

Departamento de Ciencias Morfológicas

Facultad de Medicina

Universidad de Granada

TESIS DOCTORAL

ESTUDIO DEL EFECTO DEL MITOXANTRONE  
EN EL DESARROLLO DEL EMBRION DE AVE

Por

BASILIO DUEÑAS RODRIGUEZ

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN

Medicina

Curso de 1991 a 1992

Folio 137

Número 274

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de D. Francisco  
Sanjurjo Rodríguez, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente  
tema, que libremente había elegido: "Estudio del efecto del butoxantone  
propranolol del metabolismo de AUC"

Terminada la lectura y contestadas la objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, este  
calificó de APTO CUM LAUDE POR UNANIMIDAD.

Granada 14 de Julio de 1992

EL PRESIDENTE,

El Secretario del Tribunal,

Fdo.:

Francisco Sanjurjo Rodríguez

EL VOCAL,

EL VOCAL,

EL VOCAL,

Fdo. José María Espín Ferrá

Fdo. F. Rodríguez Veique

Fdo. Francisco Sanjurjo Rodríguez

FIRMA DEL GRADUANDO.



UNIVERSIDAD DE GRANADA  
DEPARTAMENTO DE CIENCIAS  
MORFOLOGICAS

Tlno.: 958 - 24 35 35  
18071 - GRANADA

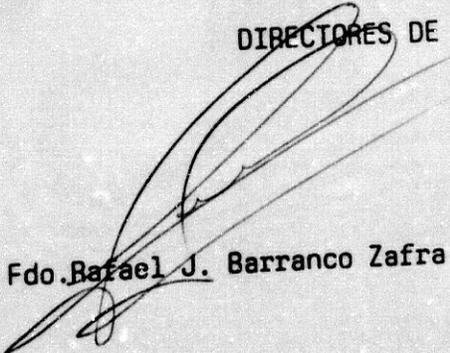
D.RAFael JESUS BARRANCO ZAFRA (A05042595043835) y D.INDALE-  
CIO SANCHEZ-MONTESINOS GARCIA (A05042414341524), ambos Profesores  
Titulares de Universidad en activo, del AREA DE CIENCIAS MORFOLO-  
GICAS (Anatomia Humana) de la Universidad de Granada:

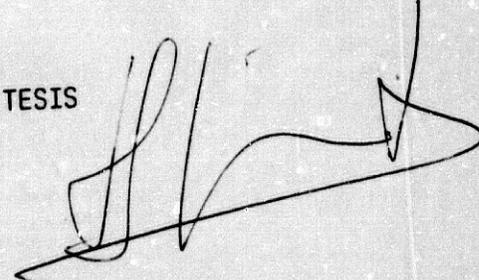
CERTIFICAN: Que todos los trabajos realizados para la e--  
jecución de la presente Tesis Doctoral por Don BASILIO DUEÑAS RO-  
DRIGUEZ, bajo el título: "ESTUDIO DEL EFECTO DEL MITOXANTHONE EN  
EL DESARROLLO DEL EMBRION DE AVE", han sido efectuados bajo nues-  
tra dirección en el Departamento de CIENCIAS MORFOLOGICAS (Anato-  
mía Humana) de la Universidad de Granada.

Con la debida antelación se ha puesto en conocimiento del -  
Ilustrísimo Señor Decano de la Facultad de Medicina, que dichos -  
trabajos se destinaban para el fin señalado.

Y para que conste, firmamos la presente certificación en --  
Granada, a veintinueve de mayo de milnovecientos noventa y dos.

DIRECTORES DE LA TESIS

  
Fdo. Rafael J. Barranco Zafra

  
Fdo. Indalecio Sanchez-Montesinos  
García.

DEDICATORIA

*A mi hija Rosa,*

AGRADECIMIENTOS

Es obligado hacer mención a las personas que han contribuido a la elaboración de este trabajo de investigación.

En primer lugar mi agradecimiento al Profesor D. Rafael Barranco Zafra, Director de mi Tesis Doctoral, sin él, mi esfuerzo hubiese sido baldío.

Expresar mi gratitud a Jesús Torío Durántez, por las horas de su tiempo libre que me ha dedicado.

Este trabajo ha necesitado también de numerosos colaboradores que me han ayudado a su elaboración, a mi hermana Pepi, Paco Espejo, Paco Rueda, José Gutierrez y Miguel Gallego, agradeciéndole su colaboración y ayuda.

Por último también deseo mostrar mi agradecimiento a mis padres, mi familia, mis amigas y amigos, que confiaron y me alentaron en los momentos difíciles para que este trabajo viese la luz.

INDICE

	<u>Pág.</u>
INTRODUCCION.....	1
Revisión histórica de los agente quimiotera picos.....	2
Farmacología del Mitoxantrone.....	24
Teratogénesis Experimental.....	39
JUSTIFICACION. ....	56
MATERIAL Y METODOS.....	61
RESULTADOS.....	74
DISCUSION.....	155
CONCLUSIONES.....	176
BIBLIOGRAFIA.....	179

**INTRODUCCION**

**REVISION HISTORICA  
DE LOS  
AGENTES QUIMIOTERAPICOS**

La capacidad de curar el cáncer con medidas locales, cirugía y radioterapia, está limitada por la presencia de metástasis viables fuera del campo de tratamiento, realidad esta que no fue bien comprendida hasta las dos últimas décadas.

Según DE VITA, 1.988, la quimioterapia del cáncer es el tratamiento de las metástasis. Siguiendo a este autor, y TANNOCK, 1.983, los tumores con capacidad de invadir el estroma circulante y atravesar las membranas basales siempre desprenden células al mismo tiempo que van creciendo. Algunas de estas células son capaces de establecer clonas metastásicas, incluso antes de que sea detectado el tumor primario.

SKIPPER, 1.964, utilizando como modelo la leucemia murina, formuló los conceptos básicos de la quimioterapia. Estos conceptos se basaban:

- 1) Razones por las que la cirugía o la irradiación curan a menudo cánceres localizados, pero no pueden curar las metástasis.

2) Relación inversa invariable entre la cantidad total de células tumorales al principio del tratamiento y la curabilidad.

3) Influencia de la fracción de crecimiento y muerte celular sobre los índices y la variación de los índices de crecimiento del tumor.

4) Los "modelos experimentales" en animales, cuando se emplean apropiadamente, son útiles para seleccionar fármacos y combinaciones de fármacos, que serán a su vez útiles, para tratar cánceres del hombre, solos o como terapia adyuvante.

5) Modalidad de tratamiento combinado (cirugía más quimioterapia e irradiación más quimioterapia).

En 1.943, LURIA y DELBRUCK, describieron un principio de genética bacteriana, que es importante para comprender la genética del

cáncer. Estos autores notaron que la *Escherichia coli* no se hacia resistente al bacteriófago porque sobreviviera a su exposición, sino porque desarrollaba colonias de bacterias que habían mutado espontáneamente hacia un tipo con resistencia intrínseca a la infección.

GOLDIE y COLDMAN, 1.979, aplicaron este principio al estudio de la aparición de células tumorales con resistencia a los quimioterápicos, y mostraron que las alteraciones citogenéticas no aleatorias que presentan muchos tumores humanos están probablemente muy relacionadas con cierta capacidad para resistir la acción de los citostáticos.

Siguiendo estos autores, también relacionaron la mutación espontánea hacia la quimioresistencia con la masa tumoral. Concluyeron que la posibilidad de encontrar una línea celular quimioresistente era ya muy elevada antes de que la población alcanzase  $10^6$  células, asumiendo una tasa de mutación del orden de  $10^{-6}$  o mayor, por lo que la exposición al citostático sería ineficaz.

MENDELSON, 1.960, describió que el efecto destructor de los agentes quimioterápicos del cáncer tiene una selectividad definida para las células cancerosas respecto a las células normales del huésped.

Aunque las células cancerosas no se dividen más deprisa que sus correspondientes de tejido normal, tienen generalmente una mayor fracción de crecimiento.

Ya entrando en las perspectivas históricas de los agentes quimioterápicos, para DE VITA, 1.988, existen dos tipos de fármacos usados para el tratamiento de cualquier enfermedad: Los que suprimen los síntomas sin eliminar la causa de la enfermedad y los que curan.

La farmacoterapia curativa empezó con el uso de los antimaláricos. El uso de la corteza de Cinchona, que contiene quinina, y de ipecacuana, que contiene emetina, para el tratamiento de la malaria, puede considerarse probablemente como el primer éxito de la quimioterapia. Estas sustancias, descubiertas de manera accidental datan del siglo XVII, y fueron usadas sin saber las causas de la enfermedad, la naturaleza de los fármacos ni su modo de acción. Sin embargo servían.

Al principio del siglo XX, Paul Ehrlich estableció el término "quimioterapia" para el uso de un fármaco de composición conocida como tratamiento de las parasitosis. Posteriormente, entre 1.903 y 1.915, identificó un determinado número de fármacos con propiedades

anticancerosas a los que con especificidad denominó quimioterápicos anticancerosos, MARSHALL, E. K., 1.964. El derivado 606 mostró ser eficaz no solo contra las infecciones por tripanosomas sino también contra la sífilis del conejo. Ehrlich denominó a este fármaco, primero sintetizado que demostró su efectividad en una enfermedad parasitaria humana, Salvarsán.

La investigación del tratamiento del cáncer tomó importancia a principio de siglo con tres líneas principales de investigación, DE VITA, 1.978, 1.979 y 1.981. La primera fue el desarrollo de la cirugía oncológica que llevó a Halstead en 1.894 a proponer la resección en bloque como parte de una operación de cáncer, concretamente la mastectomía radical. Por el mismo tiempo Röntgen descubrió los Rx, aportando un segundo método como tratamiento del cáncer localizado. El tercer avance, en una gran parte apoyado en los trabajos de Paul Ehrlich, llevó a George Clowes, de Roswell Park Memorial Institute de Búffalo, a desarrollar cepas de roedores con posibilidad de transmisión de tumores a otro de la misma especie, modelos de estudio que fueron utilizados desde entonces como campo de experimentación de potenciales agentes quimioterápicos.

Sin embargo, como indica SUGIURA, K., 1.971, a comienzo del siglo XX muy poco se conocía de la eficacia de compuestos

orgánicos; por lo que utilizaban en la quimioterapia del cáncer productos inorgánicos tales como sulfato de cobre, cloruro de calcio, peróxido de arsénico, etc.. Algunos como el sulfato de cobre poseían cierta acción inhibitoria sobre el cáncer mamario espontáneo del ratón, sin embargo, resultaba demasiado tóxico en el hombre para su utilización; ello indujo a la aparición de sales cúpricas de aminoácidos y polipéptidos KOBBER, 1.912, que administradas por vía intravenosa e intraperitoneal en animales que presentaban tumores espontáneos, demostraron ligeros efectos inhibidores.

En 1.921 se practicó un estudio in vitro de la influencia de hidrogeniones y diversas sales en concentraciones variadas sobre carcinoma de rata, con resultados no muy uniformes al no estar controladas y aun menos estandarizadas las diversas soluciones en las que se introducían los fragmentos, SUGIURA, K., 1,971.

El tratamiento quimioterápico general del cáncer humano fue casi abandonado hacia el año 1.916, quizás debido a que las dosis que se precisaban para producir un efecto inhibitor sobre las células malignas eran muy elevadas, por lo que condicionaban a la vez efectos tóxicos generales como amplias áreas de destrucción tisular en tejidos sanos, próximos o distantes a la localización primaria del tumor. Ello supuso la

existencia de un reducido número de publicaciones valorables relacionadas en cuanto al tratamiento y la respuesta que las sales orgánicas ejercían en cánceres humanos, REGNAULT, 1.916.

En 1.917 se dedicó una primordial atención a la probable relación entre presencia y crecimiento neoplásico y aporte alimenticio, al advertir la rareza de aparición de cánceres entre las personas oriundas de Africa, India, Islas de la India y Brasil, con una dieta estrictamente vegetal, con inclusión de aquellos que, desplazados de sus lugares de origen, se adaptaban a la forma europea de vida, con el subsiguiente cambio en los hábitos alimenticios, introduciendo en su dieta proteínas y carnes; se realizaron estudios con diversas dietas, y en la mayoría de las ocasiones se coincide en la positividad de alguna de éstas, ricas en iones metálicos (mercurio, cobre, plata y arsénico) que muestran poseer una cierta y específica acción selectiva sobre las células cancerígenas. Asimismo se estudian los colorantes orgánicos e inorgánicos; llegando, 28 años después de haberse descubierto el primer colorante del alquitrán, a analizar un derivado con capacidad selectiva en células en crecimiento, de elevado índice mitótico, así como en algunos gérmenes patógenos, SUGIURA, 1.971.

WASSERMAN, KEYSER y WASSERMAN, en 1.911, observan cómo inyecciones de selenio-eosina en la circulación sanguínea de roedores portadores de tumores malignos, suponían una localización específica del selenio coloidal en las masas tumorales, por lo que consideraron esta mezcla inorgánica como tratamiento eficaz para cierto número de tumores.

WEIL, en 1.916 señaló que, cuando se inyecta por vía intravenosa o subcutánea, compuestos de ciertos colorantes, en particular Rojo Congo, no se conseguía efecto terapéutico definido.

Sugiura, K., en su estudio sobre la influencia del tratamiento preliminar in vitro mediante algunos colorantes sobre el crecimiento subsiguiente de neoplasias malignas en ratas y ratones, observa que tanto el grado de destrucción del tumor así como la sensibilidad de los diferentes tumores, son muy diversos para los diferentes colorantes. Por otra parte, desde que Abel aisló el principio activo de la glándula suprarrenal, esta sustancia se utilizó ampliamente como vasoconstrictor y hemostático. Estas propiedades sugirieron, claro está, que el principio activo llamado adrenalina, podría tener efecto destructor sobre ciertos tipos de crecimiento neoplásico, dando comienzo a la investigación en el campo de la hormonoterapia

antineoplásica, SUGIURA, 1.971.

En 1.910 REICHER señaló que la inyección de adrenalina en sarcomas de ratas y sarcomas de ratón provocaban necrosis central, seguida de destrucción de estos tumores. En 1.929 SOKOLOFF, tras la inyección intratumoral de una mezcla que contenía adrenalina, azul de pirral y cloruro férrico obtenía una regresión local de tumores trasplantados en ratas y ratones. En 1.930 Coffey y Humber indicaron que la inyección de un extracto de corteza suprarrenal de oveja producía cambios en el tejido canceroso humano.

SUGIURA y BENEDICT, en 1.933 realizaron un estudio sistemático en ratones, con el fin de obtener mayor información acerca del valor terapéutico de hormonas en el cáncer, encontrando que las inyecciones subcutáneas o intraperitoneales repetidas de insulina, tiroxina, parathormona, adrenalina, telina (oveja y ternera), carecían de acción curativa, si bien retrasaba el crecimiento de los tumores trasplantados.

Pero es en los finales de los años 40, cuando se van a producir los verdaderos avances en la quimioterapia antineoplásica; para la mayoría de los investigadores es en estas fechas cuando comienza la

quimioterapia moderna.

Es a principio de esta década cuando Lewisohn y Cols. publican una serie de trabajos en los que se ocupan de los efectos de diversos extractos que contenían vitaminas y de vitaminas purificadas, sobre el crecimiento de tumores trasplantados y tumores espontáneos de ratón; entre estas sustancias se encontraban la xantopterina y el factor L. casei o ácido fólico. Con todos estos extractos y vitaminas Lewisohn y Cols hacen notar efectos claramente inhibidores sobre el crecimiento del sarcoma 180 del ratón y la regresión completa de diversos adenocarcinomas mamarios espontáneos en ratones blancos suizos.

Las publicaciones de Lewisohn y Cols llevaron a pensar a un grupo de investigadores dirigidos por el Dr. Rhoads, que si el ácido fólico, una vitamina, no tenía acción destructora sobre el tumor, tal vez esta acción la poseyera un ácido antifólico, por lo que solicita al Dr. Subba-Row del Laboratorio Lederle que le preparase una serie de antagonistas del ácido fólico; entre los preparados que investigaron se incluía la aminopterina y la ametopterina, que demuestran poseer una acción netamente inhibidora o destructora en ciertos tumores trasplantados, SUGIURA 1971.

Este interés por los antagonistas del ácido fólico aumenta al publicarse por FARBER y colaboradores, 1.948, informes de la eficacia de la aminopterina en el tratamiento de la leucemia en niños. Según BURCHENAL y Cols, 1.951, los antagonistas del ácido fólico, aminopterina y ametopterina provocaban remisión temporal de la leucemia aguda, sarcoma de células del retículo y linfosarcoma en niños. También se publica casos de curaciones completas de coriocarcinoma y corioadenoma en la mujer con antagonistas del ácido fólico, LI y Cols, 1.956.

Significó otro gran avance de los años 40 la utilización de agentes alquilantes en la terapéutica antineoplásica.

Los agentes alquilantes se comenzaron a utilizar en el programa militar secreto del gas en ambas guerras mundiales. Según DE VITA, 1.988, una explosión en el puerto de Nápoles y la exposición de unos marinos a estos agentes durante la II Guerra Mundial, llevó a la observación de que dichos agentes causaban hipoplasia medular y linfoide, y condujo al uso de estos fármacos en los linfomas, RHOADS, 1.946. Las mostazas nitrogenadas fueron probadas por vez primera en pacientes con enfermedad de Hodgkin, 1.934, en la Universidad de Yale, pero por la naturaleza secreta del programa militar del gas no se publicó el trabajo hasta 1.946, DE VITA,

1.978, 1.979 y 1.981. La constatación de revisiones en cánceres humanos que fueron tratados farmacológicamente despertó gran entusiasmo, con la consecuente experimentación acelerada pero con un posterior desencanto al observar que estos tumores volvían a crecer.

En 1.952 se introdujo la nitromina (óxido nitrogenado de  $\text{HN}_2$ ) para empleo clínico, comprobando que sus efectos secundarios en cuanto a la terapéutica eran menores que la de  $\text{NH}_2$ . Para disminuir la reactividad de los agentes alquilantes y lograr un transporte más eficaz del grupo de la mostaza activa, se probó la L-sarcolisina (mefalán, mostaza nitrogenada de fenilalanina), SUGIURA, 1.971.

Esta intensa investigación en el campo de las mostazas nitrogenadas dieron su resultado, surgiendo la ciclofosfamida (Cytosan), derivado cíclico de las mostaza nitrogenada, comprobándose que se obtenía una acción antitumoral más eficaz que la de las demás mostazas nitrogenadas, por lo que fue incorporado rápidamente a su uso clínico OETTGEN, 1.967.

Durante la década de los 50 y principios de los 60, fue comprobada experimentalmente una ingente cantidad de sustancias,

alentados en gran medida por los espectaculares resultados obtenidos con los derivados de las mostazas nitrogenadas y así fueron surgiendo progresivamente diferentes fármacos antineoplásicos.

Como recoge YUNIS, J., 1.983, en, 1.957, Heidelberger, de la Universidad de Wisconsin, demostró que el 5-fluouracilo y el ácido 5-fluorouracílico poseían intenso efecto carcinostático sobre algunos tumores trasplantados en ratas y ratones. Heidelberger observó que algunas células malignas utilizaban la base uracilo con una mayor efectividad que las de la mucosa intestinal de las ratas y diseñó una serie de análogos al uracilo con sustituciones fluoradas en posición 5. Esta sustitución, después de transformaciones intracelulares del derivado, originaban un nucleótido, el 5-fluorodesoxiuridilato (5-FDUMP), que es un poderoso inhibidor de la reacción de la timidilato-sintetasa y por ello, de la síntesis de D.N.A., mostrándose especialmente activo frente a tumores solidos.

Otro gran avance de la farmacología antineoplásica lo constituyó el desarrollo de los análogos de las purinas. Se comprobó que la purina sin sustitución no era eficaz ante un espectro de tumores, SUGIURA, 1.953, pero la aparición de la 6-mercaptopurina CLARKE, 1.953, demostró una gran actividad contra diversos tipos de tumores, especialmente como

agente antileucemiante.

Y en el campo de los esteroides, según SUGIURA, 1.971, durante las década de los 50 y 60, se ensayaron más de 200 esteroides para combatir diversos tumores. Se comprobó que la cortisona y otros varios corticoides, SUGIURA y STOCK, 1.950, tenían efecto intenso sobre el linfosarcoma y el sarcoma osteógeno. En la clínica, a principios de los 50, PEARSON y Cols. 1.950, ensayaron la cortisona y la hidrocortisona, encontrando un efecto beneficioso en la leucemia y en el cáncer mamario metastásico.

Fueron experimentadas también el grupo de las quinoleinas; SAKAI y Cols en 1,955 observaron que, de entre ellas, el 1-óxido de 4-nitroquinoleína poseía intensa acción antitumoral sobre el carcinoma de Ehrlich, tanto en las formas sólidas como en las ascíticas, pero su éxito no llegó a culminarse en la clínica, por los efectos secundarios que conllevaba.

Otro campo de investigación activa en quimioterapia del cáncer, durante esta época, lo constituye el estudio de productos de microorganismos. Los antibióticos, ya conocidos de tiempos atrás, eran

utilizados de una manera eficaz en la clínica como agentes antimicrobianos, lo que llevó a un extenso grupo de investigadores a comprobar su eficacia, como agentes antitumorales. Los primeros resultados positivos en animales de experimentación los aportaron REILLY 1.953 y SUGIURA y Cols 1.950, quienes comprobaron el efecto antitumoral de algunos antibióticos. Pero es a comienzos de los años 60 en que PINKEL, 1.959 y TAN y Cols, 1.959 publican sus experiencias con un antibiótico aislado a partir del *Streptomyces*, la Actinomicina-D, mostrando la curación del tumor de Wilms en niños y tenía un efecto beneficioso en neuroblastomas, rhabdomiosarcomas, linfosarcomas y melanomas. Al mismo tiempo se ensayaba la mitomicina-C, y con posterioridad HIBINO y Cols, 1.966, IYER, 1.964, comprueban sus efectos en la clínica observando buenos resultados en cánceres de estómago, mama y pulmón, así como en leucemias.

Las primeras antraciclinas de uso clínico fueron la Adriamicina y la Daunorrubicina, que son también antibióticos producidos por especies de *Streptomyces*, DE VITA 1.988.

La Daunorrubicina se obtuvo casi simultáneamente por investigadores italianos, que la llamaron Daunomicina, y un grupo francés que la llamo Rubidomicina; significó un complemento importante para el

tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda y útil en el tratamiento del neuroblastoma, TAN, 1.967.

La Adriamicina fue descrita por primera vez por HANDA y SATO, 1.975. Su farmacología está aún sin desarrollar, solo en los dos últimos años se han realizado trabajos con la metodología adecuada. En función de su utilidad clínica y como fármaco antitumoral, la adriamicina únicamente ha sido superada por los agentes alquilantes. Desempeña un papel importante en el tratamiento de los tumores sólidos, como los carcinomas de mama, pulmón, tiroides y ovario, así como los sarcomas de tejidos blandos, CROOKE, 1.978 y MIKKELSEN, 1.977.

Según la revisión realizada por CREASEY, 1.977 el estudio exhaustivo de los extractos de las plantas, propició, a principios de los años 60, la aparición de gran cantidad de compuestos raros y citotóxicos. Algunos de estos compuestos mostraron su capacidad para bloquear la mitosis celular. Entre ellos se encuentran derivados de la colchicina y derivados de la podofilotoxina del podofilo americano; posteriormente surgen los alcaloides de la vinca, vincristina y vimblastina, derivados del arbusto ornamental *Vinca rosae*, y las epipodofilotoxina VM-26 y VP-16, derivados de un producto de la planta mandrágora. Tanto los

derivados de la colchicina como los del podofilino no tuvieron en principio un impacto relevante en la quimioterapia clínica. No así con las drogas del grupo de la Vinca, que se mostraron muy eficaces en el tratamiento de linfomas y leucemias HODES, 1.962, y las Epipodofilotoxinas VM-26 y VP-16 muy activas en la enfermedad de Hodgkin. En un principio su mecanismo de acción no era bien conocido, como lo confirman las publicaciones de MADOC JONES, 1.968. La primera manifestación de la acción de estos fármacos es la detención de las células en la metafase de la mitosis. Sin embargo, para las células en cultivo parecen que son más sensibles los efectos tóxicos de estos compuestos durante la fase S del ciclo celular. No obstante, algunos años más tarde, esta cuestión quedó aclarada: "Los alcaloides de la Vinca, por medio de su enlace con la tubulina, inhiben el proceso de unión de los microtúbulos y provocan la disolución del huso mitótico" OWELLEN, 1.976.

Otras sustancias, comenzaron a usarse clínicamente en la terapéutica antineoplásica, como es el caso de la L-Asparaginasa, la cual, según KRAKOFF, 1.971, se caracteriza por ser uno de los logros más útiles en quimioterapia del cáncer durante la década de 1.960. Su efecto sobre tumores animales se observó mucho antes de determinar cual era el mecanismo de acción; en 1.953, KIDD comprobó que el suero del cobaya

tenía efectos antileucémicos cuando se administraba al ratón. Diez años más tarde BROOME, 1.963, demostró que el factor responsable se purificaba con la enzima L-asparaginasa.

Se comprobó que algunas células tumorales carecen de la enzima sintetasa de asparagina y, por lo tanto, dependen de la asparagina exógena para su crecimiento; no ocurre así con las células normales.

Más tarde se observó que preparaciones de la enzima altamente purificadas obtenidas de *E. Coli* y *Erwimia Carotovora* mostraban una gran actividad contra las leucemias linfoblásticas agudas infantiles y entraron a formar parte de las pautas de inducción en el tratamiento de estas enfermedad, DE VITA, V.T., 1.988.

Otras células neoplásicas han sido menos regularmente deficientes en sintetasa de asparagina, y la utilidad de la L-asparaginasa no se extendió más allá de la leucemia linfoblástica aguda.

A finales de los años 60, comenzaron a usarse dos sustancias más en la terapia antitumoral: la hidroxiurea, un compuesto estructuralmente sencillo que inhibe la reducción enzimática de los

ribonucleótidos de purina y pirimidina KRAKOFF, 1.968, y en consecuencia bloquea la síntesis de DNA; y la procarbina, que pasó a ser uno de los agentes más útiles para combatir la enfermedad de Hodkin avanzada, Brunner (cit. BELON, J., 1990).

Según SANS-SABRAFEN, 1.976, el uso de metales pesados como terapia de las neoplasias no es un hecho nuevo: "de tal suerte que Gould en 1.937, describe la anemia causada por el plomo, utilizado en aquel entonces como carcinostático, y Lissauer, 1.865, había utilizado ya el arsénico para el tratamiento de la leucemia mieloide crónica".

El conocimiento de los complejos de platino data de mediados del pasado siglo. En 1.844, PEYRONE, descubre la existencia de dos sales de cloruro de platino. En 1.893, Werner sugiere que estas dos sales son isómeros geométricos, lo que posteriormente fue confirmado en 1.962 por Basolo y Pearson; con lo que ambas sales inmortalizaron a sus descubridores al recibir el nombre de éstos, si bien actualmente la sal de Peyrone es conocida como cis-dicloraminoplatino (II) (Cisplatino) y la sal de Reiset como su isómero trans. DE VITA, 1.988.

La aplicación clínica del platino fue descubierta por

Rosemberg en 1.965 al observar que inhibía el crecimiento de un cultivo bacteriano cuando era sometido a una corriente eléctrica transmitida por electrodos de platino. Tras analizar los productos resultantes de la electrólisis del platino encontró que el responsable de este efecto era el cis-diclorodiaminoplatino o cis-platino (CDDP), hasta entonces conocido como sal de Peyrone, ROSEMBERG y Cols. 1.965 y 1.967.

Poco tiempo después, en 1.968, se ensayó su actividad en modelos experimentales de tumores en ratones, observándose que el cisplatino inhibía completamente el desarrollo del sarcoma 180. En 1.971, este compuesto fue sometido a sucesivos ensayos clínicos; el primer informe de actividad anticancerosa evidente en humanos fue presentado en 1.972 por Mill y Cols. y desde entonces se ha comprobado su alta efectividad en el tratamiento de los tumores testiculares, carcinomas ováricos y neoplasias de cabeza y cuello, DE VITA, 1.988.

Para GONZALEZ BARON, 1.989, el platino es el único metal pesado al que se le reconoce actualmente actividad antineoplásica.

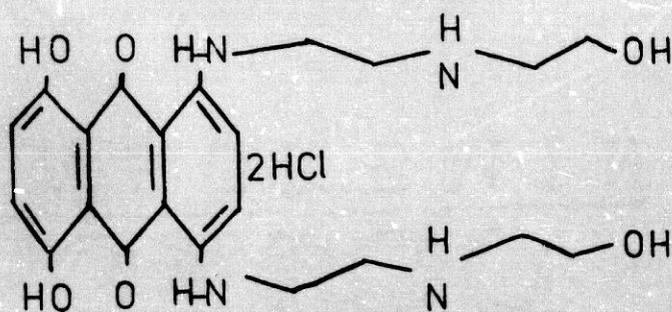
Cientos de sustancias han sido ensayadas, en las dos últimas décadas; aún concentrándonos en las más relevantes, relatar en este

capítulo su aparición cronológica, lo haría interminable, esto, unido a su reciente aparición nos obliga a detener aquí este resumen histórico de la aparición de las sustancias más trascendentes en la quimioterapia antineoplásica, para centrarnos en la que resulta ser el objeto de nuestra investigación, el Mitoxantrone, y cuya aparición en la clínica coincide con la época en que detenemos nuestra revisión histórica, finales de la década de los 70.

**FARMACOLOGIA DEL MITOXANTRONE**

El Mitoxantrone es una antracediona, derivado del dihidroxi de ametantrone, cuya aparición se centra a finales de la década de los 70, JOHNSON y Cols, 1.979, MURDOCK y Cols, 1.979.

Su fórmula desarrollada:



Las antracenodionas carecen de la posición amino azúcar, considerado el principal responsable de la cardiotoxicidad de las antraciclina. Sin embargo conservan el anillo policíclico planar y por lo tanto mantienen el potencial de intercalarse con el DNA.

Siguiendo los anteriores autores, el Mitoxantrone es el derivado de Ametantrone que tiene la mayor actividad antineoplásica cuando lo comparamos con el resto de las antracenodionas.

El Mitoxantrone muestra su actividad en numerosos

modelos preclínicos standard de tumores animales. Este screening preclínico es un requisito previo para todos los fármacos anticancerosos antes de su experimentación en el hombre.

Así DURR, F.E., y cols. 1.983, WALLACE, R.E. y cols. 1.979, FUJIMOTO, S. y OGAWA, M., 1.982, CORBETT, T.H. y cols. 1.982 y SCHABEL, F.M. y cols., 1.983, demostraron esta actividad preclínica in vivo en numerosos modelos estandarizados de tumores murinos, leucemia P388, leucemia L1.210, melanoma B16, coion 26, incrementando la duración de la supervivencia y/o aumentando el número de supervivientes a largo plazo, con una potencia mayor o igual a la de la doxorubicina y una intensificación de la actividad en las combinaciones medicamentosas.

En cuanto a su actividad in vitro, nos parece obligado referirnos al ensayo clonogénico de tumores humanos (H.T.C.A.). Este ensayo fue descrito por primera vez por Hamburger y Salmon, JONES, S.E. y cols. 1.985. Muy resumidamente implica el clonado de muestras frescas de tumor humano en un medio de agar blando. Los cultivos celulares resultantes se usan para verificar la eficacia de fármacos antineoplásicos con objeto de seleccionar los medicamentos potencialmente terapéuticos para tumores determinados. Pero este ensayo presenta algunos problemas:

1º.- La dificultad de cultivar algunas células tumorales humanas y la heterogeneidad de los tumores humanos, VON HOFF, D.D., 1.985.

2º.- La concentración "crítica" más corrientemente utilizada es la décima parte de la concentración plasmática máxima clínicamente alcanzable, LATHAN, B. y cols., 1.984, MEYSKENS, F.L. y cols., 1.984, JONES, S.E. y cols., 1.985, SALMON, S.E., 1.985. Con un fármaco como Mitoxantrone, cuya farmacocinética clínica no está todavía plenamente establecida, existe la posibilidad que la concentración elegida para el H.T.C.A. no fuese clínicamente significativa.

3º.- El punto final del H.T.C.A. no está todavía plenamente establecido, además, hasta la fecha, las correlaciones in vitro/in vivo son más significativas para pronosticar la resistencia del medicamento que su sensibilidad, MEYSKENS, F.L. y cols., 1.984, JONES, S.E. y cols., 1.985, SHOEMAKER, R.K. y cols., 1.985.

Según SALMON, S.E., 1.985, por lo menos un veinte por ciento de muestras de un tipo de tumor único, deberían demostrar sensibilidad antes de que el tumor pudiera considerarse sensible.

En base a estos criterios y tras los estudios de ALBERTS, D.S., y cols., 1.985, JONES, S.E. y cols., 1.985, SALMON, S.E., 1.985, WEISS, G. y VON HOFF, D.D., 1.985, COWAN, J.D. y cols., 1.983 y GEORGOULIAS, V. y cols., 1.983, el Mitoxantrone ha mostrado actividad en el H.T.C.A. en tumores de ovario, mama, pulmón, linfomas, sarcomas, tumores pancreáticos, melanomas, leucemias, mielomas, neuroblastomas, y tumores prostáticos, biliares, renales y testiculares. No se ha pronosticado la actividad de Mitoxantrone en el carcinoma hepatocelular.

Asimismo otras investigaciones in vitro, BHALLA, K. y cols., 1.985, GANAPATHI, R. y cols., 1.985 y TSURUO, T. y cols., 1.985, han comprobado que el Mitoxantrone muestra cierta pérdida de efectos o una resistencia cruzada total en algunas células resistentes a las antraciclínas.

GANAPATHI, R. y cols., 1.985 y TSURUO, T. y cols., 1.985, observaron que el verapamil y la trifluoroperacina son capaces de intensificar la actividad del Mitoxantrone en células P388 resistentes a la doxorubicina. Por último, aunque todavía no se han investigado las implicaciones clínicas de este hallazgo, OHNOSKI, T. y cols., 1.985, WANG, B.S. y cols., 1.984 y YANG, S. y cols., 1.985, comprobaron que la

hipertermia in vitro intensificaban los efectos citotóxicos del Mitoxantrone.

#### MECANISMO DE ACCION:

Aunque todavía sigue pendiente una ingente labor investigadora para determinar el mecanismo de la actividad antitumoral del Mitoxantrone, los datos preliminares indican numerosas posibilidades.

BOWDEN, T.S. y cols., 1.985, describen que el Mitoxantrone se fija intensamente al DNA y demuestra dos lugares de fijación, el lugar más fuerte representa la intercalación y el lugar más débil la fijación electrostática de los grupos NH y OH de la cadena lateral de Mitoxantrone a la columna vertebral fosfática de la espiral del DNA.

Otros estudios han proporcionado datos de que la intercalación del Mitoxantrone se produce entre pares de bases del DNA. Así LOWN, J.W. y cols., 1.977, comprobaron que el Mitoxantrone puede causar un desenrollado parcial del DNA superespiralizado y que produce un aumento de la viscosidad del DNA sonificado. KAPUCINSKI, J. y cols., 1.981 demuestran también el desenrollado del DNA cerrado.

En cuanto a la localización de la intercalación, LOWN, J.W. y cols., 1.984, 1.985, describen que el Mitoxantrone se fijaba intensamente al DNA cuando la hendidura principal estaba bloqueada y menos efectivamente cuando la solución recaía en la hendidura secundaria.

KAPUCINSKI, J. y cols., 1.981, al realizar pruebas de fijación electrostática, demuestran que el Mitoxantrone es capaz de ligarse a los homopolimeros sintéticos RNA y DNA de espiral simple. Con respecto a esto último, se observaron también variaciones espectrales diferentes de las que se habían observado con los productos de doble espiral.

Estas observaciones proporcionan buenas pruebas de la capacidad del Mitoxantrone para fijarse electrostáticamente a los ácidos nucleicos.

Referente a la síntesis del DNA, numerosos estudios *in vitro* LEDERLE, 1.983, JOHNSON, R.K. y cols., 1.983, NISHIO, A. y cols., 1.983, ZEECHENG, R.K. y cols., 1,983 han demostrado que el Mitoxantrone es un potente inhibidor de la síntesis del DNA. En estos estudios se ha comparado a la doxorrubicina, comprobándose que tenía un efecto inhibidor sobre el DNA mucho más potente que ésta.

KAPUCINSKI, J. y cols., 1.981 y SAFA, A.R. y TSENG, M.T., 1.984 han estudiado la acción del Mitoxantrone sobre el RNA, y comprueban que se fija directamente tanto al RNA de doble espiral como al RNA de espiral simple, concentrándose en los núcleos y fijándose al RNA citoplasmático de las células tratadas.

En cuanto a la síntesis del RNA, TRAGANOS, F. y cols., 1.980 y JOHNSON, R.K. y cols., 1.983 demuestran que a concentraciones bajas, el Mitoxantrone parece incrementar la síntesis del RNA, mientras que la inhibición completa solo se produce a concentraciones medicamentosas elevadas.

Por último SAFA A.R. y TSENG, M.T., 1.984 examinaron los efectos del Mitoxantrone sobre la síntesis proteica, en cáncer de mama humano, tanto con receptores estrogénicos positivos como negativos y observaron una inhibición de la síntesis proteica, pero sin saber como se producía esta inhibición, concluyendo "que la actividad antitumoral del Mitoxantrone es más probablemente el resultado de la inhibición de la síntesis del RNA y DNA que conduce a una inhibición general de la síntesis proteica, a una supresión del crecimiento celular y a la muerte celular".

Y refiriéndonos al momento de su acción, DREWINKO, B. y cols., 1.981, DURR, K.E. y cols., 1.983 y 1.984, MURDOCK, K.E. y cols., 1.985, TRAGANOS, F. y cols., 1.980, ZEECHENG, R.K. y cols., 1.983, creen que el Mitoxantrone es un agente inespecífico del ciclo celular, es decir, es capaz de destruir células en todas las fases del ciclo, lo mismo que en la fase estacionaria Go, siendo su cinética de destrucción celular más potente que la producida por la doxorubicina, JONHSON, R.K. y cols., 1.983.

### FARMACOCINETICA

Actualmente la farmacocinética del Mitoxantrone se está investigando activamente.

Los estudios de experimentación animal proporcionaron los primeros indicios de su eliminación cinética multifásica. GAMS, R.A., 1.983, LU, K. y cols., 1.983 y OSTROY, F. y cols., 1.980, en estudios realizados en ratas, perros y monos y utilizando el fármaco marcado con C<sup>14</sup>, mostraron que las concentraciones plasmáticas de radioactividad descendían rápidamente en las primeras dos horas, después de la administración y que a continuación los niveles descendían con mayor lentitud.

En la monografía LEDERLE, 1.983 se describe que el volumen de distribución ( $V_0$ ) aparente se situó en una media de 392, esto indica la extensa fijación tisular del fármaco.

Y siguiendo esta monografía, la vía de secreción más importante fue la biliar, siendo muy limitada la vía urinaria.

En cuanto a los estudios clínicos realizados, ALBERTS, D.S. y cols., 1.985, EHNINGER, G. y cols., 1.985 (a), HULHOVEN, R. y cols., 1.984, MALSPEIS, L. y cols. 1.983, NEIDHART, J.A. y cols., 1.983, SMYTH, J.F. y cols., 1.984, se adaptó la cinética del Mitoxantrone a un modelo tricompartmental abierto. Todos estos estudios se basaron en ensayos de cromatografía líquida de alta presión (H.P.L.C.), con diversas sensibilidades. Sus conclusiones muestran una vida media  $T_{1/2}$  alfa muy corta, indicando que Mitoxantrone se elimina rápidamente del plasma. Una vida media  $T_{1/2}$  beta también corta, habitualmente menor de una o dos horas, y un período de vida media terminal,  $T_{1/2}$  gamma, bastante largo.

El volumen de distribución  $V_d$  fue muy considerable, lo que indica la extensa fijación tisular de Mitoxantrone, existiendo un consenso general a este respecto en los autores antes citados.

Por lo que respecta a las vías de eliminación, ALBERTS, D.S. y cols., 1.983(a), GOLDSMITH, M.A. y cols., 1.981, LOO, F. y cols., 1.981, LU, K. y cols., 1.983 y SMYTH, J.F. y cols., 1.984, han descrito que la vía urinaria no es la principal vía de secreción para el Mitoxantrone. Habitualmente, durante 5 días de observación se recuperaba menos del 13% de una dosis administrada. Las vías de eliminación más importantes son la biliar CHICCARELLI, F.S. y cols., 1.984 y la fecal, ALBERTS, D.S. y cols., 1.985.

En los trabajos de ALBERTS, D.S. y cols., 1.985 y EHNINGER, G. y cols., 1.985(b), el Mitoxantrone es metabolizado en el curso de cuatro a ocho horas después de su administración, probablemente en el hígado, pero posiblemente también en otros órganos.

En base a los hallazgos de los ensayos H.P.L.C. más sensibles, se forman por lo menos tres metabolitos. Dos de estos metabolitos han sido identificados como los ácidos dicarboxílico y monocarboxílico respectivamente.

Los resultados obtenidos en los exámenes necropsicos en el hombre, ALBERTS, D.S. y cols., 1.983(b) y ROBOZ, J. y cols., 1.984

confirman los hallazgos de experimentación animal, en el sentido de que el Mitoxantrone se halla a mayor concentración en tejidos y órganos que en el suero, durante un tiempo significativo después de su administración.

Para finalizar, la administración de Mitoxantrone por vía intraperitoneal, ha sido estudiada por ALBERTS, D.S. y cols., 1.985 y LOEFFER, L. y cols., 1.986, en pacientes con tumores de ovario, existiendo aún pocos datos farmacocinéticos y pudiendo resumirse que administrado por vía intraperitoneal presenta un cociente entre el aclaramiento total y el peritoneal tan elevado, que determina la ventaja terapéutica que se puede tener por esta vía.

### EFFECTOS SECUNDARIOS Y TOXICIDAD CLINICA

El estudio S OG, 1.982, el estudio EORTC, 1.982, CROSLY, R.J., 1.983, 1.984, GRYGEL, J., 1.985 y Mc DONALD, M., 1.984, demostraron que la administración de Mitoxantrone en monoterapia a dosis de 12-14 mgr/m<sup>2</sup> cada 3 semanas a pacientes con cáncer de mama avanzado, linfoma no Hodking y cáncer primario de hígado, es bien tolerado. Los efectos agudos no hematológicos más frecuentes fueron náuseas y vómitos, mucositis y alopecia, en un grado leve o moderado, según el

sistema de graduación de la O.M.S..

ALVAREZ BERMUDEZ, C.A. y cols., 1.984, EHNINGER, C. y cols., 1.984, PERITI, P. y cols., 1.985, DE LA GARZA, J. y cols., 1.984, HOLMES, F.A. y cols., 1.984 y HOLLAND, J.F. y cols., 1.985, observaron que cuando el producto se utiliza en combinaciones con otros, la frecuencia de efectos secundarios fue superior que con la administración en monoterapia.

En los paciente leucemicos, a los efectos secundarios vistos con anterioridad, se añade la diarrea.

Refiriéndonos al poder cardiotóxico del Mitoxantrone, se conoce muy bien el potencial cardiotóxico de la doxorubicina y otras antraciclinas, destacando la preocupación por las apariciones de insuficiencia cardíaca congestiva. En la mayoría de los estudios de experimentación animal, la administración de Mitoxantrone no da lugar a las típicas alteraciones morfológicas progresivas en el tejido cardíaco asociadas a las antraciclinas.

En el medio clínico, BENJAMIN, R.S. y cols., 1.984,

1.985, CLARK, G.M. y cols., 1.985, COLEMAN, R.E. y cols., 1.984 DUKART, G. y cols., 1.984, FOSTER, B. y cols., 1.984, GAMS, R.A. y cols., 1.983 y 1.984 y UNVERFERTH, D.V. y cols., 1.983, analizaron con respecto a la cardiotoxicidad, más de 6.500 pacientes adultos y más de 300 niños tratado con Mitoxantrone. En relación con los pacientes adultos, se describieron 276 incidentes cardíacos significativos, con 118 casos de insuficiencia cardíaca congestiva, que representa una frecuencia del 1,8%. Otros 123 pacientes, 1,9%, presentaban reducciones en la fracción de eyección y 35 pacientes, 0,5%, mostraron trastornos electrocardiográficos, angina de pecho, infarto de miocardio, pericarditis, hipotensión, o alteraciones al examen biopsico del endomiocardio.

La mayoría de estos pacientes presentaban factores de riesgo preexistentes, como la administración anterior de antraciclina, radioterapia al tórax y mediastino y enfermedades cardiovasculares subyacentes.

En cuanto a los pacientes pediátricos, se comunicaron 21 episodios cardíacos significativos en más de 300 niños tratados, lo que supone una frecuencia global del 7%. Siete paciente, 2,3% desarrollaron una insuficiencia cardíaca congestiva y 14 pacientes, 4,7%, mostraron

disminución del FEVI o cualquier otro indicio de decremento de la función cardíaca. Salvo un solo paciente, el resto había recibido anteriormente antraciclinas.

TERATOGENESIS EXPERIMENTAL

De forma amplia y genérica se considera como malformación congénita "Una perturbación de los factores morfogenéticos normales", cuyas manifestaciones morfológicas se conocen desde la antigüedad; valga como ejemplo el que en ciertas pinturas egipcias de hace cinco mil años se representa el pie varo; no olvidemos que el rey Septal de la XIX dinastía, como apunta ORTS LLORCA, 1.961, padecía esta lesión; fisuras palatinas han sido observadas en momias egipcias, y casos de éstos y de amputación congénita de los brazos han sido representados en la alfarería prehistórica peruana. Evidentemente, es lógico que durante mucho tiempo sólo se consideraran como malformaciones congénitas las que son aparentes en el nacimiento, las cuales en la antigüedad, fueron objeto de mito y veneración, como cita THOMPSON, 1.930, "el hombre con su extrema proclividad para honrar lo maravilloso, lo extremo y lo prodigioso, fomentó el culto cuasirreligioso de adoración a los monstruos y la adivinación, donde las malformaciones se atribuían a hechos perinatales sujetables a los tiempos y presagios". Ejemplo de ello, como hace notar LASH, J.W., 1.964, son las tablas Caldeas cuneiformes, con grabados de hace 4.000 años, las cuales enfatizan la primitiva preocupación por el nacimiento, apariencia y significado de la nueva vida. Los recién nacidos eran cuidadosamente observados buscando malformaciones y eran catalogados por los sacerdotes Bavu como portentos de importancia local

o nacional, puesto que se creía que el recién nacido anormal era una predicción definitiva de futuros acontecimientos.

Pasaron los siglos siendo considerada la adivinación como la causa prominente de la teratogénesis, hasta que llegamos a finales del siglo XVI, en que como dice NEDDHAM, 1.959, empezó la teratogénesis a ser tratada como una desviación de la embriología normal; y prueba de ello la constituyen los escritos de Ambrosio Parée: "Muchas son sus causas; la primera de ellas es la gloria de Dios que manifiesta así su poder...; otra es que Dios castiga así la maldad del hombre. La tercera, es la abundancia de semilla o exceso de materia, o lo contrario, por lo que faltarán una o más partes o serán decrépidas o pequeñas. Monstruos pueden producirse por la pequeñez del vientre de la madre, por las posturas inadecuadas o por enfermedades hereditarias...; un jorobado produce un jorobado, un lisiado otro lisiado, un chato otro chato...; y bien puede producirse por la fuerza de hipocresía del diablo". Dejando aparte los factores religiosos o supersticiosos de este párrafo de Parée, es evidente que en él se distinguen los dos grandes grupos de causas que se han hecho clásicos en el análisis causal de las anormogénesis: las hereditarias (un jorobado produce un jorobado...) y los externos o ambientales (la pequeñez del vientre de la madre...).

Dado el carácter de nuestro trabajo de investigación, consideramos que resultaría fatuo el extendernos en la exposición y comentario de las causas genéticas o hereditarias, por lo que centraremos nuestra exposición en el grupo de agentes externos capaces de provocar alteraciones de la normogénesis.

Estamos totalmente de acuerdo con JIMENEZ COLLADO, 1.966, cuando dice "La acción de los agentes teratógenos capaces de provocar o inducir anomalías más o menos específicas es difícil de estudiar, porque solo pueden ser puestas en evidencia por la experimentación". Efectivamente, hemos de recurrir a la embriología experimental, no solamente para profundizar en el conocimiento de los agentes etiológicos, sino para una mejor comprensión de su mecanismo patogénico.

La obtención experimental de malformaciones puede realizarse, generalmente, por dos métodos:

a) El método directo; se realiza sobre todo con embriones de ave; en él, el experimentador lesiona una región determinada del embrión, por picaduras, fisuraciones, destrucción por termocauterio con agujas calientes, etc..., ORTS LLORCA, 1.941. obtuvo espinas bifidas en embriones

de pollo al extirpar uno de los bordes del canal medular; WOLF, 1.936, obtuvieron malformaciones importantes (Archiencéfalia, triocefalia y malformaciones cardíacas) realizando radiaciones selectivas. Evidentemente, en fechas más recientes, dado el aumento de las posibilidades y el perfeccionamiento de las técnicas, la realización de trabajos por este método se ha multiplicado, lo que lógicamente haría interminable su reflejo en este capítulo.

b) El método indirecto, se efectúa generalmente en mamíferos; con este método el agente teratógeno afecta a la totalidad del embrión, bien por la administración a la madre, caso de los mamíferos, o bien, en el caso de las aves, al conjunto del huevo.

Tal y como indica JIMENEZ COLLADO, 1.966, la respuesta ante un agente, tras su administración a la totalidad del embrión, se encuentra condicionada a dos factores:

a) El estadio o estado de desarrollo embrionario en el momento de añadir el agente.

b) La sensibilidad específica de cada especie a este agente.

Respecto de los agentes teratógenos, siguiendo a KONG-SUN, 1.976, podemos agruparlos en dos grupos: Los agentes físicos y los químicos.

Los agentes físicos en las aves, como es nuestro caso, pueden incidir con su más amplio espectro; no obstante podemos destacar a título de ejemplo, las experiencias realizadas con alteración de la temperatura, de entre las que destacamos los trabajos de ROMANOFF, 1.960, que obtuvieron brachimelias de forma regular.

Otro de los agentes físicos a tener en cuenta en la teratogénesis experimental es la hipoxia; autores como MARTINEZ, M., 1.957, señalaron la influencia teratógena de la falta de oxígeno durante la gestación en la especie humana y en el campo experimental; DARESTE, 1.989, y ORTS LLORCA, 1.959, obtuvieron malformaciones de embriones de pollo, tras someterlos a bajos niveles de oxígeno.

Pero sin duda, el agente físico más conocido como teratógeno, son las radiaciones (rayos X, isótopos radiactivos, radiocobalto, etc...); en este sentido podemos destacar los trabajos de experimentación de ROMANOFF, 1.960, amén de una larga lista que consideramos no

enriquecería sobremanera esta introducción, dado el carácter de nuestro trabajo.

Respecto de los agentes químicos, comprenden el grupo más amplio; ya en 1.950, ANCEL, en su tratado "La Chimiotheratogenesis chez les Vertébrés" describe 54 agentes químicos con capacidad teratógena; poco tiempo después STOLL Y MARAUD, 1.965, aumentan esta cifra a 119; y en la actualidad podemos afirmar, sin temor a la equivocación y dado el auge de colorantes, conservantes, fármacos e industria química en general, que la cifra de sustancias capaces de alterar el desarrollo, supera con creces las afirmaciones más audaces.

La experimentación con sustancias químicas ha sido, y continúa siendo, muy amplia y profusa. Las primeras experiencias en este campo se realizaron con sustancias inorgánicas; empleando ioduros y cloruro potásico, se obtuvieron malformaciones muy diversas. El Profesor ORTS LLORCA, 1.961, obtuvo espinas bífidas en embriones de pollo inyectándole sales de litio. Y así hasta un largo etc..

Ahora bien, dado el auge de la farmacoterapia a partir de los años treinta, los investigadores de este área, poco a poco fueron

polarizando sus experiencias hacia otro tipo de sustancias químicas, los agentes orgánicos.

Pero sin duda alguna estamos de acuerdo con J. LAPORTE, 1.964, cuando afirma "La importancia eventual de los factores externos, y concretamente de los compuestos utilizados como medicamentos, en la génesis de malformaciones congénitas, aún cuando perfectamente conocida desde hace años, ha pasado a primer plano de la actualidad a raíz de la epidemia de focomelia desencadenada en diversos países del occidente de Europa durante los años 1.954-61 y relacionada posteriormente con la utilización de especialidades farmacéuticas conteniendo talidomida".

Pero si bien el auge de la experimentación en este campo, acaecido en la década de los sesenta, tuvo su detonante en la sensibilización social que provocó la epidemia de focomelia, no es menos cierto que la aparición y utilización de los quimoterápicos antineoplásicos, por su mecanismo de acción, atrajo el interés de un gran número de investigadores, de los que obviamente sólo citaremos aquí aquellos trabajos que puedan destacar por su aportación al objeto de nuestro estudio.

Así en 1.960, TUCHMANN-DUPLESSIS y MERCIER-PARROT, afirman que en la especie humana se obtienen casi con seguridad malformaciones por la administración a la madre de la aminopterina, clorambucil, ciclofosfamida y busulfán.

En el campo de la teratogénesis experimental, Murphy, en el Symposium de Londres de 1.960, presentó los resultados, por él obtenidos, en relación con la teratogenicidad en la rata, de una serie de fármacos antineoplásicos; resultaba curioso que el único producto que se mostraba inactivo, la aminopterina, era precisamente el único que se sabía con certeza, de entre los estudiados por él, que en aquel entonces resultaba altamente peligroso en la mujer gestante.

Durante la década de los años sesenta, la quimioterapia experimental se extendió a una amplia gama de productos y de animales; valgan como representación del enorme número de trabajos publicados los siguientes:

MARVIN, 1.962, describió la producción de malformaciones en el pollo con la O-fenilenediamina, la trietilenmelamina, el uniracil-D, la ciclofosfamida y el sulfato de actinoboline. SALZGEBER, 1.962,

demostró que las mostazas nitrogenadas también son causantes de malformaciones en el embrión de pollo.

Para TUCHMANN-DUPLESSIS y MERCIER-PARROT, 1.966, la actinomicina-D en combinación con la radioterapia, se mostraba teratógena en ratas, produciendo, anoftalmía, microftalmía, ausencia de pedículo óptico, anencefalia, espina bífida, alteraciones cardiovasculares y esqueléticas.

Los casos de anoftalmía o de malformaciones oculares, fueron surgiendo como una de las alteraciones morfogénicas producidas por los citostáticos. En 1.964, FERM, sugirió que de la Colchicina, Vinblastina y Vincristina, la primera tiene la mayor actividad inhibidora de la mitosis sobre el ojo fetal del Hamster.

Otros trabajos más recientes intentan profundizar en los mecanismos de producción de los citostáticos de alteraciones oculares. En 1.970, CLAVERT, estudió con detalle las características de la microftalmía inducida con ciclofosfamida en el embrión del conejo y dice: "Del análisis de estos resultados podemos concluir que la cúpula óptica pasa por dos períodos de sensibilidad; uno es el período del 6º al 8º día, es decir, durante

la gastrulación y el comienzo de la neurulación; el otro se sitúa alrededor del 11° - 12° día, es decir, durante la formación y cierre de la hendidura colobómica.

En 1.975, WILSON y cols., afirman que "Junto con la Vinblastina, otros alcaloides de la Vinca activos, tales como la Vincristina y la dexacetilvinblastina, inhiben la mitosis, al destruir los microtúbulos del aparato mitótico. Esto provoca la acumulación, debido al bloqueo, de las células en estadio de metafase"; en su trabajo estudiaron el enlace de la Vinblastina a la tubulina cerebral del embrión de pollo.

SIEBER, 1.978, estudió los efectos teratógenos de 3 nuevos agentes antitumorales derivados vegetales, la Mainterina, Vp-16-213 y la Vm-26, comparándolos con los efectos de la Vincristina y la colchicina en ratones albinos, que recibieron una sola inyección intraperitoneal del fármaco en los días 6, 7 y 8 de gestación, entre sus resultados dice: "En la dosis más baja 0,2 mg/Kgr. la Vincristina indujo la microftalmía en una proporción relativamente alta de fetos por camada, cuando fue administrada en el día 6 u 8, con dosis de 0,3 mg/Kgr. en el día 6-7 al 25% de los fetos por camada poseían esta malformación. Además el 44,1% de los fetos expuestos a una dosis de 0,4 mg/Kgr. en el día 6 de gestación tenía

anoftalmía o microftalmía.

En 1.980, CHATOT y cols, cultivaron embriones de rata en suero humano enriquecido con glucosa, y afirman: "El suero de otros dos sujetos tratados con quimioterapia, permitió que los embriones sobrevivieran 48 horas, pero todos los embriones eran anormales; las anomalías entre estos embriones sobrevivientes incluyen retraso del desarrollo ocular".

Algún tiempo después, ZIRVI y cols, 1.985, estudian la toxicidad de la Doxorubicina y la AD-32 en embriones de pollo. Ambos fármacos fueron disueltos en 11-emulfor e inyectados con técnicas asépticas en el saco de aire a niveles de dosis que oscilaron entre 1 a 20 microgramos por huevo para Dx y 5 a 100 microgramos para AD-32. La incidencia global de embriones anormales fue del 96% para Dx y 38% para AD-32 en el día 1 y varió hasta 20% para Dx y 40% para AD-32 en el día 2. Las anomalías oculares oscilaron desde una microftalmía moderada a muy grave, y anoftalmía. La mayoría de los defectos del ojo eran bilaterales e igualmente graves en ambos lados.

En 1.986, NOVOTNA y JELINEK, inyectan en la cavidad amniótica ciclofosfamida a embriones de pollo en el día 3 de incubación, a

dosis que oscilaron entre los 0,3 y los 30 microgramos, encontrando malformaciones oculares a los 10 microgramos.

Más recientemente NARBAITZ y MARINO, 1.988, realizan un trabajo sobre la inducción experimental de microftalmía en el embrión de pollo con una sola dosis de cisplatino. Para ello inyectaron en la cámara de aire del huevo, a los 5 días de incubación, 75 microgramos de cisplatino, contenidos en un volumen de solución de 1 ml; esta solución contenía cisplatino, cloruro sódico y manitol en agua destilada. Los embriones fueron extraídos y sacrificados en intervalos diarios hasta seis días después de la inyección. Los resultados obtenidos fueron los siguientes: En un experimento inicial, 23 embriones de pollo inyectados con CDP fueron matados tres días después de la inyección (en el 8º día de incubación); en 17 embriones 74%, los ojos eran claramente más pequeños. En un 2º experimento, 46 embriones inyectados, fueron observados 6 días después de la inyección (en el día XIº de la incubación); de éstos, 4 estaban muertos, y 37 (88% de los supervivientes) presentaban microftalmía bilateral. No detectaron ningunas malformaciones extraoculares en los embriones inyectados con cisplatino y no se observó malformación de ningún tipo en los embriones testigos correspondientes.

En un tercer experimento, más de 30 embriones inyectados con CDP y un número similar de testigos fueron sacrificados a intervalos diarios. La observación de la estructura interna de sus ojos demostró que en todos los ojos microftámicos habían lesiones en la zona ciliar. Los procesos ciliares que eran evidentes en los testigos no fueron observados en los ojos afectados. La distribución del pigmento en esta zona era irregular. Estas alteraciones aparecían de dos a tres días después de la inyección y progresaron rápidamente a partir de entonces. La retina misma pareció quedar sin afectar durante los primeros 2 ó 3 días después de la inyección; a partir de entonces, en adelante, pudieron observar múltiples pliegues retinales, que aumentaban de tamaño y de complejidad. En los casos más graves, observaron pliegues en toda la superficie interna del ojo, de manera que no se podía distinguir entre regiones retinales y cuerpo ciliar.

Tras el estudio histológico y con microscopía electrónica, llegaron a la conclusión de que la microftalmía obtenida resultó de una reducción en el ritmo de secreción de líquidos por el epitelio ciliar y no por el escape o trasvase de humor vítreo.

Asimismo afirman: "el índice de crecimiento de la capa neural es regulado intrínsecamente y no depende del tamaño total del ojo

ni tampoco del índice de crecimiento de la capa pigmentada. Una interpretación similar probablemente explicaría el hipercrecimiento y repliegue de la capa neural observados en nuestros experimentos presentes. Los cambios retinales, por tanto serían secundarios a la microftalmía y no serían causa de este defecto".

Recientemente BERRAL DE LA ROSA, 1989, en su trabajo de tesis doctoral, realiza un estudio teratológico de toxicidad del cisplatino en ratas gestantes y dice: "Las malformaciones características (fisura palatina, exencefalia, sindactilia, miembros fusionados y anomalías esqueléticas como costillas fusionadas, escoliosis lumbar, etc.) inducidas con alta frecuencia por estos compuestos no se advirtieron en nuestro estudio para las diferentes dosis y días de administración, excepto en el caso del único feto malformado, correspondiente a la dosis de 0,5 mgr/Kgr aplicada el día 9 de gestación, con presencia de malformaciones del tipo de palada: hendido, exencefalia y microftalmía".

Para finalizar J. BELON, 1.990, tras la administración de cisplatino depositado sobre membrana corioacantoidea en embriones de ave, observa malformaciones del polo cefálico en el 97% de los casos, quedando integrados por anoftalmía bilateral (2%); anoftalmía unilateral (12%);

microftalmía bilateral (16%); microftalmía unilateral (61%); encefalosquisis (63%); alteraciones telencefálicas (67%); anomalías en la bolsa de Ratke (51%); y alteraciones notocordales (42%).

Por último no podemos cerrar este capítulo sin hacer mención, aunque somera, a los hallazgos teratógenos de los citostáticos en la especie humana. La bibliografía en este punto, si bien no es muy abundante, también presenta sus controversias. Así, GSTOTTNER y cols., 1.978, describen el caso de un niño nacido normal a cuya madre se administró quimioterapia como terapéutica a una leucemia aguda promielocítica. En 1.979, SCHAISON y cols. afirman: "En el hombre, el riesgo teratógeno de las drogas es limitado. Sólo, el Metotrexato es realmente peligroso y solamente durante el primer trimestre del embarazo".

JACOBS y cols., 1.980, publican un artículo al respecto, en el que podemos leer: "La paciente era una mujer, con un feto varón y recibió un tratamiento de cisplatino (una sola dosis de 50 mg/Kg i.v.) antes de la intervención definitiva" "Contenidos dentro de la cavidad uterina, observamos una placenta de 10 x 6 x 6 cm. con un feto varón que medía 6 cm. de longitud. Todos los órganos fetales fueron estudiados citológicamente. El testículo fetal demostró la presencia de células gigantes

posiblemente megacariocitos sin otras anormalidades. Los demás órganos fetales no tenían nada que destacar".

En 1.986, ARACENA y cols., presentan en su publicación un caso de recién nacido con múltiples malformaciones, cuya madre, en los primeros meses de gestación recibió tratamiento con 5-Fluoruracilo y ciclofosfamida; entre las malformaciones descritas leemos "a nivel de la cara destaca frontal plano, puente nasal muy bajo, cejas espesas, blefarofimosis, epicanto, opacidad corneal bilateral, paladar alto, micrognatia, orejas rotadas bien conformadas". "La ecoencefalografía confirma la impresión clínica de hidrocefalia, mostrando escasa corteza cerebral y quistes en zona posterior". "El cariograma de linfocitos periféricos con bandeado-G, resultó normal lo que descarta la posible participación de una cromosomopatía como responsable de los errores morfológicos del presente caso".

JUSTIFICACION

La realización de una Tesis Doctoral ha de poseer como premisa condicionante el estudio y análisis personal de un trabajo de investigación, con temática y planteamiento lógicamente ligado a la trayectoria y al quehacer cotidiano en el que se desarrolla una labor.

El contabilizar dieciocho años dedicado por entero al campo de la cirugía, hizo surgir en mi el anhelo de profundizar en mis conocimientos, y en base a mi experiencia como facultativo clínico, aportar, amén de satisfacer mi curiosidad innata, mi modesto y pequeño grano de arena al campo del saber médico.

Dado que mi especialidad, la cirugía, abarca un amplio sector de este saber, decidí concretar mi actuación en una parcela en la que con especial atención dedico gran parte de mi labor diaria, la sanación o en el peor de los casos la paliación de los efectos del cáncer de mama, y fundamentalmente de los compuestos que como apoyo a la cirugía utilizamos en este cometido.

Obviamente este interés se concretó en la revisión bibliográfica que se ha expuesto previamente, y llamó poderosamente mi atención el hecho de que un quimioterápico, el objeto de nuestro estudio, el

mitoxantrone que actualmente cosecha exitos casi a diario en nuestra lucha contra el cáncer, adolezca de estudios básicos que aclaren su efecto en el período embrionario, ante la posibilidad de su administración a una mujer gestante. Lógicamente nos pusimos en contacto con los laboratorios que suministran el citado compuesto, y tras confirmarnos la ausencia de estudios al respecto decidimos orientar nuestra actuación en rellenar, o al menos intentarlo, ese vacío.

Tras nuestras primeras experiencias comprendimos que nuestra aportación podría ser mucho más amplia, pues como pudimos comprobar, aún se desconocen gran parte de los efectos de este quimioterápico ¿afecta por igual a todas las líneas celulares? ¿guarda relación la dosis administrada con el efecto conseguido?, estas y otras preguntas nos hicieron en principio converger en el presente trabajo de investigación, planteándonos la realización de una investigación seria y metódica, es decir, siguiendo paulatinamente los postulados básicos de toda investigación reglada:

Primero: Señalar de antemano "el objeto" o finalidad de la investigación, es decir, un planteamiento previo del problema.

Segundo: Establecer una "hipótesis de trabajo"

Tercero: "Material". Seleccionar las muestras en las que importa mucho más la calidad que la cantidad.

Cuarto: "Método". Dependiendo siempre del material a investigar.

Quinto: Extraer una síntesis de nuestro estudio, y la discusión y aplicación de los resultados.

Estos cinco principios, que nos marcan la ruta a seguir en una temática de investigación, son los que hemos pretendido aplicar en nuestro trabajo de investigación.

Establecido el objetivo, nos allanó francamente el camino el seguir las palabras del Maestro Cajal: "Es frecuente la imposibilidad de esclarecer la estructura y función de un órgano, porque atacamos el problema por su lado más difícil, pretendiendo resolverlo en el hombre o vertebrados superiores, en los que muestra gran complejidad, y no por medio

de embriones, donde alcanza su máxima sencillez". Pero, es más, si añadimos técnicas de experimentación, Embriología Experimental, la panorámica de nuestro estudio es mucho más amplia y precisa.

No obstante y dado que la experimentación embrionaria humana, por principios, queda fuera de nuestra intención, decidimos seguir una vía que, si paralela, resulta factible de extrapolación, nos referimos a la embriología comparada. Por ello, y por el alto volumen de sujetos de experimentación, decidimos inclinarnos por el embrión de ave, que entre los vertebrados presenta una asequibilidad mayor, fiabilidad en sus resultados y una manipulación relativamente más simple.

MATERIAL Y METODOS

## A.- MATERIAL:

Han sido empleadas series de huevos de gallina raza "legorn blanca" empollados, remitidos de la granja para su incubación. Realizado un estudio porcentual a fin de detectar el estadio en que se encontraban, para lo cual se han abierto 1 de cada 10, de modo constante hemos observado la presencia de mancha blanca y en ningún caso inicio y aún menos diferenciación de blastodisco, correspondiendo por tanto al estadio 0 de "Hamburger-Hamilton" o preincubador de Ranver. En todas las series se han dejado el 20% de huevos de la misma recogida a fin de ser tenidos como testigos. A los embriones testigos a su vez se les ha dividido en dos grupos:

- A. La mitad fueron incubados según el proceder habitual del laboratorio, esto es, una vez realizada la extracción de 2 cc. y su ulterior cierre se mantienen en incubación idéntico tiempo que los experimentales.
- B. A la otra mitad de los huevos testigos, una vez retirados los 2 cc. de albúmina, se le ha colocado

únicamente agua destilada, en el mismo área o lugar en que ha sido colocada en los embriones experimentales, la misma cantidad de agua y Mitoxantrone.

Los embriones experimentales han sido divididos en 4 series cada una de 100 huevos. De modo general en todas las series la técnica ha sido la siguiente:

A las 24 horas de ser introducidos en estufa de cultivos "Selecta" a 37°C de temperatura, con control y grado de humedad constante, se les extirpa a través del polo agudo y con micropipeta, 2 cc. de albúmina; seguidamente y una vez cerrado el orificio con parafilm, y siguiendo el proceder de Lutz se practica en el culmen una apertura rectangular de 1 x 2 cm., maniobra previa y necesaria para la visualización del disco embrionario. Sobre los blastocitos observados y una vez confrontado su estadio, se coloca la cantidad y proporción de Mitoxantrone que corresponde unitaria e independientemente a cada una de las series y grupos de huevos escogidos para la fase experimental.

Aunque es materialmente imposible la exacta

implantación sobre el área embrionaria, prácticamente la colocación es en la mayoría de los casos similar, ya que han sido colocados tomando como centro el nudo de Hensen, y eje, la línea primitiva.

Ordenados según dosis y criterio cronológico, se catalogan las 4 series y grupos según la dosis administrada de Mitoxantrone previa dilución al 5%:

Serie 1: Comprende un total de 100 embriones inyectados a las 60 horas de incubación, cuando se encontraban en el estadio 10 de H.H. y subdivididos en 5 grupos:

a) Grupo 1º: 20 embriones inyectados con 2'5 mcl. de dilucion

b) Grupo 2º: 20 embriones inyectados con 5 mcl. de dilución.

c) Grupo 3º: 20 embriones  
inyectados con 7'5  
mcl. de dilución.

d) Grupo 4º: 20 embriones  
inyectados con 10 mcl.  
de dilución.

e) Grupo 5º: 20 embriones utilizados  
como testigos. 10  
embriones del grupo A  
y 10 embriones del  
grupo B.

Serie 2: Comprende un total de 100 embriones  
inyectados a las 84 horas de incubación,  
cuando se encontraban en el estadio 14 de  
H.H. y subdivididos en 5 grupos:

- a) Grupo 1º: 20 embriones  
inyectados con 2'5  
mcl. de dilución.
- b) Grupo 2º: 20 embriones  
inyectados con 5 mcl.  
de dilución.
- c) Grupo 3º: 20 embriones  
inyectados con 7'5  
mcl. de dilución.
- d) Grupo 4º: 20 embriones  
inyectados con 10 mcl.  
de dilución.
- e) Grupo 5º: 20 embriones utilizados  
como testigos. 10 em-  
briones del grupo A y  
10 embriones del grupo  
B.

**Serie 3:** Comprende un total de 100 embriones inyectados a los cuatro días de incubación, cuando se encontraban en el estadio 18 de H.H. y subdivididos en 5 grupos:

a) Grupo 1º: 20 embriones inyectados con 2'5 mcl. de dilución.

b) Grupo 2º: 20 embriones inyectados con 5 mcl. de dilución.

c) Grupo 3º: 20 embriones inyectados con 7'5 mcl. de dilución.

d) Grupo 4º: 20 embriones inyectados con 10 mcl. de dilución.

e) Grupo 5º: 20 embriones utilizados como testigos. 10 embriones del grupo A y 10 embriones del grupo B.

Serie 4: Comprende un total de 100 embriones inyectados a los cinco días y medio de incubación, cuando se encontraban en el estadio 22 de H.H. y subdivididos en 5 grupos:

a) Grupo 1º: 20 embriones inyectados con 2'5 mcl. de dilución.

b) Grupo 2º: 20 embriones inyectados con 5 mcl. de dilución.

c) Grupo 3º: 20 embriones  
inyectados con 7'5  
mcl. de dilución.

d) Grupo 4º: 20 embriones  
inyectados con 10 mcl.  
de dilución.

e) Grupo 5º: 20 embriones utilizados  
como testigos. 10  
embriones del grupo A  
y 10 embriones del  
grupo B.

Dado que la dosis administrada en humanos adultos y una vez extrapolada por peso a embriones de ave resulta ser de 6,25 microlitros de Mitoxantrone diluido al 5%, hemos considerado oportuno establecer nuestra pauta de actuación independientemente del estadio del desarrollo embrionario en dos dosis de menor cuantía, 5 y 2,5 microlitros y otras dos de mayor cuantía, 7,5 y 10 microlitros, y ello dado que la OMS en

su informe de 1967, sobre principios aplicables a la investigación teratógena de los medicamentos, señala que la posología se debe de fijar basándose en el peso corporal de los animales, y siguiendo las citadas directrices hemos extrapolado la dosis a tenor del peso a su correspondiente en la media en los embriones de ave.

En todas las series y una vez cerrada la ventana con parafilm se reintroduce en estufa durante 72 horas, a partir de las cuales se interrumpe bruscamente la incubación siendo extraídos e introducidos en formol neutro al 20%.

De todos los embriones supervivientes y en todas las series se hace un estudio macroscópico así como un control fotográfico, siendo escogidos para su estudio microscópico aquéllos que presentan un mayor grado de malformación.

En todas las series, se han despreciado los embriones que aparecen tras las 72 horas de incubación muertos, aunque presentaran marcados grados de malformación, ya que en estos casos es imposible el estudio y seriación histológica.

De cada serie, y habida cuenta de la existencia de malformaciones similares en todos los embriones supervivientes, hemos elegido el espécimen más característico.

## B.- METODO

Una vez alcanzado el estadio del desarrollo en cada una de las series, hemos procedido a depositar sobre el embrión la cantidad correspondiente de Mitoxantrone diluido al 5%.

La sustancia administrada, el Mitoxantrone, y más concretamente el compuesto usado por nosotros, cuyo nombre comercial responde al de Novantrone, es elaborado por los laboratorios LEDERLE, S.A..

La administración de la cantidad requerida según la serie y el grupo, se efectuó con micropipeta semiautomática de la marca BRADS, utilizando en cada una de las series, capilares previamente esterilizados, proceso en el que se procuró invertir un período de tiempo no superior a 20 minutos por serie.

Tras la administración del Mitoxantrone, en disolución al

5%, se procedió nuevamente a cerrar con parafilm la ventana efectuada en el huevo y se reintroduce en la incubadora otras 72 horas, transcurridas las cuales, procedimos a la extracción y el aislamiento del embrión.

Una vez aislado el embrión, se procedió a su estudio externo y tras ser fotografiado, medido, pesado y comprobado su volumen, se introduce en formol neutro al 20%.

Los embriones, una vez fijados y previa selección, fueron cortados, en cortes semifinos, y teñidos según la técnica de la Hematoxilina de Harris, para su posterior estudio.

En el caso de los embriones testigo de cada estadio, se tomaron en consideración solamente los diez del grupo B, por presentar una mayor similitud de técnica de laboratorio.

Los resultados obtenidos fueron procesados en un ordenador personal IBM utilizándose la base de datos de Base III-plus. El análisis estadístico se efectuó mediante el programa estadístico SPSS-PC.

Se realizó estudio descriptivo de los datos mediante

medidas de tendencia central y dispersión para variables cuantitativas y porcentajes para variables cualitativas, realizándose cuadros resumen de dichas medidas e histogramas y diagramas de barras.

Para la comparación de varias medidas se utilizó el análisis de varianza de una vía utilizando la técnica de Student-Newman-Keuls, para el análisis de las diferencias.

RESULTADOS

Tras la administración del mitoxantrone a los embriones según el método ya reseñado, pasamos a analizar los efectos sobre dichos embriones en cuanto a alteraciones morfológicas, longitud, volumen y peso. Nos encontramos los siguientes resultados en los embriones supervivientes, considerando que por estadio y dosis, el número total de embriones inyectados fue de veinte, a excepción de los testigos, donde se utilizaron diez embriones para cada estadio.

ESTADIO 10 DE H.H.

Dosis 2,5 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>gr.</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	1,65	0,2	0,26	Normal
2	1,75	0,25	0,28	Normal
3	1,4	0,13	0,18	Tronco en "S"
4	1,124	0,11	0,18	Tronco en "S"
5	1,6	0,2	0,25	Normal
6	1,2	0,12	0,18	Tronco en "S"
7	1,65	0,2	0,26	Normal
8	1,45	0,14	0,2	Tronco en "S"

Dosis 5 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>gr.</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	1,6	0,1	0,13	Tronco en "S"
2	1,7	0,1	0,13	Tronco en "S"
3	1,6	0,15	0,18	Tronco en "S"
4	1,5	0,1	0,12	Normal
5	1,4	0,1	0,12	Tronco en "S"
6	1,6	0,13	0,15	Tronco en "S"
7	1,65	0,15	0,17	Normal
8	1,55	0,13	0,14	Tronco en "S"

Dosis 7,5 microlitros

Nº Embrión	cm. Longitud	c.c. Volumen	gr. Peso	Malformación
1	1	0,1	0,09	Extrofia cardíaca, Atrofia de cola y Tronco en "S"
2	1,35	0,1	0,09	Extrofia cardíaca, Tronco "S"
3	1,35	0,1	0,09	Extrofia cardíaca, Tronco "S"
4	0,6	0,05	0,04	Amorfo
5	1,1	0,08	0,08	Tronco en "S"
6	0,6	0,06	0,018	Agenesia de cola, microftalmia bilateral
7	0,6	0,06	0,06	Microcefalia, Tronco "S", Anoftalmia
8	1,35	0,1	0,09	Normal
9	1,35	0,1	0,09	Normal
10	1	0,1	0,09	Normal
11	0,7	0,05	0,04	Tronco en "S"
12	1	0,08	0,08	Normal
13	0,6	0,06	0,02	Tronco en "S", microcefalia
14	0,6	0,06	0,06	Tronco en "S"

Dosis 10 microlitros

Nº Embrión	cm. Longitud	c.c. Volumen	gr. Peso	Malformación
1	0,8	0,04	0,04	Tronco en "S"
2	0,9	0,04	0,04	Normal
3	0,6	0,02	0,007	Microftalmia izquierda, Tronco en "S"
4	0,8	0,03	0,01	Tronco en "S"
5	0,9	0,01	0,04	Normal
6	0,8	0,04	0,03	Tronco en "S"
7	0,8	0,02	0,007	Tronco en "S"
8	0,8	0,04	0,02	Tronco en "S"
9	0,8	0,03	0,01	Tronco en "S"
10	0,6	0,02	0,007	Tronco en "S"
11	0,9	0,04	0,04	Normal
12	0,9	0,04	0,04	Normal
13	0,8	0,04	0,03	Tronco en "S"
14	0,8	0,04	0,02	Tronco en "S"
15	0,7	0,02	0,007	Tronco en "S"
16	0,9	0,04	0,04	Tronco en "S"

TESTIGOS:

cm. Longitud	c.c. volumen	gr. peso	nº de supervivientes
$\bar{x} = 1,72$	$\bar{x} = 1,88$	$\bar{x} = 0,253$	9

ESTADIO 14 DE H.H.

Dosis 2,5 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>gr.</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	1,35	0,08	0,08	Atresia caudal
2	1,3	0,09	0,09	Microftalmia Izquierda, Tronco en "S"
3	1,4	0,11	0,11	Tronco en "S"
4	1,45	0,16	0,16	Atresia caudal y atrofia unila- teral de cristalino con microf- talmia bilateral
5	1,3	0,08	0,08	Tronco en "S"
6	1,35	0,1	0,12	Normal
7	1,2	0,05	0,06	Microftalmia Izquierda
8	1,35	0,08	0,08	Tronco en "S"
9	1,35	0,1	0,14	Normal
10	1,4	0,15	0,11	Tronco en "S"
11	1,45	0,15	0,16	Normal
12	1,3	0,15	0,14	Normal
13	1,3	0,15	0,12	Normal
14	1,3	0,15	0,11	Tronco en "S"

Dosis 5 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>gr.</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	1,15	0,1	0,10	Tronco en "S"
2	1,05	0,1	0,12	Normal
3	1,3	0,12	0,14	Normal
4	1	0,1	0,11	Normal
5	1,15	0,12	0,15	Normal
6	1,10	0,1	0,11	Normal
7	0,8	0,07	0,08	Tronco en "S" y Hemorragia cefálica
8	0,95	0,05	0,06	Hemorragia cefálica
9	1,15	0,12	0,12	Normal
10	1,05	0,1	0,10	Normal
11	1,3	0,12	0,14	Normal
12	1	0,07	0,08	Tronco en "S"
13	1,10	0,08	0,15	Normal
14	1,10	0,08	0,12	Normal
15	0,8	0,07	0,06	Normal
16	1	0,1	0,11	Normal

Dosis 7,5 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>gr.</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	1,3	0,1	0,12	Normal
2	0,75	0,03	0,06	Anoftalmia bilateral, Microcefalia y atresia caudal
3	0,9	0,09	0,11	Anoftalmia bilateral y atresia caudal
4	0,9	0,06	0,07	Anoftalmia bilateral
5	0,9	0,09	0,11	Anoftalmia bilateral
6	1,2	0,1	0,12	Normal
7	0,8	0,05	0,05	Anoftalmia bilateral
8	0,9	0,1	0,1	Normal
9	0,9	0,09	0,11	Normal
10	0,9	0,08	0,09	Atresia caudal

Dosis 10 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>gr.</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	0,9	0,07	0,08	Microftalmia bilateral
2	1,2	0,1	0,12	Normal
3	0,7	0,05	0,05	Anoftalmia bilateral
4	0,7	0,05	0,05	Anoftalmia bilateral
5	0,8	0,07	0,07	Microftalmia bilateral
6	1	0,1	0,1	Normal
7	1,15	0,12	0,15	Normal
8	0,9	0,07	0,06	Normal
9	0,9	0,07	0,06	Tronco en "S"
10	1,2	0,09	0,08	Normal
11	1,15	0,09	0,12	Normal
12	0,7	0,05	0,05	Tronco en "S"
13	0,7	0,05	0,06	Tronco en "S"
14	1	0,08	0,09	Normal

TESTIGOS:

<u>cm. Longitud</u>	<u>c.c. volumen</u>	<u>gr. peso</u>	<u>nº de supervivientes</u>
$\bar{x} = 1,8$	$\bar{x} = 0,22$	$\bar{x} = 0,28$	9

ESTADIO 18 DE H.H.

Dosis 2,5 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>gr.</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	1,5	0,2	0,24	Normal
2	1,15	0,1	0,12	Normal
3	1,3	0,1	0,13	Normal
4	1,1	0,2	0,15	Atrofia de cola
5	1,3	0,2	0,21	Atrofia de cola
6	1	0,12	0,13	Normal
7	1,4	0,15	0,20	Normal
8	1,5	0,2	0,24	Normal
9	1,3	0,1	0,13	Normal
10	1,3	0,2	0,21	Normal
11	1,4	0,15	0,20	Normal
12	1,5	0,15	0,12	Normal
13	1,1	0,2	0,15	Normal
14	1	0,12	0,13	Normal

Dosis 5 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>gr.</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	1,2	0,15	0,19	Normal
2	1,1	0,15	0,18	Atresia caudal
3	0,9	0,06	0,08	microftalmia bilateral
4	1,35	0,15	0,15	Normal
5	1,30	0,2	0,21	Normal
6	0,9	0,1	0,10	Atresia caudal
7	0,8	0,1	0,08	microftalmia bilateral
8	1,15	0,2	0,16	Normal
9	1,25	0,2	0,16	Normal
10	1,3	0,2	0,19	Normal
11	0,9	0,07	0,08	Normal
12	0,9	0,09	0,1	Normal
13	1,1	0,15	0,18	Normal
14	1,2	0,15	0,2	Normal
15	1,15	0,2	0,14	Normal
16	1,2	0,2	0,16	Normal
17	1,35	0,2	0,15	Normal
18	1,35	0,2	0,18	Normal
19	1,15	0,15	0,16	Normal
20	1,30	0,2	0,2	Normal

Dosis 7,5 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>Cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>Gr</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	1,4	0,18	0,17	Normal
2	1,25	0,16	0,17	Normal
3	1,05	0,145	0,15	Normal
4	1	0,14	0,15	Normal
5	1	0,14	0,15	Normal
6	1,1	0,15	0,16	Normal
7	0,95	0,12	0,11	Atresia caudal
8	1	0,14	0,15	Normal
9	0,8	0,12	0,1	Atresia caudal
10	1,15	0,155	0,16	Normal
11	1	0,14	0,15	Normal
12	1	0,14	0,15	Normal
13	1	0,13	0,13	Normal
14	1,05	0,14	0,15	Normal
15	1,1	0,15	0,18	Normal
16	1	0,14	0,14	Normal
17	1	0,14	0,15	Normal
18	1	0,14	0,15	Normal

Dosis 10 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>Cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>Gr</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	1	0,13	0,14	Normal
2	0,9	0,13	0,13	Normal
3	1	0,14	0,15	Normal
4	1	0,14	0,15	Normal
5	0,8	0,12	0,11	Atresia de cola
6	1,06	0,14	0,13	Normal
7	1	0,14	0,15	Atresia de cola
8	1,4	0,18	0,17	Normal
9	1	0,14	0,15	Normal
10	1,25	0,16	0,17	Normal
11	1	0,14	0,15	Normal
12	1,05	0,14	0,15	Normal
13	0,95	0,12	0,11	Normal
14	0,8	0,11	0,11	Atresia de cola y microftalmia unilateral
15	1,05	0,14	0,15	Normal
16	1,1	0,14	0,16	Normal
17	1	0,14	0,15	Normal
18	1	0,14	0,15	Normal

TESTIGOS:

<u>cm. Longitud</u>	<u>c.c. volumen</u>	<u>gr. peso</u>	<u>nº de supervivientes</u>
$\bar{x} = 1,91$	$\bar{x} = 0,25$	$\bar{x} = 0,30$	10

ESTADIO 22 DE H.H.

Dosis 2,5 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>Cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>Gr</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	1,8	0,25	0,3	Normal
2	1,4	0,22	0,2	Normal
3	1,52	0,25	0,24	Normal
4	1,4	0,2	0,21	Normal
5	1,5	0,25	0,26	Normal
6	1,5	0,25	0,26	Normal
7	1,5	0,2	0,22	Normal
8	1,45	0,22	0,23	Normal
9	1,4	0,22	0,23	Normal
10	1,5	0,25	0,24	Normal
11	1,4	0,22	0,23	Normal
12	1,4	0,22	0,23	Normal
13	1,4	0,21	0,23	Normal
14	1,6	0,25	0,26	Normal
15	1,5	0,25	0,25	Normal
16	1,6	0,25	0,26	Normal

Dosis 5 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>Cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>Gr</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	1,4	0,22	0,2	Normal
2	1,5	0,25	0,24	Normal
3	1,5	0,25	0,22	Normal
4	1,45	0,22	0,23	Normal
5	1,3	0,20	0,212	Normal
6	1,2	0,25	0,20	Normal
7	1,3	0,25	0,2	Normal
8	1,2	0,25	0,2	Normal
9	1,2	0,20	0,2	Normal
10	1,2	0,22	0,18	Normal
11	1,5	0,25	0,23	Normal
12	1,3	0,24	0,3	Normal
13	1,3	0,24	0,2	Normal
14	1,3	0,23	0,19	Normal
15	1,25	0,25	0,22	Normal
16	1,35	0,25	0,22	Normal

Dosis 7,5 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>Cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>Gr</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	1,2	0,3	0,20	Normal
2	1,35	0,25	0,22	Normal
3	1,25	0,25	0,18	Normal
4	1,4	0,25	0,25	Normal
5	1,2	0,2	0,16	Normal
6	1,2	0,2	0,18	Normal
7	1,2	0,2	0,18	Normal
8	1,15	0,15	0,15	Atresia caudal
9	1,2	0,15	0,14	Anoftalmia bilateral
10	1,2	0,13	0,15	Normal
11	1,25	0,16	0,2	Normal
12	1,25	0,25	0,2	Normal

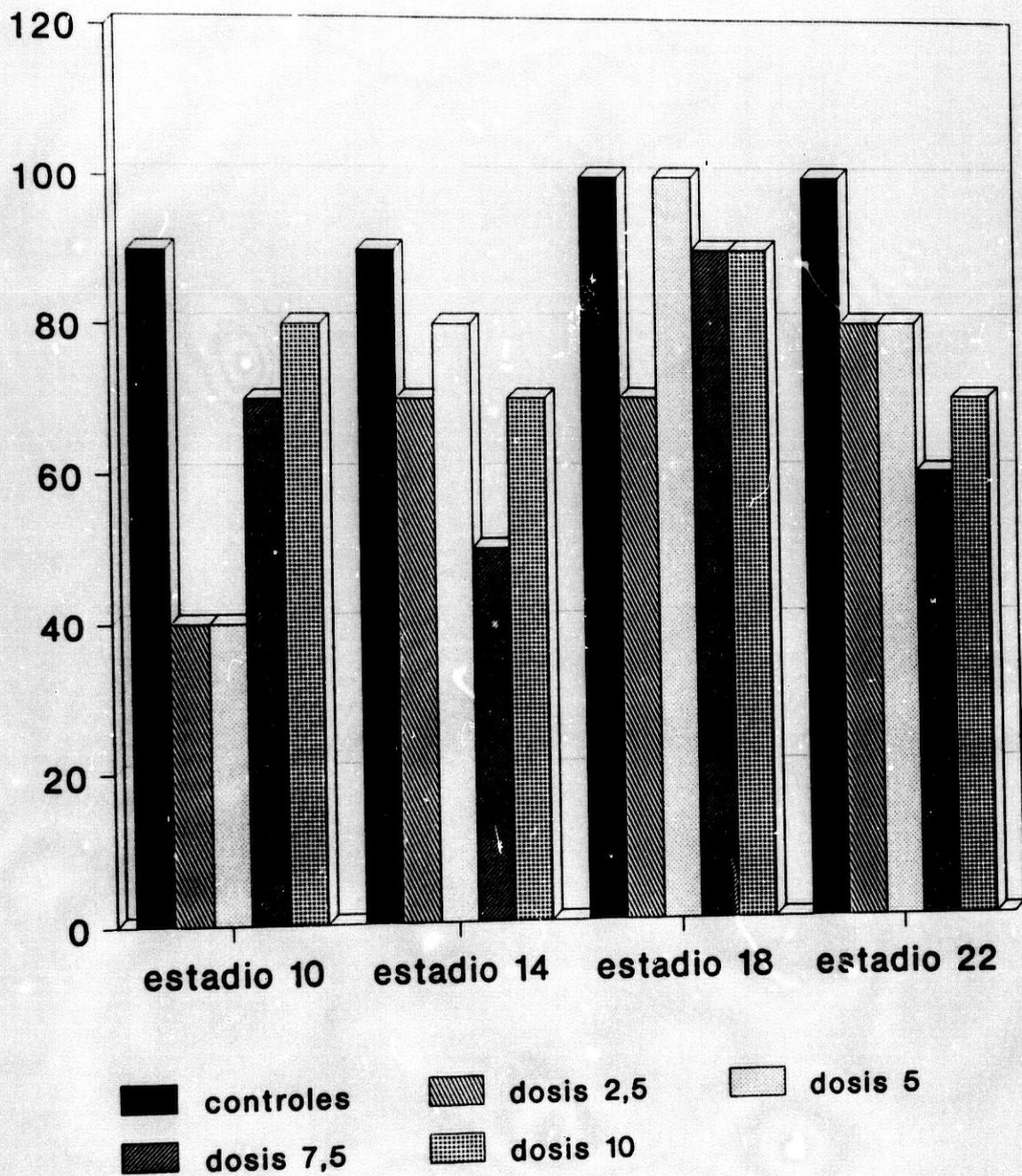
Dosis 10 microlitros

<u>Nº</u> <u>Embrión</u>	<u>Cm.</u> <u>Longitud</u>	<u>c.c.</u> <u>Volumen</u>	<u>Gr</u> <u>Peso</u>	<u>Malformación</u>
1	1,25	0,22	0,18	Normal
2	1,2	0,16	0,15	Atresia caudal
3	1,15	0,16	0,15	Atresia caudal
4	1,2	0,2	0,18	Atresia caudal
5	1,27	0,18	0,17	Normal
6	1,2	0,2	0,18	Normal
7	1,2	0,3	0,20	Normal
8	1,2	0,2	0,18	Normal
9	1,2	0,2	0,17	Normal
10	1,35	0,25	0,22	Normal
11	1,25	0,17	0,18	Normal
12	1,2	0,18	0,18	Normal
13	1,2	0,17	0,17	Normal
14	1,2	0,17	0,18	Normal

TESTIGOS:

<u>cm. Longitud</u>	<u>c.c. volumen</u>	<u>gr. peso</u>	<u>nº de supervivientes</u>
$\bar{x} = 1,96$	$\bar{x} = 0,29$	$\bar{x} = 0,33$	10

## % de supervivencia de embriones dosis y estadios



**DATOS ESTADISTICOS DE LONGITUD  
SEGUN ESTADIOS Y DOSIS**

Individualizando los distintos parámetros, refiriéndonos  
a la longitud de los embriones tratados y según los estadíos y dosis.

**ESTADIO 10**

Estadísticos de por niveles de	V4 V3	longitud dosis	Media	D.E.	Casos
Variable	Valor var.				
Para población global			1.0963	.3840	46
V3	2.50		1.4787	.2247	8
V3	5.00		1.5750	.0926	8
V3	7.50		.9429	.3216	14
V3	10.00		.8000	.0966	16
controles			1.7200		9
Total Casos =	46				

**ESTADIO 14**

Estadísticos de por niveles de	V4 V3	longitud dosis	Media	D.E.	Casos
Variable	Valor var.				
Para población global			1.0815	.2175	54
V3	2.50		1.3429	.0675	14
V3	5.00		1.0625	.1420	16
V3	7.50		.9600	.1578	10
V3	10.00		.9286	.1929	14
controles			1.8000		9
Total Casos =	54				

ESTADIO 18

Estadísticos de V4 por niveles de V3		longitud dosis	Media	D.E.	Casos
Variable	Valor var.				
Para población global			1.1080	.1729	70
V3	2.50		1.2500	.1687	14
V3	5.00		1.1425	.1749	20
V3	7.50		1.0472	.1266	18
V3	10.00		1.0200	.1386	18
controles			1.910		10
Total Casos =		70			

ESTADIO 22

Estadísticos de V4 por niveles de V3		longitud dosis	Media	D.E.	Casos
Variable	Valor var.				
Para población global			1.3266	.1396	58
V3	2.50		1.4856	.1094	16
V3	5.00		1.3294	.1076	17
V3	7.50		1.2273	.0647	11
V3	10.00		1.2193	.0478	14
controles			1.9600		10
Total Casos =		58			

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LA LOGSITUD

ESTADIO 10 DOSIS 2,5

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	1.479	1	12.5	12.5	12.5
D.E.	.225	1	12.5	12.5	25.0
Mínimo	1.130	1	12.5	12.5	37.5
Máximo	1.750	1	12.5	12.5	50.0
		1	12.5	12.5	62.5
		2	25.0	25.0	87.5
		1	12.5	12.5	100.0
TOTAL		8	100.0	100.0	

ESTADIO 10 DOSIS 5

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	1.575	1	12.5	12.5	12.5
D.E.	.093	1	12.5	12.5	25.0
Mínimo	1.400	1	12.5	12.5	37.5
Máximo	1.700	3	37.5	37.5	75.0
		1	12.5	12.5	87.5
		1	12.5	12.5	100.0
TOTAL		8	100.0	100.0	

ESTADIO 10 DOSIS 7,5

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.943	5	35.7	35.7	35.7
D.E.	.322	1	7.1	7.1	42.9
Mínimo	.600	3	21.4	21.4	64.3
Máximo	1.350	1	7.1	7.1	71.4
		4	28.6	28.6	100.0
TOTAL		14	100.0	100.0	

ESTADIO 10 DOSIS 10

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.800	2	12.5	12.5	12.5
D.E.	.097	1	6.3	6.3	18.8
Mínimo	.600	8	50.0	50.0	68.8
Máximo	.900	5	31.3	31.3	100.0
TOTAL		16	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 2,5

	Valor	Frecuencia	%	%	%
Media	1.343	1.20	1	7.1	7.1
D.E.	.068	1.30	5	35.7	35.7
Mínimo	1.200	1.35	4	28.6	28.6
Máximo	1.450	1.40	2	14.3	14.3
		1.45	2	14.3	14.3
		-----			
TOTAL		14	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 5

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	1.063	.80	2	12.5	12.5
D.E.	.142	.95	1	6.3	6.3
Mínimo	.800	1.00	3	18.8	18.8
Máximo	1.300	1.05	2	12.5	12.5
		1.10	3	18.8	18.8
		1.15	3	18.8	18.8
		1.30	2	12.5	12.5
		-----			
TOTAL		16	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 7,5

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.960	.80	1	10.0	10.0
D.E.	.158	.90	7	70.0	70.0
Mínimo	.800	1.20	1	10.0	10.0
Máximo	1.300	1.30	1	10.0	10.0
		-----			
TOTAL		10	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 10

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.929	.70	4	28.6	28.6
D.E.	.193	.80	1	7.1	7.1
Mínimo	.700	.90	3	21.4	21.4
Máximo	1.200	1.00	2	14.3	14.3
		1.15	2	14.3	14.3
		1.20	2	14.3	14.3
		-----			
TOTAL		14	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 2,5

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	1.250	1.00	2	14.3	14.3
D.E.	.169	1.10	2	14.3	28.6
Mínimo	1.000	1.15	2	14.3	42.9
Máximo	1.500	1.30	4	28.6	71.4
		1.40	2	14.3	85.7
		1.50	2	14.3	100.0
TOTAL		14	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 5

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	1.143	.80	1	5.0	5.0
D.E.	.175	.90	4	20.0	25.0
Mínimo	.800	1.10	2	10.0	35.0
Máximo	1.350	1.15	3	15.0	50.0
		1.20	3	15.0	65.0
		1.25	1	5.0	70.0
		1.30	3	15.0	85.0
		1.35	3	15.0	100.0
TOTAL		20	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 7,5

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	1.047	.80	1	5.6	5.6
D.E.	.127	.95	1	5.6	11.1
Mínimo	.800	1.00	9	50.0	61.1
Máximo	1.400	1.05	2	11.1	72.2
		1.10	2	11.1	83.3
		1.15	1	5.6	88.9
		1.25	1	5.6	94.4
		1.40	1	5.6	100.0
TOTAL		18	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 10

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Medio	1.020	.80	2	11.1	11.1
D.E.	.139	.90	1	5.6	16.7
Mínimo	.800	.95	1	5.6	22.2
Máximo	1.400	1.00	8	44.4	66.7
		1.05	2	11.1	77.8
		1.06	1	5.6	83.3
		1.10	1	5.6	88.9
		1.25	1	5.6	94.4
		1.40	1	5.6	100.0
TOTAL		18	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 2,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido	Acumulado
				%	%	%
Media	1.486	1.40	7	43.8	43.8	43.8
D.E.	.109	1.45	1	6.3	6.3	50.0
Mínimo	1.400	1.50	4	25.0	25.0	75.0
Máximo	1.800	1.52	1	6.3	6.3	81.3
		1.60	2	12.5	12.5	93.8
		1.80	1	6.3	6.3	100.0
		-----				
TOTAL			16	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 5

		Valor	Frecuencia	%	Válido	Acumulado
				%	%	%
Media	1.329	1.20	4	23.5	23.5	23.5
D.E.	.108	1.25	1	5.9	5.9	29.4
Mínimo	1.200	1.30	5	29.4	29.4	58.8
Máximo	1.500	1.35	2	11.8	11.8	70.6
		1.40	1	5.9	5.9	76.5
		1.45	1	5.9	5.9	82.4
		1.50	3	17.6	17.6	100.0
		-----				
TOTAL			17	100.0	100.0	

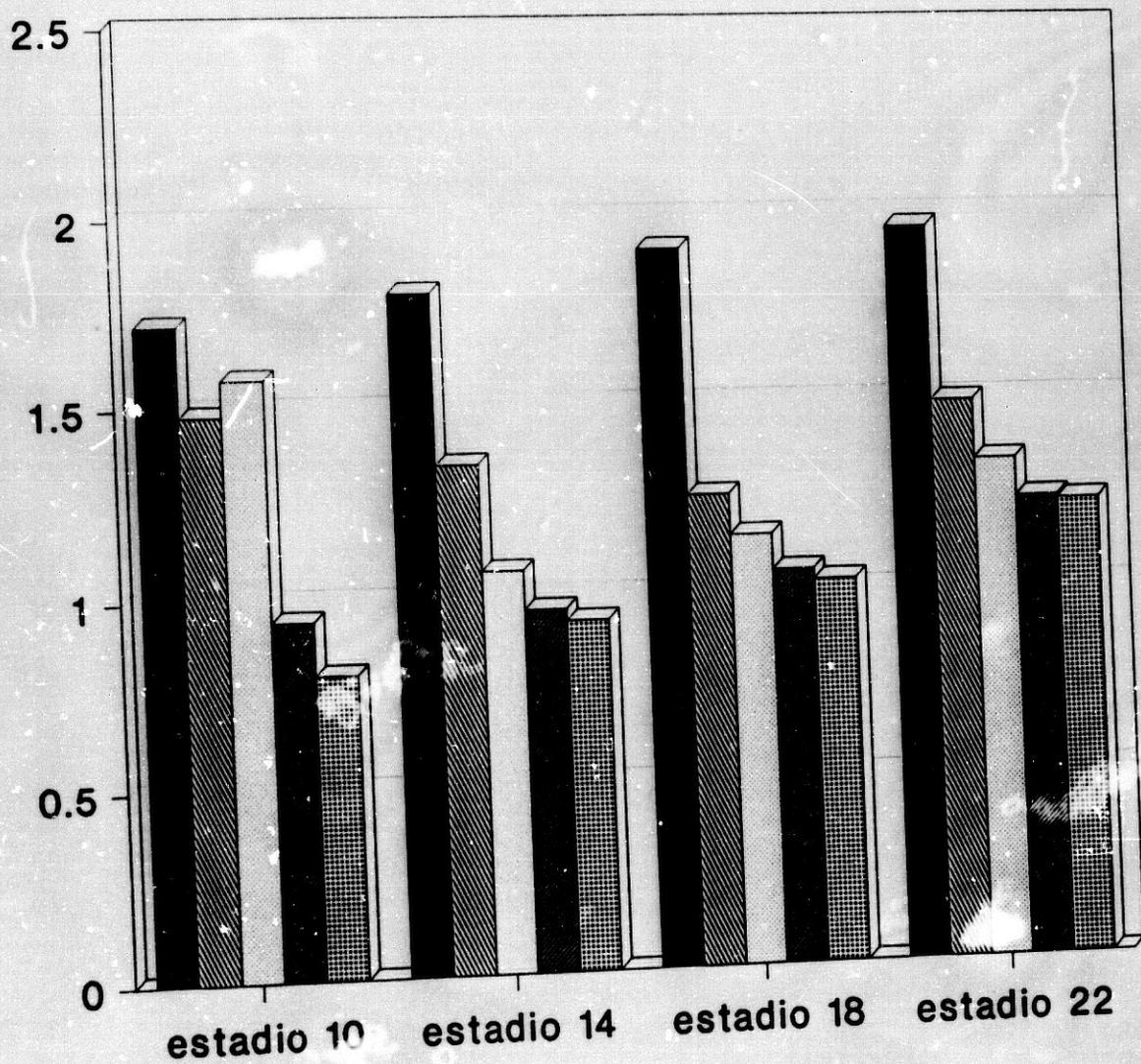
ESTADIO 22 DOSIS 7,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido	Acumulado
				%	%	%
Media	1.227	1.15	1	9.1	9.1	9.1
D.E.	.065	1.20	6	54.5	54.5	63.6
Mínimo	1.150	1.25	3	27.3	27.3	90.9
Máximo	1.400	1.40	1	9.1	9.1	100.0
		-----				
TOTAL			11	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 10

		Valor	Frecuencia	%	Válido	Acumulado
				%	%	%
Media	1.219	1.15	1	7.1	7.1	7.1
D.E.	.048	1.20	9	64.3	64.3	71.4
Mínimo	1.150	1.25	2	14.3	14.3	85.7
Máximo	1.350	1.27	1	7.1	7.1	92.9
		1.35	1	7.1	7.1	100.0
		-----				
TOTAL			14	100.0	100.0	

# LONGITUD EMBRIONES por dosis y estadios



■ controles      ▨ dosis 2,5      □ dosis 5  
▩ dosis 7,5      ▤ dosis 10

**DATOS ESTADÍSTICOS DE VOLUMEN  
SEGUN ESTADIOS Y DOSIS**

En cuanto al volumen de los embriones tratados y según los estadíos y dosis.

**ESTADIO 10**

Estadísticos de V5 por niveles de V3		volumen dosis	Media	D.E.	Casos
Variable	Valor var.				
Para población global			.0859	.0551	46
V3	2.50		.1688	.0503	8
V3	5.00		.1200	.0227	8
V3	7.50		.0786	.0211	14
V3	10.00		.0338	.0089	16
controles			.1800		9
Total Casos =		46			

**ESTADIO 14**

Estadísticos de V5 por niveles de V3		volumen dosis	Media	D.E.	Casos
Variable	Valor var.				
Para población global			.0911	.0308	54
V3	2.50		.1071	.0458	14
V3	5.00		.0944	.0210	16
V3	7.50		.0850	.0172	10
V3	10.00		.0757	.0221	14
controles			.2200		9
Total Casos =		54			

**ESTADIO 18**

Estadísticos de V5 por niveles de V3		volumen dosis			
Variable	Valor var.		Media	D.E.	Casos
Para población global			.1446	.0342	70
V3	2.50		.1386	.0438	14
V3	5.00		.1560	.0486	20
V3	7.50		.1428	.0136	18
V3	10.00		.1383	.0150	18
controles			.2500		10
Total Casos =		70			

**ESTADIO 22**

Estadísticos de V5 por niveles de V3		volumen dosis			
Variable	Valor var.		Media	D.E.	Casos
Para población global			.2214	.0370	58
V3	2.50		.2319	.0197	16
V3	5.00		.2429	.0126	17
V3	7.50		.2036	.0537	11
V3	10.00		.1971	.0387	14
controles			.2900		10
Total Casos =		58			

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DEL VOLUMEN

ESTADIO 10 DOSIS 2,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.169	.11	1	12.5	12.5	12.5
D.E.	.050	.12	1	12.5	12.5	25.0
Mínimo	.110	.13	1	12.5	12.5	37.5
Máximo	.250	.14	1	12.5	12.5	50.0
		.20	3	37.5	37.5	87.5
		.25	1	12.5	12.5	100.0
		-----				
TOTAL			8	100.0	100.0	

ESTADIO 10 DOSIS 5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.120	.10	4	50.0	50.0	50.0
D.E.	.023	.13	2	25.0	25.0	75.0
Mínimo	.050	.15	2	25.0	25.0	100.0
Máximo	.150					
		-----				
TOTAL			8	100.0	100.0	

ESTADIO 10 DOSIS 7,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.079	.05	2	14.3	14.3	14.3
D.E.	.021	.06	4	28.6	28.6	42.9
Mínimo	.050	.08	2	14.3	14.3	57.1
Máximo	.100	.10	6	42.9	42.9	100.0
		-----				
TOTAL			14	100.0	100.0	

ESTADIO 10 DOSIS 10

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.034	.02	4	25.0	25.0	25.0
D.E.	.009	.03	2	12.5	12.5	37.5
Mínimo	.020	.04	10	62.5	62.5	100.0
Máximo	.040					
		-----				
TOTAL			16	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 2,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.107	.01	1	7.1	7.1	7.1
D.E.	.046	.05	1	7.1	7.1	14.3
Mínimo	.010	.08	3	21.4	21.4	35.7
Máximo	.160	.09	1	7.1	7.1	42.9
		.10	2	14.3	14.3	57.1
		.15	5	35.7	35.7	92.9
		.16	1	7.1	7.1	100.0
		-----				
TOTAL			14	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.094	.05	1	6.3	6.3	6.3
D.E.	.021	.07	2	12.5	12.5	18.8
Mínimo	.050	.08	3	18.8	18.8	37.5
Máximo	.120	.10	6	37.5	37.5	75.0
		.12	4	25.0	25.0	100.0
		-----				
TOTAL			16	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 7,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.085	.05	1	10.0	10.0	10.0
D.E.	.017	.06	1	10.0	10.0	20.0
Mínimo	.050	.08	1	10.0	10.0	30.0
Máximo	.100	.09	4	40.0	40.0	70.0
		.10	3	30.0	30.0	100.0
		-----				
TOTAL			10	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 10

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.076	.05	4	28.6	28.6	28.6
D.E.	.022	.07	4	28.6	28.6	57.1
Mínimo	.050	.08	1	7.1	7.1	64.3
Máximo	.120	.09	2	14.3	14.3	78.6
		.10	2	14.3	14.3	92.9
		.12	1	7.1	7.1	100.0
		-----				
TOTAL			14	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 2,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.157	.10	3	21.4	21.4	21.5
D.E.	.044	.12	2	14.3	14.3	57.1
Mínimo	.100	.15	3	21.4	21.4	71.4
Máximo	.200	.20	6	42.9	42.9	100.0
		-----				
TOTAL			14	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.156	.06	1	5.0	5.0	5.0
D.E.	.049	.07	1	5.0	5.0	10.0
Mínimo	.060	.09	1	5.0	5.0	15.0
Máximo	.200	.10	2	10.0	10.0	25.0
		.15	6	30.0	30.0	55.0
		.20	9	45.0	45.0	100.0
		-----				
TOTAL			20	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 7,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.143	.12	2	11.1	11.1	11.1
D.E.	.014	.13	1	5.6	5.6	16.7
Mínimo	.120	.14	9	50.0	50.0	66.7
Máximo	.180	.15	4	22.2	22.2	88.9
		.16	1	5.6	5.6	94.4
		.18	1	5.6	5.6	100.0
		-----				
TOTAL			18	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 10

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.138	.11	1	5.6	5.6	5.6
D.E.	.015	.12	2	11.1	11.1	16.7
Mínimo	.110	.13	2	11.1	11.1	27.8
Máximo	.180	.14	11	61.1	61.1	88.9
		.16	1	5.6	5.6	94.4
		.18	1	5.6	5.6	100.0
		-----				
TOTAL			18	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 2,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.232	.20	2	12.5	12.5	12.5
D.E.	.020	.21	1	6.3	6.3	18.8
Mínimo	.200	.22	5	31.3	31.3	50.0
Máximo	.250	.25	8	50.0	50.0	100.0
		-----				
TOTAL			16	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.220	.20	2	11.8	11.8	35.3
D.E.	.013	.22	3	17.6	17.6	17.6
Mínimo	.200	.23	1	5.9	5.9	23.5
Máximo	.250	.24	2	11.8	11.8	35.3
		.25	9	52.9	52.9	94.1
		-----				
TOTAL			17	100.0	100.0	

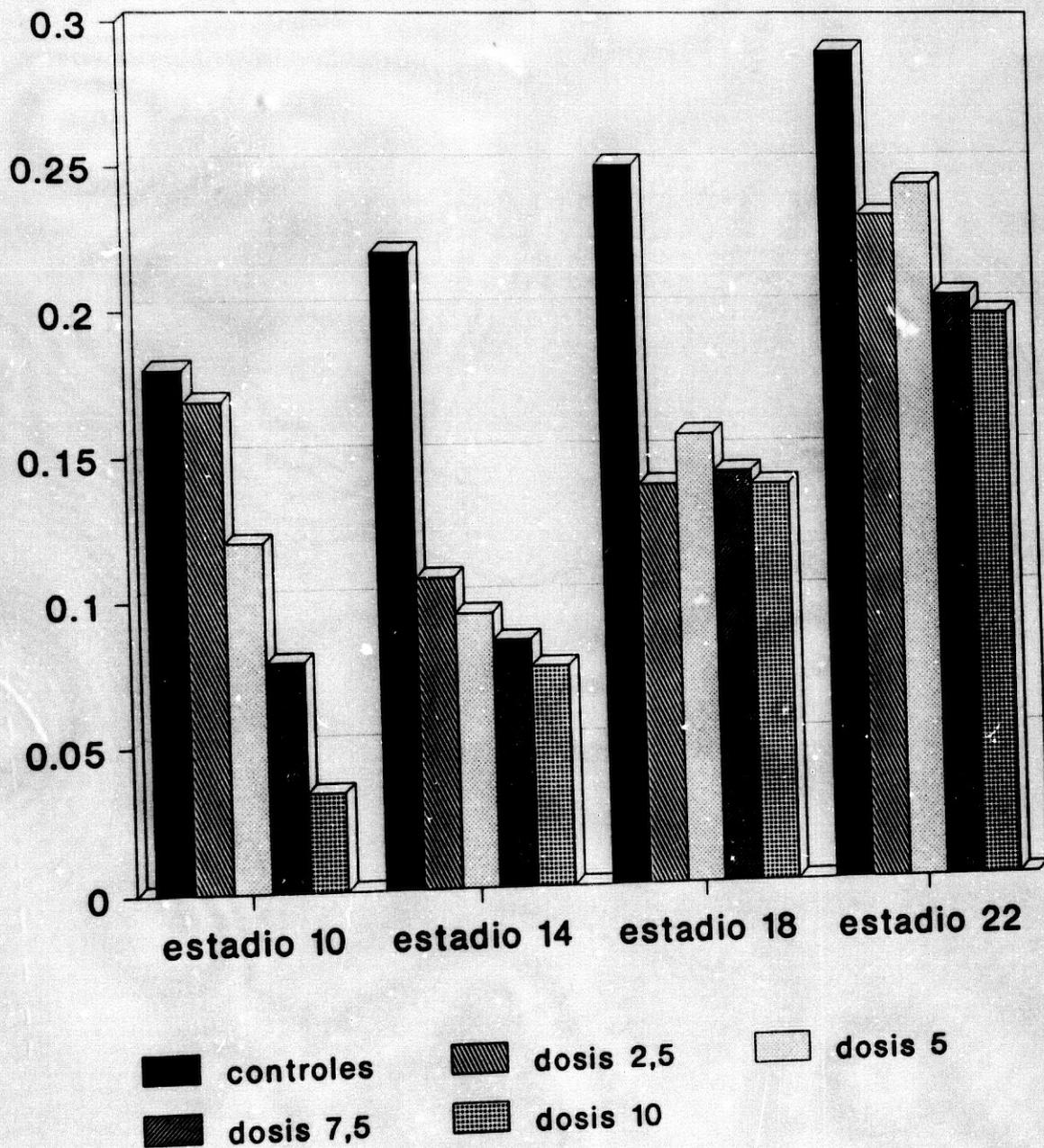
ESTADIO 22 DOSIS 7,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.204	.13	1	9.1	9.1	9.1
D.E.	.054	.15	2	18.2	18.2	27.3
Mínimo	.130	.16	1	9.1	9.1	36.4
Máximo	.300	.20	3	27.3	27.3	63.6
		.25	3	27.3	27.3	90.9
		.30	1	9.1	9.1	100.0
		-----				
TOTAL			11	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 10

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.197	.16	2	14.3	14.3	14.3
D.E.	.039	.17	3	21.4	21.4	35.7
Mínimo	.160	.18	2	14.3	14.3	50.0
Máximo	.300	.20	4	28.6	28.6	78.6
		.22	1	7.1	7.1	85.7
		.25	1	7.1	7.1	92.9
		.30	1	7.1	7.1	100.0
		-----				
TOTAL			14	100.0	100.0	

# VOLUMEN EMBRIONES por dosis y estadios



**DATOS ESTADÍSTICOS DE PESO  
SEGUN ESTADIOS Y DOSIS**

Asimismo, respecto al peso de los embriones y según los estadíos y dosis.

**ESTADIO 10**

Estadísticos de V6 por niveles de V3		peso dosis	Media	D.E.	Casos
Variable	Valor var.				
Para población global			.0967	.0780	46
V3	2.50		.2237	.0427	8
V3	5.00		.1425	.0225	8
V3	7.50		.0800	.0417	14
V3	10.00		.0250	.0137	16
controles			.2530		9
Total Casos =		46			

**ESTADIO 14**

Estadísticos de V6 por niveles de V3		peso dosis	Media	D.E.	Casos
Variable	Valor var.				
Para población global			.0965	.0340	54
V3	2.50		.1043	.0413	14
V3	5.00		.1013	.0342	16
V3	7.50		.0990	.0228	10
V3	10.00		.0814	.0311	14
controles			.2800		9
Total Casos =		54			

**ESTADIO 18**

Estadísticos de V6 por niveles de V3		peso dosis	Media	D.E.	Casos
Variable	Valor var.				
Para población global			.1630	.0843	70
V3	2.50		.1686	.0455	14
V3	5.00		.1900	.1495	20
V3	7.50		.1483	.0195	18
V3	10.00		.1433	.0185	18
controles			.3000		10
Total Casos =		70			

ESTADIO 22

Estadísticos de V6 por niveles de V3		peso dosis			
Variable	Valor var.		Media	D.E.	Casos
Para población global			.2067	.0358	58
V3	2.50		.2406	.0241	16
V3	5.00		.2153	.0270	17
V3	7.50		.1809	.0314	11
V3	10.00		.1779	.0176	14
controles			.3300		10
Total Casos =		58			

DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DEL PESO

ESTADIO 10 DOSIS 2,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido	Acumulado
				%	%	%
Media	.224	.18	3	37.5	37.5	37.5
D.E.	.043	.20	1	12.5	12.5	50.0
Mínimo	.180	.25	1	12.5	12.5	62.5
Máximo	.280	.26	2	25.0	25.0	87.5
		.28	1	12.5	12.5	100.0
TOTAL			8	100.0	100.0	

ESTADIO 10 DOSIS 5

		Valor	Frecuencia	%	Válido	Acumulado
				%	%	%
Media	.143	.12	2	25.0	25.0	25.0
D.E.	.023	.13	2	25.0	25.0	50.0
Mínimo	.120	.14	1	12.5	12.5	62.5
Máximo	.180	.15	1	12.5	12.5	75.0
		.17	1	12.5	12.5	87.5
		.18	1	12.5	12.5	100.0
TOTAL			8	100.0	100.0	

ESTADIO 10 DOSIS 7,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido	Acumulado
				%	%	%
Media	.067	.02	2	14.3	14.3	14.3
D.E.	.027	.04	2	14.3	14.3	21.4
Mínimo	.020	.06	2	14.3	14.3	35.7
Máximo	.090	.08	2	14.3	14.3	50.0
		.09	6	42.9	42.9	92.9
		.20	1	7.1	7.1	100.0
TOTAL			14	100.0	100.0	

ESTADIO 10 DOSIS 10

		Valor	Frecuencia	%	Válido	Acumulado
				%	%	%
Media	.025	.01	6	37.5	37.5	37.5
D.E.	.014	.02	2	12.5	12.5	50.0
Mínimo	.010	.03	2	12.5	12.5	62.5
Máximo	.040	.04	6	37.5	37.5	100.0
TOTAL			16	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 2,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.104	.01	1	7.1	7.1	7.1
D.E.	.041	.06	1	7.1	7.1	14.3
Mínimo	.010	.08	3	21.4	21.4	35.7
Máximo	.160	.09	1	7.1	7.1	42.9
		.11	2	14.3	14.3	57.1
		.12	2	14.3	14.3	71.4
		.14	2	14.3	14.3	85.7
		.16	2	14.3	14.3	100.0
		-----				
TOTAL			14	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.101	.02	1	6.3	6.3	6.3
D.E.	.034	.06	2	12.5	12.5	18.8
Mínimo	.020	.08	2	12.5	12.5	31.3
Máximo	.150	.10	2	12.5	12.5	43.8
		.11	3	18.8	18.8	62.5
		.12	3	18.8	18.8	81.3
		.14	2	12.5	12.5	93.8
		.15	1	6.3	6.3	100.0
		-----				
TOTAL			16	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 7,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.099	.05	1	10.0	10.0	10.0
D.E.	.023	.07	1	10.0	10.0	20.0
Mínimo	.050	.09	1	10.0	10.0	30.0
Máximo	.120	.10	1	10.0	10.0	40.0
		.11	4	40.0	40.0	80.0
		.12	2	20.0	20.0	100.0
		-----				
TOTAL			10	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 10

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.081	.05	3	21.4	21.4	21.4
D.E.	.031	.06	3	21.4	21.4	42.9
Mínimo	.050	.07	1	7.1	7.1	50.0
Máximo	.150	.08	2	14.3	14.3	64.3
		.09	1	7.1	7.1	71.4
		.10	1	7.1	7.1	78.6
		.12	2	14.3	14.3	92.9
		.15	1	7.1	7.1	100.0
		-----				
TOTAL			14	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 2,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido Acumulado	%
Media	.169	.12	2	14.3	14.3	14.3
D.E.	.046	.13	4	28.6	28.6	42.9
Mínimo	.120	.15	2	14.3	14.3	57.1
Máximo	.240	.20	2	14.3	14.3	71.4
		.21	2	14.3	14.3	85.7
		.24	2	14.3	14.3	100.0
		-----				
TOTAL			14	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 5

		Valor	Frecuencia	%	Válido Acumulado	%
Media	.153	.08	3	15.0	15.0	70.0
D.E.	.050	.10	2	10.0	10.0	20.0
Mínimo	.080	.14	1	5.0	5.0	25.0
Máximo	.240	.15	2	10.0	10.0	35.0
		.16	4	20.0	20.0	55.0
		.18	3	15.0	15.0	70.0
		.19	2	10.0	10.0	80.0
		.20	2	10.0	10.0	90.0
		.24	1	5.0	5.0	95.0
		-----				
TOTAL			20	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 7,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido Acumulado	%
Media	.148	.10	1	5.6	5.6	5.6
D.E.	.019	.11	1	5.6	5.6	11.1
Mínimo	.100	.13	1	5.6	5.6	16.7
Máximo	.180	.14	1	5.6	5.6	22.2
		.15	9	50.0	50.0	72.2
		.16	2	11.1	11.1	83.3
		.17	2	11.1	11.1	94.4
		.18	1	5.6	5.6	100.0
		-----				
TOTAL			18	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 10

		Valor	Frecuencia	%	Válido Acumulado	%
Media	.143	.11	3	16.7	16.7	16.7
D.E.	.018	.13	2	11.1	11.1	27.8
Mínimo	.110	.14	1	5.6	5.6	33.3
Máximo	.170	.15	9	50.0	50.0	83.3
		.16	1	5.6	5.6	88.9
		.17	2	11.1	11.1	100.0
		-----				
TOTAL			18	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 2,5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.241	.20	1	6.3	6.3	6.3
D.E.	.024	.22	1	6.3	6.3	12.5
Mínimo	.200	.22	1	6.3	6.3	18.8
Máximo	.300	.23	5	31.3	31.3	50.0
		.24	2	12.5	12.5	62.5
		.25	1	6.3	6.3	68.8
		.26	4	25.0	25.0	93.8
		.30	1	6.3	6.3	100.0
		-----				
TOTAL			16	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 5

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.215	.18	1	5.9	5.9	5.9
D.E.	.027	.19	1	5.9	5.9	11.8
Mínimo	.180	.20	6	35.3	35.3	47.1
Máximo	.300	.21	1	5.9	5.9	52.9
		.22	4	23.5	23.5	76.5
		.23	2	11.8	11.8	88.2
		.24	1	5.9	5.9	94.1
		.30	1	5.9	5.9	100.0
		-----				
TOTAL			17	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 7,5

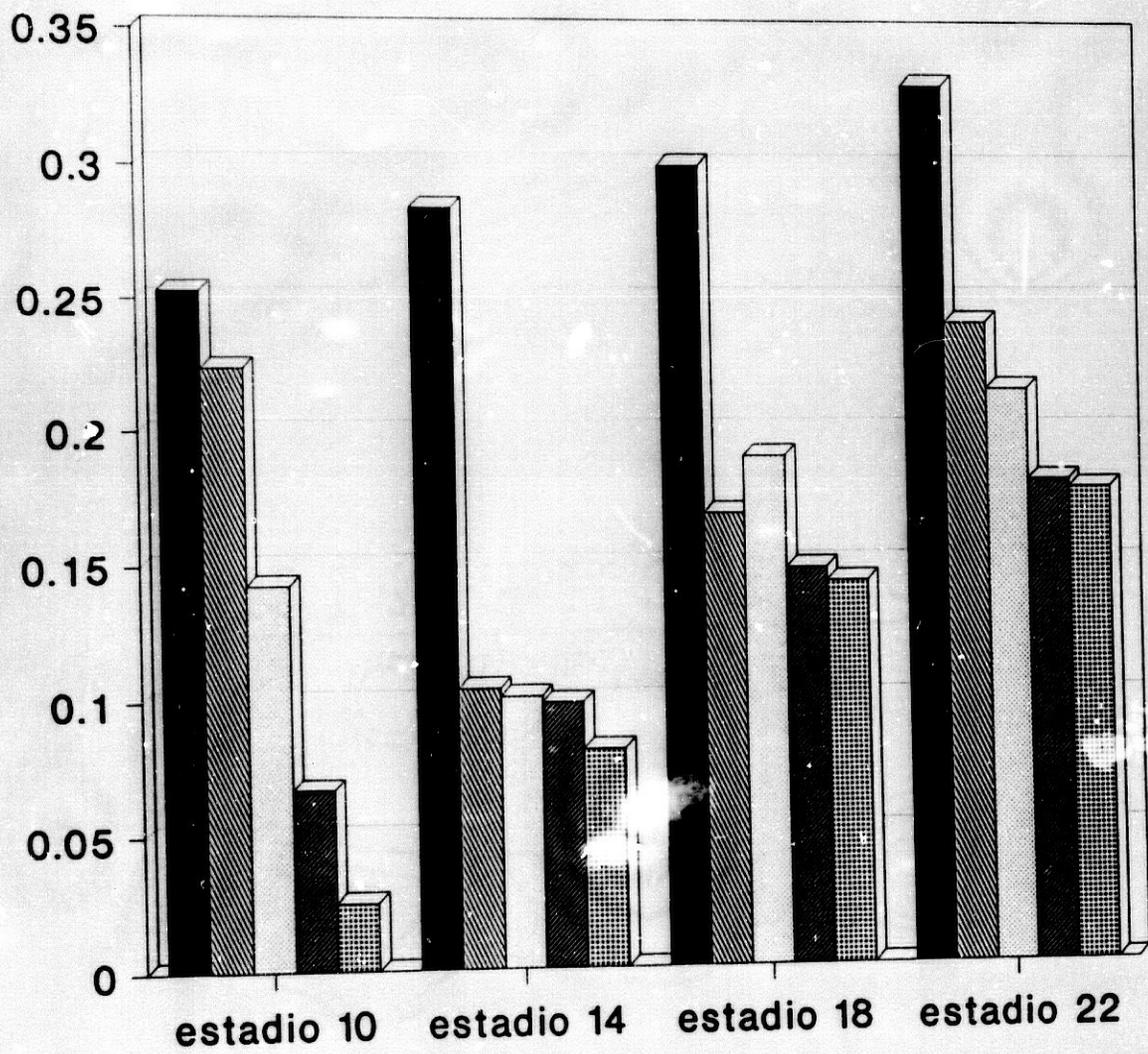
		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.181	.14	1	9.1	9.1	9.1
D.E.	.031	.15	2	18.2	18.2	27.3
Mínimo	.140	.16	1	9.1	9.1	36.4
Máximo	.250	.18	3	27.3	27.3	63.6
		.20	3	27.3	27.3	90.9
		.25	1	9.1	9.1	100.0
		-----				
TOTAL			11	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 10

		Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
Media	.178	.15	2	14.3	14.3	14.3
D.E.	.018	.17	3	21.4	21.4	35.7
Mínimo	.150	.18	7	50.0	50.0	85.7
Máximo	.220	.20	1	7.1	7.1	92.9
		.22	1	7.1	7.1	100.0
		-----				
TOTAL			14	100.0	100.0	

# peso embriones

## dosis y estadios



■ controles      ▨ dosis 2,5      □ dosis 5  
▩ dosis 7,5      ▤ dosis 10

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS DATOS OBTENIDOS EN LOS EMBRIONES SUPERVIVIENTES.

Procedemos a realizar nuestro estudio utilizando un paquete estadístico SPSS-PC, realizando análisis descriptivo de los datos (medias y desviaciones típicas en las variables cuantitativas y porcentajes en las cualitativas) agrupando los resultados por fases de desarrollo embrionario y dosis de Mitoxantrone utilizadas. Dicho análisis se representa gráficamente utilizando diagramas de barras (realizados con el programa Harvard Graphics).

Para comparar los efectos de las distintas dosis de Mitoxantrone sobre variables analizadas se emplea el análisis de la varianza de un factor (también denominado de una vía). Dicha prueba es una generalización de la prueba de la *t* de Student para datos independientes, pero apropiada para cualquier número de grupos; en nuestro estudio nos permitirá conocer si las medias de peso, longitud y volumen de los embriones difieren según las cuatro dosis de Mitoxantrone empleadas.

Así, para cada una de las variables de peso, longitud y volumen tenemos  $r (= 4)$  grupos de observaciones dependiendo de la dosis utilizada, por tanto podemos obtener una media global (independiente de la dosis utilizada) y una media en cada uno de los grupos (definidos de acuerdo a la dosis empleada).

La desviación de cada una de las observaciones respecto a la media global podemos separarla en dos partes:

$$y_{ij} - \bar{Y} = (y_{ij} - \bar{y}_i) + (\bar{y}_i - \bar{Y})$$

El primer término de la derecha es la desviación de una observación ( $y_{ij}$ ) respecto a su media de grupo,  $\bar{y}_i$ , y el segundo término es la desviación de la media del grupo respecto a la media general.

La idea base es que la variabilidad total de los datos es suma de dos variabilidades: la variabilidad de los datos "dentro" de cada muestra y la variabilidad existente "entre" las muestras. Si la hipótesis nula

fuera cierta, las dos varianzas que ocasionan coincidirían, siendo distintas en otro caso.

Si elevamos al cuadrado estas desviaciones y hacemos el sumatorio de todas las observaciones, obtenemos la suma de cuadrados total, que, al igual que antes, puede ser dividida en dos partes:

- a) la suma de cuadrados de las desviaciones de cada lectura alrededor de la media de su grupo de dosis correspondiente.
- b) la suma de cuadrados de las desviaciones de cada media de grupo alrededor de la media general (contándose una vez para cada observación).

Es decir  $SCT\ total = SCD\ dentro\ del\ grupo + SCE\ entre\ grupos.$

Si existen grandes diferencias entre las medias de los grupos, es probable que la SC entre grupos sea mayor que la SC intragrupos. Si por otra parte, todas las medias de grupos son casi iguales y aún existe una considerable variación intragrupos, es probable que suceda lo contrario. Por tanto, los tamaños relativos de las SC entregrupos e intragrupos ofrecen una oportunidad para valorar la variación entre las medias de los grupos en comparación con la variación intragrupos.

La variabilidad total de los datos se mide por la cantidad de SCT (suma de cuadrados total), siendo el numerador de la varianza de todos los datos como si fueran una sola muestra, por tanto, sus grados de libertad son  $N - 1$  ( $N =$  el número total de embriones en cada fase, independiente de la dosis de Mitoxantrone empleada).

La variabilidad entre las muestras se mide por la cantidad, SCE (suma de cuadrados entre). Como se calcula en base a  $r$  muestras, sus grados de libertad son  $r - 1$  (en nuestro caso,  $4 - 1 = 3$ ).

La variabilidad dentro de las muestras se mide por la cantidad de SCD (suma de cuadrados dentro), y se obtendrá por diferencia de la "total" a la "entre" (pues como hemos visto, la SCT era la suma de la SCE + SCD). Sus grados de libertad también se obtienen por diferencia o, equivalentemente, como  $N - r$ .

Las sumas de cuadrados anteriores son variabilidades brutas totales. Para obtener variabilidad promedio es preciso dividir cada SC por sus grados de libertad, obteniendo así las medias cuadradas; estas medias cuadradas son la varianza "entre" y la varianza "dentro".

Como la varianza "dentro" es mezcla de las varianzas de todas las muestras  $S^2$  será una estimación de la varianza con independencia de la  $H_0$ , sea cierta o no. Si la  $H_0$  es cierta, la variabilidad "entre" solo dependerá del azar, y así estimará también a la varianza.

El test de análisis de la varianza consiste en comparar ambas varianzas (entre y dentro) por el procedimiento clásico de la F de

Snedecor. La cantidad experimental es el cociente de las dos varianzas, la cantidad teórica es una F de las tablas de Snedecor; los grados de libertad son los de las dos varianzas divididas.

Si la razón de varianzas no es significativa o, incluso, si lo es ligeramente, tiene poco sentido examinar las diferencias entre pares de medias.

Si F es significativo, contamos con una evidencia razonable de que existen diferencias reales entre medias y que son lo suficientemente grandes para mostrarse por encima de la variación al azar. En este caso, conviene examinar las diferencias entre grupos al objeto de estudiar a qué se debe la significación encontrada.

De entre los diferentes métodos de estudio hemos seleccionado el de Student-Newman-Keuls. Este método -denominado secuencial- comienza ordenando las  $r$  medias de los grupos en orden ascendente y compara en primer lugar las dos medias extremas de entre las

r, luego las dos medias extremas de entre cada uno de los dos grupos de (r-1) medias consecutivas, y así sucesivamente con grupos de (r-2), (r-3), ... y 2 medias consecutivas. La ventaja del procedimiento es evidente: en cada paso el número de medias comparadas va disminuyendo, el valor de K también y, consecuentemente, el de t, siendo por tanto, más probable encontrar una significación.

A tenor de lo anteriormente expuesto procedemos seguidamente a reflejar los datos del estudio estadístico por nosotros efectuado para los embriones supervivientes en nuestro trabajo de investigación.

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

ESTADIO 10

LONGITUD

por DOSIS

		Análisis de la varianza			
P	Fuente	G.L.	Suma de cuadrados	Media cuadrados	F experim.
	Entre grupos	3	4.7377	1.5792	34.9540
.0000					
	Dentro del grupo	42	1.8976	.0452	
	Total	45	6.6353		

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Rangos para un nivel de significación de .050 -

2.86 3.43 3.78

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
 El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
 $.1503 * \text{Rango} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$

(\*) Denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

Media	Grupo	
.8000	Grp10	G G G G
.9429	Grp 7	r r r r
1.4787	Grp 2	p p p p
1.5750	Grp 5	l
		0 7 2 5
		* *
		* *

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

ESTADIO 14

		LONGITUD		Análisis de la varianza		
por		DOSIS		Suma de	Media	F
P	Fuente	G.L.		cuadrados	cuadrados	experim.
	Entre grupos	3		1.4371	.4790	22.3986
.0000						
	Dentro del grupo	50		1.0694	.0214	
	Total	53		2.5065		

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Rangos para un nivel de significación de .050 -

2.85 3.41 3.76

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
 El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
 $.1034 * \text{Rango} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$

(\*) Denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

Media	Grupo	
.9286	Grp10	G G G G
.9500	Grp 7	r r r r
1.0625	Grp 5	p p p p
1.3429	Grp 2	l
		0 7 5 2
		*
		* * *

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

ESTADIO 18

LONGITUD

por

DOSIS

Fuente	G.L.	Análisis de la varianza			
		Suma de cuadrados	Media cuadrados	F	P
Entre grupos .0003	3	.5120	.1707		7.2662
Dentro del grupo	66	1.5501	.0235		
Total	69	2.0621			

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Rangos para un nivel de significación de .050 -

2.83 3.39 3.73

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
El valor realmente comparado con la  $Media(J) - Media(I)$  es..  
 $.1084 * Rango * \sqrt{1/N(I) + 1/N(J)}$

(\*) Denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

Media	Grupo	
1.0200	Grp10	G G G G
1.0472	Grp 7	r r r r
1.1425	Grp 5	p p p p
1.2500	Grp 2	l
		0 7 5 2
		*
		* * *

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

ESTADIO 22

LONGITUD

por

DOSIS

P	Fuente	G.L.	Análisis de la varianza		
			Suma de cuadrados	Media cuadrados	F experim.
	Entre grupos .0000	3	.6745	.2248	27.8213
	Dentro del grupo	54	.4364	.0081	
	Total	57	1.1109		

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Rangos para un nivel de significación de .050 -

2.84 3.41 3.75

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
.0636 \* Rango \* Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

(\*) Denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

Media	Grupo	
1.2193	Grp10	G G G G
1.2273	Grp 7	r r r r
1.3294	Grp 5	p p p p
1.4856	Grp 2	1
		0 7 5 2
		* *
		* * *

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

ESTADIO 10

VOLUMEN  
por DOSIS

		Análisis de la varianza			
Fuente	G.L.	Suma d cuadrados	Media cuadrados	F	P
Entre grupos .0000	3	.1085	.0362	53.7912	
Dentro del grupo	42	.0282	.0007		
Total	45	.1367			

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Rangos para un nivel de significación de .050 -

2.86 3.43 3.78

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
.0183 \* Rango \* Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

(\*) Denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

Media	Grupo	
.0539	Grp10	G G G G
.0786	Grp 7	r r r r
.1200	Grp 5	p p p p
.1688	Grp 2	1
		0 7 5 2
		*
		* *
		* * *

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

ESTADIO 14

VOLUMEN

por DOSIS

P	Fuente	G.L.	Análisis de la varianza		
			Suma de cuadrados	Media cuadrados	F experim.
	Entre grupos .0440	3	.0075	.0025	2.9005
	Dentro del grupo	50	.0429	.0009	
	Total	53	.0503		

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Rangos para un nivel de significación de .050 -

2.85 3.41 3.76

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
.0207 \* Rango \* Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

(\*) Denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de

Media	Grupo	G G G G
.0757	Grp10	r r r r
.0850	Grp 7	p p p p
.0944	Grp 5	1
.1071	Grp 2	0 7 5 2

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

ESTADIO 18

VOLUMEN

por DOSIS

P	Fuente	G.L.	Análisis de la varianza		
			Suma de cuadrados	Media cuadrados	F experim.
	Entre grupos .3518	3	.0039	.0013	1.1090
	Dentro del grupo	66	.0769	.0012	
	Total	69	.0807		

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Rangos para un nivel de significación de .050

2.83 3.39 3.73

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.

El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
 $.0241 * \text{Rango} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$

No existen dos grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

ESTADIO 22

VOLUMEN

por DOSIS

P	Fuente	G.L.	Análisis de la varianza		
			Suma de cuadrados	Media cuadrados	F experim.
	Entre grupos .0006	3	.0214	.0071	6.7742
	Dentro del grupo	54	.0567	.0011	
	Total	57	.0781		

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Student-Newman-Keuls Procedure  
Rangos para un nivel de significación de .050 -

2.84 3.41 3.75

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
.0229 \* Rango \* Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

(\*) Denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

Media	Grupo	
.1971	Grp10	
.2036	Grp 7	
.2319	Grp 2	* *
.2429	Grp 5	* *

G G G G  
r r r r  
p p p p  
1  
0 7 2 5

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

ESTADIO 10

PESO

por DOSIS

P	Fuente	G.L.	Análisis de la varianza		
			Suma de cuadrados	Media cuadrados	F experim.
	Entre grupos .0000	3	.2397	.0779	117.2451
	Dentro del grupo	42	.0286	.0007	
	Total	45	.2683		

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Student-Newman-Keuls Procedure  
Rangos para un nivel de significación de .050 -

2.86 3.43 3.78

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
.0185 \* Rango \* Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

(\*) Denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

Media	Grupo	G G G G
.0250	Grp10	r r r r
.0671	Grp 7	p p p p
.1425	Grp 5	1
.2237	Grp 2	0 7 5 2
		*
		* *
		* * *

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

ESTADIO 14

PESO  
por DOSIS

P	Fuente	G.L.	Análisis de la varianza		
			Suma de cuadrados	Media cuadrados	F experim.
	Entre grupos .2840	3	.0045	.0015	1.3023
	Dentro del grupo	50	.0570	.0011	
	Total	53	.0614		

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Student-Newman-Keuls Procedure  
Rangos para un nivel de significación de .050 -

2.85 3.41 3.76

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
.0239 \* Rango \* Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

No existen dos grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

ESTADIO 18

PESO  
por DOSIS

		Análisis de la varianza			
P	Fuente	G.L.	Suma de cuadrados	Media cuadrados	F experim.
	Entre grupos .3074	3	.0258	.0086	1.2255
	Dentro del grupo	66	.4640	.0070	
	Total	69	.4899		

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Rangos para un nivel de significación de .050 -

2.83 3.39 3.73

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
 $.0593 * \text{Rango} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$

No existen dos grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

ESTADIO 22

por	PESO DOSIS	Análisis de la varianza			
Fuente	G.L.	Suma de cuadrados	Media cuadrados	F experim.	P
Entre grupos .0000	3	.0386	.0129	20.3074	
Dentro del grupo	54	.0342	.0006		
Total	57	.0729			

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Rangos para un nivel de .050 -

2.84 3.41 3.75

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
.0178 \* Rango \* Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

(\*) Denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

Media	Grupo	
.1779	Grp10	G G G G
.1809	Grp 7	r r r r
.2153	Grp 5	p p p p
.2406	Grp 2	l
		0 7 5 2
		* *
		* * *

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

		LONGITUD			
por		ESTADIO			
		Análisis de la varianza			
P	Fuente	G.L.	Suma de cuadrados	Media cuadrados	F experim.
	Entre grupos	3	2.3119	0.7706	14.0175
	Dentro del grupo	224	12.3148	0.0550	
	Total	227	14.6267		

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Rangos para un nivel de significación de .050 -

2.81 3.34 3.67

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
 El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
 $.1658 * \text{Rango} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$

(\*) Denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

Media	Grupo	
.8000	Grp14	G G G G
.9429	Grp10	r r r r
1.4787	Grp18	p p p p
1.5750	Grp22	1 1 1 2
		4 0 8 2
		* * *

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

por		VOLUMEN	Análisis de la varianza		
		ESTADIO			
P	Fuente	G.L.	Suma de cuadrados	Media cuadrados	F experim.
	Entre grupos	3	0.6494	0.2165	140.1884
.0000					
	Dentro del grupo	224	0.3459	0.0015	
	Total	227	0.9953		

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Rangos para un nivel de significación de .050 -

2.81 3.34 3.67

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
 El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
 $.1034 * \text{Rango} * \text{Sqrt}(1/N(I) + 1/N(J))$

(\*) Denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

Media	Grupo	
.9286	Grp10	G G G G
.9600	Grp14	r r r r
1.0625	Grp18	p p p p
1.3429	Grp22	l l l 2
		C 4 8 2
		* *
		* * *

ANÁLISIS DE LA VARIANZA DE UNA VÍA

PESO

por

ESTADIO

Fuente	G.L.	Análisis de la varianza		
		Suma de cuadrados	Media cuadrados	F experim. P
Entre grupos .0000	3	.4958	.1653	41.4820
Dentro del grupo	224	.8925	.0040	
Total	227	1.3884		

Búsqueda de significación: COMPARACIONES MÚLTIPLES POR EL MÉTODO DE STUDENT-NEWMAN-KEULS

Rangos para un nivel de significación de .050 -

2.81 3.34 3.67

Los rangos anteriores son la tabla de rangos.  
El valor realmente comparado con la Media(J)-Media(I) es..  
.0446\* Rango \* Sqrt(1/N(I) + 1/N(J))

(\*) Denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de .050

Media	Grupo	
0.0928	Grp10	G G G G
0.0965	Grp14	r r r r
0.1630	Grp18	p p p p
0.2067	Grp22	l l l l
		0 4 8 2
		* *
		* * *

## RESULTADOS DEL ANALISIS DE LA VARIANZA DE UNA VIA

Una vez aplicado el análisis de la varianza en los datos de longitud, volúmen y peso en los embriones supervivientes tras la administración de las dosis referidas de 2,5, 5, 7,5 y 10 microlitros hemos obtenido los siguientes resultados:

En relación a la longitud, y cuando dichos embriones se encontraban en el estadio 10 de H.H., el análisis de la varianza denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de 050 entre los embriones tratados con dosis de 2,5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 7,5 y 10 mcl., y los tratados con dosis de 5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 7,5 y 10 mcl.

Cuando los embriones se encontraban en el estadio 14 de H.H., el análisis de la varianza denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de 050 entre los embriones tratados con dosis de 2,5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 5, 7,5 y 10 mcl., y los tratados

con dosis de 5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 10 mcl.

Cuando los embriones se encontraban en el estadio 18 de H.H., el análisis de la varianza denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de 050 entre los embriones tratados con dosis de 2,5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 5, 7,5 y 10 mcl., y los tratados con dosis de 5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 10 mcl.

Cuando los embriones se encontraban en el estadio 22 de H.H., el análisis de la varianza denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de 050 entre los embriones tratados con dosis de 2,5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 5, 7,5 y 10 mcl., y los tratados con dosis de 5 mcl., respecto a los tratados con dosis de 7,5 y 10 mcl.

En relación al volúmen y cuando los embriones se encontraban en el estadio 10 de H.H., el análisis de la varianza denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de 050 entre los embriones tratados con dosis de 2,5 mcl. respecto a los tratados con dosis

de 5, 7,5 y 10 mcl.; los tratados con dosis de 5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 7,5 y 10 mcl. y los tratados con dosis de 7,5 respecto a los tratados con dosis de 10 mcl.

Cuando los embriones se encontraban en el estadio 14 de H.H. el análisis de la varianza denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de 050 entre los embriones tratados con dosis de 2,5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 10 mcl.

Cuando los embriones se encontraban en el estadio 18 de H.H. en el análisis de la varianza no existen grupos significativamente diferentes a un nivel de 050.

Cuando los embriones se encontraban en el estadio 22 de H.H. el análisis de la varianza denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de 050 entre los embriones tratados con dosis de 2,5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 7,5 y 10 mcl, y los tratados con

dosis de 5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 7,5 y 10 mcl.

Por último y en relación al peso y cuando los embriones se encontraban en el estadio 10 de H.H. el análisis de la varianza denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de 050 entre los embriones tratados con dosis de 2,5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 5, 7,5 y 10 mcl; los tratados con dosis de 5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 7,5 y 10 mcl. y los tratados con dosis de 7,5 respecto a los tratados con dosis de 10 mcl.

Cuando los embriones se encontraban en los estadios 14 y 18 de H.H., no existieron en el análisis de la varianza grupos significativamente diferentes a un nivel de 050.

Cuando los embriones se encontraban en el estadio 22 de H.H. el análisis de la varianza denota pares de grupos significativamente diferentes a un nivel de 050 entre los embriones tratados con dosis de 2,5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 5, 7,5 y 10 mcl, y los tratados con dosis de 5 mcl. respecto a los tratados con dosis de 7,5 y 10 mcl.

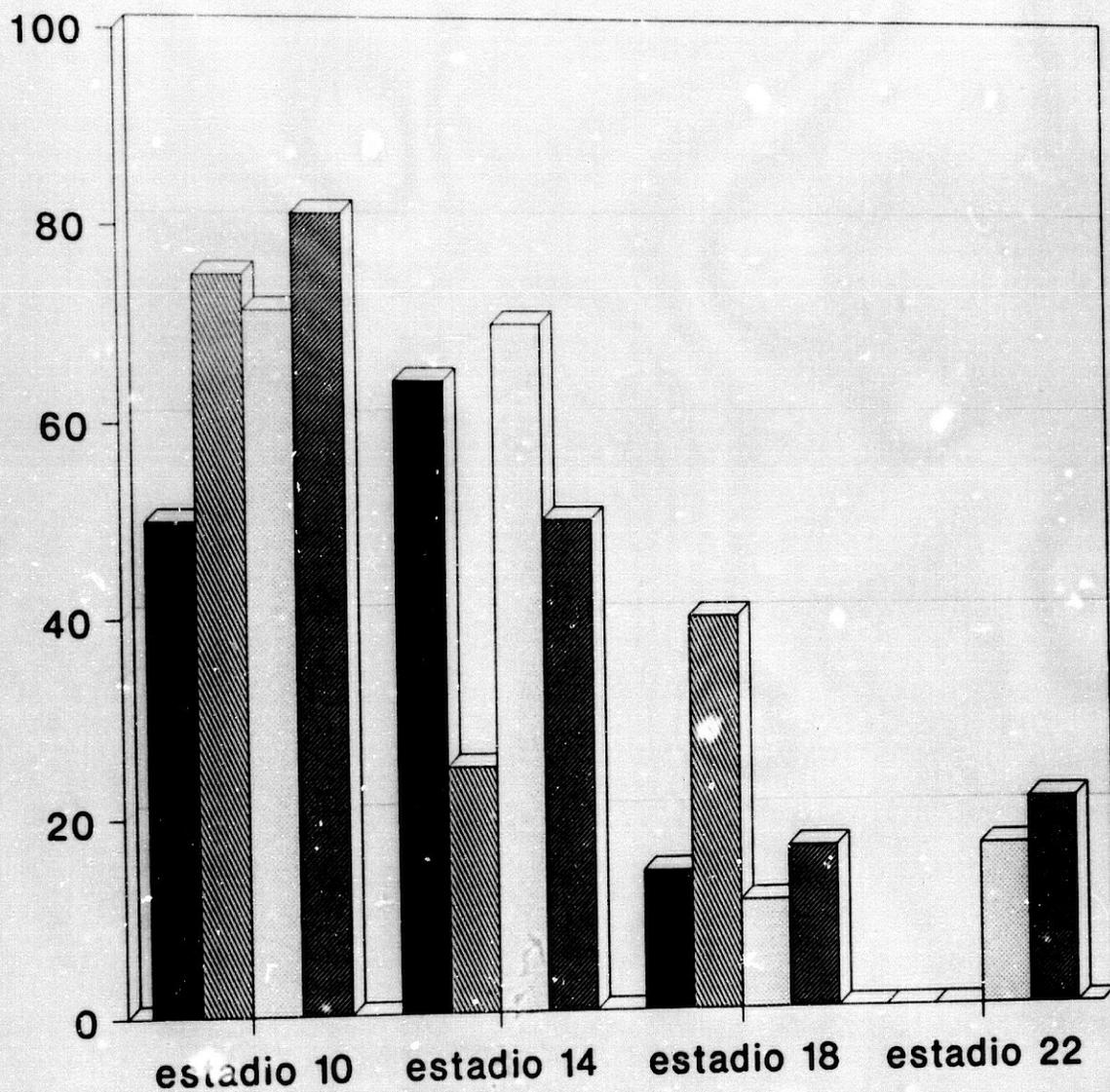
## ESTUDIO DE LAS MALFORMACIONES

Tal y como se refleja en el cuadro general de resultados, en nuestro trabajo de investigación hemos comprobado la producción, por parte del citostático objeto de nuestro estudio, el mitoxantrone, de una serie de alteraciones morfológicas en el desarrollo embrionario.

De manera general y tras agrupar el porcentaje global de embriones malformados por dosis y estadios hemos obtenido los siguientes resultados, que en aras de un mejor estudio comparado los representamos en diagrama de barras.

En el estudio de estos resultados hemos de hacer constar que no se han incluido aquellos embriones que transcurridas 48 horas de la administración, se encontraban muertos, por lo que estas cifras reflejan exclusivamente el estudio de las malformaciones acaecidas en los embriones supervivientes.

# % de malformaciones dosis y estadios



■ dosis 2,5  
□ dosis 7,5

▨ dosis 5  
▩ dosis 10

## DISTRIBUCION DE FRECUENCIAS DE LAS MALFORMACIONES OBTENIDAS

### ESTADIO 10 DOSIS 2,5

#### MALFORMACIÓN 1

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	4	50.0	50.0	50.0
tronco en "S"	1.00	4	50.0	50.0	100.0
TOTAL		8	100.0	100.0	

### ESTADIO 10 DOSIS 5

#### MALFORMACIÓN 1

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	2	25.0	25.0	25.0
tronco en "S"	1.00	6	75.0	75.0	100.0
TOTAL		8	100.0	100.0	

### ESTADIO 10 DOSIS 7,5

#### MALFORMACIÓN 1

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	4	28.6	28.6	28.6
tronco en "S"	1.00	8	57.1	57.1	85.7
atrofia cola	3.00	1	7.1	7.1	92.9
amorfo	4.00	1	7.1	7.1	100.0
TOTAL		14	100.0	100.0	

#### MALFORMACIÓN 2

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	8	57.1	57.1	57.1
extrofia cardíaca	2.00	3	21.4	21.4	78.6
microcefalia	5.00	2	14.3	14.3	92.9
microftalmia bilat	6.00	1	7.1	7.1	100.0
TOTAL		14	100.0	100.0	

#### MALFORMACIÓN 3

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	12	85.7	85.7	85.7
atrofia cola	3.00	1	7.1	7.1	92.9
anofthalmia	7.00	1	7.1	7.1	100.0
TOTAL		14	100.0	100.0	

ESTADIO 10 DOSIS 10

MALFORMACIÓN 1

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	4	25.0	25.0	25.0
tronco en "S"	1.00	12	75.0	75.0	100.0
TOTAL		16	100.0	100.0	

MALFORMACIÓN 2

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	15	93.8	93.8	93.8
microftalmia izqda	8.00	1	6.3	6.3	100.0
TOTAL		16	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 2,5

MALFORMACIÓN 1

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	5	35.7	35.7	35.7
tronco en "S"	1.00	6	42.9	42.9	78.6
atrofia cola	3.00	2	14.3	14.3	92.9
microftalmia izqda	8.00	1	7.1	7.1	100.0
TOTAL		14	100.0	100.0	

MALFORMACIÓN 2

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	13	92.9	92.9	92.9
microftalmia izqda	8.00	1	7.1	7.1	100.0
TOTAL		14	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 5

MALFORMACIÓN 1

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	12	75.0	75.0	75.0
tronco en "S"	1.00	3	18.8	18.8	93.8
hemorragia cefálica	9.00	1	6.3	6.3	100.0
TOTAL		16	100.0	100.0	

MALFORMACIÓN 2

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	15	93.8	93.8	93.8
hemorragia cefálica	9.00	1	6.3	6.3	100.0
TOTAL		16	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 7,5

MALFORMACIÓN 1

Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	4	40.0	40.0	40.0
atrofia cola	3	30.0	30.0	70.0
anoftalmia	3	30.0	30.0	100.0
TOTAL	10	100.0	100.0	

MALFORMACIÓN 2

Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	8	80.0	80.0	80.0
anoftalmia	2	20.0	20.0	100.0
TOTAL	10	100.0	100.0	

MALFORMACIÓN 3

Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	9	90.0	90.0	90.0
microcefalia	1	10.0	10.0	100.0
TOTAL	10	100.0	100.0	

ESTADIO 14 DOSIS 10

MALFORMACIÓN 1

Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	7	50.0	50.0	50.0
tronco en "S"	3	21.4	21.4	71.4
microftalmia bilat	2	14.3	14.3	85.7
anoftalmia	2	14.3	14.3	100.0
TOTAL	14	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 2,5

MALFORMACIÓN 1

Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	12	85.7	85.7	85.7
atrofia cola	2	14.3	14.3	100.0
TOTAL	14	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 5

MALFORMACIÓN 1

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	16	80.0	80.0	80.0
atrofia cola	3.00	2	10.0	10.0	90.0
microftalmia bilat.	7.00	2	10.0	10.0	100.0
TOTAL		20	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 7,5

MALFORMACIÓN 1

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	16	88.9	88.9	88.9
atrofia cola	3.00	2	11.1	11.1	100.0
TOTAL		18	100.0	100.0	

ESTADIO 18 DOSIS 10

MALFORMACIÓN 1

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	15	83.3	83.3	83.3
atrofia cola	3.00	3	16.7	16.7	100.0
TOTAL		18	100.0	100.0	

MALFORMACIÓN 2

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	17	94.45	94.45	94.45
microftalmia unilat.	8.00	1	5.55	5.55	100.0
TOTAL		18	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 2,5

MALFORMACIÓN 1

	Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	0.0	16	100.0	100.0	100.0
TOTAL		16	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 5

MALFORMACIÓN 1

Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	17	100.0	100.0	100.0
TOTAL	17	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 7,5

MALFORMACIÓN 1

Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	9	81.8	81.8	81.8
atrofia cola	1	9.1	9.1	90.9
anofthalmia	1	9.1	9.1	100.0
TOTAL	11	100.0	100.0	

ESTADIO 22 DOSIS 10

MALFORMACIÓN 1

Valor	Frecuencia	%	Válido %	Acumulado %
normal	11	78.6	78.6	78.6
atrofia cola	3	21.4	21.4	100.0
TOTAL	14	100.0	100.0	

Como se puede apreciar el mayor porcentaje de malformaciones apareció en el estadio 10 de H.H. y el estadio 14 de H.H disminuyendo considerablemente en el estadio 18 de H.H. y llegando a desaparecer para la dosis de 2,5 y 5 en el estadio 22 de H.H.

Tras esta visión general del porcentaje de malformaciones encontrado, pasemos al estudio individualizado de las malformaciones obtenidas.

Obviamente reflejar en nuestra iconografía la totalidad de los embriones, por nosotros estudiados, supondría adjuntar un volúmen de fotografías que completaría varios álbumes, lo cual resultaría excesivamente gravoso por lo innecesario; dado que las malformaciones por nosotros obtenidas se han repetido en las diferentes dosis y estadíos, en ocasiones aisladas en otras asociadas de forma variable, hemos considerado efectuar una selección de los embriones cuyas malformaciones resultan representativas de las encontradas en el conjunto de las diversas dosis y estadíos que han constituido nuestro trabajo de investigación.

Asimismo hemos de hacer constar que la malformación más frecuente y que apareció en la práctica totalidad de los embriones corresponde a la microsomnia, pero no cabe duda que esta queda claramente puesta de manifiesto en la comparación de las cifras de peso, volumen y longitud de las tablas de resultados, a ser comparadas con las de los

embriones testigos, por ello en este apartado no incluimos iconografía comparada.

Fig. 1 y 1a

Embrión al que se le administraron 10 mcl de mitoxantrone cuando se encontraba en el estadio 10 de H.H. de desarrollo.

En la figura 1, se aprecia la fuerte inflexión que presenta a nivel del tronco, lo que hemos dado en denominar "Tronco en S", anomalía esta que se presentó con una elevada frecuencia en los estadios 10 y 14 de H.H., no así en los estadios 18 y 22 de H.H. donde no apareció ningún caso.

En la figura 1a, perteneciente al lado izquierdo del mismo embrión comprobamos la existencia de una discreta microftalmia unilateral en este lado, y que pudimos observar que se verifica a expensas de un menor crecimiento de la cúpula retiniana, no así de la placoda cristaliniiana que mantenía un diámetro similar en ambos lados hecho este que pudimos comprobar en la generalidad de los casos de microftalmia unilateral, como el que observamos. Asimismo hemos de hacer constar que los casos de microftalmia por nosotros obtenidos aparecieron en el estadio 10 ó 14 de H.H., solo un caso en el estadio 18 de H.H. y ninguno en el estadio 22 de H.H., y siempre en el lado izquierdo.

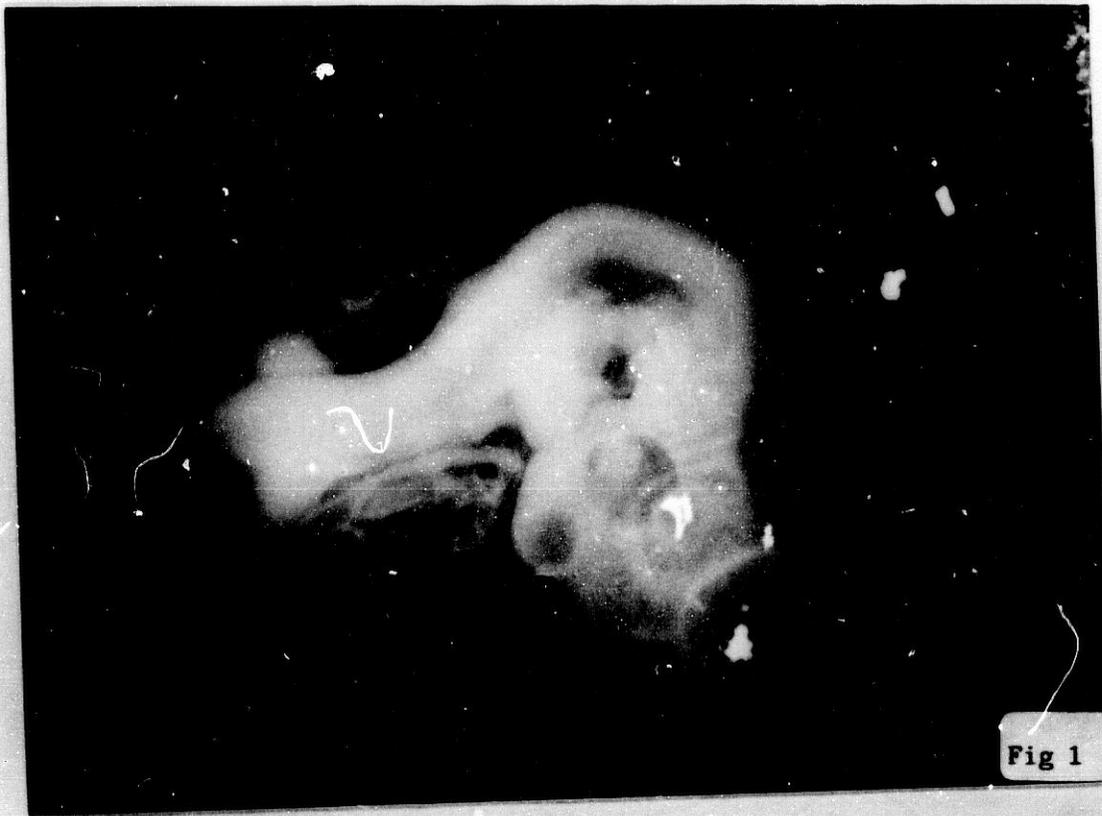


Figura 2 y 2a

Embrión al que se le administraron 10 mcl de mitoxantrone cuando se encontraba en el estadio 14 de H.H. de desarrollo.

En la figura 2 observamos el embrión completo, ya fijado en formol al 15%, inmediatamente antes de ser incluido en parafina, y en el que se aprecia claramente la fuerte inflexión del Tronco, "Tronco en S".

La figura 2a, corresponde a un plano de sección perteneciente a este mismo embrión, que interesa a la zona de inflexión truncal y en el que se aprecia la doble imagen medular, letras M, y la doble imagen notocordal, letras N, asimismo apreciamos una notocorda arrosariada con evidentes signos de lisis lo que concuerda con una clara afectación mesodérmica.



Fig 2

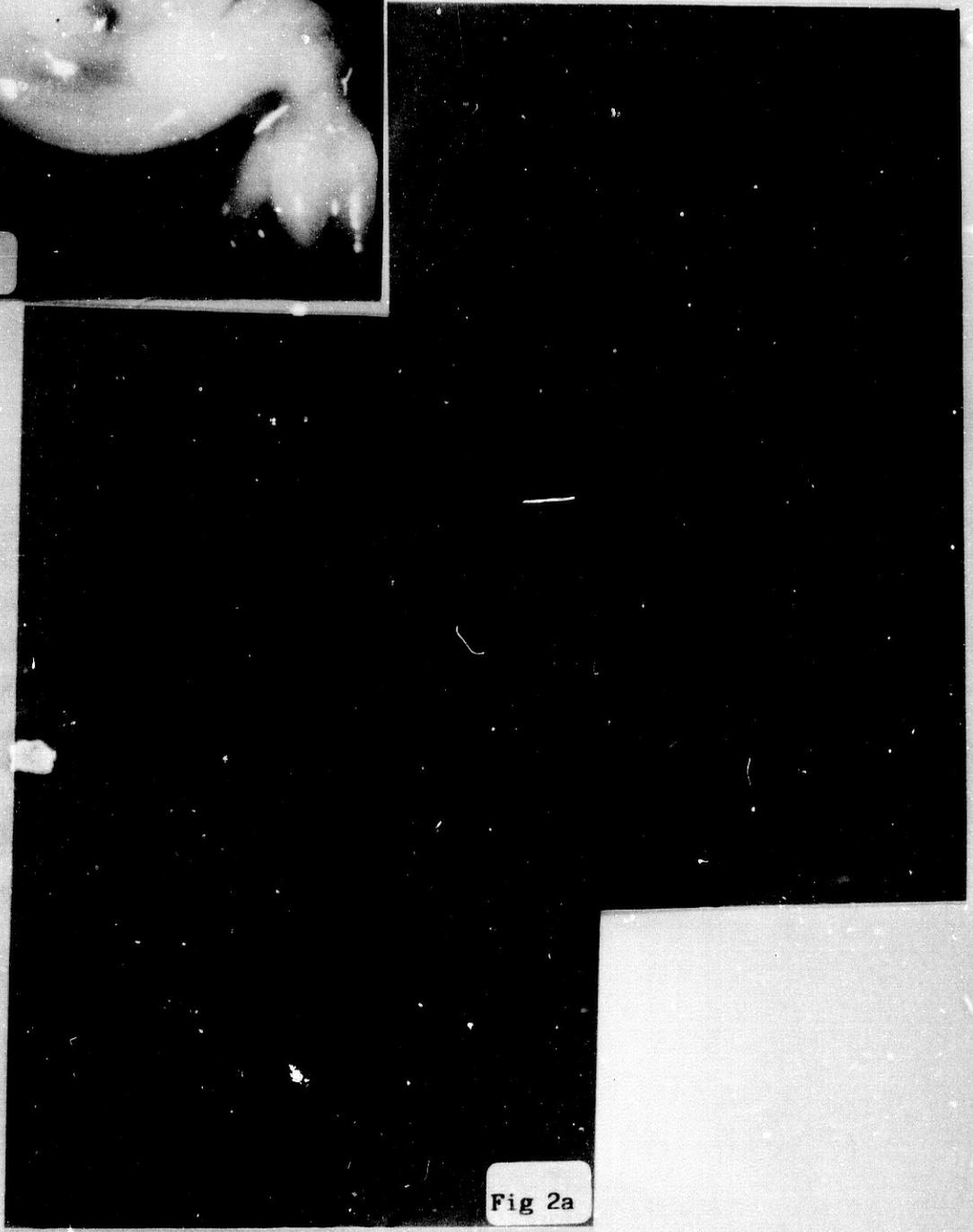


Fig 2a

*[Handwritten scribble]*

✓

### Figuras 3 y 4

Corresponden estas figuras a dos embriones a quienes se administró 7,5 mcl de mitoxantrone cuando se encontraban en el estadio 10 de H.H. de desarrollo, y representan dos tipos diferentes de asociación malformativa que incluye la inflexión del tronco.

En la figura 3, observamos el único caso de inflexión truncal a nivel cervical asociado a una microcefalia y anoftalmia bilateral por una grave alteración en el desarrollo de las vesículas encefálicas.

En la figura 4, se aprecia una leve inflexión truncal en este caso asociada a una agenesia de cola y ligera despigmentación retiniana.



Fig 3



Fig 4

Figuras 5 y 5a

Ambas figuras corresponden al mismo embrión, al que se administraron 7,5 mcl de mitoxantrone cuando se encontraba en el estadio 14 de H.H. de desarrollo.

En este embrión se apreció una marcada microsomnia, y se observa una discreta inflexión del tronco acompañada de agenesia de cola, no obstante la mayor alteración corresponde al polo cefálico donde podemos apreciar una microcefalia con agenesia bilateral de vesículas ópticas, anoftalmia, alteración esta última que encontramos casi exclusivamente en el estadio 14 de H.H. de desarrollo y para las dosis de 7,5 mcl y 10 mcl.

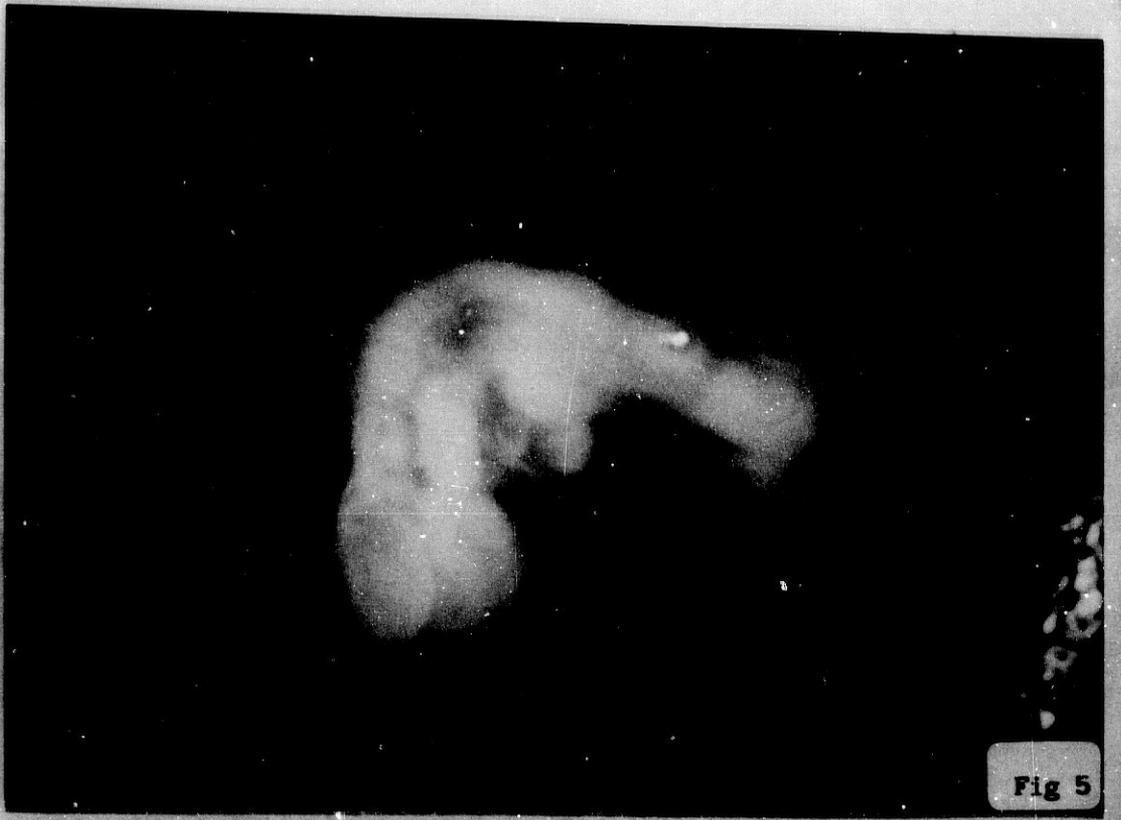


Fig 5



Fig 5a

Figuras 6 y 6a

Corresponden ambas imágenes a un embrión al que se administró 2,5 mcl cuando se encontraba en el estadio 14 de H.H. de desarrollo.

En el que se observa la existencia de una agenesia de cola con una morfología normal a nivel del tronco.

A nivel ocular se aprecia una ligera microftalmia bilateral, pero llama la atención en la figura 6a correspondiente al lado izquierdo del embrión, la existencia de una ligera atrofia del cristalino de este lado en comparación con el del lado derecho que presenta un diámetro mayor.



Figuras 7 y 7a

Ambas imágenes corresponden al mismo embrión al que se administraron 10 mcl cuando se encontraba en el estadio 18 de H.H. de desarrollo.

Este embrión constituye una clara representación de las dos malformaciones que aparecieron en los embriones de los estadios 18 y 22 de H.H., la atrofia caudal y la microftalmia uni o bilateral.

En el caso que nos ocupa coinciden ambas malformaciones, la atrofia de cola y la microftalmia concretamente unilateral y que afecta al globo ocular del lado izquierdo, la comparación con el del lado derecho pone de manifiesto esta marcada microftalmia.

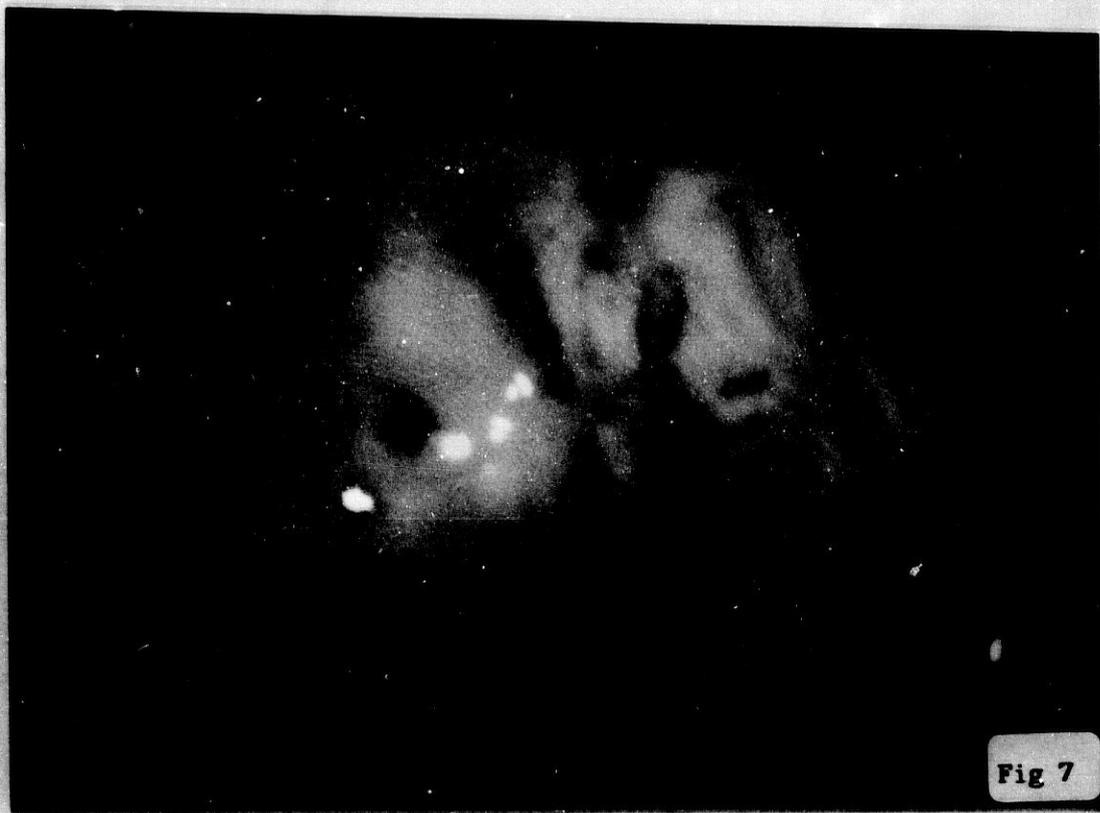


Fig 7

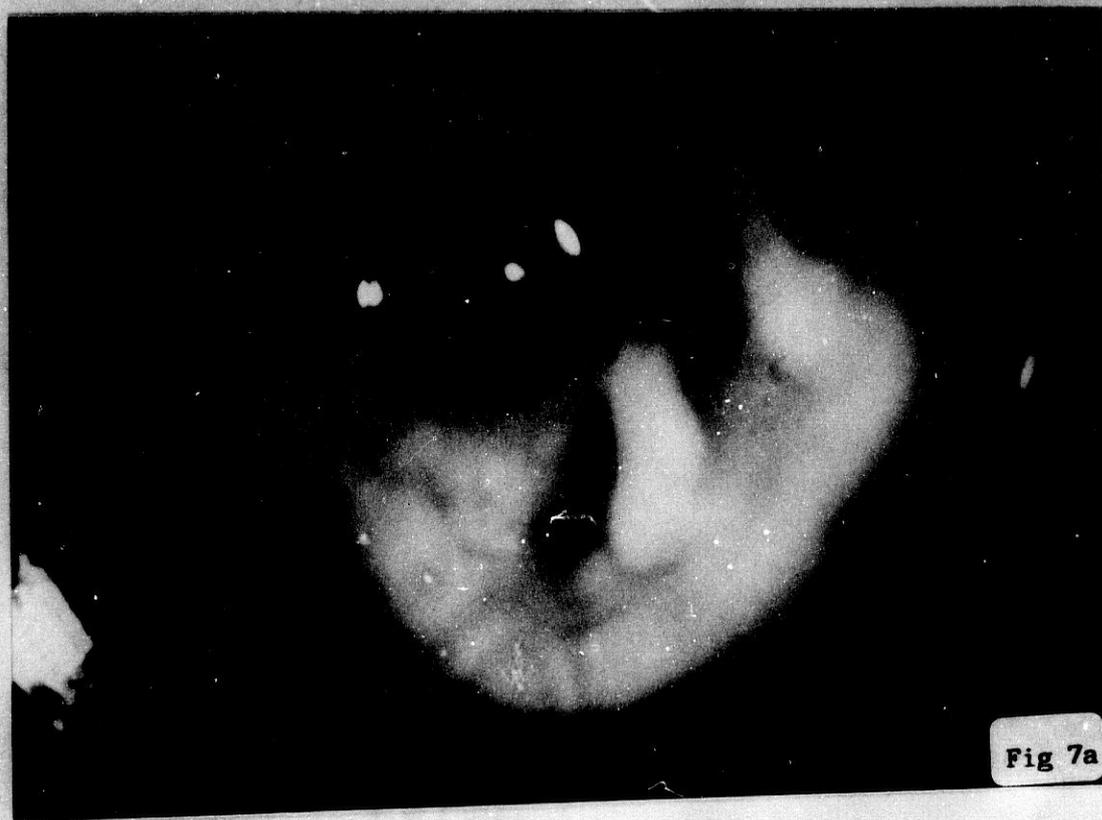


Fig 7a

5

Amén de las malformaciones anteriormente expuestas en el presente trabajo de investigación hemos obtenido una alteración del desarrollo que se ha evidenciado en la práctica totalidad de los embriones supervivientes, nos referimos a la microsomia que de forma general ha aparecido en todos los estadíos y para todas las dosis, encontrando un menor volúmen y un menor peso en los embriones tratados que en los embriones testigos, por ello les mostramos seguidamente los cuadros de medias y porcentajes de volúmen y pesos según estadíos y dosis y que consideramos suficientemente aclarativos de dicha alteración en el desarrollo:

V O L U M E N (en c.c.)

<u>Estadío</u>	<u>Testigos</u>	<u>2,5 mcl</u>	<u>5 mcl</u>	<u>7,5 mcl</u>	<u>10 mcl</u>
10	0.18	0.169	0.120	0.079	0.034
14	0.22	0.107	0.094	0.085	0.074
18	0.25	0.157	0.156	0.143	0.138
22	0.29	0.232	0.220	0.204	0.197

P E S O (en gr.)

<u>Estadío</u>	<u>Testigos</u>	<u>2,5 mcl</u>	<u>5 mcl</u>	<u>7,5 mcl</u>	<u>10 mcl</u>
10	0.253	0.224	0.143	0.080	0.025
14	0.28	0.104	0.101	0.099	0.081
18	0.30	0.169	0.153	0.148	0.143
22	0.33	0.241	0.215	0.181	0.178

Para una mejor comprensión de la pérdida de peso y volúmen de los embriones tratados con Mitoxantrone en relación con los testigos les presentamos los cuadros comparativos de la media de los porcentajes de volúmen y peso considerando el 100% a la media obtenida en los testigos:

VOLUMEN

<u>Estadío</u>	<u>2.5 mcl</u>	<u>5 mcl</u>	<u>7.5 mcl</u>	<u>10 mcl</u>
10	93.8%	66.6%	43.8%	18.8%
14	48.6%	42.7%	38.6%	33.6%
18	62.8%	62.4%	57.2%	55.2%
22	80.0%	75.8%	70.3%	67.9%

PESO

<u>Estadío</u>	<u>2.5 mcl</u>	<u>5 mcl</u>	<u>7.5 mcl</u>	<u>10 mcl</u>
10	88.5%	56.5%	31.6%	9.8%
14	37.1%	36.0%	35.3%	28.9%
18	56.3%	51.0%	49.3%	47.6%
22	73.0%	65.1%	54.8%	53.9%

DISCUSSION

Como reflejamos en el capítulo de introducción, no hemos encontrado artículos o publicaciones de investigadores interesados en el efecto que la sustancia objeto de nuestro estudio, el Mitoxantrone, ejerce en el desarrollo del embrión de ave, por ello carecemos de datos con los que cotejar los resultados por nosotros obtenidos. No obstante, trataremos de efectuar un análisis, no solo del efecto global del Mitoxantrone, sino de las malformaciones por nosotros obtenidas en nuestro trabajo de investigación. Como se indica en la monografía del Novantrone que los Laboratorios Lederle, sintetizadores y distribuidores de esta sustancia, facilitan a los profesionales de la Medicina, el Novantrone ejerce efectos profundos sobre la célula que en última instancia provocan su destrucción. Sin embargo, está todavía pendiente de determinar cuál es con precisión el "suceso letal", si es que efectivamente se produce uno solo de tales sucesos, y qué sucede cronológicamente antes de la citolisis.

Según esta afirmación, el Mitoxantrone produciría la destrucción del 100% de las células, y porcentajes inferiores solo se podrían achacar a la escasez en la dosis administrada, es decir que partiendo de una

dosis, todo aumento de ésta conlleva un aumento de la citolisis, lo que en teoría resulta bastante lógico.

Pues bien, nosotros no podemos desmentir que así suceda en cultivos celulares aislados, pero no podemos estar de acuerdo en cuanto a organismo en desarrollo se refiere, a tenor del análisis de los resultados obtenidos en nuestro trabajo de investigación. Veamos el cuadro de supervivencia de embriones por dosis y estadíos, de ser cierta, en embriones, esta afirmación, al aumentar la dosis en un mismo estadio el porcentaje de supervivencia disminuiría y obviamente esto no sucede en ninguno de los cuatro estadíos por nosotros estudiados. Pero como dice TUCHMANN-DUPLESSIS, 1984, la toxicidad de un compuesto para el embrión puede manifestarse por la muerte de la camada o por la aparición de malformaciones, si bien estos dos efectos no siempre van unidos. Si observamos el cuadro global del porcentaje de embriones malformados, tampoco podemos afirmar que un aumento de dosis conlleve un aumento de las malformaciones, dado que esta relación solo existe en los estadíos 10 y 22 de H.H., pero no en los estadíos 14 y 18 de H.H.

Pero entonces cabe preguntarse: ¿Es el Mitoxantrone el responsable de la toxicidad en los embriones por nosotros estudiados?, consideramos que sí, y la aclaración creemos haberla hallado en el mecanismo íntimo de su efecto celular. Según BOWDEN y cols., 1985 "El Mitoxantrone se fija intensamente al DNA, según los diagramas de Scatchard éste presenta dos lugares de fijación: Se cree que el lugar más fuerte representa la intercalación y que el lugar más débil representa la fijación electrostática de los grupos NH y OH de la cadena lateral del Mitoxantrone a la columna vertebral fosfática de la espiral del DNA", si esta fijación fuese tan intensa, toda célula en contacto con Mitoxantrone indefectiblemente llegaría a la citolisis y obviamente creemos que no es así, y en este sentido consideramos más acertados los trabajos de LOWN y cols., 1985, que comprobaron que el Mitoxantrone solo se fija intensamente cuando la hendidura principal es bloqueada pero menos efectivamente cuando la solución recaía en la hendidura secundaria, en cuyo caso la unión resultaría labil y reversible. El factor determinante de la unión a la hendidura principal, secundaria, o simultáneamente en ambas, no ha sido aclarado por ningún autor de los por nosotros consultados. Ahora bien, si consideramos

a la célula de forma aislada, por ejemplo en cultivos celulares, las afirmaciones de Bowden, seran ciertas puesto que dependerían en principio, exclusivamente de la dosis administrada, pero en nuestro caso, cuando actuamos sobre órganos en formación e incluso cuando se actúa sobre estructuras celulares complejas, estas afirmaciones resultan inciertas, y creemos que esto es así por dos motivos fundamentalmente:

El primero lo constituiría los factores de inducción del desarrollo embrionario, los cuales obviamente han de influir por modificación en la acción o por competencia en el efecto que un tóxico celular, en nuestro caso el Mitoxantrone, ejerce.

Y en segundo lugar no hemos de olvidar que las células poseen mecanismos de regeneración enzimática, especialmente durante el período organogénético son capaces de regenerar los segmentos dañados o inmovilizados del DNA, es decir que ante la lesión de las cadenas de DNA se oponen los mecanismos de regeneración enzimática, DE VITA, 1.978, que indudablemente condicionan el efecto citostático, y que constituyen uno

de los factores, quizás el más importante, de los que conforman la susceptibilidad del individuo al fármaco.

De manera general dos tendencias engloban el efecto de las sustancias citostáticas en el desarrollo embrionario, para unos como KELLER y cols. 1.983, producirían embriotoxicidad al considerar que "sólo condicionan muerte, ya que alteran en su práctica totalidad los mecanismos vitales", mientras que otros, KOPF-MAIER y cols., 1.985, interpretan que su acción altera iniciales mecanismos morfogénicos que condicionan e incluso destruyen el patrón de desarrollo, aunque no el vital; esto es, son teratógenos.

En nuestro trabajo el Mitoxantrone ha mostrado producir lo que STAPLES y WILSON, 1.979, llaman toxicidad sobre el desarrollo, manifestada por la producción de letalidad embrionaria, pues ha producido la muerte de un número significativo de embriones, y de toxicidad embrionaria, ya que ha sido muy frecuente y casi general encontrar un tamaño muy reducido, microsomnia, en los embriones supervivientes.

Además coincidiendo con JONHSON, 1.984, el cociente entre toxicidad en el animal adulto y la toxicidad del desarrollo (A/D) resulta ser  $> 1$ , por lo que el embrión se daña a unos niveles inferiores a los que resultan tóxicos para el adulto, nosotros hemos podido confirmar este extremo, dado que el porcentaje de embriones malformados ha disminuído progresivamente para las mismas dosis al aumentar el estadio de aplicación.

Se puede comprobar que dentro de un mismo grupo de embriones, igual dosis, igual estadio, y en las mismas condiciones de incubación, ha sido muy frecuente la producción de distintos tipos de efectos, así prácticamente todos los grupos de embriones tratados con Mitoxantrone tenían embriones vivos normales y embriones muertos, a veces en distinto estadio de degeneración, y embriones con diferentes tipos de malformación. En relación a esto podríamos considerar que el Mitoxantrone sea un agente fase-específico, por lo que su acción teratógena dependería de un umbral determinado por el número de células que entran en la fase sensible durante el tiempo en que el agente está presente. Si esto ocurre al comienzo de la ola de multiplicación de un estadio de

organogénesis, es fácil imaginar cómo una pequeña diferencia en el comienzo de la ola en los embriones de un mismo grupo puede modificar los efectos citostáticos del agente TUCHMANN-DUPLESSIS, 1.984.

Asimismo hemos de tener en cuenta que el ritmo de replicación del DNA no es constante en las diferentes etapas del desarrollo, según NRUBERT y cols., 1.980, el ritmo de réplica del DNA en el embrión aumenta mil veces sobre el mecanismo genético durante los dos o tres primeros días del comienzo de la organogénesis, para mantenerse hasta el estadio de diferenciación organogénica y decrecer únicamente a partir de la fase de crecimiento. En nuestra investigación hemos comprobado cómo efectivamente el Mitoxantrone ha provocado la mayor tasa de embrioletalidad en los estadios 10 y 14 de H.H., para disminuir y en una dosis desaparecer en los estadios 18 y 22 de H.H. Idénticos resultados, y consideramos que por idéntico motivo, se comprueban tras el estudio del porcentaje de embriones malformados, cuya máxima incidencia se apreció en el estadio 10 de H.H., disminuyó en el estadio 14 de H.H. y llega a prácticamente desaparecer en el estadio 22 donde la práctica totalidad de

los embriones supervivientes presentaban una morfología normal.

No obstante, el análisis global del efecto del Mitoxantrone en el embrión de ave, no se puede considerar tan puntual en el tiempo ni tan específico de la sustancia, habida cuenta que las malformaciones observadas se localizan y son dependientes en estructuras con diferente patrón organogénico: Extrofia cardíaca, Tronco en "S", Atrofia de cola, Microftalmia, Anoftalmia, Microcefalia.... etc.; más bien podría provocar una alteración en fases iniciales del desarrollo de un grupo celular, posiblemente diferenciado específicamente de una lámina, y la posible alteración no sólo de los derivados de ella, sino de los inducidos y reactivos a la misma. Tal vez, este sea uno de los mecanismos causales de la acción teratogénica del Mitoxantrone, ya que el posible bloqueo del metabolismo del DNA alteraría o modificaría el patrón de aquellas áreas con un mayor índice de crecimiento y diferenciación, presentando en este sentido una aparente selectividad al "critical time" organogénico.

Aún así, no hemos de olvidar que el efecto citotóxico del

Mitoxantrone, como agente bloqueante de la duplicación de las cadenas de DNA, ha de estar íntimamente relacionado con la fase del ciclo de multiplicación celular en el momento preciso de su aplicación. En este sentido, KOHLER, 1.979, realizó unos interesantes estudios sobre la cinética celular embrionaria y comprobó que la velocidad del ciclo generativo de la célula varia con considerable rapidez en el curso de la vida del embrión. En ratas, por ejemplo, comprobó que entre el día 11 y 12 la célula tiene un crecimiento exponencial y la duración del ciclo completo es de 8 horas (tres generaciones celulares en 24 horas). Durante este período la fase G<sub>1</sub> está probablemente ausente, mientras que la mayor parte de las células están en fase G<sub>2</sub> y S tardía. Según los trabajos de KAPUSCINSKI y cols., 1.981, las células bloqueadas en la fase G<sub>2</sub> contienen mayores cantidades de RNA en comparación con las normales. Dado que el Mitoxantrone se une por intercalación entre pares de bases al DNA y al RNA de espiral simple y de doble espiral, y puesto que por estas fechas, como hemos visto, la mayor parte de las células se encuentran en fase G<sub>2</sub> (de máxima concentración de RNA), no es de extrañar que la unión del Mitoxantrone se efectúe con el RNA o al menos en un mayor porcentaje, con lo que la célula podría

funcionar y producir sus proteínas vitales, mientras persistieran sus existencias de RNA, con lo que la célula estaría abocada bien a la recuperación del RNA dañado mediante los procesos de regeneración enzimática o bien se abocaría a la muerte celular, en ambos casos, podría tener lugar un bloqueo del ciclo celular antes de que puedan ser evidentes efectos del fármaco sobre el DNA. Este podría constituir otro de los mecanismos de producción de alteraciones embrionarias, concretamente podría explicar el altísimo porcentaje de aparición de microsomías, sin otras malformaciones asociadas, que en nuestro trabajo de investigación hemos encontrado.

En definitiva, hemos de estar de acuerdo con autores como UNDERWOOD y cols., 1.970 o TUCHMANN-DUPLESSIS, 1.984, cuando afirman que cualquiera que sea el mecanismo general que produce el efecto nocivo sobre el producto de la concepción, la acción teratogénica resulta en un deterioro de los procesos normales de desarrollo y la respuesta final depende principalmente de la susceptibilidad del animal, que es muy variable. Algunas especies son muy resistentes a un factor y sensibles a

otro, igual ocurre con las razas de la misma especie, incluso dentro de una misma camada se producen estas diferencias, y así unos embriones son normales, otros están muertos y otros presentan malformaciones. Esto puede ser explicado, al menos parcialmente, sobre la base de diferencias genéticas y según el momento en que el factor actúa mediante un particular tipo de interacción.

## ANALISIS DE LAS MALFORMACIONES OBTENIDAS

Las alteraciones por nosotros observadas en nuestro trabajo de investigación, vienen, de modo general, a agruparse en dos, en dependencia a su posible mecanismo teratogénico:

- a) Detención en el crecimiento
- b) Destrucción de estructuras ya formadas.

El exacto conocimiento y dependencia de una u otra posibilidad en un número determinado de casos ofrece gran dificultad, no obstante en la mayoría de las malformaciones la hipótesis señalada como detención del crecimiento, parece ser que para determinadas sustancias tiene una mayor validez, lo que erróneamente podría considerarla como causa mediata e incluso directa de malformaciones. Tal criterio, como indica BELON, J., 1.990, sin embargo no es cierto y no puede ser aceptado plenamente ya que el proceso de "afectación única y primaria" condiciona necesariamente bloqueos en los mecanismos de diferenciación, crecimiento

e interacciones morfológicas, a la vez que alteraciones, siempre condicionantes, en el metabolismo tisular y enzimático de estructuras celulares en fases de determinación.

No obstante, esta primera hipótesis, independientemente del mecanismo íntimo de su producción, coincide plenamente con la alteración del desarrollo que mayor incidencia ha tenido, con diferencia, en los embriones por nosotros tratados con Mitoxantrone, y nos referimos a la aparición prácticamente generalizada de microsomias, es decir la detención global del embrión, en ocasiones, concretamente en los estadíos 10 y 14 de H.H. asociada a otras malformaciones, en otros casos como sucede en los estadíos 18 y 22 de H.H., como alteración única.

Otros investigadores obtuvieron microsomias al estudiar el efecto de las drogas citostáticas en el desarrollo embrionario, RUANO GIL, 1.964, en sus trabajos con la Talidomida en embrión de pollo, obtiene un tipo de malformación general y no específica, que es la microsomia y que aparecía indistintamente tanto en embriones intervenidos en estadíos

precoces como en embriones inyectados más tardíos. Cree, por lo tanto, que el agente teratógeno puede actuar selectivamente en cierta región inhibiendo la inducción del desarrollo de ciertos órganos según el estadio y también,, de forma general, inhibiendo el desarrollo global del embrión y produciendo como consecuencia un retraso del crecimiento. ROS TRENCHS y DOMENECH RATTO, 1.975, en su trabajo del Genoxal en el embrión de pollo, obtienen gran número de microsomias y torsión patológica del tronco con la mencionada droga, dado que la ciclofosfamida (Genoxal) dentro del grupo de las sustancias citostáticas, actúa como un agente alquilante, consideraron este efecto como el resultado del bloque generalizado de las cadenas de DNA, con lo cual produciría alteraciones nucleares y cromosómicas, provocando la desnaturalización y precipitación del DNA.

KONG SUN, C., 1.976, en su estudio de Tesis Doctoral del efecto de la Daunomicina sobre el embrión de pollo, obtuvo en 8 casos una detención global del crecimiento del embrión (microsomnia), dos inyectados en el estadio 5 de H.H., 4 en el estadio 10 de H.H. y otros 2 en el estadio 12 de H.H., explicando su aparición como el resultado de la unión

de la Daunomicina a las cadenas de DNA, con la consecuente inhibición de la síntesis de RNA.

Hemos de hacer constar que en ninguno de estos trabajos se realizó la medición de volúmen y peso sistemática de los embriones estudiados, o al menos no se refleja en las publicaciones. En nuestro trabajo de investigación, sistemáticamente, como se muestra en el capítulo de resultados, hemos medido, pesado, y obtenido el volúmen de todos los especímenes supervivientes, y así hemos podido comprobar la disminución del peso y el volúmen de los embriones tratados con Mitoxantrone con respecto a los embriones testigos.

El estudio de las tablas de porcentaje de volúmen y peso de los embriones tratados con respecto a los testigos, nos demuestra ésta pérdida por estadíos y dosis. Obviamente no hemos considerado la longitud, dada la incidencia de alteraciones, tipo torsión de tronco.

Dos hechos llaman poderosamente la atención: primero

que en el estadio 10 de H.H. la microsomnia resulta ser altamente dosis dependiente, obsérvese que con la dosis de 2,5 microlitros el volúmen medio es del 93,8% del de los testigos y el peso del 88,5% del de los testigos, mientras que para la dosis de 10 microlitros el porcentaje desciende vertiginosamente y se sitúa en el 18,8% para el volúmen y el 9,8% para el peso; sin embargo en el resto de estadios 14, 18 y 22 de H.H. la disminución del porcentaje de volúmen y peso con respecto a los testigos, al aumentar la dosis en un mismo estadio no fue tan intensa, e incluso para los estadios 14 y 18, no significativa. El segundo hecho que nos llama la atención, lo comprobamos al analizar estos porcentajes por dosis en los cuatro estadios estudiados, y observamos que para la dosis de 2,5 microlitros en el estadio 10 de H.H. la disminución de peso y volúmen respecto a los testigos fue mínima y casi inapreciable, no obstante la misma dosis aplicada a los embriones del estadio 14 de H.H. provocó en ellos una pérdida de volúmen y peso superior al 50% con relación a los testigos; un hecho similar se aprecia en la dosis de 5 microlitros aunque en menor cuantía.

Para nosotros la explicación a estos hechos no tiene una respuesta fácil, no obstante hemos de recordar que la acción del Mitoxantrone radica en la unión de su molécula por intercalación entre pares de bases al DNA y al RNA de espiral simple y de doble espiral, por lo que creemos, que la alteración en la relación estadio/dosis y efecto, sólo podría deberse a la diferente susceptibilidad del embrión a la acción del Mitoxantrone, y esta estaría, en principio, en íntima relación al cociente número de moléculas intercaladas/disponibilidad de los mecanismos de regeneración enzimática.

Mención aparte merece la torsión patológica del tronco por nosotros encontrada en 19 ejemplares inyectados en el estadio 10 de H.H. y en 11 ejemplares inyectados en el estadio 14 de H.H., no guardando su aparición relación significativa con la dosis administrada, el estudio de los cortes seriados efectuados en algunos de estos especímenes, pone de manifiesto la clara afectación mesodermal. Siendo el mecanismo íntimo de la normodiferenciación notocordal un aumento selectivo del DNA, resulta evidente que el Mitoxantrone ha alterado o modificado el gradiente

morfogénico de la notocorda provocando la existencia de inflexiones o irregularidades, que a su vez, inciden en el patrón y disposición del escleromesénquima a partir del que se origina y da lugar a las formaciones vertebrales.

Respecto de la agenesia de cola ha aparecido en dos ocasiones en los ejemplares del estadio 10 de H.H. asociada a otras alteraciones en ambos casos; 5 casos aparecieron en los ejemplares inyectados en el estadio 14 de H.H., en dos de ellos apareció como malformación aislada; 9 embriones presentaron esta malformación de los inyectados en el estadio 18 de H.H. y sólo en 1 caso se presentó asociada a una microftalmia unilateral; y finalmente apareció, siempre de forma aislada, en cuatro ejemplares del estadio 22 de H.H. Estamos totalmente de acuerdo con JIMENEZ COLLADO, J., 1969, cuando incluye a este tipo de malformación en el grupo cuyo mecanismo teratogénico es el de la destrucción de estructuras ya formadas, en el que podemos incluir los casos de anoftalmia por nosotros obtenidos. Así este autor defiende la importancia del incremento anormal y atípico de procesos destructivos o degenerativos

de órganos normalmente desarrollados, ya que observa un aumento en el proceso de "muerte celular" que a su vez condiciona y da origen a desestructuración de áreas normal y previamente establecidas. Un ejemplo de este proceso es el síndrome de regresión caudal que en ocasiones, incluso, sobrepasa la desaparición de la cola dando lugar a fusiones en miembros inferiores. Obviamente, sea cual sea el mecanismo teratogénico podemos afirmar que en la producción de la malformación caudal, interviene el efecto resultante del Mitoxantrone sobre el desarrollo de la notocorda, si bien no descartamos la intervención secundaria de otros factores como el nutritivo y/o de oxigenación, agravando a las lesiones primitivas y a continuación causando degeneración de las estructuras de la parte caudal del embrión.

La microftalmia se observó en 9 ejemplares del total de los especímenes a los que se administró Mitoxantrone, dada la afectación, anteriormente comentada, que el Mitoxantrone provoca en el mesodermo, estamos plenamente de acuerdo con BELON, J., 1.990, al considerar que el posible factor causal o integrado en el proceso inductor anómalo que

condiciona la malformación, es la alteración del mesodermo precordial, y el mecanismo patogénico sería la detención de la invaginación de la vesícula óptica, y al no establecer contacto la retina con el tapetum, detención de la diferenciación y crecimiento retiniano.

Finalmente hemos de mencionar la aparición en nuestros ejemplares de tres casos de microcefalia: dos en los embriones inyectados en el estadio 10 de H.H. con la dosis de 7,5 microlitros y uno en el estadio 14 de H.H. en la dosis de 7,5 mcl. Otros dos ejemplares presentaron áreas hemorrágicas y tres más tenían extrofia cardíaca. Como es lógico la escasa incidencia de estas malformaciones en nuestra casuística, anulan su posible relación etiológica con el Mitoxantrone al no poseer valores de relación significativos, por lo que obviaremos su análisis.

CONCLUSIONES

12

1ª. El Mitoxantrone en nuestro trabajo de investigación, se ha mostrado, en el embrión de ave, como un agente embriotóxico, quedando reflejada su toxicidad embrionaria por:

- a) Producción de embrioletalidad, que alcanzó porcentajes significativos en los r'os primeros estadíos por nosotros estudiados: 10 de H.H. y 14 de H.H. Y niveles no significativos en los estadíos 18 de H.H. y 22 de H.H.
- b) Producción de malformaciones de especial incidencia en los estadíos tempranos y prácticamente inexistentes en los estadíos tardíos.

2ª. La única alteración del desarrollo que aparecía en la totalidad de los embriones a los que se administró Mitoxantrone, fue el retraso en el crecimiento de los embriones en desarrollo.

3ª. Tras estudio de los embriones que presentaban malformaciones asociadas a la microsomnia, hemos podido comprobar que provoca una clara afectación mesodermal.

4ª. Del estudio estadístico se desprende que el Mitoxantrone provocó, en la totalidad de los grupos por dosis y estadíos, la alteración del desarrollo de mayor incidencia significativa en la dosis de 10 microlitros aplicada en el estadío 10 de H.H., y la de menor incidencia significativa en la dosis de 2,5 microlitros aplicada en el estadío 10 de H.H.

5ª. El estudio de la varianza refleja que en el estadío 10 de H.H. el incremento de la dosis ha sido significativamente proporcional al incremento del efecto provocado por el Mitoxantrone, esta relación dosis/efecto no ha resultado significativa para los estadíos 14 y 18 de H.H. y resulta relativamente significativa para el estadío 22 de H.H.

BIBLIOGRAFIA



ALBERTS, D.S.; PENG, Y.M.; LEIGH, S. et al (1983a).- Disposition of mitoxantrone in patients. *Cancer Treat Rev.*, 10 (Suppl.B): 23-27.

ALBERTS, D.S.; PENG, Y.M.; LEIGH, S. et al (1983b).- Pharmacokinetics of mitoxantrone in patients. *Proc 13th ICC. Viena SY58-3*: 212/14-19.

ALBERTS, D.S.; PENG, Y.M.; BOWDEN, G.T. et al (1985).- Mechanism of action and pharmacokinetics of Novantrone in intravenous and intraperitoneal therapy. In the *Current Status of Novantrone, Advances in Chemotherapy*. Wiley, New York, pp. 15-21.

ALBERTS, D.S.; YOUNG, L.; MASON, L. et al. (1985).- In vitro evaluation of anticancer drugs against ovarian cancer at concentrations achievable by intraperitoneal administration. *Semin. Oncol.* 12 (3) Suppl.; 4:38-42.

ALBERTS, D.S.; PENG, Y.M.; BOWDEN, G.T. et al (1985).- Pharmacology of mitoxantrone: Mode of action and pharmacokinetics. *Invest. New. Drugs.* 3 (2):101-107.

ALVAREZ BERMUDEZ, C.A.; SANTOS, R.L.; LEHMANN, O. et al. (1984).- Mitoxantrone, cyclophosphamide and 5-fluorouracil in advanced breast cancer. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 4 (Abs C-207).

ANCEL, P. (1950).- *La chimiotheratogenese chez les vertebrés*. Vol. 1, Doin et Cie. Paris.

ARACENA, M. y cols. (1986).- Embriopatia por agentes antineoplásicos. *Rev. Med. Chile*, 114, 864-866.

BELON CARRION, J. (1990).- Analisis Experimental de los efectos Teratógenos del Cis-Platino en vertebrados. *Tesis Doctoral*. Madrid.

BENJAMIN. R.S. (1984).- Clinical evaluation of mitoxantrone cardiac toxicity. *Cancer Chemotherapy in the 1980'S. A Focus on Novantrone*, 8 (ABS).

BENJAMIN, R.S.; CHAWLA, S.P.; EWER, M.S. et al (1984).- Evaluation of mitoxantrone cardiac toxicity by nuclear angiography and endomyocardial biopsy. Proc. 20th Ann. Mtg. Am. Soc. Clin. Oncol., Toronto, (Abs C-156).

BENJAMIN, R.S.; CHAWLA, S.P.; EWER, M.S., et al. (1985).- Evaluation of mitoxantrone cardiac toxicity by nuclear angiography and endomyocardial biopsy: An update. Invest. New. Drugs., 3:25-30.

BERRAL DE LA ROSA, C. (1989).- Estudio teratológico de toxicidad del cisplatino en ratas gestantes. Tesis doctoral. Facultad de Medicina de Córdoba.

BHALLA, K.; HINDENBURG, A.; TAUB, R.N. et al. (1985).- Isolation and characterization of ant anthracycline-resistant human leukemic cell line. Cancer Res., 45 (8):3.657-3.652.

BOWDEN, T.S., ROBERTS, R.; ALBERTS, D.S. et al (1985).- Comparative molecular pharmacology in leukemic L1210 cells of the anthrance anticancer drugs mitoxantrone and bisantrene. Cancer Res. 45 (10):4.915-4.920.

BROOME, J.D. (1963).- Evidence that the L-asparaginase of guinea pig serum is responsible for its antilymphoma effects. I. Properties of the L-asparaginase of guinea pig serum in relation to those of the antilymphoma substance. J. Exp. Med., 118, 99-120.

BURCHENAL, J.H.; KARNOFSKY, D.A. y cols. (1951).- The effects of the folic Acid antagonist and 2-6-diaminopsine on neoplastic disease, with special reference to acute laeukemia. Cancer. New York, 549, 69.

CLARK, G.M.; TOKAZ, L.K.; VON HOFF, D.D. et al (1985).- Cardiotoxicity in patients treated with mitoxantrone on Southwest Oncology Group Phase II protocols. Cancer Treat. Symp.; 3:25-39.

CLARKE, D.; PHILIPS, F.; STEMBERG, S.; STOCK, C.; ELION, G. and HITCHINGS, H. (1953).- 6-Mercaptopurine: Effects in mouse sarcoma 180 and in normal animals. Biochemie. vol. 13, nº 8, 593.

CLAVERT, A. (1970).- Etudes des malformations oculaires déterminées chez l'embryon de Lapin par le cyclophosphamide. *Arch. Anat. histol. Embr.* (Strasbo), 53, 209-271.

COLEMAN, R.E.; MAISEY, M.N.; KINGHT, R.K. et al (1984).- Mitoxantrone in advanced breast cancer. A phase II study special attention to cardiotoxicity. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.*; 20 (6):771-776.

CORBETT, T.H.; ROBERTS, B.J.; TRADER, M.W. et al (1982).- Response to transplantable tumors of mice to anthracenodione derivatives alone and in combination with clinically useful agents. *Cancer Treat. Rep.*, 66 (5):1.187-1.200.

COWAN, J.D.; CLARK, G.; VON HOFF, D.D. (1983).- Activity of mitoxantrone and bisantrene in an human cloning system. In Rozenzweig M. et al (Eds.): *New Anticancer Drugs: Mitoxantrone and Bisantrene*. Raven, New York, pp. 39-46.

CREASEY, W.A. (1977).- Plant Alkaloids. In Becker, F.A. (ed): *Cancer: A Comprehensive Treatise*, vol. 5, pp. 379-425. New York. Plenum Press.

CROOKE, S.T.; DU VERNAY, V.H.; GALVAN, L.; PRESTAYKO, A.W. (1978).- Structure-activity relationships of anthracyclines relative to effects on macromolecular synthesis. *Mol. Pharmacol.* 14:290-298.

CROSSLEY, R.J. (1983).- Clinical safety and tolerance of mitoxantrone (Novantrone). *Cancer Treat. Rev.*; 10 (Suppl. B): 20-36.

CROSSLEY, R.J. (1984).- Clinical safety and tolerance of mitoxantrone. *Semin. Oncol.*; (3) Suppl. 1:54-58.

CHATOT, C.L. y cols. (1980).- El cultivo exitoso de embriones de rata en suero humano y su aplicación en la detección de teratógenos. *Science*, 207, 1471-1473.

CHICARELLI, F.S.; MORRISON, J.A.; GAUTAM, S.R. (1984).- Biliary pharmacokinetics of <sup>14</sup>C-Mitoxantrone in the rat following different intravenous doses and characteristics of drug-related material in the bile. *Abstract*, 354, *Federation proceedings* 43:345.

DARÈSTE, C. (1989).- *Recherche sur la production artificielle des monstruosités*. 1 vol., areinwald, París.

DE LA GARZA, J.; ERAZO, A.; CARDENAS, J. et al (1984).- Mitoxantrone + 5-fluorouracil + cyclophosphamide in advances breast cancer. *Proc. 20th Ann. Mtg. Am. Soc. Clin. Oncol. Toronto* (Abs C-481).

DE VITA, V.T. (1978).- The evolution of therapeutic research in cancer. *N. Engl. J. Med.*, 298, 907-910.

DE VITA, V.T. (1979).- Human models of human diseases: Breast cancer and the lymphomas. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 5, 1855-1867.

DE VITA, V.T.; HENNEY, J.E. and HUBBARD, S.M. (1981).- Estimation of the numerical and economic impact of chemotherapy in the treatment of cancer. In Burchenal, J.H.; Oettgen, H.S. (eds): *Cancer Achievements, Challenges, and Prospects for the 1980s*, pp. 857-880. New York, Grune and Stratton.

DE VITA, V.T.; HELLMAN, S. y ROSEMBERG, S.A. (1988).- *Cáncer: principios y práctica de oncología*. Ed. Salvat. 2ª ed. Tomo I. Barcelona.

DREWINKO, B.; PATCHEN, M.; YANG, L.Y., et al (1981).- Differential killing efficacy of twenty antitumor drugs on proliferating and nonproliferating human tumor cells. *Cancer. Res.* 41:2.328-2.333.

DUKART, G.; BARONE, J.S. (1984).- An overview of cardiac episodes following mitoxantrone administration. *Cancer. Treat. Symp.* 3:35-41.

DURR, F.E.; WALLACE, R.E. (1983).- Comparison of the antitumor activity of CL232, 315, a novel aminoanthraquinone, with standard anticancer agents. *Proc. 11th. ICC*:1.595-1596.

DURR, F.E. (1984).- Biologic and biochemical effects of mitoxantrone. *Sem. Oncol.* 11 (3) Suppl. 1:3-10.

DURR, F.E.; WALLACE, R.E.; CITARELLA, R.V. (1984).- Molecular and biochemical pharmacology of mitoxantrone. *Cancer. Treat. Rev.*; 10 (Suppl. B):3-11.

EHNINGER, G.; WEIBLE, K.H.; HEIDEMANN, E.G. et al (1984).- Mitoxantrone as cyclophosphamide in patients with advanced breast cancer. *Cancer. Treat. Rep.*, 68:1.283.

EHNINGER, G.; PROKSCH, B.; HEINZEL, G. et al (1985a).- Pharmacokinetics and metabolism of mitoxantrone in man. *Pro. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 4 (Abs. C-105).

EHNINGER, G.; PROKSCH, B.; HEINZEL, G. et al (1985b).- The pharmacokinetics and metabolism of mitoxantrone in man. *Invest New Drugs*; 3 (2):109-116.

EORTC Clinical Screening Group (1982).- Phase II Clinical trial of mitoxantrone: Results of a broad screening programme. *Data on File*, Lederle.

FARBER, S.; DIAMOND, L.K.; MERCER, R.D.; SILVESTER, R.F. Jr y WOLFF, J.A. (1948).- Temporary remissions in acute leukaemia in children produced by folic acid antagonist, 4-aminopteroyl-glutamic acid (aminopterin). *New England Journal of Med.*, 238, 787.

FERM, V.H. (1964).- Effects of transplacental mitotic inhibitors on the fetal hamster eye. *Anat. Rec.*, 148, 129-133.

FOSTER, B.; LEV, L.; BERGMANN, C. et al (1984).- Cardiac events (CE) in patient (pts) treated with mitoxantrone (M) in Phase II trials (ph II) sponsored by the National Cancer Institute (NCI). *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.*, 25:168.

FUJIMOTO, S.; OGAWA, M. (1982).- Antitumor activity of mitoxantrone against marine experimental tumors: Comparative analysis against various antitumor antibiotics. *Cancer. Chemoter. Pharmacol.*, 8:157-162.

GAMS, R.A.; GSTROY, F.; BARTOLUCCI, A.A. et al (1983).- Phase II studies of mitoxantrone in the Southeastern Cancer Study Group. In Rozenzweig, M. et al (eds.): *New Anticancer Drugs: Mitoxantrone and Bisantrene*. Raven, New York, pp. 131-141.

GAMS, R.A.; WESLER, M.J. (1984).- Mitoxantrone cardiotoxicity: Results from Southeastern Cancer Study Group. *Cancer. Treat. Symp.*, 3:31-33.

GANAPATHI, R.; GRABOWSKI, D.; SCHMIDT, H., et al (1985).- Potentiation of cytotoxicity in vitro of DNA binding antitumor drugs by the calmodulin inhibitor trifluoperazine (TFP) in doxorubicin-resistant cells. *Fed. Proc.*, 44 (3):503.

GEORGOULIAS, V.; JASMIN, C.; AMESLAND, F. (1983).- In vitro sensitivity of human myeloblast colony-forming cells (CFU-ML) to anthracyclines, neoanthramycin and mitoxantrone. *Proc. 13th Int. Cong. Chemother.*, Vienna 14 (4/3-3):9-15.

GOLDIE, J.H.; COLDMAN, A.J. (1979).- A mathematic model for relating the drug sensitivity of tumors to the spontaneous mutation rate. *Cancer. Treat. Rep.*, 63:1727-1733.

GOLDSMITH, M.A.; OHNUMA, T. et al (1981).- Phase I clinical and pharmacological evaluation of mitoxantrone. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, (Abs. C-22).

GONZALEZ BARON, (1989).- Principios de cancerología. 1ª ed., Interamericana. Barcelona

GRYGEL, J. (1985).- Clinical safety and toxicity of Novantrone (mitoxantrone). 14th ICC., Kyoto, Japan, (Abs Ws 13-4).

GSTOTTNER, M.; FRITSCH, H. and DIENSTL, F. (1978).- Delivery of a normal child after chemotherapy of acute promyelocytic leukaemia during pregnancy. *Blut.*, 36 (3), 171.

HAMBURGER, V. and HAMILTON, H.L. (1951).- A series of normal stages in the development of the chick embryo. *J. Morph.*, 88, 49-92.

HANDA, K.; SATO, S. (1975).- Generation of free radicals of quinone group containing anticancer chemicals in NADPH-micro-some system as evidenced by initiation of sulfite oxidation. *Gann.*, 66:43-47.

HIBINO, S.; YAMADA, K. y HOSKINO, A. (1966).- Clinical pharmacology of mitomycin. *Kyowa Hakko Kogyo*, 179, 210.

HODES, M.E. y cols. (1962).- Vinkaleukoblastine IV. A Summary of two and one-half years experience in the use of vinblastine. *Cancer Chemoth. Rep.*, 16, 401.

HOLLAND, J.F.; PACIUCCI, P.A. (1985).- Novantrone mitoxantrone, vincristine, and dexamethasone in patients with refractor lymphoma: a Phase I-II study. Protocol., 3-65. Data on File, Lederle.

HOLLAND, J.F.; PACIUCCI, P.A.; OHNUMA, T. et al (1985).- Novantrone, mitoxantrone, vincristine and prednisone in patients with acute lymphoblastic leukemia in relapse (Phase I-II). Protocol., 3-55, Data on File, Lederle.

HOLLAND, J.F.; WIERNIK, P.H. (1985).- Novantrone mitoxantrone and cytosine arabinoside in patients with acute myeloblastics leukemia. Phase I-II study. Protocol., 3-54. Data on File, Lederle.

HOLMES, F.A.; YAP, H.Y.; ESPARZA, L. et al (1984).- Mitoxantrone, cyclophosphamide, and 5-fluorouracil in the treatment of hormonally unresponsive metastatic breast cancer. *Semin. Oncol* II; (3) Suppl. 1:28-31.

HULHOVEN, R.; DUMONT, E.; HARVENGT, C. (1984).- Plasma kinetics of mitoxantrone in leukemic patients. *Med. Oncol. Tumor Pharmacother*, 1 (3):201-204.

IYER, V. and SZYBALSKI, W. (1964).- Mitomycins and ponfiromycin: Chemical mechanism of activation and crosslinking of DNA. *Science*, 145, 55-58.

JACOBS, A. y cols. (1980).- Oat Cell Carcinoma of the uterine Cervix in a Pregnant Woman treated with cis-diaminedichloro-platinum. *Gynecologic Oncology*, 9, 405-410.

JIMENEZ COLLADO, J. (1966).- Anomalies septales provoquées par le bleu tripan chez des embryons de Rats. *Arch. Anat. Histol. et Embryol. Lausanne*, 49, 425-440.

JIMENEZ COLLADO, J. (1969).- Extirpation of neural fold in avian embryos. *Ar Anat. Microscop. Exp. Vol.* 32, 84-98.

JOHNSON, E. (1984).- A prioritization and biological decision tree for developmental toxicity safety evaluations. *J. Am. Coll. Toxicol.*, 3(2):141-7.

JOHNSON, R.K.; ZEE-CHENG, R.K.Y.; LEE, W.W. et al (1979).- Experimental antitumor activity of aminoanthraquinones. *Cancer. Treat. Rep.*, 63 (3):425-439.

JOHNSON, R.K.; BROOME, M.G.; HOWARD, S.W. et al (1983).- Experimental therapeutic and biochemical studies of anthracenedione derivatives. In Rozenzweig, M. et al: *New York Anticancer Drugs: Mitoxantrone and Bisantrene*. Raven, New York, pp. 1-28.

JONES, S.E.; DEAN, J.C.; YOUNG, L.A., et al (1985).- The human tumor clomogenic assay in human breast cancer. *J. Clin. Oncol.*, 3 (1):92-97.

KAPUSCINSKI, J.; DARZYNKIEWICZ, A.; TRAGANOS, F. et al (1981).- Interactions of a new antitumor agent, 1,4-dihydroxy--5,8-bis <<2-(2-hydroxyethyl-1)amino>-ethyl>amino>-9,10-antra-cenedione, with nucleic acids. *Biochem. Pharmacol.*, 30:231-240

KELLER, K.A. and AGGARWAL, S.K. (1983).- Embriotoxicity of cisplatin in rats and mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 69, 245-56.

KIDD, J.G. (1953).- Regression of transplanted lymphomas induced in vivo by means of normal guinea pig serum. I. Course of transplanted cancers of various kinds in mice and rats given guinea pig serum, horse serum, or rabbit serum. *J. Exp. Med.*, 98, 565-582.

KOBER, P.A. y SUGIURA, K. (1912).- The copper complexes of aminoacids, peptids and peptones. I. *J. Biol. Chem.*, 13, 1.

KOHLER, E. (1979).- Grow Kinetics of mammalians embryos during organogenesis. In: **Metabololic Pathways in Mammalian Embryos During Organogenesis and its Modifications by Drugs**. Frei Universitat Berlin: 17-27.

KONG SUN SHUN, C. (1976).- Efectos teratógenos producidos por la acción de la daunemicina sobre el embrión de pollo. **Tesis doctoral**. Madrid.

KOPF-MAIER, P.; ERKENSWICK, P. and MERKER, H.J. (1985).- Lack of severe malformations versus ocurrence of marked embriotoxic effects after treatment of pregnant micd with cis-platinum. *Toxicology*, 34(4), 321-31.

KRAKOFF, I.H.; BROWN, N.C. y REICHARD, P. (1968).- Inhibition of Ribonucleoside diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res.*, 28, 1359.

KRAKOFF, I.H. (1971).- **Clínicas Médicas de Norteamérica**. Ed. Interamericana. 1ª ed. Méjico.

LAPORTE SALAS, J. (1964).- Fármacos y malformaciones congénitas. *Anales de Medicina*. Vol. III. nº 1, 71-72.

LASH, J.W. (1964).- Normal embryology and teratogenesis. *Amer. J. Obst. and Gynec.* Vol. 90, nº 7-2.

LATHAN, B.; VON HOFF, D.D.; ELSLAGER, E. (1984).- Use of a human tumor cloning system to evaluate analog of methotresate and mitoxantrone. *Cancer Treat. Rev.*, 68:733.

LEDERLE (1983).- Monografía del Novantrone. Data on file. Lederle 1983. Canadá.

LI, M.C.; HERTZ, R. and SPENCER, D.B. (1956) - The effect of methotrexate upon choriocarcinoma and choriadenoma. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 93.

LOEFFER, T.; FREUD, W. (1986).- Pharmacokinetics of Mitoxantrone Intraperitoneal. *Proc. Am. Assoc. Cancer Res.*, (Abs. 694).

LOO, T.L. (1981).- Pharmacology of new cancer chemotherapy agents. In *Cat Achiev Challenges Prospects 1980's*; 2:147-162.

LOWN, J.M.; SIM, S.; MAJUMDAR, K.C.; CHUNG, R. (1977).- Strand scission of DNA by bound adriamycin and daunomycin in the presence of reducing agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 79:705-710.

LOWN, J.W.; HANSTOCK, C.C.; BRADLEY, R.D. et al (1984).- Interactions of the antitumor agents mitoxantrone and bisantrene with deoxyribonucleic acids studied by electron microscopy. *Mol. Pharmacol.*, 25:178-184.

LOWN, J.W.; MORGAN, A.R.; YENS-F, et al (1985).- Characteristics of the binding of the anticancer agents mitoxantrone and ametantrone and related structures to deoxyribonucleic acids. *Biochemistry*, 24:4.028-4.025

LU, K.; SAVARAJ, N; LOO, T.L. (1983).- Pharmacokinetics studies of mitoxantrone. In Rozenzweig, M. et al. (eds): **New Anticancer Drugs: Mitoxantrone and Bisantrone**. Raven, New York, pp. 71-84.

LURIA, S.E.; DELBRUCK, M. (1943).- Mutations of bacteria from sensitivity to virus resistance. *Genetics* 28:491-511.

MADOC-JONES, H. and MAURO, F. (1968).- Interphase action of vinblastine and vincristine: Differences in their lethal action through the mitotic cycle of cultured mammalian cells. *J. Cell. Physiol.*, 72, 185-196.

MALSPEIS, L.; NEIDHART, J.A. (1983).- Pharmacokinetics of Novantrone (mitoxantrone HCL, CL 232, 315) following administration of a single intravenous dose. In **Novantrone Mitoxantrone Hydrochloride: South African Submission**; 5:C9-C97

MARI MARTINEZ, M. (1957).- **Malformaciones congénitas, Etipato-genia y Anatomía Patológica**. Ed. Alhambra. Madrid.

MARSHALL, E.K.Jr. (1964).- Historical perspectives in chemotherapy. In Goidin A, Hawking, I.F. (eds): **Advances in Chemotherapy**, Vol. 1, pp. 1-8. New York, Academic Press.

MARVIN, A.; RICH y cols. (1962).- The effects of some purine analogs on the Growth of the E. Ep. 1 and Chick Embryo Fibroblast Cell. *Cancer Research*. 22, 1-3.

MCDONALD, M.; SCOTT, S.C. (1984).- Mitoxantrone (M). Acute and chronic toxicity (tox). **Abs 6th Int Symp. Future Trends in Chemother**, 123 (Abs 47).

MENDELSON, M.L. (1960).- The growth fraction: A new concept applied to tumors. *Science*, 132:1496.

MEYSKENS, F.L. Jr.; LOESCHER, L.; MOON, T.E. et al (1984).- Relation of in vitro colony survival to clinical response in a prospective trial of single agent chemotherapy for metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.*, 2 (11):1.223-1.228.

MIKKELSEN, R.B.; LIN, D.S.; WALLACH, D.F. (1977).- Interaction of adriamycin with human red blood cells: A biochemical and morphologic study. *J. Mol. Med.* 2:33-40.

MURDOCK, K.C. y cols. (1979).- Antitumor agent 1:1.4 bis [(Aminoalkyl)amino]9,10 Anthracenediones. *Journal of Medicinal Chemistry*, 22:1.024-1.030.

MURDOCK, K.C.; WALLACE, R.E.; WHITE, R.J. et al (1985).- Discovery and preclinical development of Novantrone. In the *Current Status of Novantrone, Advances in Chemotherapy*. Wiley. New York, 3-13.

NARBAITZ, R. and MARINO, I. (1988).- Experimental induction of microphthalmia in the Chick Embryo with a single dose of Cisplatin. *Teratology*, 37, 127-134.

NEEDHAM, J. (1959).- *A history of Embryology*. Cambridge University Press.

NEIDHART, J.A.; MALSPEIS, L.; MISER, J. (1983).- Pharmacokinetics of Novantrone mitoxantrone HCL (CL 232, 315) following administration of a single intravenous dose in pediatric and young adult patients. In *Novantrone Mitoxantrone Hydrochloride: South African Submission*, 5: C98-C199.

NISHIO, A.; UYEKI, E.M. (1983).- Cellular uptake and inhibition of DNA synthesis by dihydroxyanthraquinone and two analogues. *Cancer. Res.*, 43:1.951-1.956.

NOVOTNA, B. and JELINEK, R. (1986).- Comparación de los efectos mutagénicos y embriotóxicos de la ciclofosfamida en el embrión de pollo. *Environments mutagenesis*, 8, 241-252.

NRUBERT, D. BARRACH, H.J. and MERKER, H.J. (1980).- Drug-induced damage to the embryo or fetus. In: Grundman, E., ed. Drug-induced pathology. New York: Springer-Verlag, 241-331.

OETTGEN, H.F.; OLD, L.JU.; BOYSE, E.A.; CAMPBELL, H.A.; PHILIPS, F.S.; CLARKSON, B.D.; TALLAL, L.; LEYSER, R.D.; SCHWARTZ, M.K. y HO KIM, J. (1967).- Inhibition of leukemias in man by L-asparaginase. *Cancer Res.*, 28, 1359.

OHNOSKI, T.; OHNUMA, T.; BERANEK, J.T. et al (1985).- Combined cytotoxicity effect of hyperthermia and anthracycline antibiotics on human tumor cells. *J. Nat. Cancer. Inst.*, 74 (2):275-281.

ORTS LLORCA, F. (1941).- Contribución al estudio de las espinas bífidas, basada en hechos de embriología experimental. *Arch. de Anat.* XXX.

ORTS LLORCA, F.; GENIS GALVEZ, J. y RUANO-GIL (1959).- Malformations encephaliques et microphthalmie gauche après section des vaisseaux vitelins gauches chez l'embryon de poulet. *Acta Nat.*, 38, 1-34.

ORTS LLORCA, F. (1961).- Anatomía humana. Ed. Científico Médica. Barcelona.

ORTS LLORCA, F. (1961).- Malformaciones congénitas. Factores determinantes más importantes de las anormogénesis. *Discurso de la Academia de Cirugía.*

OSTROY, F.; SPENNEY, J.G.; GAMS, R.A. (1980).- Preliminary pharmacologic studies of 1,4-dihidroxy-5, 8-bis ([2-[2-hydroxyethyl]amino]ethyl)amino]-9, 10-anthracenedione (American Cyanamid) CL 232315, NCS 301739) in beagle dogs. *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.*, (Abs. 789).

OWELLEN, R.J.; HARTKE, C.A.; DICKERSON, R.M. and HAIMS, F.O., (1976).- Inhibition of tubulin-microtubule polymerization by drugs of the vinca alkaloid class. *Cancer Res.*, 36, 1499-1502.

PEARSON, O.H.; ELLEL, L.P. y TALBOT, T.R. (1950).- The use of ACTH and cortisone in neoplastic disease. *Bulletin of the N. York Acad. of Medic.*, 26, 235.

PERITI, P.; DELLA CUNA, G.R.; PANNUTI, F. y cols. (1985).- First-line combination chemotherapy with Mitoxantrone and cyclophosphamide in advanced breast cancer. *Invest. New Drugs*. 3(2):167-171.

PEYRONE, M. (1844).- Ueber die einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür. *Justus Liebigs Ann. Chem.* 51, 1-29.

PINKEL, D. (1959).- Actinomycin D in childhood cancer. *Pediatrics (Am. Acad. of Ped.)*, 23, 342.

REGNAULT, J. (1916).- La fagocytaxie des sels de magnesie. *Bull. Gen. de Ther.*, 168, 737-752.

REICHER, K. (1910).- Experimentale betraje zur therapie maligner tumoren. *Ductchs Medizinische Wochenschrift*. Stuggart. vol. 36, 1356.

REILLY, H. (1953).- Microbiology and Cancer Therapy a review. *Cancer Research*, Vol. 13, nº 12, p. 821.

RHOADS, C.P. (1946).- Nitrogens mustards in the treatment of neoplastic disease. *Cancer Research*, 10, 656.

ROBOZ, J.; PACIUCCI, P.A.; SILIDES, D. et al (1984). Detection and quantification of mitoxantrone in human organs. A case report. *Cancer Chemother Pharmacol.*; 13:67-68.

ROMANOFF, A.L. (1960).- *The avian Embryo, Structural and Funcional Development*. The Macmillan Co. New york.

ROS TRENCHS, y DOMENECH RATTO, cit. por KONG SUN (1976).

ROSENBERG, B. (1965).- Inhibition of cell division in Scherichia Coli by electrolysis products from a platinum electrode. *Nature*, 205, 698-9.

ROSENBERG, B.; VAN CAMP, L.; GRIMLEY, E.B. and THOMSON, A.J., (1967).- The inhibition of growth or cell division in Scherichia Coli by different ionic species of platinum complexes. *J. Biol. Chem.*; 242, 1347-52.

RUANO GIL, D. y JIMENEZ COLLADO, J. (1964).- Acción de la Talidomida sobre los embriones de poilo cultivados "in vitro". *Sesión científica de la Facultad de Medicina*.

SAFA, A.R.; TSENG, M.T. (1984).- Inhibition of protein synthesis and cell proliferation in cultured human breast cancer cell treated with mitoxantrone. *Cancer. Letters*; 24:317-326.

SAKAI, S.; MINODA, K.; SAITO, G.; ADAGI, S.; UENO, A. y FUKUOKA, F. (1955).- The effects of 1.ox.4-nitrokileina on the Growth of a variety of Mouse and Rat tumors. *Gann.*, 46, 605.

SALMON, S.E. (1985).- Predictive in vitro models for anticancer activity. 14th ICC, Kyoto, Japan. (Abs WS-13-2).

SALZGEBER, B. (1962).- Experimental evaluation of certain nitrosoureas on Chick Embryon. *C. R. Acade. Sc.* 245, 3581.

SANS-SABRAFEN, J. y ROSELL COSTA, R. (1976).- *Manual de quimioterapia antineoplásica*. Ed. Toray, S.A.

SCHABEL, F.M. Jr.; CORBETT, T.H.; GRISWOLD, D.P. Jr., et al (1983).- Therapeutic activity of mitosantrone and ametrantrone against murine tumors. *Proc. 13th ICC, Vienna*; SY85-1:212-9-13

SCHAISSON y cols. (1979).- Los riesgos feto-embrionarios de los quimioterápicos. *Bull. Cancer (París)*, 66, 2, 165-170.

SHOEMAKER, R.K.; WOLPER-DEFILIPPES, M.K.; KERN, D.H. et al (1985).- Application of human tumor colony-formen assay to new drugs screening. *Cancer Res.*; 45 (5):2.145-2.153.

SIEBER, S.M. y cols. (1978).- Efectos teratogénicos y citogenéticos de algunos agentes antitumorales derivados de vegetales, vincristina, colchicina, maintansina, Vp-16-213, en ratones. *Teratology*, 18, 31-48.

SKIPPER, H.E.; SCHABEL, F.M. Jr.; WILCOX, W.S. (1964).- Experimental evaluation of potential anticancer agents. XII. On the criteria and kinetics associated with "curability" of experimental leukemia. *Cancer Chemother Rep.* 35:1-111.

SMYTH, J.F.; MACPHERSON, J.S.; RAMSAY, M. et al (1984).- Clinical pharmacology mitoxantrone. *Proc. Am. Asoc. Cancer Res.*; (Abs. 16).

SOKOLOFF, B. (1929).- Rôle du cortex de la surrénale dans le développement du cancer. *Comptes Rendus de la Société de Biologie.* 264, 101.

STAPLES, R.E. and WILSON, J.G. (1979).- Definition of teratogenesis and teratogen. In: *Environmental toxicology branch*. National Institute of environmental health sciences. Chapter 4, North Carolina: Research Triangle Park, 25-6.

STOLL, R. y MARAUD, R. (1965).- *Introduction a l'études malformations*. Vol. 1. Gauthier-Villars. Paris.

SUGIURA, K. y BENEDICT, S.R. (1933).- Hormonotherapy cancer treatment. *Amer. J. Cancer*, 18, 583.

SUGIURA, K.; STOCK, C.Ch.; REILLY, H.C. and MIYOMO M. SCHMID (1950).- Studies in a tumor spectrum. VII. The effect of antibiotics on the growth of a variety of Mouse, Rat and Hamster tumors. *Cancer Research*, vol. 18, 66.

SUGIURA, K. (1953).- Effects of various compounds on the erlich ascietes Carcinoma. *Cancer Research*, 13(6), 431-42.

SUGIURA, K. (1971).- *Clínicas médicas de Norteamérica*. Ed. Interamericana. 1ª ed. México.

SWOG (1982).- Phase II study of Novantrone mitoxantroe HCL using a single dose every 3 weeks schedule for adult patients with solid tumors. A multicenter cooperative trial of the Southwest Oncology Group (SWOG). Data on file Lederle.

TAN, C.; DARGEON, H. y BURCHENAL, J.H. (1959).- Actinomycin D in childrood cancer. *Pediatric*, 24, 544.

TAN, C.T.C. y cols. (1967).- Daunomycin an antitumor antibiotic in the treatment of neoplasitic disease. *Cáncer*, 20, 333.

TANNOCK, I.F. (1983).- Biology of tumor growth. *Hosp. Pract.* 81-93.

THOMPSON, C.J.S. (1930).- *The mystery and lore of monsters*. Ed. Williams and Norgute LTD. London.

TRAGANOS, F.; EVENSON, D.P.; STAIANO-COICO, et al (1980).- Action of dihydroxyanthraquinone on cell cycle progression and survival of a variety of cultured mammalian cells. *Cancer. Res.* ; 40:671-681.

TSURUO, T.; KAWABATA, H.; NAGUMO, H. et al (1985).- Potentiation of antitumor agents by calcium channel blockers with special reference to crossresistance patterns. *Cancer. Chemother. Pharmacol.*; 15 (1):16-19.

TUCHMANN-DUPLESSIS, A. and FIEBIGER, T.J. (1984).- Drugs and other xenobiotics as teratogens. *Pharmac. Ther.*, 26, 273-344.

TUCHMANN-DUPLESSIS, H. y MERCIER-PAROT, L. (1960).- Ciba Foundation Sym. on Congenital Malformations. pág. 115, Churchill. Londres.

TUCHMANN-DUPLESSIS and MERCIER-PAROT (1966).- Réactions provoquées chez l'embryon par deux antimétabolites chimiquement voisins. *Bull. Scheitz. Akad. Med. Wiss*, 22, 153.

UNDERWOOD, T.; ITURRIAN, W.B.; CADWALLADER, D.E. (1970).- Some aspects of chemical teratogenesis. *Am. J. Hospital Pharm.* 27:115-22.

UNVERFERTH, D.V.; UNVERFERTH, B.J.; BALCERZAK, S.P. et al (1983).- Cardiac evaluation of mitoxantrone. *Cancer. Treat. Rep.*; 67 (4):343-350.

VON HOFF, D.D. (1985).- Implications of tumors cell heterogeneity for in vitro drugs sensitivity testing. *Sem. Oncol.*; 12 (3):327-331.

WALLACE, R.E.; MURDOCK, K.C.; ANGIER, R.B. et al (1979).- Activity of a novel anthracenedione, 1,4-dihydroxy-5,8-bis[[[2-[(2-hydroxyethyl)amino]ethyl]amino]]-9,10-anthracene-dione dihydrochloride, against experimental tumors in mice. *Cancer. Res.*; 39:1.570-1.574.

WANG, B.S.; LUMANGLAS, A.L.; RUSZALA-MALLON, V. et al (1984).- Effect of hypothermia on the sensitivity of human colon carcinoma cells to mitoxantrone (MX). *Proc. Am. Assoc. Cancer. Res.*; 25:341 (Abs. 1.350).

WASSEPMAN, A.; KEYSER, F. y WASSERMAN, M. (1911).- Beitrage zum problem geschwindigkeit von der blutbahn aus therapeutisch zum blinglussen. *Deutsche Medizinische Wochenschrift. Stuggar*, V. 37. 2389.

WEIL, R. (1916).- Oncology Therapeutic. *Cancer Research*, 1, 95.

WEISS, G.; VON HOFF, D.D. (1985).- Human tumor cloning assay: Clinical applications for ovarian, gastric, pancreatic, and colorectal cancers. *Semin. Oncol.*; 12 (3) Suppl. 4:69-74.

WILSON, L. y cols. (1975).- The mechanism of action of vinblastine. Binding of (acetyl-H) vinblastine to embryonic chick brain tubulin and tubulin from sea urchin sperm tail outer doublet microtubules. *Biochemistry*, 14, 5586.

7

WOLFF, E. (1936).- Les bases de la tératogénèse expérimentale des vertébrés amniotes d'après les résultats des méthodes directes. *Arch. Anat. Hist. et Embryol.*, 22, 1-382.

YANG, S.; RAFLA, S. (1985).- Temperature effect on mitoxantrone cytotoxicity in chinese hamster cells in vitro. *Cancer. Res.*; 45 (8):3.593-3.597.

YUNIS, J. (1983).- The chromosomal basis of human neoplasia. *Science*, 221(4607):227-236.

ZEE-CHENG, R.K.Y.; CHENG, C.C. (1983).- Anthraquinone anticancer agents. *Drugs of the future*; 8 (3):229-249.

ZIRVI, K.A. (1985).- Los efectos embriotóxicos de la Doxorubicina y de la AD-32. *Teratology*, 31, 247-257.