

Trabajo Original

Toxicología Experimental

Pruebas de efectividad *in vivo* de la formulación Cytoreg® contra el melanoma *B16F1* en ratones hembras *C57BL/6//BIO*

**Rosa De Jesús¹, Nelson Vicuña-Fernández², Andrés Osorio³, Marie Cuervo⁴ David
Martucci⁵, Lewis Pozo⁵, William Jiménez⁵.**

¹Profesora Titular. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Directora del Bioterio de la Universidad de Los Andes.

²Profesor Titular. Departamento de Farmacología y Toxicología. Facultad de Medicina. Universidad de Los Andes.-

³Asistente de Investigación. Bioterio Universidad de Los Andes.

⁴Profesora Instructora. Bioterio. Universidad de Los Andes.

⁵Químico e Investigadores Empresa Cytorex de Venezuela filial de Cytorex Internacional INC.

Correspondencia: Dra. Rosa De Jesús. Bioterio Universidad de Los Andes. Vía Principal de Santa Rosa. La Hechicera. Mérida. Venezuela. Apartado 5101. email: rosadej@ula.ve, telefax. (0274)2403128.

Resumen

Con la finalidad de ampliar los estudios preclínicos de la formulación Cytoreg® (Laboratorio Cytorex Internacional Inc., Maracaibo, estado Zulia, Venezuela) como terapia antineoplásica alternativa, en el presente trabajo se evaluó la efectividad de esta formulación sobre el melanoma provocado por células de la línea *B16F1* cultivadas *in vivo* en ratones hembras *C57BL/6//BIO*. En la experiencia se usaron 30 ratones hembras, distribuidos de la siguiente manera: grupo control enfermo (10 ratones), grupo enfermo con tratamiento de prueba Cytoreg® (10 ratones), grupo enfermo con el tratamiento convencional interferón α -2b (5 ratones) y grupo control sano (5 ratones); todos los ratones fueron inoculados con las células de melanoma *B16F1*, excepto el grupo control sano. Se evaluó el consumo de agua y de alimento diario, el peso corporal y el desarrollo del tumor. Se determinaron los parámetros hematológicos: leucocitos, hematocrito y cuenta diferencial. Se observó que la formulación Cytoreg® estimuló el aumento de la concentración de leucocitos, no alteró los porcentajes del hematocrito e incrementó el porcentaje de neutrófilos, monocitos, basófilos y eosinófilos. El tamaño alcanzado por el tumor en los ratones tratados con la formulación Cytoreg® fue similar al de los ratones tratados con el tratamiento convencional.

Palabras clave: cáncer, Cytoreg®, ratón *C57BL/6//BIOU*, melanoma.

Summary

Test of effectiveness in vivo of the formulation Cytoreg® against melanoma

***B16F1* in female mice C57BL/6//BIOU.**

With the purpose of extending the pre - clinics studies of the Cytoreg® formulation (Cytorex Internacional Laboratory Inc., Maracaibo, stated Zulia, Venezuelan) as antineoplásic therapy alternative. In the present assay was evaluated the efficiency of this formulation on the melanoma provoked by cells of the B16F1 line, maintained in mice females C57BL/6//BIOU. In the experience were used 30 mice females, distributed of the following way: sick control (10 mice), group sick with treatment of Cytoreg® (10 mice), sick group with the conventional treatment with interferon α -2b (5 mice) and group healthy control (5 mice); all the experimental mice were inoculated with of melanoma cells B16F1, except the group healthy control. There was evaluated the consumption of water and of food daily, the weight body and the development of the tumor. The hematologic parameters evaluated were white leukocytes, hematocrit and differential account. The results demonstrate that the formulation Cytoreg® stimulated the increase of the concentration of leukocytes, did not alter the percentages of the hematocrit, and increased of the neutrophils and eosinophils percentages. The size tumor's in the mice treated with Cytoreg® formulations was similar to that of the conventional treatment mice.

Key words: Cancer, Cytoreg®, mouse *C57BL/6//BIOU*, melanoma.

Introducción

Cytoreg® es una formulación química desarrollada por el laboratorio Cytorex International Inc. del estado Zulia, Venezuela, con la finalidad de ser usada como una quimioterapia alternativa contra células cancerígenas. La incorporación en el mercado de un nuevo medicamento contempla varias etapas, una de ellas es el estudio preclínico con la finalidad de evaluar la actividad biológica, la toxicidad, el efecto en la reproducción, en la progenie y las propiedades farmacocinéticas, entre otros. Estos estudios se realizan en animales, tomando en cuenta los resultados de un análisis previo de las propiedades físico-químicas y del comportamiento del compuesto de forma *in vitro* (1).

En estudios *in vitro* previos, el Cytoreg® presentó un efecto dosis - crecimiento dependiente del tiempo, además de un efecto inhibitorio en todas las células por la inducción de apoptosis vía CPP32, independiente de la sensibilidad hormonal de las células. Los datos presentaron que no sólo podría la vía CPP32 ser un objetivo potencial para la regulación de la apoptosis inducida por el Cytoreg®, sino que también podría jugar un papel significativo en el régimen quimioterapéutico en muchos tumores humano malignos (2). Dentro de los estudios realizados con la formulación se encuentran la aplicación sobre lesiones en la piel ocasionadas por hongos (3), además de los estudios preclínicos se han realizado: la determinación de la Dosis Letal 50 (DL50), evaluación de la toxicidad aguda y crónica, los cuales se realizaron en hembras de la especie rata, de la línea no consanguínea *BIO:Wistar* y, la toxicidad crónica en conejas (4), además de la farmacocinética.

Con el fin de ampliar los estudios preclínicos con el Cytoreg®, el objetivo en este trabajo fue evaluar la efectividad de la formulación sobre el melanoma provocado por células de la línea *B16F1* (5), cultivadas *in vivo* en ratones hembras *C57BL/6//BIO* (6), producidas en el bioterio de la universidad de Los Andes, Mérida-Venezuela.

Materiales y Métodos

Material biológico. Se utilizaron 30 ratones hembras de la línea *C57BL/6//BIOU*, entre 8 y 10 semanas de edad, producidas y mantenidas en el Bioterio de la Universidad de Los Andes (BIOULA), alimentados con ratarina comercial (Protinal), tratada con temperatura de 120 °C por 1 minuto y suministrada a voluntad, al igual que el agua (esterilizada a 120 °C por 20 minutos). Los grupos de ratones fueron alojados en cajas T2 (26 x 21 x 24) cm, mantenidos a una temperatura de 21 ± 4 °C, y 12 horas luz: 12 horas oscuridad. Los ratones fueron distribuidos como se muestra en la Tabla 1.

Se usaron 10 ratones para probar la efectividad de la formulación, grupo identificado como D1C, este número se seleccionó debido a la necesidad de contar con un número significativo estadísticamente para garantizar que los efectos que se observarán, pudiesen ser atribuidos a la administración de la formulación, ya que la formulación en prueba es un producto de primera generación, que se encuentra en evaluación con la intención de ser llevado al consumo humano. Se usaron 10 ratones con el tumor, grupo identificado como Control Enfermo, con la finalidad de contar con un número similar al grupo D1C. Los grupos de ratones usados para la administración de la terapia convencional: Interferon α -2b (INT A), y el grupo control sano, fue de 5 ratones cada uno, no se usó la misma cantidad de ratones que los otros grupos involucrados en la experiencia debido a que una terapia convencional que ya es aplicada en el tratamiento del melanoma a los humanos, debe haber sido lo suficientemente validada; con respecto a los ratones sanos, por su propia condición de salud, no se consideró el uso de un número grande de ratones, ya que estos serían centinelas del ambiente para comprobar la no existencia de factores ajenos a la experiencia.

Obtención de las células de melanoma *B16F1*. Las células de melanoma murino *B16F1* fueron donadas por el Dr. Juan Luis Concepción, del Laboratorio de Enzimología de Parásitos de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Los Andes - Mérida. Éstas se extrajeron de un tumor proveniente de un ratón *C57BL/6* macho. Luego de retirar la cápsula del tumor, se succionaron las células mediante una jeringa, y se colocaron en

PBS glucosilado al 0,9 % (pH 7,4). Posteriormente se llevó a cabo una disociación mecánica de las células extraídas en una cápsula de *petri* para eliminar cualquier resto de tejido, usando jeringas de calibre decreciente, de forma continua. Se procedió posteriormente a realizar el conteo de las células a inocular, en un volumen de 1 a 1 en PBS glucosilado al 0,9 % (pH 7,4). El conteo de células se realizó en la cámara de Neubauer.

Inoculación de las células cancerígenas. La inoculación de las células se realizó vía intramuscular en el muslo posterior izquierdo, en un volumen menor a 0,1 mL contenido de 5×10^5 células del melanoma murino, en 25 ratones hembras seleccionadas aleatoriamente de las 30 previstas a ser usadas en el estudio, esta vía facilitó la replicación eficaz, fácil seguimiento y medición del crecimiento del tumor, el cual fue evaluado durante 10 días post-inoculación para posteriormente iniciar los tratamientos.

Pruebas de efectividad del Cytoreg®. A los 10 días post-inoculación de las células de melanoma, se procedió a la administración de los tratamientos: por vía oral (intragástrica involuntaria) en una dosis diaria de 0,49 mL/Kg de peso (7) de la formulación Cytoreg®, a un grupo de 10 ratones; a la vez, se comenzó a administrar el tratamiento convencional, INT A, éste se administró mediante inyección vía intraperitoneal, tres veces a la semana en una dosis de 66 UI/Kg disuelto en PBS pH 7,4 (8), a un grupo de 5 ratones. A 10 de los ratones restantes inoculados, no se les aplicó ninguno de los tratamientos, este último fue el grupo control enfermo (CE). Para estudiar la efectividad de la formulación se siguió el crecimiento del melanoma, para lo que se midió el diámetro del tumor utilizando un vernier cuyas medidas fueron registradas en centímetros, esta medida se realizó dos veces por semana, durante 2 semanas. Los tratamientos fueron administrados durante 15 días.

Monitoreo del estado fisiológico del animal. Se evaluó el consumo de agua y de alimento diariamente, a todos los animales del estudio, durante el periodo de tratamiento. Se pesaron los animales, usando una balanza SF-400 (capacity 5000gx1g/200oz X 0,102), al inicio, durante y al finalizar el tratamiento, y se efectuaron

pruebas hematológicas, para lo que se tomaron muestras de sangre de la vena de la cola (9), al inicio del tratamiento y al finalizar el tratamiento. Las pruebas hematológicas realizadas fueron: hematocrito, leucocitos y cuenta diferencial (neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, monocitos y basófilos). En la valoración del hematocrito, la sangre se centrifugó en un micro-hematocrito Modelo *CriptSpin*. Para realizar el conteo de glóbulos blancos, se usó la cámara de Neubauer, diluyendo la muestra en solución de Turk y para el conteo diferencial se realizó un frotis que se coloreó con Giemsa 10% (10). El total de sangre usada para las pruebas fue de 3 gotas, aproximadamente 0,3 mL, se realizaron también toma de muestras a los ratones sanos, en el mismo período de tiempo.

Pruebas estadísticas.

Como lo que se pretendía determinar era si la formulación en prueba afectaba el crecimiento del tumor, el diseño experimental se realizó proponiendo 3 grupos experimentales que permitieron comparar el desarrollo del tumor: bajo la influencia de un tratamiento convencional (INT A), uno sin tratamiento (CE) y el otro con el tratamiento en prueba. Los datos se procesaron usando la prueba de Kolmogorov-Smirnov como prueba de ajuste para revisar la distribución de los datos, se realizó el análisis estadístico ANOVA, considerándose estadísticamente significativo para un $p < 0.05$, y posteriormente se utilizó la prueba de T para dos muestras independientes (*Two Sample T test*), para realizar la comparación de los datos entre tratamientos.

Para el análisis estadístico se compararon los resultados del crecimiento del tumor entre los ratones a los cuales se les dio tratamiento (D1C e INT A) y el control enfermo (CE).

A pesar de que el objetivo del trabajo fue el de evaluar la efectividad de la formulación Cytoreg® y con el análisis estadístico anterior se podía cumplir el objetivo, se evaluaron además algunos parámetros fisiológicos, tales como: consumo de agua, consumo de alimento, peso corporal y parámetros hematológicos. Las pruebas para el análisis estadístico de estos resultados fueron las mismas que las usadas en el análisis anterior: Kolmogorov-Smirnov como prueba de ajuste para revisar la distribución de los datos, ANOVA (one way AOV) y la prueba de T para dos muestras independientes (*Two Sample*

T test); a excepción del análisis del peso corporal, en todos los demás se consideraron los resultados de los cuatro grupos del estudio: CE (control enfermo), D1C (tratados con la formulación de prueba), CS (control sano) e INT A (con tratamiento convencional), se consideraron valores estadísticamente significativos para un $p < 0,05$. Todas las pruebas estadísticas se realizaron usando el software estadístico *Statistix7.0* (11); este trabajo fue aprobado por el Comité de Ética del Bioterio de la Universidad de Los Andes

Resultados

El consumo de agua y de alimento, de los animales que recibieron los tratamientos y los controles fue fluctuante durante los 15 días de registro. Con respecto al consumo de agua, los ratones del grupo D1C, consumieron un promedio de 2,4 mL/diarios/ratón, los ratones de los grupos CE e INT A, de 2,9 mL/diarios/ratón, en contraste con el grupo CS que tuvo un promedio de 3,8 mL/diarios/ratón. En relación al consumo del alimento, el consumo medio diario por ratón durante los 15 días fue de 3,1 g para el D1C y de 3,3 g para los ratones sometidos al tratamiento con INT A. Se observó que los ratones enfermos sin ningún tratamiento (CE) tuvieron el menor consumo medio de alimento, el cual fue de 2,0 g /diario, y el consumo medio del grupo sano control fue de 2,7 g.

Los resultados obtenidos en la prueba estadística Kolmogorov-Smirnov conllevó a rechazar la Hipótesis nula, H_0 : la muestra no presenta una distribución normal, para ambos parámetros fisiológicos; al realizar la prueba ANOVA, se obtuvieron diferencias estadísticas significativas para el consumo de agua y de para el consumo de alimento, con un $p < 0,05$ respectivamente, conllevando a aceptar la H_0 : el consumo de agua no es igual entre los grupos involucrados en el estudio, y, H_0 : el consumo de alimento no es igual entre los grupos involucrados en el estudio. Los resultados de p de las prueba T de comparación de dos muestras son presentados en la Tabla 2.

Comportamiento del peso corporal. Antes de inocular las células del melanoma a los grupos en prueba, el peso de los animales se encontró entre 17,9 y 23,9 g. Al final de la experiencia el peso de los ratones enfermos, sin tratamiento (CE) y los tratados (D1C e

INT A), se encontraron entre 27 g y 29 g respectivamente, para algunos de estos ratones por principios éticos en el uso de los animales de laboratorio del Bioterio, se le aplicó el "punto final", la eutanasia se aplicó, a tres ratones del grupo enfermo control y 2 ratones del grupo tratados con INT A, para estos últimos, el exceso de peso fue de 7 g, correspondiendo probablemente, al peso del tumor. Ninguno de los ratones de estos dos grupos, presentaron una conducta normal dentro de la caja. El peso medio del grupo de ratones control sano fue de 23 g, y al igual que los ratones tratados con la formulación en prueba, ambos presentaron una conducta normal dentro de la caja. Los resultados de la evaluación de la prueba estadística Kolmogorov-Smirnov, de los datos obtenidos de peso versus tiempo, de los grupos D1C, INT A y CE conllevó a rechazar la Hipótesis nula, H_0 : la muestra no presentan una distribución normal ($p > 0,05$); al realizar la prueba ANOVA, peso versus tratamiento, se obtuvieron diferencias estadísticas significativas, en el análisis de la comparación de los grupos mediante la prueba T se obtuvo, entre CE vs. D1C y CE vs. INT A, un $p < 0,05$ y para D1C vs INT A se encontró que no existen diferencias estadísticamente significativas. Los resultados conllevan a aprobar la hipótesis nula, H_0 : el peso corporal del grupo D1C no es diferente al presentado por el grupo INT A.

Comportamiento del tamaño del tumor del melanoma. Se pudo observar con respecto al crecimiento del tumor, en todos los ratones inoculados con las células del melanoma, que éste tuvo un crecimiento continuo en todos los grupos. Al analizar los datos (tamaño vs tiempo) mediante la prueba Kolmogorov - Smirnov se encontró que no existían diferencias estadísticamente significativas, por lo que se rechaza la hipótesis nula, H_0 : la muestra no presentan una distribución normal, indicando la existencia de una distribución normal de los datos, por lo que estos se analizaron mediante un Análisis de Varianza de una sola vía (*one way AOV*). Para los resultados encontrados en la comparación de los grupos mediante la prueba T, se encontró para CE vs D1C y CE vs INT A, diferencias estadísticas significativas y para INT A vs D1C, no significativas, $p > 0,05$.

Parámetros hematológicos. En la Tabla 3, se pueden observar los promedios de los valores hallados para los parámetros hematológicos: leucocitos y hematocrito evaluados, antes de la administración de los tratamientos y a los 15 días post tratamiento. En el análisis estadístico se encontraron diferencias significativas.

En la Tabla 4, se pueden observar los promedios de los valores hallados para la cuenta diferencial de las células: neutrófilos, linfocitos, eosinófilos, basófilos y monocitos, antes de la administración de los tratamientos y a los 15 días post tratamiento.

El análisis estadístico mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov, presentó para todos los parámetros evaluados valores de $p > 0,05$, indicando una distribución normal en relación al tiempo: inicial (t_0) y final ($t_{15 \text{ días}}$). En el ANOVA realizado, datos versus tratamiento, no se encontraron diferencias significativas a excepción de los grupos D1C y CE para los parámetros basófilos y monocitos, y el grupo CE para el porcentaje de neutrófilos, para un $p > 0,05$, y al comparar los grupos de tratamientos mediante la prueba T al tiempo final, se encontraron diferencias estadísticas entre los grupos: D1C vs EC para los parámetros glóbulos blancos ($p=0,0127^*$) y neutrófilos ($p=0,0026^*$); D1C vs CS para el parámetro eosinófilos ($p=0,0135^*$); D1C vs INT A para los parámetros neutrófilos ($p=0,0108^*$), linfocitos ($p=0,0009^*$) y eosinófilos ($p=0,0040^*$); CS vs EC para neutrófilos ($p=0,0162^*$); INT A vs CS para neutrófilos ($p=0,0321^*$); linfocitos ($p=0,0009^*$) y eosinófilos ($p=0,0040^*$); INT A vs EC para glóbulos blancos ($p=0,0007^*$).

Discusión

En este trabajo, se evaluó el crecimiento del tumor melanoma junto con algunos parámetros fisiológicos, con la finalidad de evaluar la efectividad de la formulación Cytoreg®, los resultados obtenidos permitieron determinar la eficiencia de ésta con respecto al retardo del crecimiento del tumor y a la respuesta fisiológica de los ratones tratados durante 15 días.

La evaluación de los parámetros fisiológicos en general, permite valorar el estado de salud de los animales que son sometidos a distintas pruebas en los laboratorios, la desviación de los valores normales de tales parámetros conducen a sospechar algún efecto adverso de las pruebas. Según Arencibia y col. (12), el consumo normal de agua de los animales es del 10 % del peso vivo. El consumo de agua por parte de los ratones del grupo control sano, fue de 3,8 mL, siendo mayor que lo propuesto por los autores antes mencionados, ya que el peso corporal promedio observado fue de 23 g, en base a este valor, no se observó que no se obtuvieron diferencias estadísticas significativas, entre los ratones del grupo control sano (CS) y los grupos tratados, y se observó diferencias estadísticamente significativas entre estos y el grupo enfermo control, considerando que la patología sin tratamiento afecta el consumo de agua, Según Hernández (13), el consumo de alimento de los ratones es de 1,3 a 1,5 g por cada 10 g de peso corporal por día. Para los ratones del grupo control sano, el promedio de peso fue de 23 g, y el del consumo de alimento fue de 3,2 g/10 g de peso, observándose relación con lo propuesto por el autor. Este comportamiento no fue el observado por los ratones del resto de los grupos (D1C, CE, INT A), durante los 15 días del tratamiento, los cuales presentaron diferencias significativas ($p < 0.05$). El consumo de alimento de los ratones con la patología (CE, INT A y D1C), no presentó relación entre el aumento del peso y el consumo del alimento; de acuerdo a lo propuesto por el autor, estos consumieron menor cantidad de alimento, el promedio del peso de los ratones con la patología fue de 26 g y el consumo de alimento promedio fue de 1,2 g de alimento, considerándose por tanto, que la presencia del tumor afectó el consumo de alimento. En cuanto al peso corporal, se observó diferencias significativas entre los grupos D1C, CE INT A ($p = 0,0000$), lo que pudo estar relacionado con el tamaño del tumor, ya que al comparar este parámetro entre estos grupos. Sin embargo, no se observó diferencias estadísticamente significativas entre el peso alcanzado por los ratones del grupo INT A y D1C, pero si entre estos dos y el grupo control enfermo. Las medidas del tumor durante los 15 días de tratamiento, en los ratones de los tres grupos en prueba mediante el análisis estadístico ANOVA, no presentaron diferencias significativas entre los grupos de

ratones tratados: INT A y D1C, con un $p=0,3095$, sin embargo, se observó diferencias significativas entre los grupos tratados y el control enfermo. El tratamiento convencional INT A, es una terapia basada en una citocina que se utiliza a menudo contra el melanoma metastásico en humanos (14), su efecto conjuntamente con otros medicamentos antineoplásicos como la diosmina (15), en el melanoma metastásico pulmonar (16, 17); en este estudio el tamaño medio del tumor en los animales tratados con INT A, tuvo el mismo crecimiento que el de los animales tratados con la formulación Cytoreg®, mecanismos tales como: la inducción de la apoptosis de las células cancerígenas (18), o la interferencia de las vías de señalización del tumor causantes de las metástasis del pulmón del melanoma *B16F1* (19), pudiesen estar involucrados en el efecto del Cytoreg®, sobre el desarrollo de tumor melanoma, sin embargo, deben realizarse estudios especializados o más profundos comprobar los mecanismos por los cuales se retrasa el crecimiento del tumor con respecto a los Controles Enfermos, cuando los animales son tratados con la formulación.

En el análisis de los parámetros hematológicos, se debe tener en cuenta que los leucocitos, en patologías como el cáncer o en el uso de ciertos medicamentos, el número relativo y absoluto de los diferentes tipos a menudo reflejan el tipo, la duración y la gravedad de la enfermedad. Una variedad de factores, incluyendo infecciones bacterianas, cáncer, estrés y quimioterapia, provocan el aumento o la disminución del número de neutrófilos, un tipo de leucocitos.

En la experiencia se encontró que en el análisis estadístico (prueba T), para los valores de los parámetros hematológicos, antes de iniciar el tratamiento y después de 15 días de tratamiento, solamente los valores del porcentaje de basófilos y monocitos para los ratones de los grupos CE y D1C, presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p<0.05$), indicando que existen diferencias entre los valores antes y después del tratamiento; igual comportamiento se observó para el porcentaje de neutrófilos pero en el grupo D1C; el resto de los parámetros evaluados no presentaron diferencias estadísticas cuando se evaluaron los valores iniciales con respecto a los valores finales.

En la bibliografía se reporta como normal que el porcentaje de linfocitos sea mayor que el de neutrófilos en los ratones (20), este comportamiento pudo observarse para los grupos involucrados en el estudio, a excepción del grupo D1C; a pesar de que la concentración de leucocitos, se encontró dentro del rango considerado normal para los ratones.

La neutropenia (disminución de los neutrófilos) es el efecto adverso hematológico más frecuente en pacientes con cáncer; la formulación Cytoreg®, desvía la relación linfocitos:neutrófilos considerada normal para ratones a neutrófilos:linfocitos. De acuerdo a la bibliografía, la formulación actuaría como un inmunomodulador influenciando en la diferenciación de las células hematopoyéticas (21, 22).

De forma general, la monocitopenia es una condición que afecta a los individuos cuando son sometidos a la quimioterapia (23), los resultados obtenidos indican que los ratones que se sometieron al consumo de la formulación en prueba, presentaron una condición de monocitosis en lugar de una monocitopenia, lo que indica una recuperación de una neutropenia, característica de las patologías oncológicas. Igualmente se pudo observar, un aumento de los basófilos (basofilia), en los ratones que recibieron la formulación, ninguna de estas dos condiciones fueron observadas en los ratones sometidos al tratamiento convencional INT A, quienes presentaron una condición de monocitopenia y de basofilia, ambas características de la patología sufrida (24), la cual estuvo presente en los ratones del grupo control enfermo. Los ratones CE y los tratados con Cytoreg, presentaron eosinofilia, este hallazgo caracteriza a las patologías inflamatorias (25, 26).

En los ratones del grupo control sano, los valores hematológicos permanecieron sin diferencias significativas a lo largo de la experiencia, este resultado se corroboró al no observarse diferencias significativas para un $p = 0,0918$.

Conclusiones

Se concluyó que el Cytoreg ®, ejerce un efecto positivo en el aumento de la concentración de glóbulos blancos y del porcentaje de neutrófilos, eosinófilos, de monocitos y de basófilos y en la no alteración del hematocrito, condición ésta que deben presentar los ratones cuando existe salud en los mismos, logrando superar ciertas patologías. La formulación Cytoreg® presentó lo que se pudiese considerar una efectividad similar, en cuanto al desarrollo del tumor, a la presentada por la terapia convencional INT A, la cual a pesar de que no detuvo el crecimiento del tumor en un 100%, este fue menor que el presentado por los ratones a los que no se les administró tratamiento.

Tabla 1. Distribución del número de animales de cada uno de los grupos experimentales.

Grupo	Grupos experimentales	Nº de animales	Nº de animales por cajas T2
1	Control Enfermo (CE)	10	5
2	Ratones tratados con la formulación Cytoreg® (D1C)	10	
3	Ratones tratados con terapia convencional Interferon α - 2b (INT A)	5	
4	Control Sano (CS)	5	

Tabla 2. Valor de *p* para la relación del consumo de agua y de alimento comparando tratamientos, mediante la prueba T de comparación de dos muestras.

	D1C vs CE	D1C vs CS	D1C vs INT A	INT A vs CE	INT A vs CS	CE vs CS
Consumo de agua	0,1064	0,0000 *	0,0063	0,6346	0,0003*	0,0001*
Consumo de alimento	0,0198*	0,3713	0,0596	0,0458*	0,0758	0,0401*

* Estadísticamente Significativo

Tabla 3. Promedio de los valores de leucocitos y hematocrito obtenidos en los diferentes grupos de tratamientos y los controles antes y a los 15 días de tratamiento.

Grupo de tratamiento	leucocitos (cel/mm ³) t ₀	leucocitos (cel/mm ³) t ₁₅	Hematocrito (%) t ₀	Hematocrito (%) t ₁₅
CE	7,515±1166,3	6,2107±1166,3	45,4±3,4	30,1±3,0
D1C	11,825±2715,2	14,145±2715,2	50,1±2,8	39,8±4,6
INT A	12,670±12730	10,550±5770,2	47,5±4,8	35,6±2,2
CS	13,500±13480	13,400±3955,0	56,0±3,7	55,3±2,0

CE: control enfermo. D1C: ratones tratados con la formulación Cytoreg®. INT A: ratones con tratamiento convencional. CS: control sano. (\pm SD).

Tabla 4. Promedio de los valores de la cuenta diferencial obtenidos en los diferentes grupos de tratamiento y los controles antes (t₀) y a los 15 (t₁₅) días de tratamiento.

grupos	CE	D1C	INT A	CS
Neu (t ₀)	36,8±0,2	30,0±2,1	29,4±0,8	21,1±0,3
Neu (t ₁₅)	61,1±1,1	35,6±0,8	62,2±0,7	16,7±1,2
Lin (t ₀)	63,5±1,2	79,6±0,8	68,2±1,5	78,6±2,2
Lin (t ₁₅)	58,3±1,1	58,3±1,7	54,4±2,1	74,6±1,6
Mon (t ₀)	0,7±1,1	1,6±0,9	0,4±1,4	0,4±1,3
Mon (t ₁₅)	2,3±1,1	0,5±0,6	0,6±0,8	0,4±0,9
Eos (t ₀)	2,2±0,4	4,4±1,2	1,4±1,2	0,0±0,5
Eos (t ₁₅)	4,3±0,3	5,0±2,1	2,6±1,1	0,4±0,2
Bas (t ₀)	1,1±0,9	0,5±0,9	0,0±0,6	0,0±0,5
Bas (t ₁₅)	1,4±0,6	0,2±0,4	0,0±0,5	0,0±0,2

Neu: Neutrófilos, Lin: Linfocitos, Mon: Monocitos, Eos: Eosinófilos, Bas: Basófilos.

Referencias Bibliográficas

1. Marovac J. Investigación y desarrollo de nuevos medicamentos: de la molécula al fármaco. Rev. méd. Chile [serial online] 2001 Ene [citado 2013 Jun 08]; 129(1): 99-106. Disponible en: URL: <http://www.scielo.cl/scielo>.
2. Kumi-Diaka J, Hassanhi M, Brown J, Merchant K, García C, Jiménez W. Cytoreg® inhibits growth and proliferation of human adenocarcinoma cells via induction of apoptosis. J Carcinog. 2006; 5:1.
3. Loaiza N, Hassanhi M, Morales E. Actividad biológica de extractos de dos cepas de la cianobacteria nostoc. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas. 2014; 1:46.
4. De Jesús R, Vicuña-Fernández N, Molina R, Martucci D, Pozo L, Jiménez W. Estudio de la toxicidad crónica en conejos administrando la formulación Cytoreg®. Revista de Toxicología en Línea. 2014; 45:52-68.
5. Quiñones B, Urbina E, Pérez M. Acción del piroxicam en ratones hembras cepa C57B/L6 con melanoma B16F1. MedULA. 1994; 3 (3-4):47-52.
6. Moreno Y. Estudio de la condición genética y fisiológica de la cepa C57BL/6 //BIOU producida en el bioterio de la universidad de los Andes. [Tesis de Licenciatura], Mérida. Universidad de los Andes. 2008.
7. Cuervo Marie. Pruebas de efectividad de la formulación Cytoreg, contra el melanoma B16F1 inoculado en ratones hembra C57BL/6//BIO. [Tesis de Licenciatura], Mérida. Universidad de los Andes. 2012.
8. Álvarez N, Martínez C, Ortega V. Efectos del IFN alpha y la diosmina en el melanoma metastásico pulmonar murino. RevEsp Patol. 2008;41: 123-129.
9. De Jesús R. Introducción a la ciencia de los animales de laboratorio. 1era Ed. Mérida (Venezuela): Consejos de Publicaciones Universidad de Los Andes; 1998. p 87.
10. Calcaño M. Observación y recuento de células sanguíneas. [serial online] 2010. Ene [citado 09 Enero 2012]; Disponible en: URL: http://www.ciencias.ula.ve/biologia/if_practica_2_celulas_sanguineas_b_2010.pdf.
df. metastásico pulmonar murino. RevEsp Patol. 2008;41:123-129.

- 11.**Díaz P, Fernández P. Métodos no paramétricos para la comparación de dos muestras. [serial online] 2014 Jun. [citado 17 agosto 2007]: Disponible en: [URL:http://www.fisterra.com/mbe/investig/no parametricos/no parametricos.asp](http://www.fisterra.com/mbe/investig/no_parametricos/no_parametricos.asp).
- 12.**Arencibia A, Fernández S. Consideraciones importantes acerca de la cuarentena de ratas y ratones como biomodelos experimentales en toxicología. RevVetArg. 2010; XXVII:1-20
- 13.**Hernández Y. Manejo y sujeción de roedores utilizados en el laboratorio. [Tesis para obtener el título de Médico Veterinario Zootecnista]. Universidad de Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Morelia Mich, México; 2009.p.148.
- 14.**Vey N, Viens P, Fossat C, Olive D, Sainty D, Baume D, et al. Clinical and biological effects of gamma interferon and the combination of gamma interferon and interleukin-2 after autologous bone marrow transplantation. Eur. Cytokine Netw.1997; 8: 389-94.
- 15.**Richards J, Gale D, Mehta N, Lestingi T. Combination of chemotherapy with interleukin-2 and interferon alpha for the treatment of metastatic melanoma. J ClinOncol. 1999; 17:651-7.
- 16.**Álvarez N, Martínez C, Ortega V. Efectos del IFN alpha y la diosmina en el melanoma metastásico pulmonar murino por interferon. Rev Esp. Patol. 2008; 41: 123-129.
- 17.**Pawlik T, Sondak V. Malignant melanoma. Current state of primary and adjuvant treatment. Crit Rev Oncol/Hematol.2003; 45:245-264.
- 18.**Raffaella R, Gioia D, De Andrea M, Capello P, Giovarellin M, Marconi O, et al. The interferon-inducible IFI 16 gene inhibits morphogenesis and proliferation of primary, but not HPV16 E6/E7-immortalized human endothelial cells. Exp Cell Res. 2004; 293: 331-345.
- 19.**Caraglia M, Marra M, Pelaia G, Maselli R, Caputi M, Marisco M, et al. Alpha-interferon and its effects on signal transduction pathways. J Cell Physiol. 2005; 202:323-35

20. Zuñiga J, Tur M, Milocco S, Piñeiro R. Ciencias y Tecnología en protección y experimentación animal. 2da Ed. Madrid (España). McGraw-Hill-Interamericana; 2012. p 82.
21. Diaz P, Ocampo A, Fernández J. Alteraciones cuantitativas y funcionales de los neutrófilos. MedOral. 2002; 7(3): 46-61.
22. Zambrano C, Vallejos C, Flores C. Factores pronósticos para desarrollar neutropenia febril en pacientes que reciben quimioterapia. Acta Cancero. 2002; 31(1): 64-69.
23. De La Fuente G. Inflamación. [serial online]. Oct [Citado 27 Oct12], 2004. Disponible en: URL: <http://www2.udec.cl/~gdelafue/web/Inflama.pdf>
24. García de Lorenzo A, López J, Sánchez M. Respuesta inflamatoria sistémica: fisiopatología y mediadores. MedInten. 2000; 24: 353-360.
25. Kouris A, González F. Eosinófilos: su rol en la patología dermatológica. Der Ven. 2005; 43: 8-16.
26. Yakushijin K, Murayama T, Mizuno I, Sada A, Koizumi T, Imoto S. Chroniceosinophilic leukemia with unique chromosomal abnormality, t (5;12)(q33;q22). Am J Hematol. 2001; 68:301-2.

Recibido: 01/10/14

Aceptado: 10/11/14