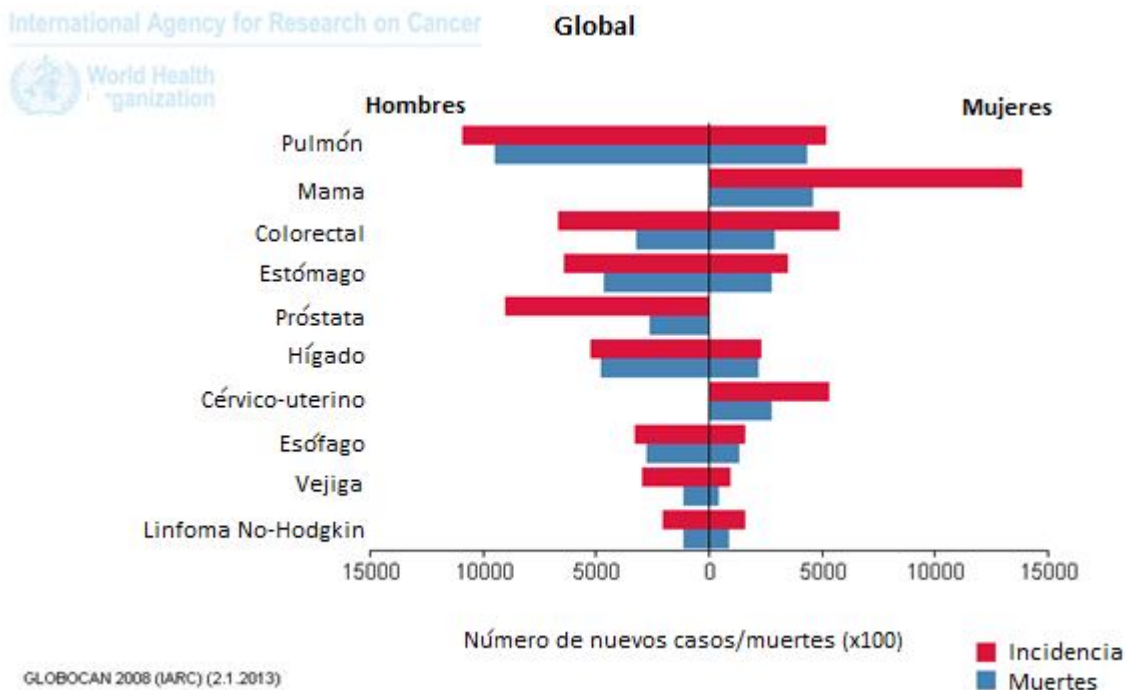


Fig. 5 - Principales tipos de cáncer en hombres y mujeres a nivel mundial (11).

A nivel global el cáncer de pulmón es el más común y la mayor causa de muerte en hombres mientras que en mujeres es el cáncer de mama (Figura 5).



Fig. 6 - Principales tipos de cáncer en hombres y mujeres en México (11).

A diferencia, en México el cáncer más común en hombres es el de próstata, sin embargo se presentan más muertes a causa del cáncer de pulmón mientras que en mujeres el cáncer de mama permanece con la mayor incidencia y mortalidad (Figura 6).

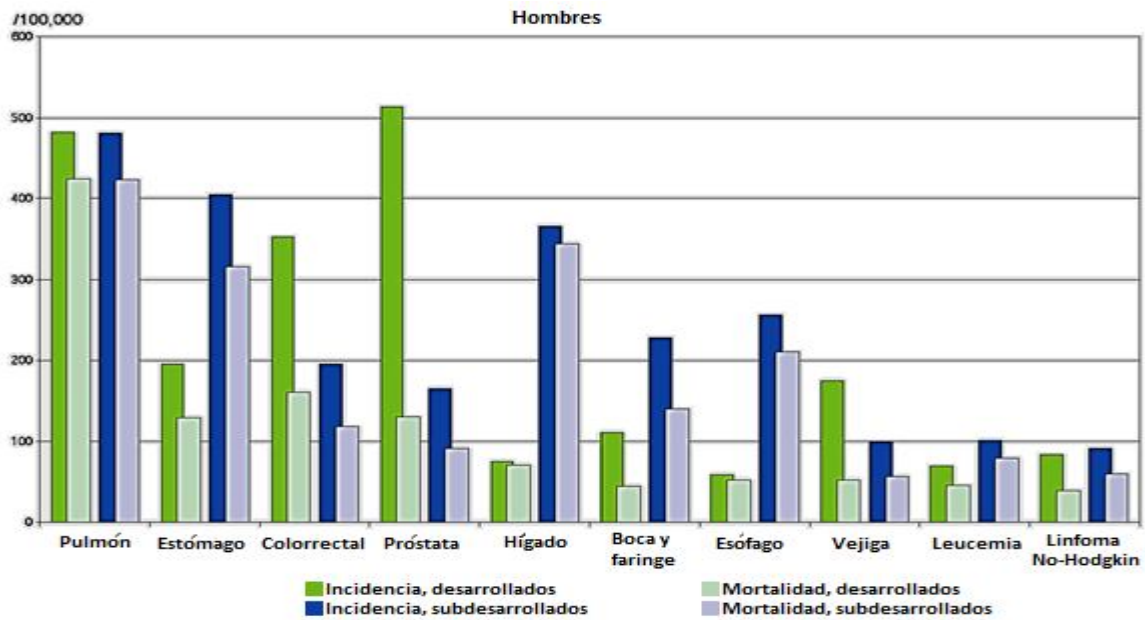


Fig. 7 - Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más comunes en hombres en países desarrollados y subdesarrollados (9).

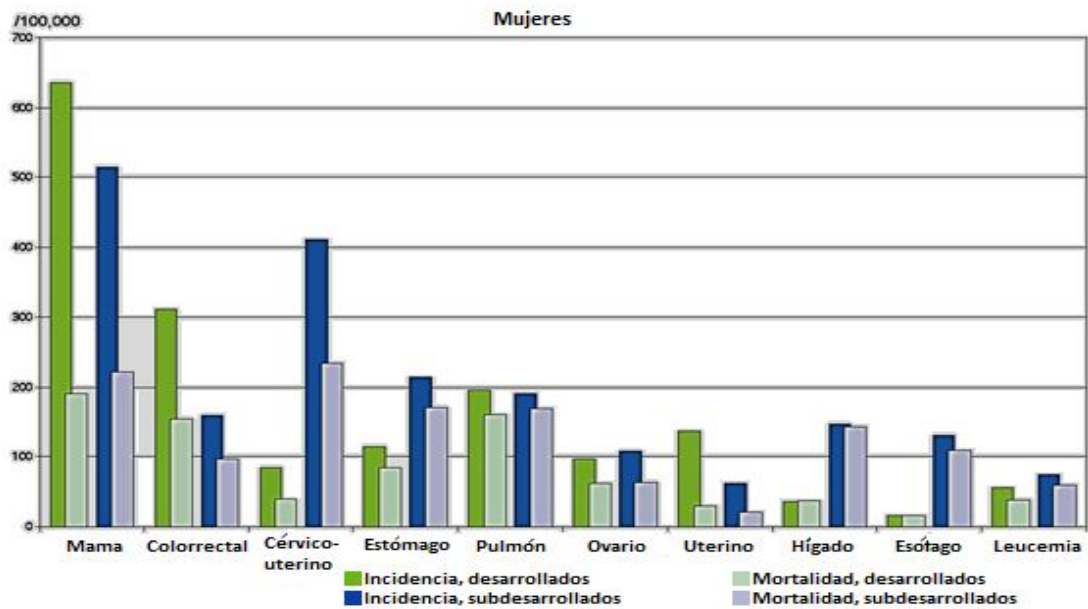


Fig. 8 - Incidencia y mortalidad de los tipos de cáncer más comunes en mujeres en países desarrollados y subdesarrollados (9).

# Etiología

El cáncer es un complejo grupo de enfermedades con un gran número de causas posibles

Aproximadamente un 30% de las muertes por cáncer son debidas a cinco factores de riesgo conductuales y dietéticos:

- índice de masa corporal elevado
- ingesta reducida de frutas y verduras
- falta de actividad física
- consumo de tabaco
- consumo de alcohol.

El consumo de tabaco es el factor de riesgo más importante, es la causa del 71% de las muertes mundiales por cáncer de pulmón.

Los tipos de cáncer causados por infecciones víricas, tales como las infecciones por virus de las hepatitis B (VHB) y C (VHC) o por Virus del papiloma humano (PVH), son responsables de hasta un 20% de las muertes por cáncer en los países de ingresos bajos y medios (3).

Por su gran incidencia es común que en las familias varios miembros lleguen a tener cáncer, algunos tipos de cáncer son causados por una mutación somática esporádica en un gen y que se transmite de generación en generación. Estas mutaciones pueden ser causadas por diversas cosas a las cuales estamos expuestos dentro de nuestro ambiente tales como el humo de cigarro, radiaciones y una mala dieta, estas mutaciones aumentan con la edad propiciando un mayor riesgo a contraer cáncer. Sólo entre el 5% y 10% de todos los casos de cáncer son hereditarios.

Existen algunos síndromes familiares de cáncer, en donde algunos tipos de cáncer parecen ir de la mano. Por ejemplo, el cáncer de mama y ovario suelen presentarse conjuntamente en familias con el síndrome de cáncer de mama y ovario hereditario. También el cáncer de colon y el endometrial tienen a relacionarse en la presencia en un síndrome llamado cáncer colorectal hereditario no poliposo también conocido como síndrome de Lynch (12).

Se sabe mucho acerca de las causas del cáncer y las intervenciones encaminadas a prevenir y tratar la enfermedad. El riesgo de padecer muchos tipos de cáncer se puede reducir mediante la adopción de hábitos de vida saludables, como alimentarse bien, hacer ejercicio con regularidad y evitando la exposición a factores de riesgo comunes como el humo de tabaco y el alcohol.

Más del 30% de las defunciones por cáncer podrían evitarse modificando o evitando los principales factores de riesgo.

## **Carcinogénesis**

Es un proceso que consta de tres etapas mediante el cual un tumor se puede transformar en maligno y desarrollar cáncer:

### **Iniciación**

Esta etapa comienza cuando una molécula o un agente físico interacciona con la célula causando daños en el DNA; en la mayoría de los casos estas lesiones son reparadas pero si la célula está muy dañada entonces es eliminada. Cuando ninguno de estos dos eventos ocurre, el daño puede inducir a una o varias mutaciones heredables. Esta mutación puede ser irrelevante si no afecta a la proteína que es codificada por el gen mutante o si produce una sustitución que no afecte la función de dicha proteína; también es posible que la alteración no sea compatible con la progresión del ciclo celular. Aunque existe la posibilidad de que esta mutación sea expresada en una proteína mutada que reprogramme a la célula a multiplicarse y evitar la apoptosis. Cuando esto sucede, las nuevas células tendrán la misma predisposición a dividirse sin control y con esto aumentar la posibilidad de que se presenten futuras mutaciones durante cada división y aumentar su tasa de proliferación, formando una aglomeración de células anormales que se convertirá en un tumor (13).



## Promoción

Una vez que una célula ha sido mutada por uno o varios iniciadores, ésta es susceptible a los efectos de los promotores. Estos compuestos promueven la proliferación de la célula, dando origen a un gran número de células hijas que contienen la mutación creada por los iniciadores (14).

Los promotores no tienen efecto cuando el organismo en cuestión no ha sido tratado previamente con un iniciador (15).

A diferencia de los iniciadores, los promotores no se unen covalentemente al DNA o a otras macromoléculas en la célula. Muchos se enlazan a receptores sobre la superficie de la célula para afectar señales intracelulares que llevan a un aumento en la proliferación celular (16).

Hay dos categorías generales de promotores: promotores específicos que interactúan con receptores en las células blanco de tejidos definidos y son específicos para una especie o tejido en particular, gracias a su interacción con receptores presentes en distintas cantidades en distintos tipos de tejido y promotores no específicos que alteran la expresión genética sin la presencia de un receptor conocido.

## Progresión

El agente progresor es aquel compuesto químico capaz de convertir una célula iniciada o en estado de promoción en una célula potencialmente maligna. La progresión de la carcinogénesis se puede producir también mediante la incorporación en el genoma de información genética exógena o alteraciones cromosómicas espontáneas.

Se refiere a la transformación irreversible de un tumor benigno a maligno. La progresión está asociada con el cambio cariotípico ya que todos los tumores que avanzan son aneuploides. Este cambio cariotípico viene con un aumento en el índice de crecimiento, invasión, metástasis y una alteración en la bioquímica y la morfología (15).

## Clasificación

El cáncer engloba a más de 100 diferentes tipos de anomalías. La mayoría de éstas toman el nombre del órgano o de las células en donde comienza a desarrollarse (6).

Las principales categorías en que pueden agruparse los diferentes tipos de cáncer son:

**Carcinoma:** Empieza en la piel o en tejidos que revisten o cubren los órganos internos.

**Sarcoma:** Empieza en hueso, en cartílago, grasa, músculo, vasos sanguíneos u otro tejido conjuntivo o de sostén.

**Leucemia:** 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:** Empiezan en las células del sistema inmunitario.

**Cáncer del sistema nervioso central:** Empieza en los tejidos del cerebro y de la médula espinal.

Una vez que se desarrolla algún tipo de cáncer este puede seguir propagándose y expandiéndose hasta invadir otros tejidos y órganos a distancia, este proceso se conoce como metástasis; las metástasis son la principal causa de muerte por cáncer (6).

## Metástasis

La metástasis es una cascada de pasos ligados secuencialmente que involucran múltiples interacciones entre el tumor y el organismo (17, 18, 19).

Una célula o un grupo de células tumorales deben ser capaces de liberarse del tumor primario, invadir el tejido local del individuo, entrar a la circulación, detenerse en alguna zona vascularizada distante, extravasarse en el intersticio y parénquima del órgano blanco y proliferar como una colonia secundaria. Para la expansión de la masa tumoral primaria es indispensable la angiogénesis, ya que frecuentemente los nuevos vasos sanguíneos que penetran en el tumor son sitios mediante los cuales la célula tumoral entra a la circulación; también es necesaria la angiogénesis para la expansión de la colonia metastásica (20, 21).

En cualquier etapa, las células tumorales deben evadir la respuesta inmune del hospedero (18).

Las células normales se mantienen en su lugar gracias a la acción de la matriz extracelular, una estructura formada por proteínas y carbohidratos que forman fibras por las cuales las células se unen entre sí. Estos contactos pueden retener a las células en su lugar, pero en células cancerosas también pueden estimularlas a formar extensiones para el movimiento migratorio favoreciendo la metástasis (22).

La pérdida de acción de estas proteínas también ocurre como parte de la transformación de células cancerosas de un estado epitelial a un estado de mayor movilidad; un cambio conocido como transición epitelio-mesenquimal o EMT (23, 24).

Para diseminarse, las células tumorales deben ser capaces de romper sus lazos con la estructura cohesiva del tejido de origen. La adhesión entre células se reduce por la pérdida de proteínas de anclaje que las une. La pérdida de estas proteínas en tumores puede darse por varios mecanismos, incluyendo mutaciones o silenciamiento epigenético del gen que las codifica (25, 26).

Sólo un porcentaje muy pequeño (<0.01%) de las células tumorales en circulación llegan a iniciar exitosamente colonias metastásicas, es por esto que se ha visto a la metástasis como una competencia altamente selectiva que favorece la supervivencia de una subpoblación de células tumorales metastásicas derivadas de un tumor primario heterogéneo (17).

Las células cancerosas se pueden diseminar desde estadios muy tempranos, cuando el tumor es pequeño y todavía no ha sido diagnosticado. Esto no significa que las primeras células en salir sean las que progresen hacia una metástasis manifiesta, pero sí indica que la diseminación no es propiedad exclusiva de tumores crecidos o avanzados.

En algunos casos, una vez que las células diseminadas alcanzan órganos distantes y sobreviven en el nuevo entorno se mantienen en un estado de latencia. Esto significa que al salir del tumor primario ya disponían de las facultades necesarias para diseminarse e infiltrar ciertos órganos, pero todavía no reunían todas las condiciones necesarias para la colonización agresiva del órgano infiltrado. Este estado de latencia puede durar años, incluso décadas, antes de que las células tumorales diseminadas evolucionen agresivamente hasta llegar a formar metástasis clínicamente detectables.

La diseminación también puede darse desde tumores metastásicos que, a su vez, siembran nuevas metástasis. Es posible que células tumorales en circulación puedan reinfiltrarse en los mismos tumores de los que partieron. De acuerdo con esta hipótesis, los tumores pueden autoenriquecerse con su progenie más agresiva, ofreciendo un mecanismo que asocia la habilidad metastásica con el crecimiento del tumor (27). Esto explicaría la correlación entre las metástasis y el tamaño del tumor (28).

## Tratamiento del cáncer

Es posible reducir y controlar la incidencia del cáncer aplicando estrategias de base científica destinadas a la prevención de la enfermedad así como a la detección temprana y al tratamiento de estos enfermos. Muchos tipos de cáncer tienen grandes probabilidades de curarse si se detectan tempranamente y se tratan de forma adecuada. Por ejemplo el cáncer de mama, el cervical y colorectal que son de los tipos con mayor relevancia, pueden ser curados si se da una detección temprana y un tratamiento adecuado (29).

El tratamiento dado para el cáncer es muy variable y depende en un número de factores propios de la enfermedad y del estado físico del paciente. El tratamiento varía de acuerdo con el tipo, el lugar y tamaño del tumor. Es por esto que es necesario conocer el grado de tumor y el estadio del cáncer antes de preparar un plan individual de tratamiento para el paciente y poder emitir un pronóstico (30, 31).

La determinación del grado de un tumor es un sistema que se usa para clasificar las células cancerosas en cuanto a su diferencia de las células normales y a la rapidez probable de crecimiento y diseminación del tumor. Algunos factores que se consideran al determinar el grado de un tumor son el grado histológico, el grado nuclear y el porcentaje de células del tumor que se están dividiendo. Generalmente, un grado bajo indica un pronóstico mejor (32).

La estadificación describe la gravedad del cáncer que aqueja a una persona basándose en la extensión del tumor original y si el cáncer se ha diseminado en el cuerpo o no. Los elementos comunes que se consideran en la mayoría de los sistemas de estadificación son:

- Sitio del tumor primario
- Tamaño del tumor y número de tumores
- Complicación de ganglios linfáticos (diseminación del cáncer a los ganglios linfáticos)
- Tipo de célula y grado de desarrollo del tumor
- Presencia o ausencia de metástasis.

El sistema TNM es uno de los sistemas de estadificación de mayor uso. Está basado en la extensión del tumor (T), el grado de diseminación a los ganglios linfáticos (N), y la presencia de metástasis (M) distante. Un número se añade a cada letra para indicar el tamaño o extensión del tumor y el grado de diseminación del cáncer.

Para muchos cánceres, las combinaciones TNM corresponden a una etapa o estadio de cinco posibles (Tabla 1).

Tabla 1. Estadificación de tumores (6).

Estadio	Definición
Estadio 0	Carcinoma <i>in situ</i> .
Estadio I, Estadio II y Estadio III	Los números más altos indican enfermedad más extensa: tamaño mayor del tumor o diseminación del cáncer más allá del órgano en donde se formó originalmente a los ganglios linfáticos vecinos o a los órganos adyacentes al sitio del tumor primario.
Estadio IV	El cáncer se ha diseminado a otros órganos.

En donde se agrupan los casos de dicha enfermedad en cinco categorías principales:

**In situ:** las células anormales están presentes sólo en la capa de células en donde se forman.

**Localizado:** el cáncer se limita al órgano en donde empezó, sin evidencia de diseminación.

**Regional:** el cáncer se ha diseminado más allá del sitio primario a ganglios linfáticos o a órganos y tejidos cercanos.

**Distante:** el cáncer se ha diseminado desde el sitio primario a órganos distantes o a ganglios linfáticos distantes.

**Desconocido:** no hay información suficiente para determinar la etapa o estadio.

Si el cáncer está confinado a un sólo lugar y no se ha diseminado, el método de tratamiento más común es la cirugía para curar el cáncer.

Si el tumor se ha diseminado sólo a los ganglios linfáticos locales, éstos algunas veces también se pueden extirpar.

Si todo el cáncer no se puede extirpar totalmente por medio de cirugía, las opciones primarias de tratamiento son: radioterapia, quimioterapia o ambas. Algunos tipos de cáncer requieren la combinación de cirugía, radiación y quimioterapia.

El linfoma (cáncer de ganglios linfáticos) rara vez se trata con cirugía. La quimioterapia y la radioterapia se utilizan con mayor frecuencia para tratar este tipo de cáncer (30, 31).

## Clasificación de los tratamientos

El tratamiento del cáncer requiere una cuidadosa selección de una o más modalidades. El objetivo consiste en curar la enfermedad o prolongar considerablemente la supervivencia y mejorar la calidad de vida del paciente matando o removiendo directamente a las células cancerosas o llevándolas a su muerte por medio de la deprivación de señales necesarias para la división celular o estimulando las defensas propias. El diagnóstico y el tratamiento del cáncer se complementan con el apoyo psicológico (3).

Los tratamientos pueden ser divididos en categorías basadas en su fin y modo de acción. Los diferentes tipos de tratamiento son usados constantemente en combinación, ya sea simultáneamente o secuencialmente.

## **Cirugía**

La cirugía oncológica tiene un papel importante en el manejo del cáncer, para profilaxis, diagnóstico, evaluación de la extensión de la enfermedad, el control del tumor primario, el control de la enfermedad regional y el tratamiento de las complicaciones. En ausencia de enfermedad sistémica, la escisión quirúrgica es el tratamiento más eficaz de las neoplasias sólidas, en los casos donde el cáncer es detectado en una etapa temprana, la cirugía puede ser suficiente para curar al paciente al remover todas las células cancerosas. Incluso en casos muy seleccionados con enfermedad metastásica, la cirugía podría controlar el tumor primario y obtener curaciones al lograr la resección de enfermedad metastásica limitada.

En casos idóneos, la cirugía es el tratamiento primario para el cáncer de mama, esófago, tiroides, estómago, hígado, páncreas, colon, recto, piel, melanoma y sarcomas, entre otros. Los tumores benignos también pueden ser removidos por medio de la cirugía.

Se estima que la resección quirúrgica produce 62% de las curaciones (33).

## **Radioterapia**

La radiación es energía que se transmite mediante ondas o mediante una corriente de partículas. Puede dañar los genes (DNA) y algunas moléculas de la célula cancerosa de manera que ya no pueda crecer y dividirse, reduciendo la masa tumoral. La radiación que se usa para tratar el cáncer se llama radiación ionizante y se puede clasificar en dos tipos importantes:

- Fotones (rayos X y rayos gamma), que son los que se usan más ampliamente.
- Radiación con partículas (electrones, protones, neutrones, iones de carbono, partículas alfa y partículas beta).

Algunos tipos de radiación ionizante tienen más energía que otros. Cuanto mayor sea la energía, más profundamente puede penetrar la radiación en los tejidos. El comportamiento de cierto tipo de radiación es importante para planear los tratamientos con tal radiación. La radiación bien administrada se considera un tratamiento local debido a que sólo afecta a las células cancerosas y a células a su alrededor. No puede curar un cáncer que ya se ha propagado a partes distantes del cuerpo, porque la mayoría de las formas de radioterapia no llegan a todas las partes del cuerpo. La radiación se usa para tratar el cáncer de varias maneras. Algunos tipos de cáncer son muy sensibles a la radiación. En estos casos se puede usar la radiación sola para reducir el tamaño del tumor o hacerlo desaparecer completamente. Para otros tipos de cáncer, se puede usar antes de la cirugía para reducir el tamaño del tumor o después de la cirugía para evitar recurrencia; algunos tipos pueden ser también resistentes a las radiaciones (34, 35).

## **Terapias biológicas**

Las terapias biológicas utilizan el sistema inmunitario del cuerpo, ya sea directa o indirectamente, para combatir el cáncer o para disminuir los efectos secundarios que pueden causar algunos tratamientos. Están diseñadas para reparar, estimular o mejorar las respuestas del sistema inmunitario. Las terapias biológicas incluyen los interferones, las interleucinas, los factores estimulantes de colonias, los anticuerpos monoclonales, las vacunas, la terapia génica y las sustancias inmunomoduladores no específicas.

Las terapias biológicas pueden ser usadas para:

- Detener, controlar o suprimir los procesos que permiten que crezca el cáncer;
- Hacer que las células cancerosas se puedan reconocer con más facilidad y, por lo tanto, que el sistema inmunitario las destruya con más facilidad;
- Bloquear o revertir el proceso que hace que una célula normal o célula precancerosa se convierta en célula cancerosa;
- Mejorar la capacidad del cuerpo para reparar o reemplazar las células normales dañadas o destruidas por otras formas de tratamiento del cáncer, como la quimioterapia o la radiación; e
- Impedir que las células cancerosas se diseminen a otras partes del cuerpo (12).



# Quimioterapia

Si bien la prevención es una estrategia para disminuir la incidencia de la enfermedad, el origen multifactorial de ésta hace difícil que se use como única forma de combate, por lo que es necesario continuar con los esfuerzos para encontrar agentes anticancerígenos efectivos. Dichos esfuerzos comenzaron a principios de 1900 cuando el químico Paul Ehrlich, quien designó el nombre de quimioterapia para el uso de químicos para tratar enfermedades, se dedicó a desarrollar fármacos para tratar enfermedades infecciosas, y fue el primero en documentar la efectividad de modelos animales en la evaluación de fármacos, lo cual tuvo un gran impacto en el desarrollo de fármacos antitumorales (36).

La quimioterapia antineoplásica consiste en la administración de un conjunto de fármacos que actúan destruyendo células tumorales por inhibición de la síntesis de DNA (efecto citotóxico) o impidiendo la división celular mediante la alteración de las fases importantes del crecimiento (efecto citostático), en definitiva interfiriendo el crecimiento tumoral.

A diferencia de la cirugía o la radiación, la quimioterapia siempre se usa como tratamiento sistémico, aunque a veces se utiliza para lesiones localizadas como coadyuvante de otros tratamientos.

Desafortunadamente, estos fármacos no son específicos para las células malignas, por lo que las células normales también pueden verse afectadas por el tratamiento, dando lugar a la toxicidad.

Las células normales que con más probabilidades resultan dañadas son aquellas que se dividen rápidamente:

- Células sanguíneas/de la médula ósea.
- Células de los folículos pilosos.
- Células del recubrimiento del tracto digestivo.
- Células del recubrimiento del tracto reproductor.

Lo que da lugar a los potenciales efectos adversos asociados con su administración.

La quimioterapia se usa para tratar muchos tipos de cáncer. En la actualidad se usan más de 100 medicamentos para quimioterapia, ya sea en monoterapia o en combinación con otros medicamentos o tratamientos y se pueden dividir en varios grupos basándose en factores tales como su mecanismo de acción, su estructura química y su relación con otros medicamentos (37, 38, 39, 40).

## **Historia de la quimioterapia contra el cáncer**

En la década de 1910 Paul Ehrlich desarrolló el primer sistema de trasplante de tumor en roedores, lo que permitió la estandarización de modelos para la evaluación de nuevas sustancias. Los primeros modelos que se desarrollaron incluían al Sarcoma 37 (S37), Sarcoma 180 (S180), Walker 256, y el tumor ascítico de Ehrlich, todos tumores cancerígenos inducidos en ratones (36).

En 1935, se creó un programa que se convertiría en un modelo para la evaluación de fármacos antineoplásicos y con el cual se evaluaron una amplia gama de compuestos, incluyendo productos naturales. Se evaluaron aproximadamente 3,000 compuestos usando el modelo murino S37 (41, 36).

Durante la Segunda Guerra Mundial se llevaron a cabo varias investigaciones una de ellas fue demostrar los efectos de los gases como armas químicas, en especial el gas mostaza y sus efectos observados en las tropas lo cual permitió observar que las células de la médula ósea y nódulos linfáticos se iban agotando en aquellas personas que estuvieron expuestas a este gas (42, 43, 44, 45).

En 1946 Goodman y Gilman realizaron experimentos en ratones usando un tumor linfoide trasplantable y lo trataron con el compuesto de mostaza nitrogenada, al observar una buena respuesta, realizaron estudios en pacientes con linfoma no Hodgkin administrando este compuesto y obteniendo resultados alentadores (46, 47, 48).

A partir de estos resultados, en 1943 se otorgó un gran apoyo a la síntesis y evaluación de una gran cantidad de compuestos alquilantes relacionados incluyendo derivados orales como el clorambucil y más recientemente la ciclofosfamida.

También durante estas investigaciones se encontró un factor, el ácido fólico, presente en los vegetales verdes que era importante para el funcionamiento de la médula ósea, y que en 1937 fue sintetizado, se demostró que la deficiencia de folato podía producir efectos parecidos a los de las mostazas nitrogenadas. Después se evaluó el ácido fólico en leucemia y se concluyó que aceleraba el crecimiento de estas células (49).

Aunque después surgieron algunas dudas sobre estas investigaciones, se desarrollaron análogos del ácido fólico que eran antagonistas del folato tal como la aminopterina y ametopterina, mejor conocidos ahora como metotrexato, en 1948 fueron probados estos compuestos en niños con leucemia mostrando una indudable regresión (50).

Durante ese tiempo, basado en los supuestos efectos antitumorales de la penicilina los cuales nunca se confirmaron, también se evaluaron los efectos de algunos antibióticos que se usaban para tratar infecciones por heridas. Resultando de este programa la actinomicina D la cual presentó significantes propiedades y se usó en el tratamiento de tumores pediátricos en los 50s y 60s, y otros antibióticos que son comúnmente usados hoy en día (51).

Estos resultados también impulsaron el desarrollo de otros fármacos. En 1948 se aisló una sustancia que inhibía el metabolismo de adenina, y para 1951 se desarrollaron la 6-tioguanina y la 6-mercaptopurina, estas tiopurinas y otros fármacos relacionados han sido usados satisfactoriamente no solo para leucemias agudas sino también para otras enfermedades (52, 53).

Fue hasta mediados de los 50s cuando se desarrolló un fármaco enfocado a tipos de cáncer no hematológicos, la síntesis de la fluoropirimidina 5- fluorouracilo (5-FU) a partir de una vía bioquímica del hepatoma en rata. Demostró actividad de amplio espectro contra tumores sólidos, por lo cual hasta la fecha sigue siendo usado para algunos tipos de cáncer. Este fármaco se convirtió en el primer ejemplo de terapia dirigida, la cual ahora es una alternativa muy importante en el desarrollo de fármacos antineoplásicos (54).

Durante la década de 1950 también se descubrieron los corticoesteroides, los cuales solían ser usados en pacientes con cáncer y en los cuales se encontró que producía una leve respuesta, inclusive cuando se usaban solos (55).

Durante la época de 1960 las terapias que dominaban el tratamiento del cáncer era la cirugía y la radioterapia, esto hasta que se observó que la tasa de curación aun con tratamientos muy radicales era alrededor de 33% debido a la presencia de micrometástasis no identificadas, y que la quimioterapia en combinación podía curar el cáncer avanzado. Con esto se empezó a utilizar la quimioterapia en conjunto con la cirugía o la radiación para tratar el problema de metástasis lo cual permitió mejorar los efectos antineoplásicos minimizando el grado de toxicidad (56, 57, 58, 59).

Con el descubrimiento de la actividad de los alcaloides de la planta *Vinca rosea* y de la ibenzmetizina (después llamada Procarbazona), se logró un gran avance para las leucemias y linfoma de Hodgkin (60, 61).

Con el conocimiento de la mejoría en la eficacia de la quimioterapia en combinación, se diseñó el programa conocido como "VAMP" (el alcaloide de *Vinca rosea*: Vincristina, ametopterina, 6-mercaptopurina y prednisona), el cual fue el primero de una serie de programas de tratamiento administrados cíclicamente y que aumentaron el rango de regresión de tumores en 60%, en comparación con las terapias usadas anteriormente.

A partir de esto, nuevos programas fueron diseñados, tales como MOMP (Mustargen, Oncovin, Metotrexato, Prednisona), el cual tomando ventaja de la disponibilidad del alcaloide de *Vinca*, combinaba vincristina con las mostazas nitrogenadas, metotrexato y prednisona, y después su derivado MOPP (Mustargen, Oncovin, Procarbazona, Prednisona), en el cual se usaba procarbazona en lugar del metotrexato, obteniendo muy buenos resultados, que fueron publicados durante 1965 y 1970 (62, 63).

A finales de 1960 se diseñaron y evaluaron dos programas: la mostaza de L-fenilalanina usada sola y el programa CMF, una combinación de ciclofosfamida, metotrexato y 5-fluoracilo, específicamente diseñados para usarse como terapia adyuvante. Ambos programas fueron efectivos en pacientes con cáncer metastásico, pero los resultados de CMF, en un régimen de quimioterapia cíclico, tuvieron un gran impacto en este tiempo con un rango de respuesta muy alentador y 20% de pacientes con una regresión completa (64, 65).

A mediados de 1974, se realizaron una serie de estudios a partir del uso de una combinación de cis-platino, vinblastina y bleomicina, la cual hoy en día es usada para todas las etapas del cáncer testicular el cual es curable en la mayoría de los pacientes (66, 67).

La llegada de los anticuerpos monoclonales potenció los efectos de la quimioterapia, aunque estos no son quimioterapia tal cual, muestran un mayor efecto cuando se combinan. A partir de mediados de 1990 se realizaron estudios con algunos de éstos tales como trastuzumab, cetuximab, bevacizumab y rituximab, los cuales forman parte importante del régimen de quimioterapia actual para algunos tumores.

Actualmente la quimioterapia ha avanzado a la época de terapias dirigidas, pero el estudio de diferentes blancos moleculares se dio a partir de la identificación de oncogenes, genes supresores de tumor y vías de señalización esenciales para el desarrollo de la vida. El primero y el mayor ejemplo de terapias dirigidas es el desarrollo del inhibidor de la quinasa tirosina Bcr-Abl imatinib para el tratamiento de leucemia mielocítica crónica (68, 69, 70).

A partir de la secuenciación del genoma también se han obtenido conocimientos muy importantes para el desarrollo de fármacos, actualmente se sabe que un gran número de las anomalías asociadas con cáncer son debidas al funcionamiento anormal de proteínas quinasas. Hoy en día importantes investigaciones se centran en el desarrollo de una serie de inhibidores de quinasas, algunas de las cuales ya han sido aprobadas por la FDA para el tratamiento de algunos tipos de cáncer que eran resistentes a la quimioterapia convencional (71, 72, 73).

Aunque los tratamientos no son siempre curativos, se ha observado una mejora significativa en la progresión y tiempo libre de enfermedad. Además gran cantidad de los regímenes de quimioterapia actuales, son usados de forma adyuvante a otras terapias con el propósito de potenciar los efectos y así mantener los órganos vitales en las mejores condiciones posibles.

A partir de 1990, la incidencia y mortalidad del cáncer empezó a disminuir, esto debido a la prevención y diagnóstico temprano, así como a los avances en los tratamientos de la enfermedad una vez que ha sido diagnosticada, por ejemplo, la inclusión de la quimioterapia en la mayoría de los programas de tratamientos.

## **Farmacos quimioterapeúticos**

Actualmente, hay una gran número de compuestos quimioterapéuticos aprobados por la FDA para el tratamiento del cáncer; estos medicamentos quimioterapéuticos se pueden dividir en varios grupos basándose en factores tales como su mecanismo de acción, su estructura química y su relación con otros medicamentos. Algunos de los fármacos de gran importancia son:

### **Fármacos antimetabolitos.**

Son una clase de medicamentos que interfieren en la síntesis del DNA y del RNA al sustituir los elementos fundamentales de estas moléculas. Estos agentes dañan las células durante la fase S, por ejemplo:

- **Análogos del ácido fólico:** Metotrexato o ametofterina (MTX)

- **Análogos de las bases pirimidínicas:**

Como análogo del uracilo destaca el 5-fluorouracilo (5-FU)

Como análogo de la citosina destaca el arabinósido de citosina, citarabina o ara-C.

Otros análogo de la citosina de más reciente utilización es la gemcitabina.

- **Análogos de las bases puricas**

La 6-mercaptopurina y la 6-tioguanina son los análogos azufrados de la hipoxantina y la guanina respectivamente.

## Inhibidores de la mitosis

Los inhibidores de la mitosis con frecuencia son alcaloides de origen vegetal y otros compuestos derivados de productos naturales. Pueden detener la mitosis o evitar que las enzimas sinteticen las proteínas necesarias para la reproducción de las células. Estos medicamentos ejercen su acción durante la fase M del ciclo celular, pero pueden dañar las células en todas las fases, por ejemplo:

- **Alcaloides de la vinca:** Vincristina y vinblastina; vindesina y vinorelbina son análogos semisintéticos.
- **Taxanos:** Paclitaxel es el producto activo del *Taxus brevifolia*. El docetaxel es un producto semisintético del *Taxus baccata*.

## Inhibidores de topoisomerasas

Las topoisomerasas del DNA son enzimas nucleares que controlan, mantienen y modifican las estructuras y la topología del DNA durante los procesos de replicación y traducción del material genético, ayudan a separar las hebras de DNA para que se puedan copiar. Los fármacos anticancerosos que ejercen su acción a este nivel estimulan y estabilizan los complejos DNA-enzima provocando la escisión mantenida de la cadena de DNA y la pérdida de su función, por ejemplo:

- **Inhibidores de la topoisomerasa I:** Irinotecán y topotecán.
- **Inhibidores de la topoisomerasa II:** Etopósido y tenipósido.

## Agentes alquilantes

Provocan su acción citotóxica mediante la formación de enlaces covalentes entre sus grupos alquilo y diversas moléculas nucleofílicas presentes en las células. Actúan preferentemente a nivel del DNA y, en concreto, de las bases nitrogenadas. También pueden reaccionar con los grupos fosfato y alquilar bases del RNA, por ejemplo:

- **Mostazas nitrogenadas:** Mecloretamina, clorambucil, ciclofosfamida, ifosfamida y melfalán.
- **Nitrosoureas:** Estreptozocina, carmustina y lomustina.
- **Alquil sulfonatos:** Busulfan.
- **Triazinas:** Dacarbazina y temozolomida.
- **Etileniminas:** Tiotepa y altretamina.

## Cis-platino

Actúa preferentemente sobre las bases del DNA, en particular con el nitrógeno en posición 7 de la guanina debido a su gran nucleofilia. Además, se comporta como un agente bifuncional produciendo enlaces cruzados entre las dos hebras del DNA.

El carboplatino y el oxaliplatino son derivados del cisplatino pero que mejoran su toxicidad.

## Antibióticos

Como mecanismo de acción, destaca su capacidad para intercalarse entre los pares de bases adyacentes de DNA y fijarse fuertemente. También son capaces de inhibir la topoisomerasa II, además, forman radicales libres que pueden afectar al DNA, alteran la membrana, inhiben la fosforilación oxidativa de las mitocondrias e inhiben diversas enzimas relacionadas con la replicación del DNA, por ejemplo:



- **Antraciclinas:** Daunorubicina, doxorubicina, epirubicina e idarubicina.
- **Bleomicinas:** Familia de glicopéptidos sintetizados por el hongo *Streptomyces verticillius* (actúa sobre la fase G2/M).
- **Mitoxantrona:** Novantrone, Pralifan
- **Mitomicina C:** Producida por *Streptomyces caespitosus* (74, 38).

Hoy en día existen en el mercado una gran variedad de fármacos antineoplásicos de diferente naturaleza y con diferentes vías de acción y muchos más que están en proceso de desarrollo pero la razón para que la búsqueda de nuevos antineoplásicos continúe está basada en la necesidad de encontrar compuestos con:

- Ausencia de resistencia cruzada.
- Un espectro más amplio de actividad.
- Mayor efectividad clínica antitumoral.
- Disminución de efectos eméticos y renales.
- Sinergismo en terapias combinadas (75, 76).

En México la necesidad de importación de estos productos y su costo muy elevado, hace que el desarrollo de productos antineoplásicos adquiera prioridad (77).

## Desarrollo de fármacos

La investigación sobre el cáncer a escala mundial es una extraordinaria maquinaria de producción científica destinada a entender y frenar esta enfermedad. Se trata de un esfuerzo cooperativo en todo el mundo desarrollado con grandes inversiones tanto públicas como privadas (5).

Gracias a estas primeras pruebas e investigaciones, el estudio de compuestos antineoplásicos ha tenido un gran apoyo por diferentes centros de investigación logrando un desarrollo muy avanzado del uso de técnicas y síntesis de nuevos compuestos a partir de los ya existentes mejorando así su eficacia y reduciendo los efectos adversos que puedan éstos provocar.

La investigación de un fármaco nuevo se inicia con el conocimiento del funcionamiento normal y anormal del cuerpo humano. Las preguntas que plantea esta investigación apuntan a determinar conceptos sobre las posibilidades de emplear un fármaco para prevenir, curar, tratar una enfermedad o problema de la salud. Esto constituye el objetivo del investigador (78).

El primer paso del desarrollo de un fármaco consiste en encontrar una sustancia con potencial actividad terapéutica o de la confirmación del potencial terapéutico de una sustancia conocida y conseguir una formulación que haga posible su administración a la especie humana. La consecución de una nueva molécula se sustenta en el conocimiento de un determinado proceso biológico o estructura molecular que permita la posibilidad de actuar frente a un determinado objetivo con el fin de curar o mejorar al paciente, o de prevenir una enfermedad o realizar un buen diagnóstico.

En general, una vez identificada la acción biológica de una sustancia y para que ésta pueda ser evaluada en humanos y posteriormente aprobada para su comercialización y ser introducida en la práctica médica es necesario realizar primero una serie de estudios preclínicos.

A partir de las regulaciones que proponen las autoridades sanitarias, por ejemplo la Agencia Europea de Medicamentos (EMA) para la unión europea y la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) de los EEUU, para la aprobación de un fármaco, se fueron estableciendo las fases que permitieran evaluar con todo rigor científico, la eficacia y seguridad de todo producto farmacéutico con fines terapéuticos. Su adherencia total o parcial va a estar condicionada por las características del producto y las exigencias locales. No constituyen una horma inflexible para todo tipo de producto pero pueden significar una guía adecuada para el desarrollo eficiente y seguro de un futuro agente terapéutico (79).

Durante el estudio preclínico, el investigador evalúa los efectos tóxicos y farmacológicos del fármaco a través de pruebas *in vitro* e *in vivo* en animales de laboratorio. Los objetivos fundamentales de la investigación preclínica a cumplir según los requerimientos de la FDA son preferentemente obtener información sobre tres áreas: a) estudios de actividad biológica o farmacodinamia, b) estudios de toxicidad que comprende a su vez estudios de toxicidad con dosis únicas y dosis múltiples, estudios de genotoxicidad, toxicidad de la reproducción, carcinogenicidad, tolerabilidad local y c) estudios de farmacocinética, todo ello en modelos experimentales (80, 81).

Los estudios preclínicos, también llamados estudios de laboratorio, incluyen:

**Estudios celulares:** son a menudo las primeras pruebas que se realizan para estudiar un nuevo tratamiento. Para determinar si pudiera ser eficaz, los investigadores analizan los efectos del nuevo tratamiento sobre células cancerosas que han crecido en una placa de laboratorio o en un tubo de ensayo. Es posible que estos estudios se realicen en células cancerosas humanas o células cancerosas de animales.

**Estudios en animales:** los tratamientos que parecen ser prometedores en los estudios celulares son después probados sobre modelos de enfermedad en animales vivos. Esto proporciona a los investigadores una idea de qué tan seguro es el nuevo tratamiento en una criatura viviente.

Los estudios preclínicos proporcionan bastante información útil, pero no ofrecen respuesta a todas las preguntas que se requiere conocer, después de todo, solo probándolos en humanos se podrá saber la forma en cómo estos compuestos se absorben, procesan y eliminan del organismo. En conjunto toda esta serie de estudios permite tener una idea lo más aproximada posible de cómo va a comportarse el medicamento cuando se administre a la especie humana y por ello permite saber cuáles son los órganos o sistemas que convendrá vigilar más estrechamente en orden a detectar una posible toxicidad. También toda la batería de estudios preclínicos permite estimar cuál va a ser la dosis inicial que se puede administrar al humano, al menos durante los primeros ensayos clínicos que se pongan en marcha. Es por esto que una vez completados los estudios preclínicos y si el tratamiento aún sigue siendo prometedor, la FDA otorga su autorización para que sea estudiado en humanos (12).

Una vez aprobados los estudios preclínicos, el estudio pasa a la siguiente etapa de evaluación clínica la cual consta de las cuatro fases siguientes:

## **FASE I**

Estos constituyen la primera administración a seres humanos. El medicamento se administra de 30 a 100 voluntarios sanos; a menos de que se espere cierta toxicidad del fármaco, por ética, se realiza en voluntarios enfermos como es en el caso de agentes antineoplásicos; primero en dosis única con incrementos graduales, y luego en dosis múltiples hasta cubrir el rango de las posibles dosis terapéuticas. Estos estudios se efectúan para obtener datos sobre seguridad, farmacocinética y en algunos casos farmacodinamia, puesto que los síntomas relevantes para investigar eficacia raramente están presentes en los voluntarios sanos. La selección de la dosis inicial es difícil. Los estudios en animales sobre el metabolismo y la toxicidad del medicamento son de utilidad limitada para la selección de la dosis inicial. Una regla de sentido común es empezar con una dosis que corresponda entre 1/10 y 1/5 de las dosis máximas toleradas. Las dosis del medicamento se aumentan gradualmente hasta que se alcanza la dosis efectiva estimada o se desarrollan efectos colaterales. En esta fase las pruebas no son ciegas y tiene una duración de 9 a 18 meses aproximadamente (80, 82).

## **FASE II**

Esta constituye la primera administración del medicamento a pacientes. El objetivo principal de esta fase es la búsqueda de dosis y de diferentes pautas de tratamiento, aunque también se obtiene información sobre seguridad, eficacia, farmacodinamia y farmacocinética de dosis únicas y múltiples. Se debe evaluar la eliminación del medicamento por el organismo, debido a que los pacientes pueden metabolizarlo diferente a los sujetos sanos. Estos ensayos se clasifican en tempranos y tardíos. Los ensayos de fase II tempranos, corresponden a la administración del medicamento a pacientes con el objeto de estudiar el potencial terapéutico y los efectos colaterales. También se hace el intento de determinar los rangos de la dosis. Los tardíos, están dirigidos a establecer la eficacia. Este estudio tiene una duración aproximada de 1 a 3 años y se realiza de forma aleatoria con un número de pacientes de 100 a 400, en un ensayo doble ciego controlado con placebo y fármaco de referencia y estrictos criterios de inclusión exclusión (80, 82).

## **FASE III**

Estos estudios corresponden a los estudios doble ciego controlados con placebo y fármaco de referencia y con distribución al azar en un número de pacientes entre 1000 y 3000 seleccionados estrictamente bajo criterios de inclusión/exclusión, con el objeto de proveer información que permita el análisis estadístico de la eficacia y seguridad del medicamento, dosis, pautas de tratamiento, farmacocinética y biodisponibilidad. Algunas reacciones adversas pueden observarse por primera vez en esta fase, como por ejemplo los efectos tóxicos producidos por procesos inmunológicos. En esta fase se pone de manifiesto la utilidad de la práctica clínica. Si los estudios en seres humanos indican que el compuesto puede ser un agente terapéutico eficaz y seguro el fabricante puede presentar una solicitud al organismo regulador correspondiente para obtener una licencia para comercializar el medicamento nuevo. Esta fase puede durar de 4 a 7 años (80, 82).

#### Fase IV

Estos estudios se hacen después que el medicamento ha recibido una licencia para su comercialización. Esta fase se refiere a la vigilancia continua de la seguridad del nuevo medicamento en las condiciones reales de uso en un gran número de pacientes. En los años siguientes al inicio de la venta, el empleo del medicamento se evalúa ya que puede suceder que el uso extensivo del producto resulte en el descubrimiento de efectos indeseables relativamente raros, toxicidad crónica desarrollada solamente después de años de exposición, interacciones con medicamentos previamente desconocidas, usos potenciales nuevos o recomendaciones sobre esquemas o vías de dosificación más apropiados. El fármaco puede permanecer con la denominación de medicamento nuevo por varios años. Mientras el producto tiene esta denominación, el fabricante tiene la obligación de comunicar cualquier información nueva con relación a su seguridad o eficacia. La agencia posee el derecho de suspender la notificación de aceptación concedida, si el hacerlo es en beneficio público (80, 82).

Una vez aprobada esta etapa el compuesto debe cumplir con todas las características farmacológicas y toxicológicas necesarias y se debe haber reunido información suficiente para su uso en pacientes humanos (Figura 9) (80, 82).



Fig. 9 - Proceso de desarrollo de nuevos fármacos (5).

## Uso de modelos animales

Actualmente consideraciones éticas y legales restringen la exposición de pacientes humanos a nuevos medicamentos sin estar seguro que será beneficiado y que no correrá algún riesgo importante, por esta razón el uso de modelos animales para el estudio de enfermedades ha jugado un rol crítico para entender los procesos lo cual ha sido de gran valor para el diseño de pruebas y regímenes de tratamientos (83).

Por más de 100 años los avances médicos en la salud humana ha sido resultado directo de estudios realizados en animales, su uso en la investigación es esencial para conocer más sobre los problemas de salud y así desarrollar nuevos y más efectivos métodos para el diagnóstico y tratamiento de enfermedades que afectan tanto a los humanos como a los animales asegurando un conocimiento científico completo de las sustancias involucradas y con esto maximizar los beneficios y evitar posibles efectos adversos (84).

La mayoría de investigaciones en la que se usan animales (84%) incluye el uso de roedores como sujeto experimental (85).

El uso de ratones es de gran utilidad debido a sus características las cuales le dan grandes ventajas sobre otros animales experimentales, por ejemplo:

- El ratón es un animal pequeño, y fácil de manipular.
- Tienen ciclos reproductivos muy cortos, son muy prolíficos y de fácil producción bajo condiciones controladas, lo que permite controlar las variables ambientales en las experimentaciones.
- Tienen la capacidad para manipular la información genética nueva dentro de la célula y de transmitirla a la línea germinal.
- Es un animal perfectamente caracterizado, el trabajo acumulado durante un siglo de investigaciones ha resultado en una inmensa cantidad de documentación sobre su biología, los fenotipos mutantes, las características de las cepas y su genoma.
- Tienen alta tolerancia a la consanguinidad, la mayor utilidad de las cepas consanguíneas radica en el hecho de que permiten realizar experimentos eliminando la variabilidad de origen genético y como sus características pueden permanecer constantes por largos periodos de tiempo éstas pueden ser usadas como base en la planificación de diferentes estudios.

Las cepas consanguíneas presentan varias características generales que le confieren importancia científica. Estas características son:

- Homocigosis
- Isogeinicidad o igualdad génica
- Uniformidad fenotípica
- Larga estabilidad génica
- Identidad
- Individualidad
- Distribución internacional
- Datos del background o fondo genético (86, 83).

El sistema de trasplantes de tumor en roedores permitió la estandarización de modelos sistemáticos para la evaluación de un mayor número de compuestos. Los primeros sistemas de modelo desarrollados incluían Sarcoma 37 (S37) y Sarcoma 180 (S180), tumores cancerígenos inducidos en ratón. En 1943, se publicaron los resultados de un gran número de trabajos realizados en la síntesis y prueba de compuestos alquilantes incluyendo al clorambucil y a la ciclofosfamida, los investigadores usaron principalmente el modelo murino S180 ya que éste era sensible a compuestos conocidos y era fácilmente trasplantado (36).

Actualmente, se han desarrollado diversos modelos preclínicos de tumor en ratones como el modelo de Leucemia L1210, Carcinoma 755, Carcinoma de Walker 256, Leucemia P388, Melanoma B16 y Carcinoma de Lewis de pulmón, de los cuales en las últimas tres décadas, se han obtenido una gran cantidad de conocimientos usando estos modelos murinos para el estudio experimental de los efectos de nuevos anticancerígenos (87).



## Modelo de evaluación antineoplásica: Melanoma B16

En el presente trabajo se utilizó el modelo de isotransplatación de la línea celular Melanoma B16F10 en ratones de la cepa CB6F1/Hsd, esta cepa de ratones tiene la característica de ser sinérgica. Para obtener animales de este tipo genético es necesaria la cruce de individuos emparentados entre sí al menos por 20 generaciones volviéndolos homocigotos en un 98.7% de su genoma, incluyendo la región del complejo mayor de histocompatibilidad HLA en el humano y H-2 en ratón (88, 89, 90).

Las cepas murinas 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, los cuales ofrecen la ventaja de reducir al máximo la variabilidad genética entre individuos dándole mayor confiabilidad a los experimentos en los cuales sean usados. Además de que es posible trasplantar un tumor de un animal a otro, garantizando el crecimiento de la línea tumoral Melanoma B16F10 siempre y cuando posean el mismo haplotipo, el cual en el caso de la cepa CB6F1/Hsd es H-2<sup>b</sup>, ya que no rechazan el implante, de esta manera el efecto antitumoral puede ser atribuido solamente al fármaco en estudio. El tiempo máximo estimado de vida para esta cepa murina es de 1000 días con un promedio de 827 días para machos y 818 días para hembras (91, 92).

El melanoma es una neoplasia que crece de células pigmentadas (melanocitos) en la capa exterior de la piel y en membranas mucosas (epidermis), si bien su incidencia se ha incrementado en las últimas dos décadas, es un tipo de cáncer poco frecuente en la población. Suele aparecer mayormente entre los 40 y 70 años y es más frecuente entre los individuos de raza blanca y en especial entre los de pelo rubio ojos azules y piel blanca. En el humano usualmente inicia como una lesión en la piel, ocasionalmente aparece en otras partes del cuerpo como el ojo, boca o vagina (93, 94).

La línea tumoral de Melanoma B16F10 es tumorigénica y metastásica en ratones singénicos de las cepas C57BL/6, CB6F1/Hsd y D2B6F1, cuenta con características ectodérmicas y endodérmicas y su haplotipo es H-2<sup>b</sup>. Esta línea se desarrolló espontáneamente en la piel de la base de la oreja de un ratón de la cepa C57BL/6 (95, 96, 97).

En experimentos previos con esta línea tumoral se encontró que los ratones machos C57BL/6 inoculados subcutáneamente con Melanoma B16 ( $1 \times 10^6$  células) tienen 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% debido al crecimiento del tumor (89, 92).

## Compuestos de coordinación

Cuando en 1969 se reportaron las propiedades antitumorales del cis-diamminodicloroplatino(II) se abrieron las puertas de la quimioterapia del cáncer para los compuestos inorgánicos. Desde entonces, numerosos han sido los compuestos inorgánicos para los cuales se han reportado propiedades antitumorales tales como los compuestos de coordinación (98).

Un compuesto de coordinación es una combinación de un átomo central, por lo general la de un metal, al que se unen covalentemente otros átomos o grupos de átomos, cada uno de los cuales se les denomina ligandos. Una entidad de coordinación puede ser una molécula neutra, un catión o un anión (99).

Actualmente el Dr. José Norberto Farfán García ha sintetizado compuestos de origen inorgánico que conforman la familia NK, NK82 es un compuesto que tiene una base de estaño y que se utilizó en este estudio para evaluar su potencial actividad antineoplásica en el modelo murino de isotrasplante de Melanoma B16F10

Así mismo, el grupo de trabajo de la Dra. Noráh Barba Beherens de la Facultad de Química, se ha dedicado a la síntesis de compuestos de coordinación de origen inorgánico como es el caso del compuesto NBOB3, el cual fue también evaluado en cuanto a la eficacia de su efecto antineoplásico en el modelo murino de Melanoma B16F10.

En estudios *in vitro* estos compuestos demostraron ya una aceptable actividad antineoplásica evaluada en las líneas celulares HCT-15, MCF-7 y HeLa para NK82 en donde se observa una gran eficacia del compuesto principalmente en la línea MCF-7 presentando valores de  $IC_{50}$  notablemente por debajo del CisPt; mientras que el compuesto NBOB3 fue evaluado en las líneas HCT-15, SKLU-1, PC3, MCF-7, HeLa y U373 demostrando mayor actividad en HCT-15 y HeLa (100, 101).

# Hipótesis

Si los compuestos de coordinación NK82 y NBOB3 han presentado actividad *in vitro* en diversas líneas celulares entonces mostrarán actividad antineoplásica contra el modelo de isotrasplantación con Melanoma B16F10 en los ratones de la cepa CB6F1

## Objetivos

### Objetivo General

Evaluar la actividad antineoplásica de dos nuevos compuestos de coordinación en un modelo tumoral murino de isotrasplantación con Melanoma B16F10 en ratones de la cepa CB6F1:Hsd.

### Objetivos Particulares

- Cultivar la línea celular de Melanoma B16F10 *in vitro* para su posterior implantación en ratones CB6F1:Hsd.
- Evaluar el efecto antineoplásico del compuesto NK82 en ratones CB6F1:Hsd con Melanoma B16F10, administrado por vía intraperitoneal.
- Evaluar el efecto antineoplásico del compuesto NBOB3 en ratones CB6F1:Hsd con Melanoma B16F10, administrado por vía intraperitoneal.

# Materiales y Métodos

## Descongelamiento de línea celular de Melanoma B16F10

La línea celular de Melanoma B16F10 que se encontraba almacenada en criotubos con Suero Fetal Bovino y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO) en un ultracongelador a  $-70^{\circ}\text{C}$ , se descongeló introduciendo los tubo en Baño María a  $37^{\circ}\text{C}$ , posteriormente bajo condiciones estériles, en un gabinete de seguridad biológica, se vertió el contenido del criotubo en un tubo cónico junto con 10 mL de medio de cultivo DMEM (GIBCO) y se centrifugó por 5 minutos a 1500 rpm. Se desechó el sobrenadante y el botón se resuspendió en 1 mL del medio de cultivo.

## Cuantificación celular

De la suspensión celular anterior se tomaron 20  $\mu\text{L}$  y se mezclaron con 80  $\mu\text{L}$  de azul Tripano el cual es un colorante cargado negativamente por lo que penetra en aquellas células cuya membrana celular está dañada, excluyendo aquellas que están intactas, sanas o viables. Por lo tanto, distingue como células viables aquellas que no tiñen de azul y como no viables aquellas que sí tiñen de azul. Una vez mezclados se tomaron 20  $\mu\text{L}$  y se colocaron en el hematocitómetro para su observación mediante el microscopio óptico utilizando un objetivo 10x. Se realizó el conteo de células viables y no viables en los cuatro cuadrantes, y se realizaron los cálculos necesarios para obtener la relación de células contenidas en la suspensión.

## Cultivo celular

Una vez contabilizado el número de células viables se sembraron de 300 a 500 mil células en una caja de cultivo de  $25\text{cm}^2$  con 5 mL de medio de cultivo suplementado con suero fetal bovino (10%), aminoácidos esenciales y antibióticos (1%). Este cultivo se incubó a  $37^{\circ}\text{C}$  y 5% de  $\text{CO}_2$ . Se revisó

diariamente para estimar el porcentaje de confluencia, cambiando el medio cada 48 horas hasta que alcanzó una confluencia del 80% (Figura 10).

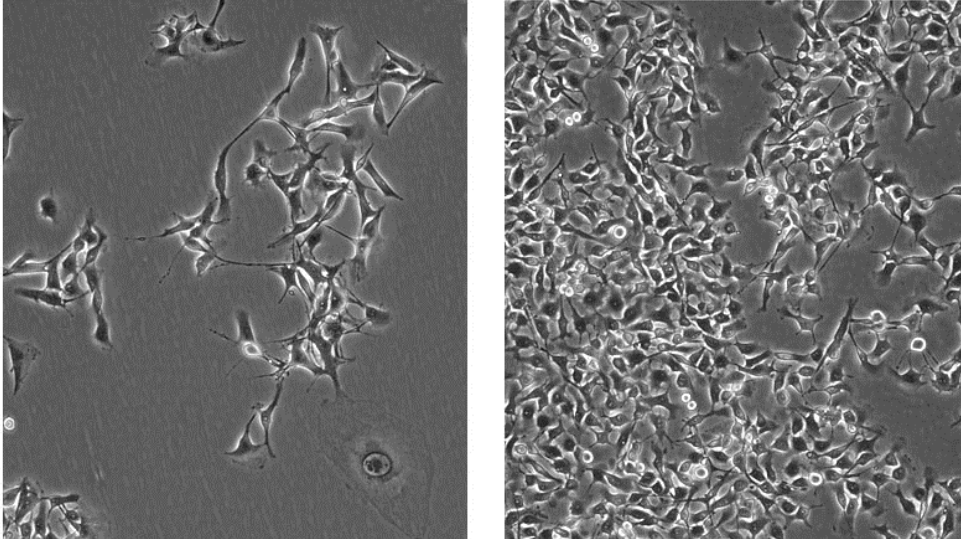


Fig. 10 - Células de la línea de Melanoma B16F10 en cultivo, una vez que el nivel de confluencia alcanzó aproximadamente un 80%, como se muestra en el lado derecho, las células estaban en condiciones óptimas para utilizarlas por lo que se tripsinizaron y se realizaron las inoculaciones (102).

## Tripsinización

Al momento de llegar a un 80% de confluencia el cultivo expresó su mayor parecido morfológico y fisiológico al modelo celular de origen por lo que se procedió a tripsinizarlo, para esto se aspiró el medio de la caja y se lavó con 5 mL de PBS, se agregaron 2 mL de la solución de tripsina EDTA, se incubó durante 5 minutos para que se degradara la matriz extracelular y después se agitó ligeramente hasta que, al microscopio se pudieron observar las células desprendidas de la superficie y separadas individualmente. Se detuvo la reacción adicionando medio de lavado. Esta suspensión se colocó en un tubo cónico y se procedió a centrifugar a 1500 rpm por 5 minutos. El sobrenadante se desechó y el paquete celular se resuspendió en 1 mL de medio de cultivo suplementado.

## **Implante celular (*in vitro* – *in vivo*)**

Del procedimiento anterior, dentro de una campana de flujo laminar y bajo condiciones de esterilidad, se tomó una alícuota que contenía una concentración de  $1 \times 10^6$  células de la línea tumoral de Melanoma B16F10. Esta suspensión se empleó para realizar el implante celular, de forma subcutánea en la región inguinal de 18 ratones hembras de la cepa singénica CB6F1:Hsd de 5 a 6 semanas de edad, asegurándose de que cada ratón haya recibido  $1 \times 10^6$  células, contenidas en un volumen de 0.5 mL de medio de cultivo.

Una vez recibido el inóculo los animales permanecieron en observación por un periodo de 15 días, tiempo aproximado en el que el tumor se hizo visible y así fue posible llevar a cabo el pase de ratón a ratón de Melanoma B16F10.

## **Trasplante de tumor (*in vivo* – *in vivo*)**

Una vez desarrollado el tumor en los ratones, estos se sacrificaron por dislocación cervical, se limpió la zona de proliferación y, dentro de una campana de flujo laminar y bajo condiciones de esterilidad, se hizo una incisión en esta región, se realizó la extracción de 1 gramo de masa tumoral, la cual se homogenizó, con la ayuda de un bisturí, con 10 mL de solución salina estéril a temperatura ambiente. Esta suspensión se filtró mediante una gasa estéril y se cuantificó mediante el procedimiento descrito anteriormente.

Posteriormente se tomó una alícuota de 0.5 mL de la suspensión la cual se sabe que contenía aproximadamente  $1 \times 10^6$  células y fue implantada vía subcutánea en la región inguinal de cada uno de los 80 ratones hembras de la cepa singénica CB6F1:Hsd con peso promedio de  $19\text{g} \pm 3\text{g}$ , de 4 a 5 semanas de edad que fueron sometidos al tratamiento.

## Mantenimiento de animales

Los animales fueron adquiridos del Centro de Producción UNAM-Harlan y permanecieron en la Unidad de Experimentación Animal (UNEXA), del conjunto E de la Facultad de Química, UNAM; en donde se mantuvieron en condiciones ambientales controladas cumpliendo con la NOM 062-200-1999: La temperatura se mantuvo a  $23\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}$  y la humedad relativa entre 40% y 60%, ciclos luz-oscuridad 12/12 horas. Se les proporcionó alimento esterilizado para ratón/rata Harlan Teklad 2018 S llevando el control del consumo de éste cada dos días, y agua purificada y filtrada hasta  $0.22\text{ }\mu\text{m}$  y clorada hasta 10 ppm *ad libitum*, las jaulas para su alojamiento fueron de polisulfonato con dimensiones de 19 x 10.5 x 8 cm, la cama usada fue “*Diamond soft bedding harlan teklad 7089*”, el cambio de jaulas se realizó cada tercer día, los bebederos se lavaron un día a la semana y se esterilizaron.

## Evaluación de la actividad antineoplásica

La evaluación de la actividad antineoplásica de los compuestos se llevó a cabo siguiendo el protocolo internacional establecido por el National Cancer Institute para el desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos (103).

Se utilizaron 80 ratones hembras de la cepa singénica CB6F1:Hsd con peso promedio de  $19\text{g} \pm 3\text{g}$  (Figura 18, ANEXOS), de 4 a 5 semanas de edad que fueron inoculadas con  $1 \times 10^6$  células de la línea tumoral de Melanoma B16F10, los cuales se dividieron de forma aleatoria en 8 grupos con 10 ratones cada uno, para los diferentes tratamientos, marcados permanentemente en la oreja con una numeración del 1 – 80.



# Compuestos

Para la realización de este estudio se ocuparon los siguientes compuestos:

## NK82

**Peso Molecular:** 441.56 g/mol

**Vehículo:** 5% Dimetilsulfóxido,  
95% Carboximetil celulosa al 0.4%

Este compuesto esta en proceso de ser patentado por lo que no se muestra información más detallada.

## NBOB3

**Nombre IUPAC:** Bromuro de (N-benzimidazol-2- carbamato de metilo) de cobre 1,1

**Formula Condensada:**  $[\text{Cu}(\text{2cmbz})\text{Br}_2]1.5\text{H}_2\text{O}$

**Peso Molecular:** 542.16 g/mol

**Vehículo:** 3% Alcohol etílico  
97% Agua inyectable

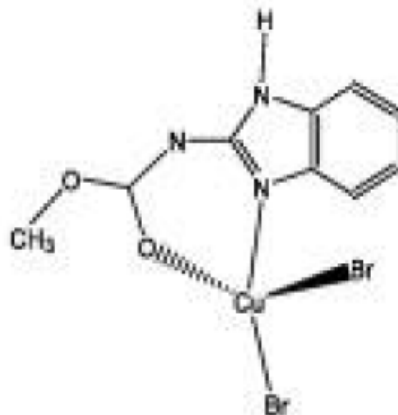


Fig. 11 - Estructura química del compuesto NBOB3 (100).

Estos compuestos fueron proporcionados por la Dr. Nora Barba y el Dr. Norberto Farfán quienes los sintetizaron y caracterizaron en la facultad de química de la Universidad Nacional Autónoma de México (100, 101).

## Dosis utilizadas

Para la determinación de las dosis empleadas en el presente estudio se utilizó como referencia la Dosis Letal 50 ( $DL_{50}$ ) obtenida anteriormente en ratones de la estirpe Hsd:ICR en machos por vía intraperitoneal que resultó ser de 38.08 mg/kg para los compuestos NBOB3 y NK82 de las cuales se empleó un cuarto y un décimo de la  $DL_{50}$  (104).

## Esquema de tratamientos

Se probaron dos compuestos, cada prueba consistió en tres tratamientos diferentes en tres grupos de 10 ratones hembras de la cepa CB6F1:Hsd con una edad promedio de 4 a 5 semanas de vida (17 – 22 g) cada uno. Como control positivo C (+) se usó ciclofosfamida en un grupo de 10 ratones, para el control negativo C (-) se administró agua inyectable.

La siguiente tabla (Tabla 2) muestra la forma en como fueron tratados los diferentes grupos:

Tabla 2. Esquema de tratamiento de los grupos experimentales.

Grupo	Individuos	Tratamiento		Esquema de tratamiento	Dosis
1	10	Agua Inyectable C (-)		1 – 9	0.5 mL
2	10	Ciclofosfamida C (+)		1 – 9	50 mg / Kg
3	10	NK82	Intermitente	QD 4X3 (1,5,9)	3.8 mg / Kg
4	10			QD 4X3 (1,5,9)	9.5/4.75 mg / Kg
5	10		Crónico	1 – 9	3.8/1.9 mg / Kg
6	10	NBOB3	Intermitente	QD 4X3 (1,5,9)	3.8 mg / Kg
7	10			QD 4X3 (1,5,9)	9.5 mg / Kg
8	10		Crónico	1 – 9	3.8 mg / Kg

El **grupo 1** o control negativo C (-) se conformó por 10 individuos que recibieron el inoculó tumoral y no recibieron ningún tratamiento, solamente se les administró 0.5 mL de agua inyectable de forma crónica durante 9 días, el cual inició a las 24 horas después de la inoculación de la línea celular. De esta forma se pudo evaluar el tiempo de vida y el incremento del peso en condiciones normales del desarrollo tumoral.

El **grupo 2** o control positivo C (+) se conformó por 10 individuos que recibieron el inoculó tumoral y fueron tratados con ciclofosfamida en su presentación comercial (Genoxal®) en una dosis de 50 mg/kg siguiendo un esquema de tratamiento crónico durante 9 días, el cual inició a las 24 horas después de la inoculación de la línea celular. Este fármaco tiene actividad antineoplásica conocida, lo que nos sirve para validar el método de evaluación

El **grupo 3** se conformó por 10 individuos que recibieron el inóculo tumoral y fueron tratados con el compuesto NK82 en una dosis de 3.8 mg / kg, que corresponde al 10% de la dosis letal 50 del compuesto, siguiendo un esquema de tratamiento de qd 4x3 es decir una administración cada 4 días, con un total de 3 administraciones en los días 1, 5 y 9, el cual inició a las 24 horas después de la inoculación de la línea celular.

El **grupo 4** se conformó por 10 individuos que recibieron el inóculo tumoral y fueron tratados con el compuesto NK82 en una dosis de 9.5 mg / kg, que corresponde al 25% de la dosis letal 50 del compuesto, siguiendo un esquema de tratamiento de qd 4x3, con un total de 3 administraciones en los días 1, 5 y 9, el cual inició a las 24 horas después de la inoculación de la línea celular, pero que a partir del día 4 se modificó la dosis reduciéndola a la mitad, es decir, a 4.75 mg/kg debido a la toxicidad del compuesto, administrando al grupo de esta forma los días 5 y 9.

El **grupo 5** fue conformado por 10 individuos que recibieron el inóculo tumoral y fueron tratados con el compuesto NK82 en una dosis de 3.8 mg / kg, que corresponde al 10% de la dosis letal 50 del compuesto, siguiendo un esquema de tratamiento crónico durante 9 días, el cual inició a las 24 horas después de la inoculación de la línea celular, pero que a partir del día 4 se modificó la dosis reduciéndola a la mitad, es decir, a 1.9 mg/kg debido a la toxicidad del compuesto, administrando al grupo de esta forma del día 4 al día 9.

El **grupo 6** fue conformado por 10 individuos que recibieron el inóculo tumoral y fueron tratados con el compuesto NBOB3 en una dosis de 3.8 mg / kg, que corresponde al 10% de la dosis letal 50 del compuesto, siguiendo un esquema de tratamiento de qd 4x3, con un total de 3 administraciones en los días 1, 5 y 9, el cual inició a las 24 horas después de la inoculación de la línea celular.

El **grupo 7** se conformó por 10 individuos que recibieron el inóculo tumoral y fueron tratados con el compuesto NBOB3 en una dosis de 9.5 mg / kg, que corresponde al 25% de la dosis letal 50 del compuesto, siguiendo un esquema de tratamiento de qd 4x3, con un total de 3 administraciones en los días 1, 5 y 9, el cual inició a las 24 horas después de la inoculación de la línea celular.

El **grupo 8** se conformó por 10 individuos que recibieron el inóculo tumoral y fueron tratados con el compuesto NBOB3 en una dosis de 3.8 mg / kg, que corresponde al 10% de la dosis letal 50 del compuesto, siguiendo un esquema de tratamiento crónico durante 9 días, el cual inició a las 24 horas después de la inoculación de la línea celular.

Las soluciones se prepararon a una concentración adecuada para cada uno de los tratamientos, de tal forma que la dosis administrada a cada ratón estuviera contenida en un volumen de 0.2 – 0.5 mL como máximo (Tabla 2).

Con estos tratamientos evaluamos si los compuestos NK82 y NBOB3 tienen alguna acción que altere el crecimiento tumoral y por lo tanto retrase el día de muerte de los grupos tratados con respecto al grupo control negativo.

A partir de que se llevó a cabo el trasplante, se registró diariamente el peso de los ratones y las muertes que ocurrieron como control de sobrevivencia, durante 60 días, tomando como “día 1” el día posterior a la realización del trasplante. Al término de este periodo se sacrificaron los animales que aún seguían vivos y se procedió con la evaluación del experimento mediante los siguientes cálculos matemáticos y estadísticos.

## Análisis de resultados

Para poder evaluar la actividad antineoplásica de los tratamientos con NK82 y NBOB3 fue necesario emplear un análisis estadístico, para poder concluir con un determinado grado de confianza ( $P < 0.95$ ) 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.

### Tratados/Control (T/C)

Este parámetro se evaluó tanto en peso como en sobrevida (103). Definido como:

$$\frac{T}{C} = \frac{X_t}{X_c} (100)$$

Dónde:

$X_t$  = promedio en peso o sobrevida del grupo t

$X_c$  = promedio en peso o sobrevida del grupo C(-)

### Porcentaje de incremento de peso

Este parámetro fue calculado con el peso corporal diario de los individuos pertenecientes a cada grupo. Se consideró que todo incremento en el peso corporal de los individuos con respecto a su peso inicial fue debido al incremento del tumor. El incremento en peso está definido de la siguiente forma: (103)

$$\%IP = \frac{Xy - X_0}{X_0} * 100$$

Donde

X<sub>0</sub>: peso corporal promedio al día 0

X<sub>y</sub>: peso corporal al día y

Y: cualquier día durante el tiempo del ensayo

### **Análisis estadístico de incremento de peso**

Para analizar los resultados en función del porcentaje de incremento de peso se empleó una prueba de análisis de varianza (ANDEVA) para los días 1, 5, 10, 15 y 17 del experimento, se escogieron estos días ya que después ya no se contaba con la población completa.

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

La prueba se hizo con el objeto de analizar si existían diferencias significativas entre el crecimiento tumoral de un grupo con respecto a otro en un día específico, de esta misma forma también fue posible evaluar si el tratamiento estaba dando un buen resultado.

Se trabajó bajo las siguientes hipótesis:

H<sub>a</sub>: al menos una  $\mu$  es diferente

H<sub>0</sub>:  $\mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \mu_4 \dots$

Para realizar la ANDEVA se construyó la siguiente tabla (Tabla 3):

Tabla 3. Análisis de varianza

Fuente de variación	Suma de cuadrados (SC)	Grados de libertad (GL)	Cuadrado de la media (CM)	Razón de varianza (F calculada)
Tratamientos	$\sum_j^k = 1 n_j (X_j - X \dots)^2$	k - 1	SC trat / GL trat	CM trat / CM error
Error	$\sum_j^k - 1 \sum_i^{n_j} - 1 (X_{ij} - x_j)^2$	n - k	SC error / GL error	
Total	$\sum_j^k - 1 \sum_i^{n_j} - 1 (X_{ij} - x_j)^2$	n - 1		

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

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

$$DVS = q_{\alpha, k, N-k} \sqrt{\frac{CM_{error}}{n}}$$

Donde  $\alpha$  es el nivel de significancia elegido, k 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, que se obtuvo consultando tablas de Tukey con  $\alpha$ , k, y N-k.

Se calcularon todas las diferencias posibles entre las parejas de medidas, cualquier diferencia que proporcione un valor absoluto que excediera de la DVS se consideró como significativa.



## Índice de sobrevida (Increased life span, ILS)

Se llama sobrevida al retardo en el día de muerte de los individuos con respecto al grupo control negativo de al menos un día. El índice de sobrevida se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

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

Dónde:

T = Grupo x (Puede ser cualquiera de los grupos tratados).

C = Grupo Control negativo C(-).

El criterio de aceptación dentro de los protocolos del NCI para considerar la evaluación de la actividad antineoplásica como efectiva en esta línea celular indica que el valor de ILS sea igual o mayor que 25 (103).

### Análisis estadístico de sobrevida

Para realizar este estudio fue necesario definir la fecha de comienzo y la fecha de finalización del seguimiento, con la que se calcularon posteriormente los tiempos de sobrevida de los sujetos experimentales.

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

Existen distintos procedimientos que permiten estimar las curvas de sobrevida, aunque quizás uno de los más populares en la investigación clínica sea el método de Kaplan-Meier (105).

. 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 ordenaron de menor a mayor todos los tiempos de supervivencia observados, anotando para cada uno de ellos el número de muertes y censuras producidas. Para cada periodo de tiempo se calculó la probabilidad de sobrevivir, y la función de Kaplan-Meier es “la probabilidad de supervivencia individual acumulada a lo largo del tiempo” (105).

Para comparar dos o más curvas de supervivencia se emplean diversos test de hipótesis que plantean como hipótesis nula que los grupos que se comparan tienen igual supervivencia, Sin embargo, el método más común para comparar tiempos de sobrevivencia de grupos independientes es la prueba de rangos logarítmicos (Log-Rank). El principio de esta prueba es dividir el tiempo de sobrevivencia, y tiene en cuenta las diferencias de supervivencia entre los grupos en todos los puntos que dura el seguimiento (106, 107, 108).

El valor de probabilidad ( $p \leq 0.05$ ) para rechazar la hipótesis nula se obtuvo de manera directa al utilizar el programa estadístico SPSS 16.0

# Resultados y discusión

Durante la realización del experimento, cada uno de los ratones fueron pesados diariamente y estos datos fueron acomodados de acuerdo a los grupos que conformaban el ensayo y graficados en la figura 12, observamos que todos los grupos presentaron en los primeros días una ligera disminución de peso respecto al día 0 puesto que durante los días 1 a 9 se les administraron los tratamientos correspondientes provocando esto estrés y una leve toxicidad lo cual provoco que bajaran de peso; después de estos días la mayoría de los grupos comenzaron a ganar peso de forma desordenada, esta ganancia de peso fue debido a la rápida multiplicación de las células cancerosas inoculadas y a la formación de la masa tumoral, a excepción del grupo 5 en donde ningún ratón tuvo crecimiento tumoral y su curva de crecimiento se comportó de forma muy similar a la curva de la figura 18 (ANEXOS) que presenta el laboratorio harlan para esta sepa (109) ya que los individuos no presentaron cambios, dando con esto mayor validez al estudio.

Podemos observar que solamente las curvas de los grupos 5 y 7 llegaron hasta el día 60 porque al menos un individuo de cada grupo seguía vivo, a diferencia de los demás grupos en los que el total de sus integrantes murieron antes de finalizar el estudio

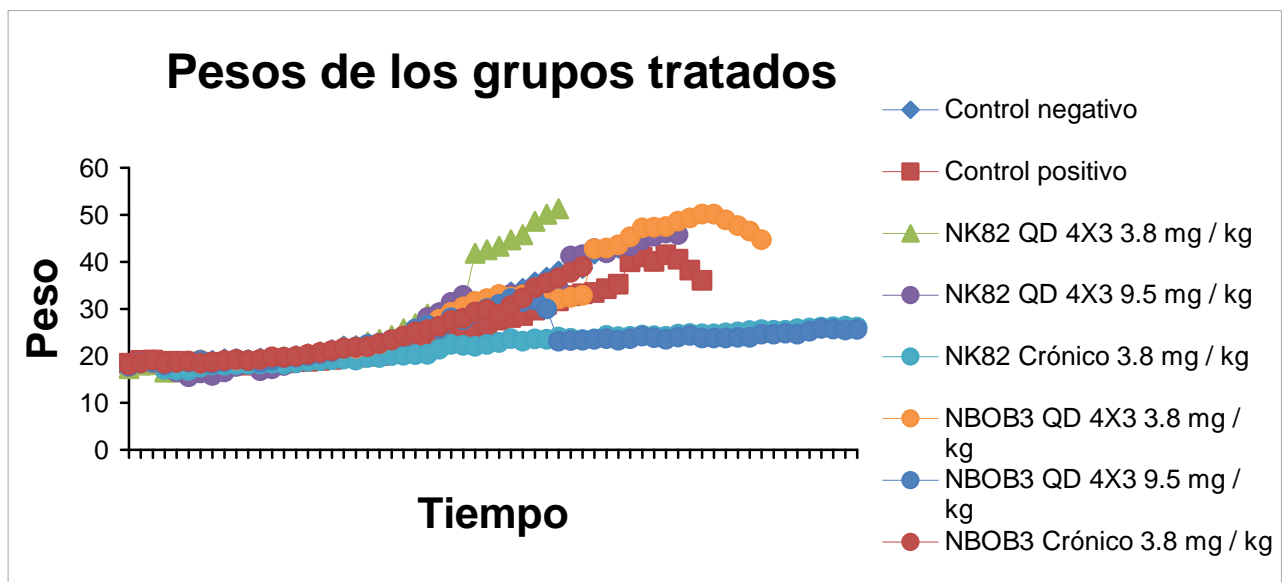


Fig. 12 - Muestra el peso promedio diario de cada uno de los grupos durante los 60 días del experimento.

Tabla 4. Muestra los valores obtenidos del índice T/C en relación al peso de los grupos en los días 1, 5, 10, 15 y 17 del experimento.

	T/C Peso				
	Día 1	Día 5	Día 10	Día 15	Día 17
Control positivo	101.17	97.48	95.58	91.22	90.22
NK82 QD 4X3 3.8 mg / kg	96.18	95.54	93.12	98.37	98.28
NK82 QD 4X3 9.5 mg / kg	100.32	85.63	86.29	94.10	94.11
NK82 Crónico 3.8 mg / kg	99.26	92.29	93.58	90.93	87.28
NBOB3 QD 4X3 3.8 mg / kg	97.82	100.05	98.51	98.51	96.97
NBOB3 QD 4X3 9.5 mg / kg	98.30	99.79	95.38	98.03	97.37
NBOB3 Crónico 3.8 mg / kg	101.17	96.33	98.66	99.23	98.19

Para el análisis de T/C (Tabla 4) se utilizaron los pesos obtenidos durante los días 1, 5, 10, 15 y 17 ya que durante este periodo se contaba con el total de individuos vivos. Se puede observar que al día 1 todos los grupos presentan un valor cercano a  $100 \pm 4$  lo que dio confiabilidad al estudio ya que indica homogeneidad de los grupos al comenzar el experimento.

Durante el día 5 y el 10 los valores de T/C disminuyeron en la mayoría de los grupos principalmente en los de NK82 crónico y mayormente en el intermitente con una dosis de 9.5mg/kg, los cuales se acercaron al índice de toxicidad ( $\leq 85\%$ ) que propone el protocolo del NCI (103, 110).

En los días 15 y 17, la mayoría de los grupos incrementaron su peso debido a su desarrollo, a que se estabilizaron de los efectos tóxicos de los compuestos y al crecimiento de la masa tumoral, por lo que aumentaron también el valor de T/C a excepción del grupo C(+) que presentó un crecimiento tumoral más lento ya que es un fármaco ya aprobado por la FDA para el tratamiento del cáncer y el

grupo crónico de NK82 en el cual los valores se alejan cada vez más del 100% ya que no presentó un crecimiento tumoral, a diferencia del grupo C(-) con el cual fueron comparados, sin embargo hasta este día no alcanzaron un valor menor a 50 para que pudieran considerarse significativos (98).

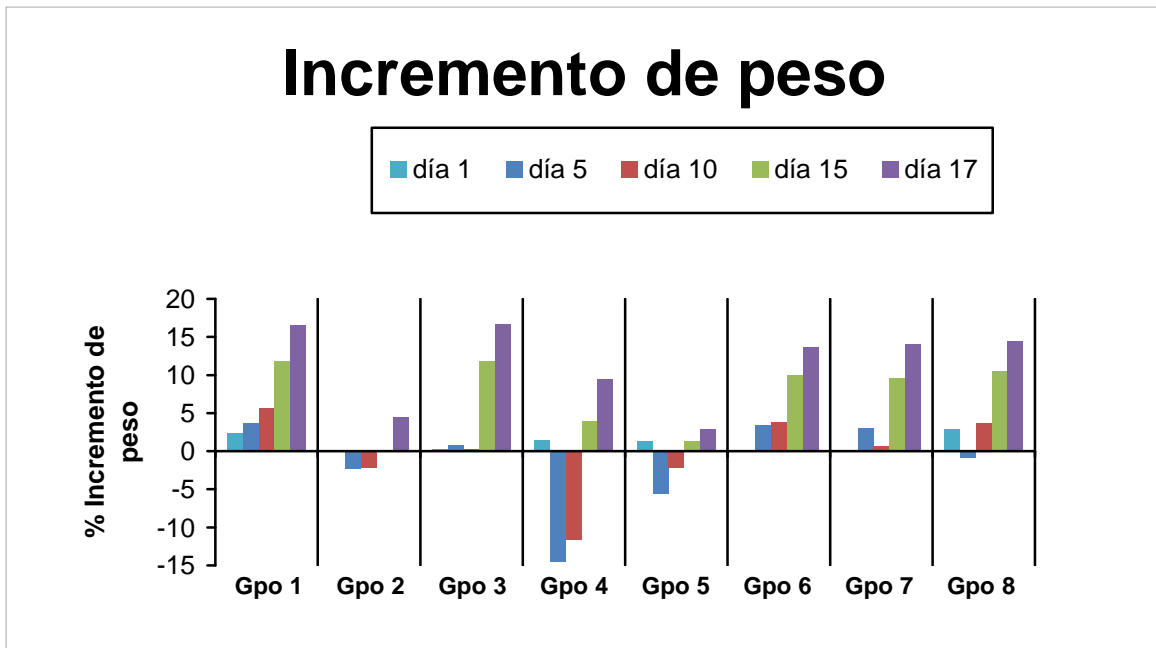


Fig. 13 - Análisis del incremento de peso de los grupos durante los días 1, 5, 10, 15 y 17

La figura 13 nos muestra el incremento que tuvieron los grupos tratados hasta el día 17 en que murió el primer ratón. Podemos observar que el grupo 1 al que solo se le administro agua inyectable y el grupo 6 con la dosis más baja de NBOB3 de forma intermitente incrementaron su peso constantemente durante este periodo; a diferencia de los grupos 2, 4, 5 y 8 que presentaron una disminución es su peso al día 5 y después una recuperación, mientras que en los grupos 3 y 7 la disminución de peso se dio hasta el día 10, seguida por su recuperación en los días posteriores. En los días 15 y 17 podemos observar que el incremento de peso de los grupos C(+) y NK82 crónico (grupo que no presentó crecimiento tumoral) era considerablemente lento a diferencia de los demás grupos que aumentaron su peso de acuerdo al crecimiento acelerado de la masa tumoral.

# Incremento de peso

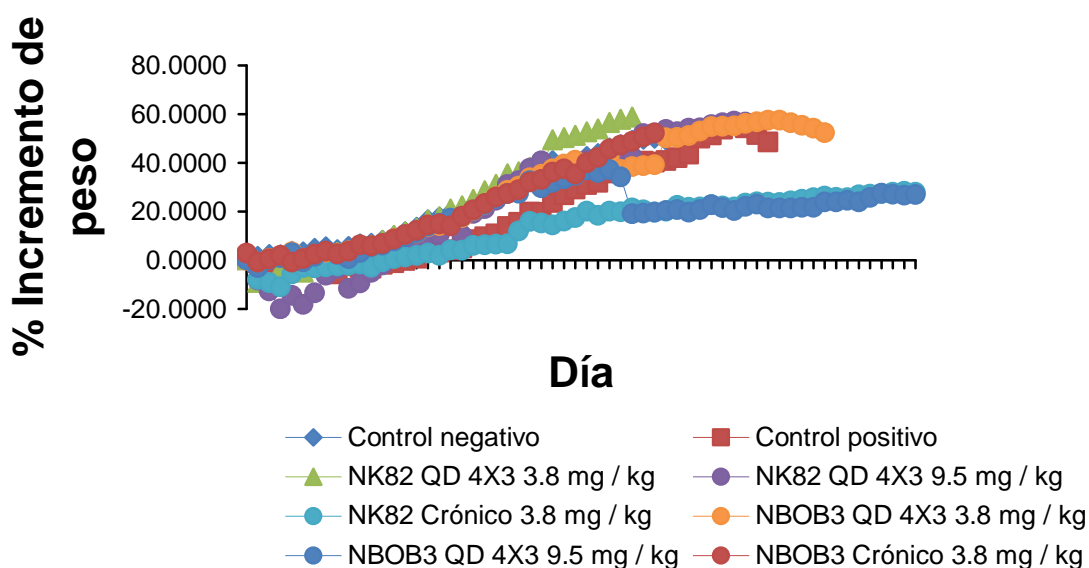


Fig. 14 - Curvas del porcentaje de incremento de peso que mostraron los diferentes grupos durante 60 días

En la figura 14 se puede observar el incremento en peso que tuvieron cada uno de los grupos cuando se les aplicaron los diferentes tratamientos y durante un periodo de 60 días que duró el experimento.

En los primeros días se observa una disminución en los pesos de algunos de los grupos que fueron tratados, a diferencia del grupo control negativo que no presentó esta disminución, se infiere que esto fue debido a la toxicidad del compuesto el cual se les administró durante los primeros nueve días de acuerdo con el protocolo del NCI el cual indica presencia de toxicidad con una disminución menor o igual al 85% respecto al grupo control negativo (103, 110).

Después de este tiempo los ratones empezaron a aumentar su peso, en parte por su desarrollo normal pero también por el crecimiento de la masa tumoral, según la curva de crecimiento

presentada por los laboratorios Harlan (figura 18, ANEXOS) para esta cepa, el máximo peso que pueden alcanzar los ratones a una edad de 60 días es aproximadamente de 25 gramos (109), peso que alcanzaron la mayoría de los grupos entre los días 25 y 30 y que continuó aumentando de acuerdo a como se incrementaba la masa tumoral, casi hasta el día en que murieron. Al final de cada curva se presentó una leve disminución en el peso, puesto que la condición de enfermedad en que se encontraban los ratones no les permitía una buena alimentación y había un deterioro de los individuos.

La curva del grupo tratado con 3.8 mg/kg de NK82 de forma intermitente fue la que presentó un mayor incremento de peso y por lo mismo una sobrevida menor, incluso que la del control negativo. Por el contrario el grupo que fue tratado con 3.8mg/kg de NBOB3 de forma intermitente tuvo un incremento de peso menor y una sobrevida mayor que la del grupo tratado con ciclofosfamida pero ambas muy por debajo de la del control negativo confirmando el uso de ciclofosfamida como control positivo (103).

La curva del grupo que fue tratado con 9.5 mg/kg de NBOB3 se extiende hasta el día 60 esto es debido a que uno de los ratones que integraban el grupo no presentó crecimiento tumoral, sin embargo al día 35 del estudio ya habían muerto todos los demás ratones de este grupo a los cuales si se les formó un tumor, este grupo presentó un comportamiento similar al grupo de 3.8mg/kg de NK82 intermitente, aumentando la sobrevida solamente un día y presentando un incremento de peso menor (Tabla 7, ANEXOS).

El grupo que se trató de forma crónica con NK82 presenta una sobrevida hasta el día 60 en que terminó el estudio (Tabla 7, ANEXOS), ya que a ninguno de los integrantes se les formó un tumor, esto, omitiendo a los tres ratones que murieron en los primeros días a causa de la alta toxicidad del compuesto, presentando un comportamiento anormal y un mal estado físico, confirmado por el daño principalmente en hígado, observado mediante las necropsias de los cadáveres y los valores de toxicidad de acuerdo al protocolo del NCI (103, 110).

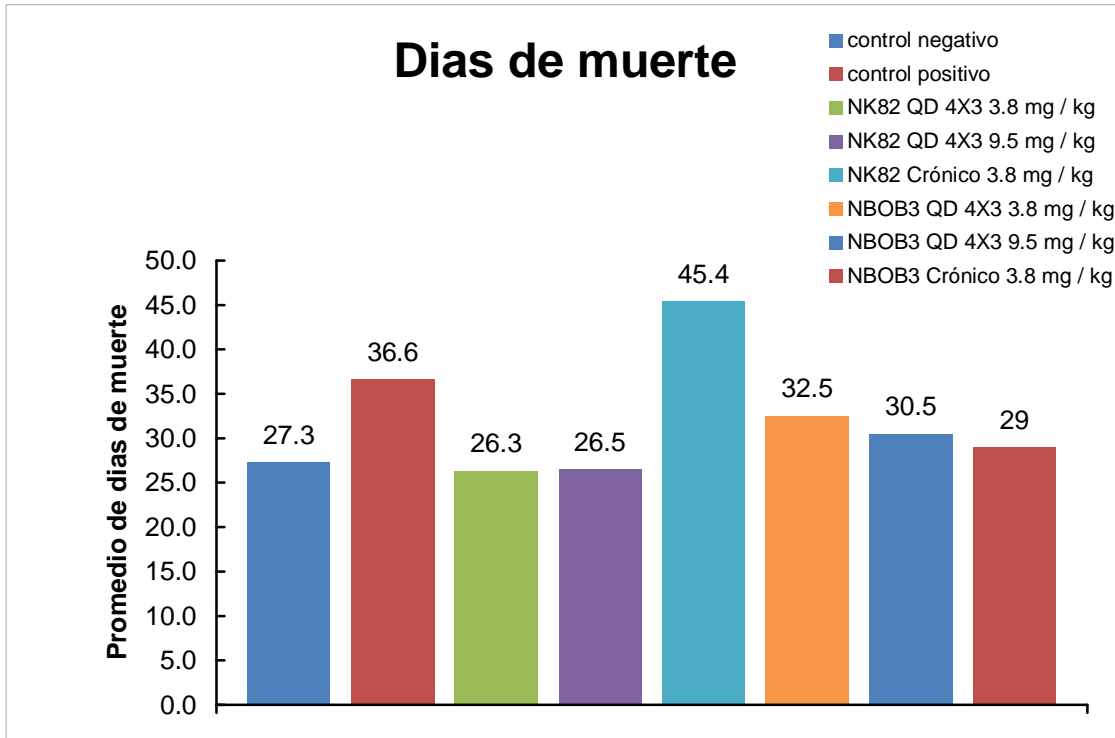


Fig. 15 - Promedio de los días de muerte de los grupos experimentales.

La figura 15 muestra el día promedio en el que murieron los ratones de los diferentes grupos tratados.

Existe una diferencia máxima entre grupos de 19 días siendo el grupo crónico de NK82 el más alto seguido por el grupo de ciclofosfamida, y el grupo de 9.5 mg/kg de NK82 el del promedio más bajo.

Con base en esto se obtuvo el valor de T/C y se calculó el índice de supervivencia (103).



Tabla 5. Muestra los valores obtenidos del índice T/C en relación a la sobrevida de los grupos tratados.

T/C Sobrevida	
Control positivo	140.77
NK82 QD 4X3 3.8 mg / kg	101.15
NK82 QD 4X3 9.5 mg / kg	101.92
NK82 Crónico 3.8 mg / kg	174.62
NBOB3 QD 4X3 3.8 mg / kg	125
NBOB3 QD 4X3 9.5 mg / kg	117.31
NBOB3 Crónico 3.8 mg / kg	111.54

La tabla 5 muestra los valores calculados de T/C en cuanto a la sobrevida de los grupos tratados comparada con la del grupo C(-), encontramos que el grupo con un valor de T/C mayor fue el de NK82 crónico, mientras que el más bajo fue el que presentó el grupo de 3.8 mg/kg de Nk82 intermitente.

El protocolo para la evaluación de nuevos fármacos del NCI establece un índice de 125 como valor límite de eficacia, siendo aceptables valores superiores (103, 98), el grupo crónico de NK82 y el grupo C(+) presentan valores superiores a 125, 174.62 y 140.77 respectivamente, validando el uso de ciclofosfamida como control positivo (103), y dando al grupo 5 un índice muy alto debido solo murieron tres ratones por toxicidad, mientras que el grupo intermitente de 3.8 mg/kg de NBOB3 se encuentra en el límite y de acuerdo al protocolo sería aceptable pero no ideal por lo que se podría ajustar esta dosis buscando un aumento en este valor (105).

Los resultados en la prueba de ANDEVA en función de la sobrevida (ANEXOS) demuestran que existe diferencia en los tratamientos utilizados. Sin embargo con los resultados obtenidos en la prueba de Tukey podemos observar que el grupo 5 en donde se utilizó el tratamiento crónico de NK82 es el que demuestra mayor diferencia con respecto a los demás grupos utilizados en el experimento siendo esta significativa (105, 110).

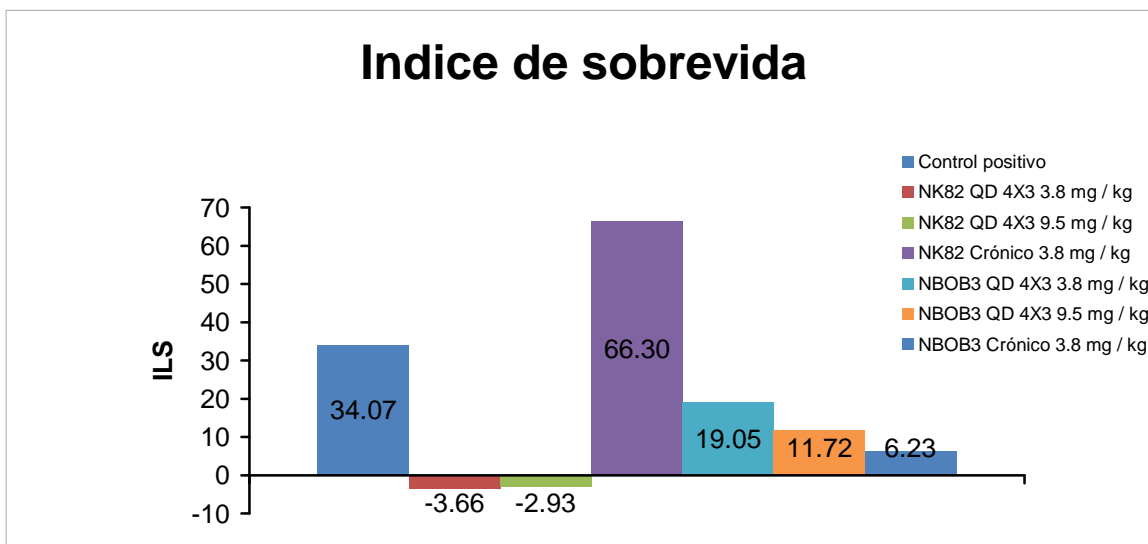


Fig. 16 - Muestra los valores de Índice de sobrevida obtenidos para cada uno de los grupos tratados.

La figura 16 muestra los valores de sobrevida calculados mediante las fórmulas descritas para cada uno de los grupos tratados; en los grupos intermitentes de NK82 se observó un índice de sobrevida negativo en comparación con el grupo control negativo indicando un tratamiento poco eficaz y probablemente tóxico para este modelo murino.

A pesar de que todos los grupos tratados con NBOB3 presentaron un índice de sobrevida positivo, con un rango de 6.23 a 19.05, no fue lo suficientemente alto para alcanzar el valor de 25 el cual indica un efecto antineoplásico aceptable para nuevos fármacos según los protocolos internacionales del NCI (103, 98), a diferencia del control positivo el cual tuvo un índice de sobrevida superior a 25, lo cual le da validez al estudio ya que se comportó de acuerdo a como se indica en el protocolo (103, 98), y también el grupo tratado crónicamente con NK82 que presenta un ILS de 66.30, muy superior al valor mínimo aceptable de actividad antineoplásica para nuevos compuestos (103,98).

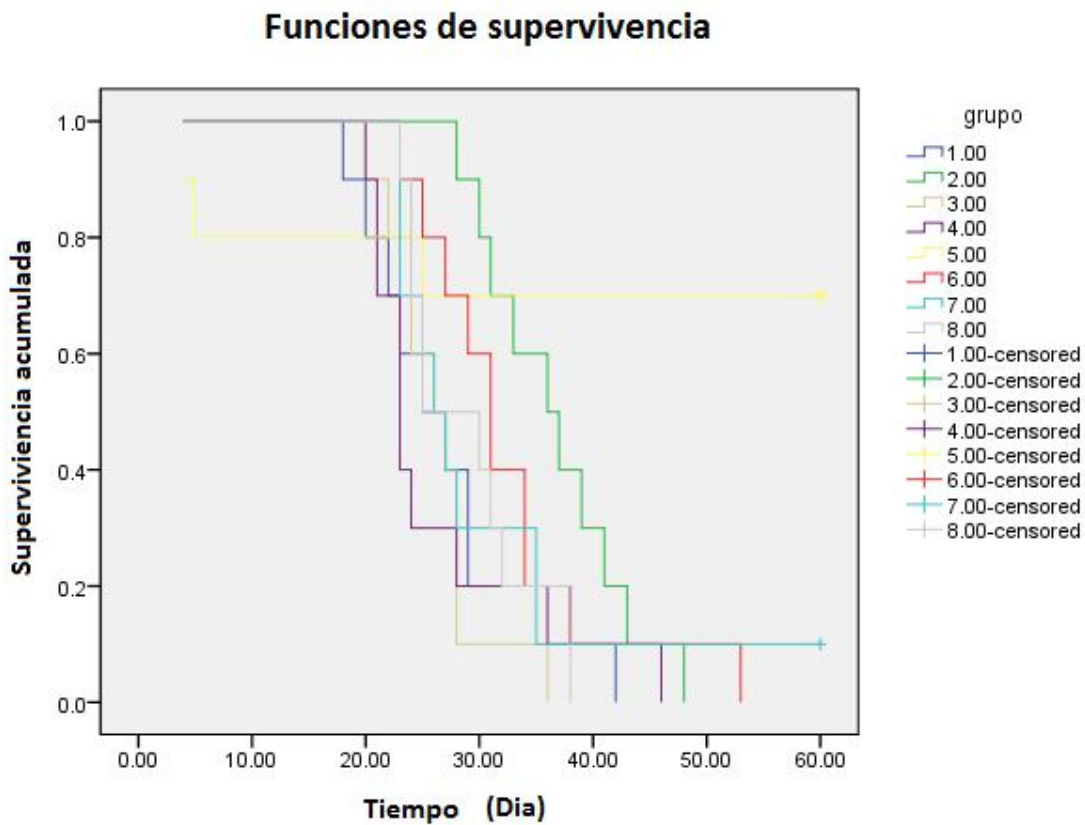


Fig. 17 - Muestra las curvas de sobrevida para cada grupo en función del análisis estadístico de Log Rank.

Tabla 6. Muestra el análisis estadístico de Log Rank en función de la supervivencia de los grupos experimentales

Comparaciones globales

	$\chi^2$	Grados de libertad	Sig.
Log Rank (Mantel-Cox)	26.839	7	.000

La figura 17 nos muestra claramente la diferencia de las curvas de supervivencia de cada grupo, podemos observar que en el caso de los grupos del tratamiento crónico con NK82 y en el de 9.5 mg/kg de NBOB3 se presentó censura ya que al menos un ratón de cada grupo seguía vivo al día 60 del experimento

Podemos observar que en general la curva del grupo administrado con ciclofosfamida presentó un mejor comportamiento que los demás grupos a excepción del grupo 5, tal y como se esperaba siendo este el control positivo, mientras que los grupos 3 y 4 fueron los que tuvieron una curva con menor actividad, incluso, menor a la del control negativo (103).

La tabla 6 nos muestra el análisis estadístico de *Log Rank* en donde podemos observar una probabilidad de  $p = 0$  la cual permitió rechazar la hipótesis nula ( $H_0$ ) con lo cual comprobamos que existen diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia de los diferentes tratamientos, principalmente en la del grupo crónico de NK82 (ANDEVA en función de supervivencia, ANEXOS). Cabe destacar que en este análisis los tratamientos fueron comparados con el grupo control negativo (105, 110).

# Conclusiones

- El modelo de Melanoma B16 fue efectivo en la evaluación de la actividad antineoplásica de los compuestos NK82 y NBOB3.
- La utilización de la ciclofosfamida como control positivo presento los resultados esperados en cuanto a su actividad antineoplásica con un índice de supervivencia igual o mayor a 25% como lo marca el NCI (103, 98), permitiéndonos comparar este resultado con los obtenidos en los diferentes tratamientos utilizados y darles validez a los resultados obtenidos.
- El compuesto NK82 presento una mayor toxicidad de acuerdo a los valores de T/C que propone el protocolo en el cual se basó este estudio (103, 110), aunque comúnmente los compuestos antineoplásicos tienen un margen limitado entre la dosis tóxica y la dosis terapéutica, el ajuste de las dosis a la mitad del tratamiento fue efectivo ya que disminuyó la toxicidad, al mismo tiempo que ejerció un gran efecto antineoplásico.
- La eficacia mostrada por el tratamiento crónico de NK82 debe ser corroborada y se deben ajustar bien las dosis para poder continuar con las siguientes etapas de evaluación, ya que estuvieron muy cerca de alcanzar el límite de toxicidad que propone el protocolo en el cual se basó este estudio (103, 110).
- Los tratamientos intermitentes de NK82 no fueron efectivos por lo que se sugiere estudiar bien sus propiedades y reevaluar las dosis y los esquemas de administración.
- En general el compuesto NBOB3 tuvo un mejor efecto antineoplásico aunque ningún tratamiento alcanzó los valores aceptables (103), a diferencia de NK82 en el cual un tratamiento sí los alcanzó.

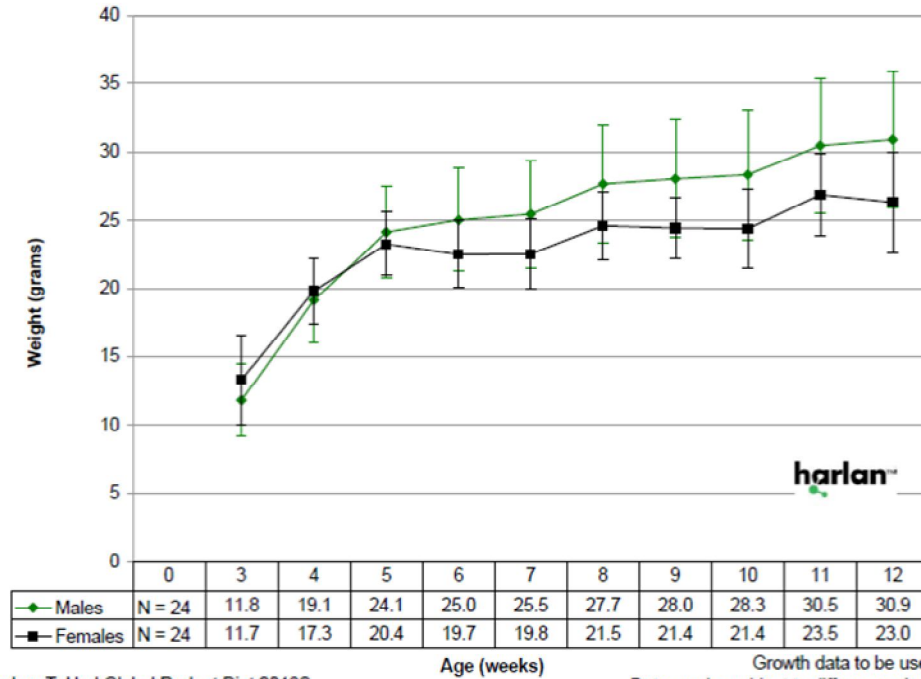
- El tratamiento intermitente de 3.8 mg/kg de NBOB3 presento un T/C y un ILS cercano al límite aceptable (103, 98) por lo que puede ser un buen candidato para posteriores evaluaciones.
- Las dosis que tuvieron mayor eficacia deberán seguir en estudio, realizar las evaluaciones en diferentes modelos, estudiar la vía de acción de los compuestos y su absorción, distribución, metabolismo y excreción, así como evaluar la eficacia de los compuestos usados en combinación.

# Anexos

Harlan Laboratories Inc., USA  
Barrier 202A, Indianapolis, IN  
2006

**CB6F1/Hsd**

Cage floor space: 71.5 in<sup>2</sup>  
Cage density: 6



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

Age (weeks)

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.

Fig. 18 - Curva de peso de ratones de la cepa CB6F1:Hsd (109).

Tabla 7. Días de muerte e índice de sobrevivencia calculado para los grupos tratados

<b>Días de muerte</b>								
<b>control negativo o</b>	<b>Control positivo o</b>	<b>NK82 QD 4X3 3.8 mg / kg</b>	<b>NK82 QD 4X3 9.5 mg / kg</b>	<b>NK82 Crónico 3.8 mg / kg</b>	<b>NBOB3 QD 4X3 3.8 mg / kg</b>	<b>NBOB3 QD 4X3 9.5 mg / kg</b>	<b>NBOB3 Crónico 3.8 mg / kg</b>	
18	28	20	20	4	23	23	23	
20	30	22	21	5	25	23	24	
22	31	24	21	25	27	23	24	
23	33	24	23	60	29	25	25	
25	36	26	23	60	31	26	25	
27	37	27	23	60	31	27	30	
29	39	28	24	60	34	28	31	
29	41	28	28	60	34	35	32	
38	43	28	36	60	38	35	38	
42	48	36	46	60	53	60	38	
<b>Prom</b>	27.3	36.6	26.3	26.5	45.4	32.5	30.5	29
<b>SD</b>	7.6	6.3	4.3	8.2	24.1	8.4	11.2	5.7
<b>ILS</b>		34.0	-3.6	-2.9	66.3	19.	11.7	6.2



## Análisis estadístico en función del incremento en peso con la prueba ANDEVA

### ANDEVA DIA 1

IP					
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F	Sig.
Tratamientos		7	12.137	1.460	.196
Error	598.685	72	8.315		
Total	683.642	79			

### Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento de peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Tukey HSD	1	2	2.16907	1.28958	.699	-1.8568	6.1949
	1	3	2.11148	1.28958	.726	-1.9143	6.1373
	1	4	.91678	1.28958	.996	-3.1090	4.9426

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento de peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
		5	1.04416	1.28958	.992	-2.9817	5.0700
		6	2.39987	1.28958	.582	-1.6260	6.4257
		7	2.17030	1.28958	.698	-1.8555	6.1961
		8	-.49257	1.28958	1.000	-4.5184	3.5332
2		1	-2.16907	1.28958	.699	-6.1949	1.8568
		3	-.05759	1.28958	1.000	-4.0834	3.9682
		4	-1.25228	1.28958	.977	-5.2781	2.7735
		5	-1.12490	1.28958	.988	-5.1507	2.9009
		6	.23080	1.28958	1.000	-3.7950	4.2566
		7	.00123	1.28958	1.000	-4.0246	4.0270
		8	-2.66164	1.28958	.448	-6.6875	1.3642
3		1	-2.11148	1.28958	.726	-6.1373	1.9143
		2	.05759	1.28958	1.000	-3.9682	4.0834
		4	-1.19470	1.28958	.982	-5.2205	2.8311
		5	-1.06732	1.28958	.991	-5.0931	2.9585
		6	.28838	1.28958	1.000	-3.7374	4.3142

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento de peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
		7	.05881	1.28958	1.000	-3.9670	4.0846
		8	-2.60406	1.28958	.477	-6.6299	1.4218
		1	-.91678	1.28958	.996	-4.9426	3.1090
		2	1.25228	1.28958	.977	-2.7735	5.2781
		3	1.19470	1.28958	.982	-2.8311	5.2205
	4	5	.12738	1.28958	1.000	-3.8984	4.1532
		6	1.48308	1.28958	.943	-2.5427	5.5089
		7	1.25351	1.28958	.977	-2.7723	5.2793
		8	-1.40936	1.28958	.956	-5.4352	2.6165
		1	-1.04416	1.28958	.992	-5.0700	2.9817
		2	1.12490	1.28958	.988	-2.9009	5.1507
		3	1.06732	1.28958	.991	-2.9585	5.0931
	5	4	-.12738	1.28958	1.000	-4.1532	3.8984
		6	1.35570	1.28958	.965	-2.6701	5.3815
		7	1.12613	1.28958	.988	-2.8997	5.1520
		8	-1.53674	1.28958	.932	-5.5626	2.4891

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento de peso

	(I) grupo	(J) grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
6		1	-2.39987	1.28958	.582	-6.4257	1.6260
		2	-.23080	1.28958	1.000	-4.2566	3.7950
		3	-.28838	1.28958	1.000	-4.3142	3.7374
		4	-1.48308	1.28958	.943	-5.5089	2.5427
		5	-1.35570	1.28958	.965	-5.3815	2.6701
		7	-.22957	1.28958	1.000	-4.2554	3.7963
		8	-2.89244	1.28958	.339	-6.9183	1.1334
	7		1	-2.17030	1.28958	.698	-6.1961
		2	-.00123	1.28958	1.000	-4.0270	4.0246
		3	-.05881	1.28958	1.000	-4.0846	3.9670
		4	-1.25351	1.28958	.977	-5.2793	2.7723
		5	-1.12613	1.28958	.988	-5.1520	2.8997
		6	.22957	1.28958	1.000	-3.7963	4.2554
		8	-2.66287	1.28958	.447	-6.6887	1.3629
8			1	.49257	1.28958	1.000	-3.5332
		2	2.66164	1.28958	.448	-1.3642	6.6875

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento de peso

(I) grupo	(J) grupo	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
	3	2.60406	1.28958	.477	-1.4218	6.6299
	4	1.40936	1.28958	.956	-2.6165	5.4352
	5	1.53674	1.28958	.932	-2.4891	5.5626
	6	2.89244	1.28958	.339	-1.1334	6.9183
	7	2.66287	1.28958	.447	-1.3629	6.6887

IP

grupo	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$
		1
6	10	-.0612
7	10	.1684
2	10	.1696
3	10	.2272
5	10	1.2945
4	10	1.4219

Tukey HSD<sup>a</sup>

IP

grupo	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$	
		1	
1	10	2.3387	
8	10	2.8313	
Sig.		.339	
Tukey B <sup>a</sup>	6	10	-.0612
	7	10	.1684
	2	10	.1696
	3	10	.2272
	5	10	1.2945
	4	10	1.4219
	1	10	2.3387
	8	10	2.8313

## ANDEVA DIA 5

IP					
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F	Sig.
Tratamientos	2596.658	7	370.951	17.718	.000
Error	1465.540	70	20.936		
Total	4062.197	77			

### Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Tukey HSD	1	2	5.99343	2.04628	.082	-.4001	12.3869
		3	2.90235	2.04628	.846	-3.4911	9.2958
		4	18.15316 <sup>*</sup>	2.04628	.000	11.7597	24.5467
		5	9.23591 <sup>*</sup>	2.17041	.002	2.4546	16.0172
		6	.22729	2.04628	1.000	-6.1662	6.6208
		7	.64662	2.04628	1.000	-5.7469	7.0401
		8	4.48170	2.04628	.370	-1.9118	10.8752

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
2	1	3	-5.99343	2.04628	.082	-12.3869	.4001
		4	-3.09108	2.04628	.799	-9.4846	3.3024
		5	12.15974 <sup>*</sup>	2.04628	.000	5.7662	18.5532
		6	3.24248	2.17041	.808	-3.5388	10.0238
		7	-5.76614	2.04628	.107	-12.1596	.6273
		8	-5.34681	2.04628	.169	-11.7403	1.0467
		9	-1.51172	2.04628	.995	-7.9052	4.8818
		3	1	2	-2.90235	2.04628	.846
3	3.09108			2.04628	.799	-3.3024	9.4846
4	15.25082 <sup>*</sup>			2.04628	.000	8.8573	21.6443
5	6.33356			2.17041	.084	-.4478	13.1149
6	-2.67506			2.04628	.893	-9.0685	3.7184
7	-2.25573			2.04628	.954	-8.6492	4.1378
8	1.57936			2.04628	.994	-4.8141	7.9728
4	1			2	-18.15316 <sup>*</sup>	2.04628	.000
		3	-12.15974 <sup>*</sup>	2.04628	.000	-18.5532	-5.7662



Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
	3	-15.25082 <sup>*</sup>	2.04628	.000	-21.6443	-8.8573
	5	-8.91726 <sup>*</sup>	2.17041	.003	-15.6986	-2.1359
	6	-17.92588 <sup>*</sup>	2.04628	.000	-24.3194	-11.5324
	7	-17.50654 <sup>*</sup>	2.04628	.000	-23.9000	-11.1131
	8	-13.67146 <sup>*</sup>	2.04628	.000	-20.0649	-7.2780
5	1	-9.23591 <sup>*</sup>	2.17041	.002	-16.0172	-2.4546
	2	-3.24248	2.17041	.808	-10.0238	3.5388
	3	-6.33356	2.17041	.084	-13.1149	.4478
	4	8.91726 <sup>*</sup>	2.17041	.003	2.1359	15.6986
	6	-9.00862 <sup>*</sup>	2.17041	.002	-15.7899	-2.2273
	7	-8.58929 <sup>*</sup>	2.17041	.004	-15.3706	-1.8080
	8	-4.75420	2.17041	.370	-11.5355	2.0271
6	1	-.22729	2.04628	1.000	-6.6208	6.1662
	2	5.76614	2.04628	.107	-.6273	12.1596
	3	2.67506	2.04628	.893	-3.7184	9.0685
	4	17.92588 <sup>*</sup>	2.04628	.000	11.5324	24.3194

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
		5	9.00862 <sup>*</sup>	2.17041	.002	2.2273	15.7899
		7	.41933	2.04628	1.000	-5.9742	6.8128
		8	4.25442	2.04628	.438	-2.1391	10.6479
	7	1	-6.4662	2.04628	1.000	-7.0401	5.7469
		2	5.34681	2.04628	.169	-1.0467	11.7403
		3	2.25573	2.04628	.954	-4.1378	8.6492
		4	17.50654 <sup>*</sup>	2.04628	.000	11.1131	23.9000
		5	8.58929 <sup>*</sup>	2.17041	.004	1.8080	15.3706
		6	-4.1933	2.04628	1.000	-6.8128	5.9742
		8	3.83508	2.04628	.573	-2.5584	10.2286
	8	1	-4.48170	2.04628	.370	-10.8752	1.9118
		2	1.51172	2.04628	.995	-4.8818	7.9052
		3	-1.57936	2.04628	.994	-7.9728	4.8141
		4	13.67146 <sup>*</sup>	2.04628	.000	7.2780	20.0649
		5	4.75420	2.17041	.370	-2.0271	11.5355
		6	-4.25442	2.04628	.438	-10.6479	2.1391

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
	grupo	grupo					
		7	-3.83508	2.04628	.573	-10.2286	2.5584

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

IP

grupo	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$			
		1	2	3	
Tukey HSD <sup>a</sup>	4	10	-14.5176		
	5	8		-5.6003	
	2	10		-2.3578	-2.3578
	8	10		-.8461	-.8461
	3	10		.7332	.7332
	7	10			2.9890
	6	10			3.4083
	1	10			3.6356
Sig.			1.000	.061	.092

IP

	grupo	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$		
			1	2	3
Tukey B <sup>a</sup>	4	10	-14.5176		
	5	8		-5.6003	
	2	10		-2.3578	-2.3578
	8	10		-.8461	-.8461
	3	10			.7332
	7	10			2.9890
	6	10			3.4083
	1	10			3.6356

## ANDEVA DIA 10

IP

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F	Sig.
Tratamientos	2021.852	7	288.836	8.951	.000
Error	2258.775	70	32.268		
Total	4280.627	77			

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Tukey HSD	1	2	7.83133	2.54040	.056	-.1060	15.7687
		3	5.34651	2.54040	.422	-2.5908	13.2839
		4	17.19478 <sup>*</sup>	2.54040	.000	9.2574	25.1321
		5	7.75000	2.69450	.093	-.6688	16.1688
		6	1.80879	2.54040	.996	-6.1286	9.7461
		7	4.97603	2.54040	.516	-2.9613	12.9134

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
		8	1.96303	2.54040	.994	-5.9743	9.9004
2		1	-7.83133	2.54040	.056	-15.7687	.1060
		3	-2.48482	2.54040	.976	-10.4222	5.4525
		4	9.36345 <sup>*</sup>	2.54040	.010	1.4261	17.3008
		5	-.08133	2.69450	1.000	-8.5002	8.3375
		6	-6.02254	2.54040	.272	-13.9599	1.9148
		7	-2.85530	2.54040	.949	-10.7926	5.0821
		8	-5.86830	2.54040	.303	-13.8056	2.0690
3		1	-5.34651	2.54040	.422	-13.2839	2.5908
		2	2.48482	2.54040	.976	-5.4525	10.4222
		4	11.84828 <sup>*</sup>	2.54040	.000	3.9109	19.7856
		5	2.40349	2.69450	.986	-6.0153	10.8223
		6	-3.53772	2.54040	.858	-11.4751	4.3996
		7	-.37048	2.54040	1.000	-8.3078	7.5669
		8	-3.38348	2.54040	.883	-11.3208	4.5539
4		1	-17.19478 <sup>*</sup>	2.54040	.000	-25.1321	-9.2574

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
	2	-9.36345 <sup>*</sup>	2.54040	.010	-17.3008	-1.4261
	3	-11.84828 <sup>*</sup>	2.54040	.000	-19.7856	-3.9109
	5	-9.44478 <sup>*</sup>	2.69450	.017	-17.8636	-1.0260
	6	-15.38599 <sup>*</sup>	2.54040	.000	-23.3233	-7.4486
	7	-12.21875 <sup>*</sup>	2.54040	.000	-20.1561	-4.2814
	8	-15.23175 <sup>*</sup>	2.54040	.000	-23.1691	-7.2944
5	1	-7.75000	2.69450	.093	-16.1688	.6688
	2	.08133	2.69450	1.000	-8.3375	8.5002
	3	-2.40349	2.69450	.986	-10.8223	6.0153
	4	9.44478 <sup>*</sup>	2.69450	.017	1.0260	17.8636
	6	-5.94121	2.69450	.362	-14.3600	2.4776
	7	-2.77397	2.69450	.968	-11.1928	5.6449
	8	-5.78697	2.69450	.396	-14.2058	2.6319
6	1	-1.80879	2.54040	.996	-9.7461	6.1286
	2	6.02254	2.54040	.272	-1.9148	13.9599
	3	3.53772	2.54040	.858	-4.3996	11.4751

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
	4	15.38599 <sup>*</sup>	2.54040	.000	7.4486	23.3233
	5	5.94121	2.69450	.362	-2.4776	14.3600
	7	3.16724	2.54040	.915	-4.7701	11.1046
	8	.15424	2.54040	1.000	-7.7831	8.0916
7	1	-4.97603	2.54040	.516	-12.9134	2.9613
	2	2.85530	2.54040	.949	-5.0821	10.7926
	3	.37048	2.54040	1.000	-7.5669	8.3078
	4	12.21875 <sup>*</sup>	2.54040	.000	4.2814	20.1561
	5	2.77397	2.69450	.968	-5.6449	11.1928
	6	-3.16724	2.54040	.915	-11.1046	4.7701
	8	-3.01300	2.54040	.933	-10.9503	4.9243
8	1	-1.96303	2.54040	.994	-9.9004	5.9743
	2	5.86830	2.54040	.303	-2.0690	13.8056
	3	3.38348	2.54040	.883	-4.5539	11.3208
	4	15.23175 <sup>*</sup>	2.54040	.000	7.2944	23.1691
	5	5.78697	2.69450	.396	-2.6319	14.2058



Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
	grupo	grupo					
		6	-.15424	2.54040	1.000	-8.0916	7.7831
		7	3.01300	2.54040	.933	-4.9243	10.9503

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

IP

grupo	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$	
		1	2
Tukey HSD <sup>a</sup>	4	10	-11.5577
	2	10	-2.1943
	5	8	-2.1129
	3	10	.2906
	7	10	.6610
	8	10	3.6740
	6	10	3.8283
	1	10	5.6371

IP

		Subconjunto para $\alpha = 0.05$	
grupo	N	1	2
Sig.		1.000	.063
Tukey B <sup>a</sup>	4	10	-11.5577
	2	10	-2.1943
	5	8	-2.1129
	3	10	.2906
	7	10	.6610
	8	10	3.6740
	6	10	3.8283
	1	10	5.6371

## ANDEVA DIA 15

IP

	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F	Sig.
Tratamientos	1575.986	7	225.141	4.840	.000
Error	3255.846	70	46.512		
Total	4831.833	77			

### Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Tukey HSD	1	2	11.85731 <sup>*</sup>	3.04999	.005	2.3278	21.3868
		3	-.04095	3.04999	1.000	-9.5705	9.4886
		4	7.86670	3.04999	.181	-1.6628	17.3962
		5	10.38417 <sup>*</sup>	3.23500	.040	.2766	20.4917
		6	1.71951	3.04999	.999	-7.8100	11.2490
		7	2.12474	3.04999	.997	-7.4048	11.6543
		8	1.22499	3.04999	1.000	-8.3045	10.7545

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
2	1	3	-11.85731 <sup>*</sup>	3.04999	.005	-21.3868	-2.3278
		4	-11.89827 <sup>*</sup>	3.04999	.005	-21.4278	-2.3687
		5	-3.99062	3.04999	.893	-13.5201	5.5389
		6	-1.47315	3.23500	1.000	-11.5807	8.6344
		7	-10.13780 <sup>*</sup>	3.04999	.029	-19.6673	-.6083
		8	-9.73257 <sup>*</sup>	3.04999	.042	-19.2621	-.2031
		3	-10.63233 <sup>*</sup>	3.04999	.018	-20.1618	-1.1028
		4	.04095	3.04999	1.000	-9.4886	9.5705
3	1	2	11.89827 <sup>*</sup>	3.04999	.005	2.3687	21.4278
		4	7.90765	3.04999	.176	-1.6219	17.4372
		5	10.42512 <sup>*</sup>	3.23500	.038	.3175	20.5327
		6	1.76046	3.04999	.999	-7.7691	11.2900
		7	2.16569	3.04999	.996	-7.3638	11.6952
		8	1.26594	3.04999	1.000	-8.2636	10.7955
		2	-7.86670	3.04999	.181	-17.3962	1.6628
		4	3.99062	3.04999	.893	-5.5389	13.5201
4	1	2	-7.86670	3.04999	.181	-17.3962	1.6628
		4	3.99062	3.04999	.893	-5.5389	13.5201

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
	3	-7.90765	3.04999	.176	-17.4372	1.6219
	5	2.51747	3.23500	.994	-7.5901	12.6251
	6	-6.14718	3.04999	.479	-15.6767	3.3823
	7	-5.74195	3.04999	.567	-15.2715	3.7876
	8	-6.64171	3.04999	.378	-16.1712	2.8878
5	1	-10.38417 <sup>*</sup>	3.23500	.040	-20.4917	-.2766
	2	1.47315	3.23500	1.000	-8.6344	11.5807
	3	-10.42512 <sup>*</sup>	3.23500	.038	-20.5327	-.3175
	4	-2.51747	3.23500	.994	-12.6251	7.5901
	6	-8.66466	3.23500	.147	-18.7722	1.4429
	7	-8.25943	3.23500	.191	-18.3670	1.8482
	8	-9.15918	3.23500	.104	-19.2668	.9484
6	1	-1.71951	3.04999	.999	-11.2490	7.8100
	2	10.13780 <sup>*</sup>	3.04999	.029	.6083	19.6673
	3	-1.76046	3.04999	.999	-11.2900	7.7691
	4	6.14718	3.04999	.479	-3.3823	15.6767

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
		5	8.66466	3.23500	.147	-1.4429	18.7722
		7	.40523	3.04999	1.000	-9.1243	9.9347
		8	-.49452	3.04999	1.000	-10.0240	9.0350
	7	1	-2.12474	3.04999	.997	-11.6543	7.4048
		2	9.73257 <sup>*</sup>	3.04999	.042	.2031	19.2621
		3	-2.16569	3.04999	.996	-11.6952	7.3638
		4	5.74195	3.04999	.567	-3.7876	15.2715
		5	8.25943	3.23500	.191	-1.8482	18.3670
		6	-.40523	3.04999	1.000	-9.9347	9.1243
		8	-.89975	3.04999	1.000	-10.4293	8.6298
	8	1	-1.22499	3.04999	1.000	-10.7545	8.3045
		2	10.63233 <sup>*</sup>	3.04999	.018	1.1028	20.1618
		3	-1.26594	3.04999	1.000	-10.7955	8.2636
		4	6.64171	3.04999	.378	-2.8878	16.1712
		5	9.15918	3.23500	.104	-.9484	19.2668
		6	.49452	3.04999	1.000	-9.0350	10.0240

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
	grupo	grupo					
		7	.89975	3.04999	1.000	-8.6298	10.4293

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

IP

	grupo	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$		
			1	2	3
Tukey HSD <sup>a</sup>	2	10	-.1234		
	5	8	1.3497	1.3497	
	4	10	3.8672	3.8672	3.8672
	7	10		9.6091	9.6091
	6	10		10.0144	10.0144
	8	10		10.5089	10.5089
	1	10			11.7339
	3	10			11.7748
	Sig.		.900	.077	.191

IP

	grupo	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$		
			1	2	3
Tukey B <sup>a</sup>	2	10	-1.1234		
	5	8	1.3497	1.3497	
	4	10	3.8672	3.8672	3.8672
	7	10		9.6091	9.6091
	6	10		10.0144	10.0144
	8	10		10.5089	10.5089
	1	10			11.7339
	3	10			11.7748



## ANDEVA DIA 17

IP					
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F	Sig.
Tratamientos	1835.188	7	262.170	5.263	.000
Error	3486.704	70	49.810		
Total	5321.893	77			

### Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Tukey HSD	1	2	12.11114 <sup>*</sup>	3.15627	.006	2.2496	21.9727
		3	-.05767	3.15627	1.000	-9.9193	9.8039
		4	7.11577	3.15627	.333	-2.7458	16.9774
		5	13.66730 <sup>*</sup>	3.34773	.003	3.2075	24.1271
		6	2.93186	3.15627	.982	-6.9297	12.7934
		7	2.62510	3.15627	.991	-7.2365	12.4867
		8	2.16151	3.15627	.997	-7.7001	12.0231

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
2	1	3	-12.11114 <sup>*</sup>	3.15627	.006	-21.9727	-2.2496
		4	-12.16881 <sup>*</sup>	3.15627	.006	-22.0304	-2.3072
		5	-4.99537	3.15627	.759	-14.8569	4.8662
		6	1.55616	3.34773	1.000	-8.9036	12.0159
		7	-9.17928	3.15627	.086	-19.0409	.6823
		8	-9.48604	3.15627	.068	-19.3476	.3755
		9	-9.94963 <sup>*</sup>	3.15627	.046	-19.8112	-.0880
		3	1	2	.05767	3.15627	1.000
4	12.16881 <sup>*</sup>			3.15627	.006	2.3072	22.0304
5	7.17344			3.15627	.323	-2.6881	17.0350
6	13.72497 <sup>*</sup>			3.34773	.003	3.2652	24.1848
7	2.98953			3.15627	.980	-6.8721	12.8511
8	2.68277			3.15627	.989	-7.1788	12.5444
9	2.21918			3.15627	.997	-7.6424	12.0808
4	1			2	-7.11577	3.15627	.333
		4	4.99537	3.15627	.759	-4.8662	14.8569

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
		3	-7.17344	3.15627	.323	-17.0350	2.6881
		5	6.55153	3.34773	.518	-3.9083	17.0113
		6	-4.18391	3.15627	.886	-14.0455	5.6777
		7	-4.49067	3.15627	.844	-14.3523	5.3709
		8	-4.95426	3.15627	.766	-14.8158	4.9073
5	1		-13.66730 <sup>*</sup>	3.34773	.003	-24.1271	-3.2075
		2	-1.55616	3.34773	1.000	-12.0159	8.9036
		3	-13.72497 <sup>*</sup>	3.34773	.003	-24.1848	-3.2652
		4	-6.55153	3.34773	.518	-17.0113	3.9083
		6	-10.73544 <sup>*</sup>	3.34773	.040	-21.1952	-.2757
		7	-11.04220 <sup>*</sup>	3.34773	.031	-21.5020	-.5824
		8	-11.50579 <sup>*</sup>	3.34773	.021	-21.9656	-1.0460
6	1		-2.93186	3.15627	.982	-12.7934	6.9297
		2	9.17928	3.15627	.086	-.6823	19.0409
		3	-2.98953	3.15627	.980	-12.8511	6.8721
		4	4.18391	3.15627	.886	-5.6777	14.0455

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
	5	10.73544 <sup>*</sup>	3.34773	.040	.2757	21.1952
	7	-.30676	3.15627	1.000	-10.1683	9.5548
	8	-.77034	3.15627	1.000	-10.6319	9.0912
7	1	-2.62510	3.15627	.991	-12.4867	7.2365
	2	9.48604	3.15627	.068	-.3755	19.3476
	3	-2.68277	3.15627	.989	-12.5444	7.1788
	4	4.49067	3.15627	.844	-5.3709	14.3523
	5	11.04220 <sup>*</sup>	3.34773	.031	.5824	21.5020
	6	.30676	3.15627	1.000	-9.5548	10.1683
	8	-.46359	3.15627	1.000	-10.3252	9.3980
8	1	-2.16151	3.15627	.997	-12.0231	7.7001
	2	9.94963 <sup>*</sup>	3.15627	.046	.0880	19.8112
	3	-2.21918	3.15627	.997	-12.0808	7.6424
	4	4.95426	3.15627	.766	-4.9073	14.8158
	5	11.50579 <sup>*</sup>	3.34773	.021	1.0460	21.9656
	6	.77034	3.15627	1.000	-9.0912	10.6319

Comparación múltiple

Variable dependiente:

Incremento en peso

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
	grupo	grupo					
		7	.46359	3.15627	1.000	-9.3980	10.3252

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

IP

grupo	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$			
		1	2	3	
Tukey HSD <sup>a</sup>	5	8	2.9103		
	2	10	4.4664	4.4664	
	4	10	9.4618	9.4618	9.4618
	6	10		13.6457	13.6457
	7	10		13.9525	13.9525
	8	10		14.4160	14.4160
	1	10			16.5776
	3	10			16.6352
Sig.			.461	.053	.343

IP

grupo	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$		
		1	2	3
Tukey B <sup>a</sup>	5	8	2.9103	
	2	10	4.4664	
	4	10	9.4618	9.4618
	6	10		13.6457
	7	10		13.9525
	8	10		14.4160
	1	10		16.5776
	3	10		16.6352

## Análisis estadístico en función de la sobrevida con la prueba ANDEVA

ANDEVA

Sobrevida					
	Suma de cuadrados	Grados de libertad	Cuadrado de la media	F	Sig.
Tratamientos	2965.988	7	423.713	3.381	.004
Error	9022.500	72	125.312		
Total	11988.488	79			

Comparación múltiple

Variable dependiente:

sobrevida

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Tukey HSD	1	2	-9.300	5.006	.584	-24.93	6.33
		3	1.000	5.006	1.000	-14.63	16.63
		4	.800	5.006	1.000	-14.83	16.43
		5	-18.100 <sup>*</sup>	5.006	.012	-33.73	-2.47
		6	-5.200	5.006	.967	-20.83	10.43

Comparación múltiple

Variable dependiente:

sobrevida

(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
	7	-3.200	5.006	.998	-18.83	12.43
	8	-1.700	5.006	1.000	-17.33	13.93
2	1	9.300	5.006	.584	-6.33	24.93
	3	10.300	5.006	.452	-5.33	25.93
	4	10.100	5.006	.478	-5.53	25.73
	5	-8.800	5.006	.650	-24.43	6.83
	6	4.100	5.006	.991	-11.53	19.73
	7	6.100	5.006	.924	-9.53	21.73
	8	7.600	5.006	.795	-8.03	23.23
3	1	-1.000	5.006	1.000	-16.63	14.63
	2	-10.300	5.006	.452	-25.93	5.33
	4	-.200	5.006	1.000	-15.83	15.43
	5	-19.100 <sup>*</sup>	5.006	.007	-34.73	-3.47
	6	-6.200	5.006	.917	-21.83	9.43
	7	-4.200	5.006	.990	-19.83	11.43
	8	-2.700	5.006	.999	-18.33	12.93



Comparación múltiple

Variable dependiente:

sobrevida

(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
4	1	-.800	5.006	1.000	-16.43	14.83
	2	-10.100	5.006	.478	-25.73	5.53
	3	.200	5.006	1.000	-15.43	15.83
	5	-18.900 <sup>*</sup>	5.006	.007	-34.53	-3.27
	6	-6.000	5.006	.930	-21.63	9.63
	7	-4.000	5.006	.993	-19.63	11.63
	8	-2.500	5.006	1.000	-18.13	13.13
	5	1	18.100 <sup>*</sup>	5.006	.012	2.47
2		8.800	5.006	.650	-6.83	24.43
3		19.100 <sup>*</sup>	5.006	.007	3.47	34.73
4		18.900 <sup>*</sup>	5.006	.007	3.27	34.53
6		12.900	5.006	.182	-2.73	28.53
7		14.900	5.006	.073	-.73	30.53
8		16.400 <sup>*</sup>	5.006	.033	.77	32.03
6		1	5.200	5.006	.967	-10.43
	2	-4.100	5.006	.991	-19.73	11.53

Comparación múltiple

Variable dependiente:

sobrevida

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
		3	6.200	5.006	.917	-9.43	21.83
		4	6.000	5.006	.930	-9.63	21.63
		5	-12.900	5.006	.182	-28.53	2.73
		7	2.000	5.006	1.000	-13.63	17.63
		8	3.500	5.006	.997	-12.13	19.13
7	1		3.200	5.006	.998	-12.43	18.83
		2	-6.100	5.006	.924	-21.73	9.53
		3	4.200	5.006	.990	-11.43	19.83
		4	4.000	5.006	.993	-11.63	19.63
		5	-14.900	5.006	.073	-30.53	.73
		6	-2.000	5.006	1.000	-17.63	13.63
		8	1.500	5.006	1.000	-14.13	17.13
8	1		1.700	5.006	1.000	-13.93	17.33
		2	-7.600	5.006	.795	-23.23	8.03
		3	2.700	5.006	.999	-12.93	18.33
		4	2.500	5.006	1.000	-13.13	18.13

Comparación múltiple

Variable dependiente:

sobrevida

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
	grupo	grupo					
		5	-16.400 <sup>*</sup>	5.006	.033	-32.03	-.77
		6	-3.500	5.006	.997	-19.13	12.13
		7	-1.500	5.006	1.000	-17.13	14.13

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Sobrevida

	grupo	N	Subconjunto para $\alpha = 0.05$	
			1	2
Tukey HSD <sup>a</sup>	3	10	26.30	
	4	10	26.50	
	1	10	27.30	
	8	10	29.00	
	7	10	30.50	30.50
	6	10	32.50	32.50
	2	10	36.60	36.60
	5	10		45.40

Comparación múltiple

Variable dependiente:

sobrevida

	(I)	(J)	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% Intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
	Sig.		.452	.073			
Tukey B <sup>a</sup>	3	10	26.30				
	4	10	26.50				
	1	10	27.30				
	8	10	29.00				
	7	10	30.50				
	6	10	32.50	32.50			
	2	10	36.60	36.60			
	5	10		45.40			

## Análisis estadístico en función de la sobrevida con la prueba log-Rank

Resumen de procesamiento

grupo	Total N	N de eventos	Censurado	
			N	Porcentaje
1	10	10	0	.0%
2	10	10	0	.0%
3	10	10	0	.0%
4	10	10	0	.0%
5	10	3	7	70.0%
6	10	10	0	.0%
7	10	9	1	10.0%
8	10	10	0	.0%
Total	80	72	8	10.0%

Tabla de sobrevida

Grupo	Tiempo	Estado	Proporción acumulativa de sobrevida al tiempo		Numero de eventos acumulados	Número de casos restantes	
			Estimado	Error estándar			
1	1	18.000	1.00	.900	.095	1	9
	2	20.000	1.00	.800	.126	2	8
	3	22.000	1.00	.700	.145	3	7
	4	23.000	1.00	.600	.155	4	6
	5	25.000	1.00	.500	.158	5	5
	6	27.000	1.00	.400	.155	6	4
	7	29.000	1.00	.300	.158	7	3
	8	29.000	1.00	.200	.126	8	2
	9	38.000	1.00	.100	.095	9	1
	10	42.000	1.00	.000	.000	10	0
2	1	28.000	1.00	.900	.095	1	9
	2	30.000	1.00	.800	.126	2	8
	3	31.000	1.00	.700	.145	3	7
	4	33.000	1.00	.600	.155	4	6
	5	36.000	1.00	.500	.158	5	5
	6	37.000	1.00	.400	.155	6	4
	7	39.000	1.00	.300	.145	7	3

Tabla de sobrevida

Grupo	Tiempo	Estado	Proporción acumulativa de sobrevida al tiempo		Numero de eventos acumulados	Número de casos restantes	
			Estimado	Error estándar			
8	41.000	1.00	.200	.126	8	2	
9	43.000	1.00	.100	.095	9	1	
10	48.000	1.00	.000	.000	10	0	
3	1	20.000	1.00	.900	.095	1	9
	2	22.000	1.00	.800	.126	2	8
	3	24.000	1.00	.	.	3	7
	4	24.000	1.00	.600	.155	4	6
	5	26.000	1.00	.500	.158	5	5
	6	27.000	1.00	.400	.155	6	4
	7	28.000	1.00	.	.	7	3
	8	28.000	1.00	.	.	8	2
	9	28.000	1.00	.100	.095	9	1
	10	36.000	1.00	.000	.000	10	0
4	1	20.000	1.00	.900	.095	1	9
	2	21.000	1.00	.	.	2	8
	3	21.000	1.00	.700	.145	3	7
	4	23.000	1.00	.	.	4	6

Tabla de sobrevida

Grupo	Tiempo	Estado	Proporción acumulativa de sobrevida al tiempo		Numero de eventos acumulados	Número de casos restantes	
			Estimado	Error estándar			
5	23.000	1.00	.	.	5	5	
6	23.000	1.00	.400	.155	6	4	
7	24.000	1.00	.300	.145	7	3	
8	28.000	1.00	.200	.126	8	2	
9	36.000	1.00	.100	.095	9	1	
10	46.000	1.00	.000	.000	10	0	
5	1	4.000	1.00	.900	.095	1	9
	2	5.000	1.00	.800	.126	2	8
	3	25.000	1.00	.700	.145	3	7
	4	60.000	.00	.	.	3	6
	5	60.000	.00	.	.	3	5
	6	60.000	.00	.	.	3	4
	7	60.000	.00	.	.	3	3
	8	60.000	.00	.	.	3	2
	9	60.000	.00	.	.	3	1
	10	60.000	.00	.	.	3	0
6	1	23.000	1.00	.900	.095	1	9



Tabla de sobrevida

Grupo	Tiempo	Estado	Proporción acumulativa de sobrevida al tiempo		Numero de eventos acumulados	Número de casos restantes
			Estimado	Error estándar		
2	25.000	1.00	.800	.126	2	8
3	27.000	1.00	.700	.145	3	7
4	29.000	1.00	.600	.155	4	6
5	31.000	1.00	.	.	5	5
6	31.000	1.00	.400	.155	6	4
7	34.000	1.00	.	.	7	3
8	34.000	1.00	.200	.126	8	2
9	38.000	1.00	.100	.095	9	1
10	53.000	1.00	.000	.000	10	0
7	1	23.000	1.00	.	1	9
	2	23.000	1.00	.	2	8
	3	23.000	1.00	.700	3	7
	4	25.000	1.00	.600	4	6
	5	26.000	1.00	.500	5	5
	6	27.000	1.00	.400	6	4
	7	28.000	1.00	.300	7	3
	8	35.000	1.00	.	8	2

Tabla de sobrevida

Grupo	Tiempo	Estado	Proporción acumulativa de sobrevida al tiempo		Numero de eventos acumulados	Número de casos restantes	
			Estimado	Error estándar			
9	35.000	1.00	.100	.095	9	1	
10	60.000	.00	.	.	9	0	
8	1	23.000	1.00	.900	.095	1	9
	2	24.000	1.00	.	.	2	8
	3	24.000	1.00	.700	.145	3	7
	4	25.000	1.00	.	.	4	6
	5	25.000	1.00	.500	.158	5	5
	6	30.000	1.00	.400	.155	6	4
	7	31.000	1.00	.300	.145	7	3
	8	32.000	1.00	.200	.126	8	2
	9	38.000	1.00	.	.	9	1
	10	38.000	1.00	.000	.000	10	0

Medias y medianas para el tiempo de sobrevivida

grupo	Media <sup>a</sup>				Mediana			
	Estimado	Error estándar	95% Intervalo de confianza		Estimado	Error estándar	95% Intervalo de confianza	
			Límite inferior	Límite superior			Límite inferior	Límite superior
1	27.300	2.422	22.552	32.048	25.000	3.162	18.802	31.198
2	36.600	1.996	32.689	40.511	36.000	3.162	29.802	42.198
3	26.300	1.383	23.590	29.010	26.000	2.372	21.351	30.649
4	26.500	2.621	21.362	31.638	23.000	1.033	20.976	25.024
5	45.400	7.249	31.193	59.607	.	.	.	.
6	32.500	2.684	27.239	37.761	31.000	1.549	27.964	34.036
7	30.500	3.389	23.858	37.142	26.000	1.581	22.901	29.099
8	29.000	1.807	25.458	32.542	25.000	3.162	18.802	31.198
Total	31.763	1.369	29.080	34.445	28.000	.993	26.055	29.945

a. La estimación está limitada al mayor tiempo de sobrevivida si es censurado.

# Bibliografía

- 1.- Brown T, Srikanthan S. Building commercial success into R & D. Scrip Magazine 1998; 70: 43-5.
2. World Health Organization (WHO). Chronic Diseases. Ginebra: World Health Organization (WHO); 2010. Disponible en: [http://www.who.int/topics/chronic\\_diseases/en](http://www.who.int/topics/chronic_diseases/en).
- 3.- Portal de la Organización Mundial de la Salud, <http://www.who.int>.
- 4.- INEGI, Mortalidad. Principales causas de mortalidad por residencia habitual, grupos de edad y sexo del fallecido, 2011.
5. García Ribas I. La investigación clínica en oncología desde la industria farmacéutica: el papel de los Especialistas médicos en el descubrimiento y desarrollo de nuevos medicamentos, departamento médico de Lilly. Unidad de oncología, rev oncol 2004; 6(9):547-51.
6. Portal del Instituto Nacional de Cáncer, <http://www.cancer.gov>.
- 7.- Lodish, H. Berk, A. Zipursky, S. L. Matsudaira, P. Baltimore, D. Darnell, J. E. Molecular Cell Biology, 5th ed. Editorial médica panamericana, EUA, 2005.
- 8.- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. Br J Cancer. 1972;26:239-57.
- 9.- World cancer report 2008, World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2008.
- 10.- World Health Organization, The Global Burden Of Disease, 2004.
- 11.- Globocan 2008, World Health Organization, <http://globocan.iarc.fr>.
- 12.- Portal de la Sociedad Americana de Cáncer, <http://www.cancer.org>.
- 13.- Casarett and Doull's. Toxicology The Basic Science of Poisons. Ed. Mc Graw-Hill. 2008. pp. 333-334.
- 14.- Yamagiwa K, Ichikawa K. Experimental Study of the Pathogenesis of Carcinoma. J Cancer Res 3:1-29,1918, <http://caonline.amcancersoc.org/cgi/content/abstract/27/3/174>.

- 15.- Pitot, H.C., Goldsworthy, T., Moran, S. The natural history of carcinogenesis: Implications of experimental carcinogenesis in the genesis of human cancer. *Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry*; Volume 17, Issue 2 , Pages 133-146. Published Online: 19 Feb 2004.
- 16.- Troll W, Wiesner R. The role of oxygen radicals as a possible mechanism of tumor promotion. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1985;25:509-28.
- 17.- Fidler, I. J., and Hart. I. R. Biologic diversity in metastatic neoplasm origins and implications. *Science (Washington DC)*. 217: 998-1001, 1982.
- 18.- Schirmacher, V. Experimental approaches, theoretical concepts, and impacts for treatment strategies. *Adv. Cancer Res.*, 43: 1-32, 1985.
- 19.- Liotta, L. A., Rao, C. N., and Barsky, S. H. Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.*, 49: 363, 1983.
- 20.- Folkman, J., and Klagsbrun, M. Angiogenic factors. *Science (Washington DC)*, 235: 442-447, 1987.
- 21.- Folkman, J. Watson, K. Ingber, D., and Hanahan, D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature (Lond.)*, 339: 58-61. 1981.
- 22.- López-Otín, C., Matrisian, L.M. Emerging roles of proteases in tumour suppression. *Nat Rev Cancer* 2007 Oct; 7(10): 800-8.
- 23.- Cano, A., Pérez-Moreno, M.A., Rodrigo, I., Locascio, A., Blanco, M.J., del Barrio, M.G., Portillo, F., Nieto, M.A. «The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression». *Nature Cell Biology* 2000; 2: 76-83.
- 24.- Yang, J., Mani, S.A., Donaher, J.L., Ramaswamy, S., Itzykson, R.A., Come, C., Savagner, P., Gitelman, I., Richardson, A., Weinberg, R.A. «Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis». *Cell* 2004; 117: 927-939.
- 25.- Perl, A.K., Wilgenbus, P., Dahl, U., Semb, H., Christofori, G. «A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma». *Nature* 1998; 392: 190-193.
- 26.- Thiery, J.P. «Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression». *Nature Reviews Cancer* 2002; 2: 442-454.

- 27.- Norton, L., Massagué, J. Is cancer a disease of self-seeding? Nature Medicine 2006; 12: 875-878.
- 28.- Minn, A.J., Gupta, G.P., Padua, D., Bos, P., Nguyen, D.X., Nuyten, D., Kreike, B., Zhang, Y., Wang, Y., Ishwaran, H., et al. «Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread». Proceedings of the National Academy of Sciences USA 2007; 104: 6740-6745.
- 29.- The national cancer institute, cancer bulletine, July 29, 2011 <http://www.cancer.gov>.
- 30.- Moscow JA, Cowan KH. Biology of cancer. In: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Medicine. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier;2007:chap 187.
- 31.- Thun MJ. Epidemiology of cancer. In: Goldman L, Ausiello D, eds. Cecil Medicine. 23rd ed. Philadelphia, Pa: Saunders Elsevier;2007:chap 185.
- 32.- American Joint Committee on Cancer. AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer, 2002.
- 33.- Granados G.M, Beltrán O.A., Soto S.B, León T.A, Cirugía oncológica: evolución histórica y estado actual, Historia y filosofía de la medicina, Gaceta Médica de México. 2011;147:551-60.
- 34.- American Cancer Society principios de la radioterapia [www.cancer.org/principios-de-la-radioterapia-pdf](http://www.cancer.org/principios-de-la-radioterapia-pdf).
- 35.- Urdiales G.C, Cordero G.I, Gómez F.N, Barreales L.R, Martínez A.R, La Radioterapia Paso A Paso Desde Cerca, Radioterapia, Tecnología Radiológica N°. 58- 2005.
- 36.- Devita, V. T. Chu, e. A history of cancer chemotherapy, Yale cancer center, Yale university school of medicine, new haven Connecticut cancer res 2008; 68: (21). November R 1, 2008.
- 37.- Plan de cuidados estandarizado, Paciente con tratamiento de quimioterapia, Hospital Universitario Ramón y Cajal, PCE/QUI/002, 2005.
- 38.- Principios de la quimioterapia: análisis exhaustivo de las técnicas y su papel en el tratamiento del cáncer, American Cancer Society, 2010, <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/002996-pdf.pdf>.
- 39.- Fundación ECO, Comité Científico, QUIMIOTERAPIA, <http://www.fundacioneco.es/images/stories/ECO/AsistenciaAIPaciente/InformacionTumores/6.Quimioterapia.pdf>.

- 40.- Dossier de enfermedad: Cáncer, Lilly, [www.lilly.es](http://www.lilly.es).
- 41.- Shear MJ, Hartwell JL, Peters VB, et al. Some aspects of a joint institutional research program on chemotherapy of cancer: current laboratory and clinical experiments with bacterial polysaccharide and with synthetic organic compounds. In: Moulton FR, editor. Approaches to tumor chemotherapy. Washington (DC): American Association for the Advancement of Science; 1947. p. 236–84.
- 42.- Goldin A, Schepartz SA, Venditti JM, DeVita VT. Historical development and current strategy of the National Cancer Institute Drug Development Program. In: Busch H, DeVita VT, editors. Methods in cancer research, V16(A). New York: Academic Press; 1979. p. 165–245.
- 43.- Zubrod CG, Schepartz S, Leiter J, Endicott JM, Carrese LM, Baker CG. The chemotherapy program of the National Cancer Institute: History, analysis, and plans. Cancer Chemother. Rep 1966;50:349–540.
- 44.- Marshall EKJR. Historical perspectives in chemotherapy. In: Golding A, Hawking IF, editors. Advances in chemotherapy, vol. 1. New York: Academic Press; 1964. p. 1–8.
- 45.- Krumbhaar EB, Krumbhaar HD. The blood and bone marrow in yellow gas (mustard gas) poisoning. Changes produced in bone marrow in fatal cases. J Med Res 1919; 40:497–508.
- 46.- Gilman A. Symposium on advances in pharmacology resulting from war research: therapeutic applications of chemical warfare agents. Fed Proc 1946;5:285–292.
- 47.- Goodman LS, Wintrobe MM, Dameshek W, Goodman MJ, Gilman A, McLennan MT. Nitrogen mustard therapy: use of methyl-bis (h-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (h-chloroethyl)amine hydrochloride for Hodgkin's disease, lymphosarcoma, leukemia, and certain allied and miscellaneous disorders. JAMA 1946;132:126–32.
- 48.- Gilman A, Philips FS. The biological actions and therapeutic applications of the h-chloroethylamines and sulfides. Science 1946;103:409–15.
- 49.- Farber S. Some observations on the effect of folic acid antagonists on acute leukemia and other forms of incurable cancer. Blood 1949;4:160–7.

- 50.- Farber S, Diamond LK, Mercer RD, et al. Temporary remissions in acute leukemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *N Engl J Med* 1948;238:787–93.
- 51.- Pinkel D. Actinomycin D in childhood cancer; a preliminary report. *Pediatrics* 1959;23:342–7.
- 52.- Hitchings GH, Elion GB. The chemistry and biochemistry of purine analogs. *Ann NY Acad Sci* 1954;60:195–9.
- 53.- Elion GB, Singer S, Hitchings GH. Antagonists of nucleic acid derivatives. VIII. Synergism in combinations of biochemically related antimetabolites. *J Biol Chem*,1954;208:477–88.
- 54.- Heidelberger C, Chaudhuri NK, Danenberg P, et al. Fluorinated pyrimidines. A new class of tumor inhibitory compounds. *Nature* 1957;179:663–6.
- 55.- Farber S, Schwachman H, Toch R, Downing V, Kennedy BH, Hyde J. The effect of ACTH in acute leukemia in childhood. In: Mote JR, editor. *Proceedings of the First Clinical ACTH Conference*. New York: McGraw-Hill-Blakiston; 1950. p. 328–30.
- 56.- Brested JH. *The Edwin Smith surgical papyrus*. Translated for The New York Historical Society. Chicago (IL): University of Chicago Press; 1930.
- 57.- Papac RJ. Origins of cancer therapy. *Yale J Biol Med* 2001;74:391–8.
- 58.- DeVita VT. The evolution of therapeutic research in cancer. *N Engl J Med* 1978;298:907–10.
- 59.- Osler W. *The principles and practice of medicine*. New York: D. Appleton and Company; 1893. p. 708.
- 60.- Johnson TS, Armstrong JG, Gorman M, Burnett JP, Jr. The vinca alkaloids: a new class of oncolytic agents. *Cancer Res* 1963;23:1390–427.
- 61.- Brunner KW, Young CS. A methyl hydrazine derivative in Hodgkin's disease and other malignant lymphomas. *Ann Int Med* 1967;66:144.
- 62.- Yankee RA, DeVita VT, Perry S. The cell cycle of leukemia L1210 cells in vivo. *Cancer Res* 1967;27:2381–5.
- 63.- DeVita VT, Moxley JH, Brace K, Frei E III. Intensive combination chemotherapy and X-irradiation in the treatment of Hodgkin's disease. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1965;6:15.



- 64.- Greenspan EM, Fieber M, Lesnick G, Edelman S. Response of advanced breast cancer to the combination of the anti-metabolite methotrexate and the alkylating agent thiotepa. *J Mt Sinai Hosp* 1963;30:246–67.
- 65.- Canellos GP, DeVita VT, Gold GL, Chabner BA, Schein PS, Young RC. Cyclical combination chemotherapy in the treatment of advanced breast carcinoma. *Proc Am Assoc Cancer Res* 1974;15:148.
- 66.- Einhorn LH, Donohue J. Cis-diamminedichloroplatinum, vinblastine, and bleomycin combination chemotherapy in disseminated testicular cancer. *Ann Int Med* 1977;87:293–8.
- 67.- Einhorn LH. Testicular cancer as a model for a curable neoplasm: The Richard and Linda Rosenthal Foundation award lecture. *Cancer Res* 1981;41:3275–80.
- 68.- Fischinger P, DeVita VT. Perceptions and opportunities in oncogene research. *Cancer Res* 1984;44:4693–6.
- 69.- DeVita VT. The governance of science at the National Cancer Institute: a perspective of misperceptions. *Cancer Res* 1983;43:3969–73.
- 70.- DeVita VT. The governance of science at the National Cancer Institute: management of resources in an era of scarcity. *Cancer Research* 1983;43:6106–8.
- 71.- DeVita VT. On special initiatives, critics and the National Cancer Program. *Cancer Treat Rep* 1984;68:1–4.
- 72.- Druker BJ, Tamura S, Buchdunger E, et al. Effects of a selective inhibitor of the Abl tyrosine kinase on the growth of Bcr-Abl positive cells. *Nat Med* 1996;2:561–6.
- 73.- Manning G, Whyte DB, Martinez R, et al. The protein kinase complement of the human genome. *Science* 2002; 298:1912–34.
- 74.- Rodilla C. F. Mecanismos de acción antitumoral, Boletín Oncológico, Hospital General "Obispo Polanco" de Teruel. Actualizado 07/08/2011.
- 75.- Desarrollo de nuevos fármacos anticancerígenos a base de cobre(II) Casiopeínas Lena Ruiz Azuara Facultad de Química Universidad Nacional Autónoma de México Red Iberoamericana CYTED Montevideo, 29 de julio 2009.

- 76.- Tovar A., C., Langrave C., García-Carrancá A., Gracia I y Ruíz Azuara L. Estudio electroforetico del mecanismo de interación de la familia de las casiopeinas I, II, y III con ADN. Memorias, 1ra Jotnada de trabajo en Casiopeinas, México, D.F. 130-133. 1994.
- 77.- Gracia, M. I. Ruiz, A. L. Altamirano, L. M. Breña, V. M. Carvajal, A. K. Fuentes, N. I. Mejía, V. C. Moreno, E. R. Rodríguez, E. S. Sumano, L. H. Trejo, S. C. DESARROLLO DE NUEVOS MEDICAMENTOS ANTINEOPLASICAS: CASIOPEÍNAS Investigación Nacional para el Desarrollo de Fármacos Oncológicos, Departamento de Química Inorgánica y Nuclear, Facultad de Química, UNAM, México, 2007.
- 78.- Manual del Centro para la Evaluacion e Investigacion de Farmacos (CDER) FDA 1998).
- 79.- Bayona, A. Fajardo, N. Development of new drugs: opportunities and benefits for Peru, Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica. V. 29, N. 4, Peru, 2012.
- 80.- García A. Aguirre J. Roitter C. Milone C. López A. C. Curso libre de farmacología aplicada legislacion y regulacion de medicamentos, Centro de Farmacoepidemiología y Uso racional de medicamentos, escuela de salud pública, facultad de ciencias médicas, Universidad Nacional de Cordoba, <http://www.cfe-fcm.unc.edu.ar>.
- 81.- Villegas T. K González M. P. Estudios Preclínicos de nuevos fármacos, inFÁRMAte, 3:16, 2007.
- 82.- Magos, G. G. Jiménez, M. Las fases en el desarrollo de nuevos medicamentos, Rev Fac Med, Vol. 52, No. 6, 260 – 264, Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM. 2009.
- 83.- Moreno R. J. Estudio de la condición genética y fisiológica de la cepa C57Bl/6 // BIOU producida en el bioterio de la universidad de los andes tesis para obtener el título de licenciada en biología Universidad de los andes, Venezuela, julio, 2008.
- 84.- California Biomedical Research Association, Why Are Animals Necessary in Biomedical Research? CBRA Fact Sheet, <http://ca-biomed.org/csbr/pdf/fs-whynecessary.pdf>.
- 85.- Patrick Bateson, P. Biggs, P.Cuthbert, A.Cuthill, I.Festing, M. The use of non-human animals in research: a guide for scientists, The royal society, uk, February 2004.
- 86.- Benavides, F. Guenet, J. Modelos Murinos De Enfermedades Humanas, Manual de Genética de Roedores de Laboratorio: Principios Básicos y Aplicaciones, Buenos Aires, 2000; 61: 215-231.

- 87.- Federal agency roles in cancer drug development from preclinical research to new drug approval: the national cancer institute and the Food and Drug Administration  
<http://www.nap.edu/catalog/11257.html>.
- 88.- Kallman Robert. F. Rodent tumor models in experimental cancer therapy. Pergamon Press, 1987.
- 89.- 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 Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana, 1991.
- 90.- Mendelsohn J. Principios de las neoplasias. En: Harrison, Isselbacher, Wilson, Brawnwald, Fauci and Kasper. Principios de Medicina Interna. Interamericana. Mc, Graw-Hill. Madrid, 1996.
- 91.- 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.
- 92.- Thompson, J. M. and Gorman, N. T. Hypertemia and radiation in the Management of Canine Tumors. J. Small Anim. Pract., 28: 457 – 477, 1987.
- 93.- Estapé Rodríguez, J. Diagnóstico de extensión y estrategia terapéutica. Revista Oncológica Medica. 20. 1141 – 1144. 2008.
- 94.- Melanoma. Cancer Society of New Zealand. Department of Dermatology, Waikato Hospital. Hamilton New Zealand. 1997.
- 95.- Foster, H. Small, H. The mouse in biomedical research. Academic Press, 1981.
- 96.- Foster M. and Thompson L. Histocompatibility relations of mouse melanoma B16 – Genetics 64 – 221, 1970.
- 97.- Sober Arthur J. and Koh Haward K. Melanoma y otras lesiones cutaneas pigmentadas. En: Harrison, Isselbacher, Wilson, Brawnwald, Fauci and Kasper. Principios de Medicina Interna. Interamericana. Mc, Graw-Hill. Madrid, 1996.

- 98.- Compuestos De Coordinacion Antitumorales, Departamento de Química Inorgánica, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba, disponible en <http://www.fq.uh.cu/dpto/qi/images/stories/pog/pag/maestria/bioinor/conferencias/cap%203%20antitumorales.pdf>.
- 99.- Salzer, A. Nomenclature Of Organometallic Compounds Of The Transition Elements, (IUPAC Recommendations 1999), Commission On Nomenclature Of Inorganic Chemistry, Inorganic Chemistry Division, International Union Of Pure And Applied Chemistry, Pure Appl. Chem., Vol. 71, No. 8, 1557, Germany , 1999.
- 100.- Sánchez, G. O. Lopez, S. H. Sánchez, B. F. Gracia, M. I. Hopfl, H. Barba, B. N. 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 Inorganic Biochemistry, 103, pp. 1204–1213, México, 2009.
- 101.- Kobakhidze, N. Farfan, N. Romero, M. Mendez, S. J. Ballinas, L. M. Garcia, O. H. Dominguez, O. Santillan, R. Sánchez, B. F. Gracia, M. I. New pentacoordinated Schiff-base diorganotin(IV) complexes derived from nonpolar side chain  $\alpha$ -amino acids, Journal of Organometallic Chemistry, 695, pp. 1189–1199, México, 2010.
- 102.- Portal De American Type Culture Collection, ATCC, B16-F10 ATCC® CRL-6475™, <http://www.atcc.org>.
- 103.- Geran, Greenberg, Macdonald, Abbot, protocols for in vivo Screening Systems, National Cancer Institute, 1987.
- 104.- Vicente, A.E. Evaluación de la actividad antineoplásica de dos nuevos compuestos de coordinación en un modelo murino de isotrasplatación (melanoma B16), Tesis que para obtener el título de químico farmacéutico biólogo, Facultad de Química, UNAM, México, D.F. 2012.
- 105.- Aguayo C. M. Lora M. E. Cómo hacer “paso a paso” un Análisis de Supervivencia con SPSS para Windows, Fundación Andaluza Beturia para la investigación en salud, fabis.org, Dot. Núm 0702006, Sevilla, 2007.
- 106.- Altman DG. Practical statistics for medical research, London: Champan & Hall, 1991.

107.- Armitage P. Berry G. in: statistical methods in medical practice, Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1994, p.477-481..

108.- C. Kaplan D. A. Meier survival Analysis, Epi Info 2000, USA, 2000.

109.- Harlan Laboratories Inc, USA Barrier 202A, Indianapolis, 2006.

110.- Kruczynski, A. Hill, B. Classic In Vivo Cancer Models: Three Examples of Mouse Models Used in experimental therapeutics, Centre de Recherche Pierre Fabre, France, 2002.