



**Formulación de recursos matemáticos y metodológicos rigurosos
para la caracterización, identificación y cuantificación de los
efectos citotóxicos desde una perspectiva dosis-respuesta de
agentes antitumorales comerciales y naturales en respuestas
individuales, sinérgicas y antagónicas**

Mireia Avecilla Martínez

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança
e à Universidade de Salamanca para obtenção do
Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais
Orientado por:*

**Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira
Miguel Ángel Prieto Lage
Manuel Ricardo Costa Calhela**

**Bragança
2016**

AGRADECIMIENTOS

Realizar el trabajo experimental y de escrita de un proyecto final de master es una tarea que implica un esfuerzo y dedicación especiales. Afortunadamente, contamos con el apoyo de personas tanto ajenas al master como implicadas en él que han estado dando soporte siempre que lo hemos necesitado, haciendo menos difícil todo el recorrido necesario hasta llegar a este punto, en el que podemos presentar sobre el papel los propósitos y resultados de una idea inicial que se ha ido trabajando poco a poco.

En primer lugar, quiero agradecer al equipo de Isabel Ferreira la oportunidad de trabajar en unos laboratorios tan nuevos y en tan buenas condiciones, y que nos haya proporcionado todo el material necesario para realizar los experimentos. Es a ella, también, a quien le agradezco como orientadora de mi proyecto que me haya dado tan buenas pautas y consejos. En la parte experimental, he tenido la suerte de contar con un gran profesional como lo es Ricardo, que no sólo es profesional, sino que tiene una gran capacidad de enseñanza y paciencia, del que por poco que haya aprendido me llevo un gran valor. Finalmente, como pieza clave para este proyecto, debo agradecer a Miguel Ángel Prieto todas las horas de dedicación y esfuerzo, así como transmisión de conocimientos para que pueda salir un buen trabajo.

Pero no todo es trabajo experimental y escrito. He tenido el placer de no tener que hacer este camino sola, sino que he tenido grandes compañeros y amigos a mi lado. A Azucena, le agradezco el haber tomado la decisión de realizar este master, ella me animó a hacerlo sin ni siquiera conocernos, y mi querida Filipa, la primera portuguesa que conocí y me ayudó desde el principio. Obviamente a mis “compis” de máster Ane, Maitane, Liane, Beñat y Joana, a vosotros ¿qué os tengo que decir?, “gracias por aguantarme”. Y por supuesto, a Euge que me animó mucho en mi último tramo, y especialmente a Mauro, que siempre estuvo a mi lado, mi gran compañero y amigo.

No voy a olvidarme de mi familia que, aunque no estuvieran allí físicamente me han ayudado desde el principio en todos los aspectos. “Gràcies papa i mama per ajudar-me i recolzar-me en tot moment des del principi, tot i no saber on arribaria tot plegat. I un petit raconet per tu, iaia,

que ens vas deixar i jo no hi vaig ser per dir-te adéu, però t'he tingut sempre als meus pensaments".

No soy persona de grandes discursos, simplemente gracias a todos, siempre recordaré esta etapa de mi vida como una experiencia muy positiva e enriquecedora, y me alegro que hayas formado parte de ella.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representación molecular de los agentes individuales utilizados como efectores para la evaluación de respuestas interactivas..... 17
- Figura 2: Diferencias entre los 7 mejores modelos para ajustar las DR de los ELCT. Son presentados cuatro casos diferentes: Caso 1: un perfil potencial; Caso 2, un perfil de primer orden; Caso 3, un perfil ligeramente sigmoidal, y Caso 4, un perfil fuertemente sigmoidal... 65
- Figura 3: Dosis-respuestas (puntos: ○) experimentales de la línea celular tumoral de NCI-H460 del ensayo colorimétrico de la SRB para hacer un barrido de los efectos de 3 agentes comerciales (compuestos puros de EL, VP-16 y CDDP) y 2 extractos naturales (mezcla de compuestos procedentes del EM y EA). Las líneas (—) representan los ajustes conseguidos con el modelo matemático seleccionado. Los valores del ajuste paramétrico y sus datos estadísticos correspondientes para la línea NCI-H460 están presentes en la Tabla 12. 67
- Figura 4: Parte A: Identificación de los posibles parámetros para el análisis de las respuestas de los ELCT por representación gráfica convencional. En la parte superior, el porcentaje de inhibición de las células tumorales se representa frente a la DR de un agente simulado. En la parte inferior, se presenta la tasa de inhibición (derivada numérica). Parte B: Ilustración de los problemas asociados con la aplicación de los posibles valores paramétricos para describir la inhibición DR de las células tumorales: Caso B1, todos los perfiles presentan los mismos valores de LD_{50} ; Caso B2, todos los perfiles presentan los mismos valores de V_m ; Caso B3, todos los perfiles presentan los mismos valores de λ ; y Caso B4, todos los perfiles presentan los mismos valores de LD_K 73
- Figura 5: Posibles distintos perfiles en función del valor paramétrico a del modelo de la Ec. [5] para cubrir el máximo grado de posibles perfiles en una respuesta de una sola variable. . 77
- Figura 6: Dosis-respuestas (puntos: ○) experimentales de cuatro líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2) por el ensayo colorimétrico de la SRB para hacer una evaluación de los efectos de 3 agentes comerciales (compuestos puros) y 2 extractos naturales (mezcla de compuestos). Estos datos (125 puntos de datos por agente y línea celular tumoral) fueron utilizados para clasificar los nueve modelos seleccionados de la bibliografía. Las líneas (—) representan los ajustes conseguidos con el modelo matemático seleccionado. Los valores del ajuste paramétrico obtenido son obtenidos en la Tabla 12..... 82

Figura 7: Comparación gráfica de los principales valores paramétricos para conseguir las respuestas experimentales. 83

Figura 8: Posibles diseños experimentales utilizados para la evaluación de efectos interactivos de la combinación de dosis de dos agentes: Radial simple (A), Radial concéntrico (B), Equiaditivo (C) y Completo (D). 90

Figura 9: Procedimiento ilustrativo para obtener las respuestas utilizando dos hipotéticas combinaciones de agentes, como ejemplo. El valor final RUV de tal interacción fue -4.94 %. 96

Figura 10: Matriz de combinación de respuestas para la línea NCI-H460, que se organiza de la siguiente manera: a) en la diagonal se pueden ver los resultados obtenidos para los controles; b) en la parte superior de la diagonal, se presenta la superficie de respuestas para cada par de agentes antitumorales; y c) en la parte inferior de la diagonal se presenta el “escenario” de diferencias entre sus respectivas interacciones nulas y la respuesta obtenida. Los resultados numéricos están en la Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16. En todos los casos los puntos (●) son los resultados experimentales obtenidos, mientras que las superficies son los resultados derivados por los modelos utilizados. 98

Figura 11: Matriz de combinación de respuestas para la línea HeLa, que se organiza de la siguiente manera: a) en la diagonal se pueden ver los resultados obtenidos para los controles; b) en la parte superior de la diagonal, se presenta la superficie de respuestas para cada par de agentes antitumorales; y c) en la parte inferior de la diagonal se presenta el “escenario” de diferencias entre sus respectivas interacciones nulas y la respuesta obtenida. Los resultados numéricos están en la Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16. En todos los casos los puntos (●) son los resultados experimentales obtenidos, mientras que las superficies son los resultados derivados por los modelos utilizados. 99

Figura 12: Matriz de combinación de respuestas para la línea MCF-7, que se organiza de la siguiente manera: a) en la diagonal se pueden ver los resultados obtenidos para los controles; b) en la parte superior de la diagonal, se presenta la superficie de respuestas para cada par de agentes antitumorales; y c) en la parte inferior de la diagonal se presenta el “escenario” de diferencias entre sus respectivas interacciones nulas y la respuesta obtenida. Los resultados numéricos están en la Tabla 14, Tabla 15 y Tabla 16. En todos los casos los puntos (●) son los resultados experimentales obtenidos, mientras que las superficies son los resultados derivados por los modelos utilizados. 100

LISTA DE TABLAS

Tabla 1: Factores de riesgo, datos estadísticos y tratamiento quimioterapéutico de los cánceres de pulmón, mama, cérvix y hepatocelular.....	16
Tabla 2: Mecanismos de acción de los compuestos de la familia de la EL y VP-16 conocidos hasta la fecha y breve descripción.	20
Tabla 3: Bioactividad (en términos de LD ₅₀) del extracto metanólico y extracto acuoso de la planta de <i>Achillea millefolium L.</i> (Dias et al., 2013).	22
Tabla 4: Comparación de diferentes criterios de selección de modelos (MSC) típicamente utilizados para comparar los modelos basados en su complejidad, bondad de ajuste o exceso de ajuste, proporcionando el criterio que elige la solución más verdadera.....	49
Tabla 5: Valores numéricos de los parámetros estimados y IC correspondientes de las Ecs. [1] a [9], después de ajustar los valores DR de cuatro líneas tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2) determinados por el ensayo colorimétrico de la SRB para hacer un análisis de los efectos de 3 agentes comerciales (EL, VP-16 y CDDP, compuestos puros) y 2 extractos naturales (EM y EA, mezcla de compuestos). Estos datos fueron utilizados para evaluar los nueve modelos seleccionados de la bibliografía (Ecs. [1] a [9]). El valor de R ² se presenta como prueba de los resultados de ajuste obtenidos. Los valores paramétricos subrayados son no significativos y por ello el resultado de los ajustes debería ser considerado como no válido.	57
Tabla 6: Respuestas estadísticas de ajuste y ranking de modelos (R _k) obtenidos para cada MSC para los efectos de cinco agentes (EL, VP-16, CDDP, EM y EA) para la línea celular tumoral NCI-H460. Los resultados obtenidos para cada MSC se presentan juntamente con el ranking individual (R _k) entre paréntesis. Finalmente, el ranking global ($\sum R_k$) basado en la suma de cada MSC para cada agente es presentado.	58
Tabla 7: Respuestas estadísticas de ajuste y ranking de modelos (R _k) obtenidos para cada MSC para los efectos de cinco agentes (EL, VP-16, CDDP, EM y EA) para la línea celular tumoral HeLa. Los resultados obtenidos para cada MSC se presentan juntamente con el ranking individuales (R _k) entre paréntesis. Finalmente, el ranking global ($\sum R_k$) basado en la suma de cada MSC para cada agente es presentado.	59

Tabla 8: Respuestas estadísticas de ajuste y ranking de modelos (Rk) obtenidos para cada MSC para los efectos de cinco agentes (EL, VP-16, CDDP, EM y EA) para la línea celular tumoral MCF-7. Los resultados obtenidos para cada MSC se presentan juntamente con los rankings individuales (Rk) entre paréntesis. Finalmente, el ranking global ($\sum Rk$) basado en la suma de cada MSC para cada agente es presentado.	60
Tabla 9: Respuestas estadísticas de ajuste y ranking de modelos (Rk) obtenidos para cada MSC para los efectos de cinco agentes (EL, VP-16, CDDP, EM y EA) para la línea celular tumoral HepG2. Los resultados obtenidos para cada MSC se presentan juntamente con el ranking individuales (Rk) entre paréntesis. Finalmente, el ranking global ($\sum Rk$) basado en la suma de cada MSC para cada agente es presentado.	61
Tabla 10: Ranking global ($\sum Rk$) basado en la suma de ranking de cada MSC para las cuatro líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2) para hacer un análisis de los efectos de 3 agentes comerciales (EL, VP-16 y CDDP, como compuestos puros) y 2 extractos naturales (EM y EA como mezclas de compuestos). Estos valores del ranking paramétrico fueron utilizados para clasificar los nueve modelos seleccionados de la bibliografía (Ecs. [1] a [9]) de más al menos eficiente para cada línea celular tumoral (ranking parcial) y finalmente para todas ellas (ranking final global).....	62
Tabla 11: Tabla Q, herramienta que nos sirve para seleccionar un diseño óptimo experimental a partir del conocimiento de los IC paramétricos de K, LD ₅₀ y <i>a</i> en función de los distintos perfiles de <i>a</i> de la Ec. [5] (observar variaciones en Figura 5), del número de desviación típica de la muestra experimental (σ), número de dosis <i>n</i> a utilizar y réplicas <i>r</i> a aplicar.	78
Tabla 12: Valores paramétricos de LD ₅₀ , V _m , λ y LD _K obtenidos la Ec. [5] y sus derivaciones expresadas en las Ec. [25], [26], [28] y [29] para analizar, describir y cuantificar de una manera rigurosa los resultados obtenidos en las cuatro líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2) para todos los agentes testados experimentalmente en el ensayo de la SRB (EL, VP-16, CDDP, EM y EA). Resultados gráficos en la Figura 6 y Figura 7.....	81
Tabla 13: Estudios más recientes de interacciones sinérgicas/antagónicas de agentes en líneas celulares tumorales de ELCT típicos.	86
Tabla 14: Valores paramétricos de la acción conjunta de diferentes agentes y dos extractos naturales ajustando los resultados experimentales a la Ec.[17] (asumiendo falta de interacción) y [21] (asumiendo mecanismos interactivos) de la hipótesis de AC (Adición de	

Concentraciones). El grado de efecto interactivo (% RUV) se calculó como está descrito en la Ec. [22]. Para todos los parámetros presentados sus estimaciones son significativos.....	101
Tabla 15: Valores paramétricos de la acción conjunta de diferentes agentes y dos extractos naturales ajustando los resultados experimentales a la Ec [13] (asumiendo falta de interacción) y [21] (asumiendo mecanismos interactivos) de la hipótesis de AI (Acción Independiente). El grado de efecto interactivo (% RUV) se calculó como está descrito en la Ec. [22]. Para todos los parámetros presentados sus estimaciones son significativos.	102
Tabla 16: Efecto de la combinación de 45 pares de combinaciones de agentes antitumorales para cada una de las líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa y MCF-7) con el ensayo colorimétrico SRB evaluando los efectos de 3 agentes comerciales (EL, VP-16 y CDDP, como compuestos puros) y 2 extractos naturales (EM y EA, como mezcla de compuestos), incluyendo aquellos en los que un agente antitumoral se combina consigo mismo, que se usan como control. Para cada caso, el RUV (%) se calcula como está descrito en la Ec. [22]. Nótese las diferencias en el escalado en los rangos de concentraciones presentado a la izquierda en cada una de las líneas celulares testadas.	103

LISTA DE ABREVIATURAS

Generales:

DR:	Dosis-respuesta.
ELCT:	Ensayos de líneas celulares tumorales para la evaluación de la proliferación celular.
IC:	Intervalos de confianza.
σ :	Desviación típica de una muestra.
AI:	Acción independiente.
AC:	Adición de concentraciones.
ICb	Índice combinado.
ADN:	Ácido desoxirribonucleico.
ATP:	Adenosíntrifosfato.

Ensayos de líneas celulares tumorales para la evaluación de la proliferación celular:

MTT:	Ensayo de medición de la función metabólica utilizando la sal de tetrazolio de bromuro de (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio).
MTS:	Ensayo de medición de la función metabólica utilizando la sal de tetrazolio de (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio.
XTT:	Ensayo de medición de la función metabólica utilizando la sal de tetrazolio de (2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilido).
SRB:	Ensayos de componentes específicos de las células utilizando el colorante de la Sulforrodamina B.

Líneas celulares experimentalmente testadas en este trabajo:

NCI-H460:	Línea celular tumoral de cáncer de pulmón de células no pequeñas.
HeLa:	Línea celular tumoral de cáncer de cérvix.
MCF-7:	Línea celular tumoral de cáncer de mama.
HepG2:	Línea celular tumoral de cáncer hepatocelular.

Otras líneas celulares:

PLP2:	Cultivos primarios de células hepáticas no tumorales.
A431:	Línea celular tumoral de carcinoma epidermoide de piel.
HCT-15:	Línea celular tumoral de cáncer colon.

Agentes inhibidores del crecimiento celular:

VP-16:	Etopósido.
CDDP:	Cisplatino.
EL:	Elipticina.
EM:	Extracto metanólico.
EA:	Extracto acuoso.

Reactivos/soluciones

DMSO:	Dimetilsulfóxido.
-------	-------------------

TCA:	Ácido tricloroacético.
HBSS:	Solución salina balanceada de Hanks.
Tris:	Tris(hidroximetil)aminometano, $(\text{HOCH}_2)_3\text{CNH}_2$.
TrypLE Express:	Sustituto de tripsina de origen no animal.
SFB:	Suero fetal bovino.
RPMI-1640:	Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medio de cultivo.

Criterios estadísticos utilizados para la selección de modelos (MSC) más adecuados:

AIC:	Criterio de Información de Akaike.
AICc:	Criterio de Información de Akaike Corregido
BIC:	Criterio de Información de Schwartz o Bayesiano.
RIC:	Criterio de Información Residual.
Cp:	Criterio de Mallows.
R^2_{adj} :	Coefficiente de correlación de determinación ajustado multiplicado.
FPE:	Error de predicción final de Akaike.
MSIC:	Criterio de selección de modelo.
MA^2 :	Análisis del Modelo cuadrado.
R^2	Coefficiente de correlación lineal.

Modelos matemáticos de distintas áreas de estudio útiles para la evaluación y cuantificación de las dosis-respuesta de células tumorales:

Ec. [1]:	Ecuación de Michaelis-Menten.
Ec. [2]:	Ecuación de Bertalanffy.
Ec. [3]:	Ecuación de Verhulst.
Ec. [4]:	Ecuación de Gompertz.
Ec. [5]:	Ecuación de Weibüll.
Ec. [6]:	Ecuación de Hill.
Ec. [7]:	Ecuación de Verhulst modificado.
Ec. [8]:	Ecuación de Gompertz modificado.
Ec. [9]:	Ecuación de Richards-Chapman.

Valores paramétricos para describir el efecto dosis-respuesta de los agentes (Ec. [5]):

R :	Respuesta (% de inhibición).
K :	Valor asintótico de la respuesta (% de inhibición).
LD_{50} :	Dosis correspondiente a la mitad de la respuesta de máxima inhibición ($K/2$), conocida como valor LD_{50} (Lethal Dose en sus siglas en ingles).
a :	Parámetro de forma sigmoideal (sin dimensiones).
λ :	Fase de latencia (unidades de dosis) a la que se consigue el mínimo valor significativo de R .
V_m :	Valor de la velocidad máxima (R / dosis).
D_K :	Dosis a la que se consigue el máximo R (unidades de dosis).

Modelo de Weibüll para describir el efecto dosis-respuesta interactiva entre relaciones binarias de agentes (Ec. [12]):

K	Asíntota (R unidades).
m	Equivalente al LD_{50} , como la dosis correspondiente a la mitad de la respuesta de máxima inhibición ($K/2$). Se utiliza como m para simplificar las ecuaciones correspondientes.
a	Parámetro de forma sigmoideal (sin dimensiones).

Perturbaciones de la respuesta a un sólo efector (Ec. [14]):

θ :	Cualquier parámetro de la ecuación ($\theta=K, m, a$).
π_{θ} :	Función de relación hiperbólica para cada parámetro de la ecuación ($\theta=K, m, a$).
b_{θ} :	Parámetro numerador de la relación hiperbólica de la ecuación ($\theta=K, m, a$).
c_{θ} :	Parámetro denominador de la relación hiperbólica de la ecuación ($\theta=K, m, a$).

Ecuaciones usadas para discernir la hipótesis de interacción y consecuentemente las interacciones sinérgicas o antagonistas de combinaciones binarias de agentes:

Ec. [13]:	Hipótesis de Acción Independiente asumiendo falta de interacción.
Ec. [16]:	Hipótesis de Acción Independiente asumiendo mecanismos interactivos.
Ec. [17]:	Hipótesis de Adición de Concentraciones asumiendo falta de interacción.
Ec. [21]:	Hipótesis de Adición de Concentraciones asumiendo mecanismos interactivos.

Parámetros para la cuantificación del criterio numérico que resume la naturaleza y la intensidad de las interacciones sinérgicas o antagonistas (Ec. [22]):

RUV :	Porcentaje de unidad relativa de volumen.
SV_{NI} :	Volumen de la superficie producida por la interacción nula.
SV_I :	Volumen de la superficie con interacciones.
A_i and A_j :	Variables dependientes que representan la concentración de n y m de ambos agentes.
h_i and h_j :	Los conjuntos de intervalos de concentración.
$\Phi_{i,j}$:	Producto de los coeficientes trapezoidales compuestos anidados.

ÍNDICE DE CONTENIDOS

AGRADECIMIENTOS	V
LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABLAS	IX
LISTA DE ABREVIATURAS	XIII
ÍNDICE DE CONTENIDOS	1
ABSTRACT	7
RESUMO	9
RESUMEN	11
1. Introducción	13
1.1. Visión general del tratamiento de los cánceres	13
1.2. Generalidades de los cánceres de pulmón, mama, cérvix y hepatocelular.	14
1.2.1. Cáncer de pulmón	14
1.2.2. Cáncer de cérvix	14
1.2.3. Cáncer de mama	15
1.2.4. Cáncer hepatocelular	15
1.3. Origen y mecanismo de acción de agentes individuales antitumorales de procedencia sintética	17
1.3.1. Elipticina	17
1.3.2. Etopósido	18
1.3.3. Cisplatino	18
1.4. Agentes naturales para el tratamiento del cáncer	21
1.5. Técnicas analíticas <i>in vitro</i> comunes para la determinación en líneas celulares tumorales de los efectos citotóxicos o antitumorales	23
1.5.1. Reducción de sales de tetrazolio	23
1.5.2. Colorimétricos no tetrazólicos	23
1.5.3. Aplicación para la determinación/cuantificación de respuestas interactivas	23

1.6. Modelos matemáticos de distintas áreas de estudio útiles para la caracterización, identificación y cuantificación de la dosis-respuesta de células tumorales a la acción de un agente	24
1.7. Modos de acción y modelos matemáticos representativos para la caracterización, identificación y cuantificación de las interacciones sinérgicas, antagónicas o de acción nula	25
2. Objetivos	29
2.1. Efectos citotóxicos de agentes tumorales individuales desde una visión de dosis respuesta	29
2.2. Efectos citotóxicos interactivos entre combinaciones binarias de agentes antitumorales	30
3. Materiales y métodos	33
3.1. Reactivos	33
3.2. Preparación de soluciones	33
3.3. Agentes antitumorales	33
3.3.1. Agentes comerciales	33
3.3.2. Agentes naturales	33
3.3.2.a) Extracto metanólico	34
3.3.2.b) Extracto acuoso	34
3.4. Descripción, conservación y mantenimiento de las líneas celulares	34
3.4.1. Líneas celulares tumorales utilizadas y origen	34
3.4.1.a) Línea celular tumoral NCI-H460	34
3.4.1.b) Línea celular tumoral HeLa	34
3.4.1.c) Línea celular tumoral MCF-7	35
3.4.1.d) Línea celular tumoral HepG2	35
3.4.2. Conservación y mantenimiento de las líneas celulares	35
3.5. Preparación de la suspensión celular	36
3.6. Determinación de la actividad antitumoral por el método de la sulforrodamina B para la evaluación de la proliferación celular	36
3.7. Modelos matemáticos de distintas áreas de estudio útiles para la caracterización, identificación y cuantificación de la dosis-respuesta de agentes individuales en células tumorales	37
3.7.1. Funciones potenciales y de primer orden sin ordenada en el origen	38

3.7.1.a) Ecuación de Michaelis–Menten _____	38
3.7.1.b) Ecuación de Bertalanffy _____	38
3.7.2. Funciones sigmoidales con ordenada en el origen (valor inicial $R_0 \neq 0$) _____	38
3.7.2.a) Ecuación de crecimiento de Verhulst _____	38
3.7.2.b) Ecuación de crecimiento de Gompertz _____	39
3.7.3. Funciones sigmoidales sin ordenada en el origen (valor inicial $R_0 = 0$) _____	39
3.7.3.a) Ecuación de Weibüll _____	39
3.7.3.b) Ecuación de Hill _____	39
3.7.3.c) Ecuación modificada de Verhulst _____	40
3.7.3.d) Ecuación modificada de Gompertz _____	40
3.7.3.e) Ecuación Richards-Chapman _____	40
3.8. Teoría y modelos matemáticos para la caracterización, identificación y cuantificación de la dosis-respuesta de células tumorales a la acción binaria de dos agentes _____	40
3.8.1. Las formas de la interacción nula _____	41
3.8.1.a) Acción independiente _____	41
3.8.1.b) Adición de concentraciones _____	41
3.8.2. La acción conjunta de dos agentes antitumorales con y sin interacciones _____	42
3.8.2.a) Acción independiente _____	42
3.8.2.b) Adición de concentraciones _____	43
3.8.3. Nociones de sinergia, antagonismo y acción nula _____	45
3.8.4. Índice global para la cuantificación de los efectos interactivos _____	46
3.9. Ajuste de los datos a los modelos _____	47
3.9.1. Coeficientes de determinación _____	47
3.9.2. Significancia de los coeficientes paramétricos y consistencia de los modelos _____	47
3.9.3. Desarrollo de un software para llevar a cabo un método de regresión automático por etapas de las acciones interactivas entre agentes antitumorales _____	47
3.10. Criterios utilizados para evaluar la selección del modelo más eficiente _____	48
3.10.1. Criterio basado en el modelo de selección de criterios (MSC) _____	48
3.10.2. Criterios estadísticos adicionales _____	48
4. Resultados y discusión _____	51

4.1. Selección del modelo matemático más apropiado para la caracterización, identificación y cuantificación de la dosis-respuesta de los efectos citotóxicos en líneas celulares tumorales de agentes individuales. Evaluación crítica de la aplicación de un valor paramétrico como único criterio estándar _____ **52**

4.1.1. Selección del modelo matemático para la caracterización, identificación y cuantificación de las respuestas de citotoxicidad en ensayos *in vitro* en líneas celulares tumorales _____ 52

4.1.2. Modelos estadísticos para la caracterización, identificación y cuantificación de respuestas biológicas _____ 53

4.1.3. Análisis de los modelos matemáticos dosis-respuesta más comunes para la caracterización, identificación y cuantificación de respuestas citotóxicas de los ELCT con criterios estadísticos selectivos. _____ 54

4.1.3.a) Aplicación de los criterios estadísticos de selección de modelos _____ 54

4.1.3.b) Criterio intuitivo adicional _____ 63

4.1.4. Selección del modelo y discusión de las principales ventajas e inconvenientes _____ 63

4.1.5. Descripción extensiva de las capacidades del modelo matemático seleccionado para la sección gráfica aumentada de la dosis-respuesta de la inhibición celular de líneas celulares tumorales _____ 68

4.1.6. Problemas de cada uno de los parámetros posibles del análisis matemático que podrían ser utilizados como criterio único para analizar los resultados dosis-respuesta de ELCT _____ 70

4.1.7. Formulación metodológica para el diseño experimental óptimo del estudio dosis-respuesta de agentes individuales con la finalidad de controlar los intervalos de confianza de los parámetros del modelo de Weibull _____ 74

4.1.8. Aplicación del modelo _____ 79

4.2. Formulación de una metodología para la identificación del modo de acción y la cuantificación del tipo de interacción _____ **84**

4.2.1. Algunos apuntes en relación a posibles diseños experimentales _____ 88

4.2.1.a) Diseño radial simple _____ 88

4.2.1.b) Diseño radial concéntrico _____ 88

4.2.1.c) Diseño equiaditivo _____ 88

4.2.1.d) Diseño completo _____ 89

4.2.2. Diseño experimental para la combinación de dos agentes antitumorales, número de concentraciones y rangos más adecuados para el análisis eficiente. _____ 90

4.2.3. Significado, juicio y etapas para el análisis de interacciones en función de las hipótesis AI y AC de interacción aceptadas _____ 91

4.2.4. Número de agentes antitumorales y tipo (puros o mezclas) que son teóricamente significativos dentro del marco de trabajo descrito _____	93
4.2.5. Nociones de las respuestas interactivas nula, sinérgica o antagónica del efecto conjunto de la acción de dos agentes: ejemplo ilustrativo del proceso metodológico _____	94
4.2.6. Reproducibilidad de la metodología y límite de confianza de la determinación de RUV _____	95
4.2.7. Aplicación para la acción conjunta entre diversos pares de agentes _____	97
4.2.8. Significados de la acción interactiva y tipo de todas las interacciones de las mezclas binarias evaluadas _____	104
4.2.8.a) Línea celular tumoral NCI-H460 _____	104
4.2.8.b) Línea celular tumoral HeLa _____	105
4.2.8.c) Línea celular tumoral MFC-7 _____	106
4.2.8.d) Línea celular tumoral HepG2 _____	107
4.2.9. Otras generalidades _____	107
5. Conclusiones _____	109
5.1. Modelos matemáticos para los efectos citotóxicos en líneas celulares tumorales _____	110
5.2. Metodología y sistemas matemáticos para la identificación del modo de acción y la cuantificación del tipo de interacción _____	111
6. Perspectivas y proyecciones del trabajo realizado _____	115
BIBLIOGRAFÍA _____	117

ABSTRACT

The development of convenient tools for describing and quantifying the effects of standard and novel therapeutic agents is essential for the research community to perform more accurate evaluations. Although in the last decade mathematical models and quantification criteria have been exchanged between different fields of study, there are relevant methodologies that lack of proper mathematical descriptions and standard criteria to quantify their responses. Therefore, part of the relevant information that can be drawn from the experimental results obtained and the quantification of its statistical reliability is lost. Despite the relevance of *in vitro* tumor cell-lines assays (TCLA), there are some areas in which they need to be cautiously re-evaluated. In order to develop an appropriate mathematical methodology for human tumor cell lines assays, three well recognized commercial antitumor agents (ellipticine, etoposide and cisplatin) and two known antitumor natural extracts (methanolic and aqueous) obtained from *Achillea millefolium* L., were used as case study in four tumour lines (NCI-H460, HeLa, HepG2 and MCF-7). The analysis of all the particular problems associated with the diverse nature of the available TCLA used is unfeasible. However, since most of the TCLA share the main objectives and similar operative requirements, the sulforhodamine B (SRB) colorimetric assay was chosen for cytotoxicity screening in tumor cell lines as an experimental case study, which was performed in a microplate system.

At first instance, there is no standard model criteria that enables the evaluation of dose-response cytotoxic effects of antitumor drugs. The common biological and practical non-linear dose-response mathematical models were tested against the obtained experimental data and by several statistical analyses, the model based in the Weibull distribution was confirmed as the convenient approximation to test the cytotoxic effectiveness of antitumor compounds. Then, the advantages and disadvantages of all different parametric criteria derived from the model that enables the quantification of the dose-response drug-effects were discussed extensively. Therefore, model and standard criteria for performing easily comparisons between different compounds were established. In addition, the model was verified with available experimental data from appropriated scientific bibliography of other TCLA. Its advantages are a simple application, provision of parametric estimates that characterize the response as standard criteria, economization of experimental effort and enabling rigorous comparisons among the effects of different compounds and experimental approaches. In all experimental data fitted, the calculated parameters were always statistically significant, the

equations prove to be consistent and the correlation coefficient of determination was in most of the cases higher than 0.98.

Secondly and strictly linked with the finding observed in the previous part, the controversial concepts of synergy and antagonism were revised using mathematical advances from areas of study. Despite their importance, the common characterization of these phenomena is often questionable due to some problematic definitions. Current methods to determine the interactive actions between agents have been recently described as simplistic. The main objectives of this thesis were: 1) to evaluate the current status of the available methodologies for evaluation of synergy and antagonism in cell line assays for testing antitumor agents; and 2) to propose a new vision for the research community by incorporating well-established ideas from different existing fields. The binary combination of increasing concentrations of each agent/extract were tested against each other in arrays of 64 independent combinations (8x8). End-point measurements were used to quantify the response for each independent condition. Once the methodological procedure was established, pseudo-mechanistic mathematical models previously developed by other authors, were used to describe the joint action between the binary combination of all the agents in all cell lines. Their application allowed to: 1) typify a joint activity in terms of the two modes of joint action accepted in the field of dose-response relationships, independent action (IA) and concentration addition (CA); and 2) led to the detection and quantification of synergistic and antagonistic effects.

Therefore, models and standard criteria for performing descriptions of individual and mixture of compounds are established from a dose-response point of view for TCLA. Its advantages are a simple application, provision of parametric estimates that characterize the response as standard criteria, economization of experimental effort and enabling rigorous comparisons among the effects of different compounds and experimental approaches. In all experimental data fitted, the calculated parameters were always statistically significant, the equations prove to be consistent and the correlation coefficient of determination was in most of the cases higher than 0.97.

RESUMO

O desenvolvimento de ferramentas adequadas para descrever e quantificar os efeitos de agentes terapêuticos convencionais e emergentes é essencial para que a comunidade científica possa realizar avaliações mais precisas. Embora na última década tenham sido adaptados padrões de modelação e quantificação matemática entre diferentes áreas de estudo, existem metodologias relevantes que não possuem descrições matemáticas adequadas e critérios padrão para quantificar as suas respostas. Assim, uma parte relevante da informação que pode ser extraída de resultados experimentais e a quantificação da sua validade estatística é perdida. Apesar da relevância dos testes *in vitro* em linhas celulares tumorais, a sua aplicação em determinadas áreas deve ser cuidadosamente reconsiderada. No sentido de desenvolver uma metodologia adequada, utilizaram-se quatro linhas celulares tumorais: carcinoma de pulmão de células não-pequenas (NCI-H460), carcinoma de mama (MCF-7), carcinoma de colón do útero (HeLa) e carcinoma hepatocelular (HepG2); três agentes antitumorais comerciais (elipticina, etopósido e cisplatino) e dois extratos naturais antitumorais conhecidos (metanol e aquoso) obtidos a partir de *Achillea millefolium* L.. A análise de todos os problemas específicos associados à natureza diversa dos ensaios disponíveis com linhas celulares tumorais (ELCT) é inviável. No entanto, considerando que muitos dos ELCT partilham requisitos e objetivos operacionais, seleccionou-se o ensaio colorimétrico da sulforrodamina B (SRB) para o efetuar o *screening* de citotoxicidade em linhas celulares tumorais, como estudo de caso.

Em primeiro lugar, não há nenhum procedimento padrão que permita a avaliação dos efeitos citotóxicos de dose-resposta de fármacos antitumorais. Neste trabalho, utilizou-se um critério de dose-resposta simples com base num modelo matemático não linear para testar a eficácia de compostos antitumorais citotóxicos. O modelo e a abordagem ajudou a descrever com precisão a dose-resposta e permitiu sintetizar a quantificação dos efeitos farmacológicos através de diferentes parâmetros que podem ser usados como um critério padrão para comparações simples entre compostos diferentes. O modelo foi verificado com dados experimentais disponíveis no nosso laboratório. As suas vantagens estão relacionadas com o facto de ser uma aplicação simples, fornecendo estimativas paramétricas que caracterizam a resposta como critério padrão, permitir uma economia de esforço experimental e efetuar comparações rigorosas entre os efeitos de diferentes compostos e abordagens experimentais. Em todos os dados experimentais obtidos, os parâmetros calculados foram sempre

estatisticamente significativos, as equações provaram ser consistentes e os coeficientes de correlação da determinação foram em todos os casos maior do que 0,98.

Em segundo lugar e, de acordo com as soluções anteriormente encontradas, os conceitos de sinergia e antagonismo englobam comportamentos característicos controversos de sistemas muito diversos. Apesar da sua importância, a caracterização comum destes fenómenos é muitas vezes questionável devido a definições pouco consensuais. Os métodos recentemente utilizados na determinação de ações interativas entre agentes têm sido apontados como sendo simplistas. Os principais objetivos aqui propostos foram: 1) avaliar o estado atual das metodologias disponíveis para avaliação de sinergismo e antagonismo; e 2) propor uma nova visão para a comunidade científica, incorporando ideias bem estabelecidas a partir de diferentes campos existentes. A combinação binária de concentrações crescentes de cada agente/extrato foi testada noutras matrizes de 64 combinações independentes (8x8). A análise foi realizada num sistema de microplacas, utilizando uma combinação binária de oito concentrações crescentes de cada agente/extrato, gerando uma matriz de resposta de 64 combinações independentes. Pretende-se criar matrizes de combinações binárias entre agentes e extratos. Uma vez aplicado o procedimento metodológico, foram utilizados modelos matemáticos pseudomecanísticos anteriormente desenvolvidos por outros autores no sentido de descrever a ação conjunta de vários pares de agentes/extratos. A sua aplicação permitiu: 1) caracterizar uma atividade conjunta em termos dos dois modos de ação conjunta aceites em matéria de relação dose-resposta, ação independente (AI) e adição de concentração (AC); e 2) levar à detecção e quantificação de efeitos sinérgicos ou antagonistas, comparando, para cada modo de ação, a organização dos resultados experimentais para vários modelos formais descrevendo diferentes cenários de interação, incluindo interação nula.

RESUMEN

El desarrollo de herramientas convenientes para describir y cuantificar los efectos de los agentes terapéuticos, tanto convencionales como nuevos, es esencial para la comunidad científica para realizar evaluaciones en una forma más precisa. Aunque en la última década los modelos matemáticos y los criterios de cuantificación se han intercambiado entre los diferentes campos de estudio, hay metodologías pertinentes que carecen de descripciones matemáticas apropiadas y criterios estándar para cuantificar sus respuestas. Por consiguiente, parte de la información pertinente que puede ser extraída de los resultados experimentales obtenidos y la cuantificación de su fiabilidad estadística es excluida. A pesar de la relevancia de los ensayos *in vitro* con líneas celulares tumorales, en la actualidad existen aspectos que necesitan alternativas de distinta índole. Con el fin de desarrollar una metodología apropiada para diversas aproximaciones, se han utilizado para tal fin: a) cuatro líneas celulares tumorales, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NCI-H460), cáncer de mama (MCF-7), cáncer de cérvix (HeLa) y cáncer hepatocelular (HepG2); tres agentes antitumorales comerciales (elipticina, etopósido y cisplatino) y dos extractos antitumorales conocidos (metanólico y acuoso) obtenidos a partir de *Achillea millefolium* L. Sin embargo, el análisis de todos los problemas particulares asociados con la naturaleza diversa de los ensayos de líneas celulares tumorales (ELCT) disponibles es inviable. Por lo tanto, como muchos de los ELCT comparten los objetivos principales y tienen requerimientos operativos similares, se ha elegido el ensayo colorimétrico de la sulforodamina B para el *screening* de la citotoxicidad en líneas celulares tumorales, como caso práctico de estudio.

En primer lugar, no hay una forma estándar que permita la evaluación de los efectos citotóxicos dosis-respuesta (DR) de los fármacos antitumorales. En este trabajo, se presenta un criterio simple DR, basado en un modelo matemático no lineal, para testar la efectividad citotóxica de compuestos antitumorales. El modelo y el criterio, ayudan a describir con precisión la DR y permiten resumir la cuantificación de los efectos farmacológicos a través de diferentes parámetros que pueden ser utilizados como criterio estándar para realizar fácilmente comparaciones entre diferentes compuestos. El modelo fue verificado con datos experimentales producidos en nuestro laboratorio y específicamente diseñados para abordar la complejidad de esta tarea. Sus ventajas incluyen: una aplicación simple, provisión de estimaciones paramétricas que caracterizan la respuesta como criterio estándar, economización de esfuerzo experimental y facilitar comparaciones rigurosas entre los efectos

de diferentes compuestos y enfoques experimentales. En todos los datos experimentales provistos, los parámetros calculados fueron siempre estadísticamente significativos, las ecuaciones obtenidas demostraron ser consistentes y los coeficientes de correlación de determinación fueron en todos los casos superiores a 0.96.

En segundo lugar y ligado explícitamente a las soluciones analíticas anteriormente encontradas, se discuten los conceptos, metodologías y modelos de cuantificación de sinergia y antagonismo existentes para los ELCT. Estos conceptos son comportamientos característicos de sistemas de muy diversa naturaleza, que han sido objeto de controversia en muchos campos. Pese a su importancia, la caracterización habitual de estos fenómenos en el contexto de la acción antitumoral es discutible, tanto por motivos de definición como del prototipo de resultados utilizados para las evaluaciones cuantitativas. Los principales objetivos de este trabajo fueron: 1) evaluar el estado actual de las metodologías disponibles para la cuantificación de efectos interactivos de sinergia y antagonismo de la combinación de dos agentes en ELCT; y 2) proponer una visión actualizada mediante la incorporación de conceptos bien establecidos de otros campos de estudio. El análisis se realiza en un sistema de microplacas, utilizando la combinación de ocho concentraciones crecientes de cada agente generando una matriz de respuesta de 64 combinaciones independientes. Una vez desarrollado el procedimiento metodológico, se aplicaron conceptos matemáticos usados satisfactoriamente por otros autores, para describir la acción conjunta de los diferentes pares de agentes. Su aplicación permitió: 1) tipificar la actividad interactiva en términos de las dos hipótesis de acción conjunta aceptadas en el campo de relaciones DR, la acción independiente (AI) y la adición de concentraciones (AC); y 2) la detección y cuantificación de los efectos sinérgicos y antagónicos comparando, para cada modo de acción, el ajuste de los resultados experimentales a los modelos formales mediante la descripción de diferentes escenarios de interacción, incluida la interacción nula (o ausencia de interacción).

1. Introducción

El cáncer es la principal causa de muerte en todo el mundo, con previsiones a incrementar su incidencia, sobre todo en los países menos desarrollados, debido al incremento de los factores de riesgo como fumar, una dieta pobre en frutas y vegetales, inactividad física, consumo de alcohol, sobrepeso y obesidad, contaminación ambiental, radiaciones, entre otros factores (Bosetti et al., 2013; Institute of Medicine, 2007). De manera global, el cáncer de pulmón es el más diagnosticado y la principal causa de muerte en hombres, mientras que el cáncer de mama es la principal causa en el caso de las mujeres. Otros cánceres frecuentemente diagnosticados son el de hígado, estómago, cérvix y colon (Jemal et al., 2010; Parkin et al., 1999; Torre et al., 2015).

En la Península Ibérica, el cáncer es la primera causa de muerte (100 000 defunciones al año, el 25% de todas las muertes), afectando de igual manera a Portugal y España, con una previsión de 200 000 casos nuevos cada año (Hespanhol et al., 2013). Se estima que la incidencia de cáncer va a duplicarse en todo el mundo en los próximos 20-40 años. Por ello, la estrategia mundial prioriza favorecer la rápida implantación de los avances científicos en el tratamiento de la enfermedad (Thun et al., 2009).

1.1. Visión general del tratamiento de los cánceres

La generalización de los tratamientos de los diferentes tipos de cáncer es muy compleja. Aun así, hay tratamientos más o menos comunes en todos ellos en cuanto a concepto. Se podrían diferenciar cinco tratamientos a aplicar según las características del paciente, como tipo y estadio del cáncer: (1) cirugía, que tiene como objetivo extirpar el tumor; (2) radioterapia, para destruir las células cancerosas; (3) la terapia dirigida, actuando en genes o proteínas específicos del cáncer; (4) inmunoterapia, para estimular las defensas naturales del cuerpo a fin de combatir el cáncer; y (5) quimioterapia, que es el uso de fármacos para destruir o inhibir la capacidad para proliferar y dividirse de las células cancerígenas (Siegel et al., 2013).

Muchas veces se usa la combinación de quimioterapia con radioterapia, o también diferentes fármacos en quimioterapia. Esta combinación de fármacos tiene muchas ventajas: permite atacar diferentes dianas (por los diferentes mecanismos de acción), incrementa la eficacia terapéutica, reduce la toxicidad y la adquisición de resistencia fenotípica (Teixeira and Guimarães, 2013).

En la **Tabla 1** se resumen los factores de riesgo, datos estadísticos y tratamiento quimioterapéutico de los cánceres de pulmón, mama, cérvix y hepatocelular. Al trabajar con la combinación de agentes tanto sintéticos como naturales en las líneas celulares, hemos resaltado sólo los quimioterapéuticos, no con ello queriendo desvalorizar los otros. Además, aunque hayan demostrado su efectividad contra el cáncer, los fármacos quimioterapéuticos presentan efectos secundarios, ya que afectan a las células que se dividen rápidamente, propiedad que no es única de las células cancerosas, sino también de células de la piel, pelo, uñas, células del revestimiento del sistema digestivo, y de las células sanguíneas. Entre los efectos adversos están la disminución del número de células sanguíneas, haciendo que los pacientes sean más propensos a tener infecciones y a estar más cansados, así como tener problemas de coagulación. Otros efectos secundarios son las náuseas, cambios en el sentido del gusto, visión y oídos, diarrea y caída de pelo.

1.2. Generalidades de los cánceres de pulmón, mama, cérvix y hepatocelular.

1.2.1. Cáncer de pulmón

Es la neoplasia más letal en todo el mundo (Li et al., 2016; Shi et al., 2012), con un 26-29% de todas las muertes por cáncer, siendo el de mayor incidencia en la población (19.4%) (Son, 2012). Dentro de las diferentes variantes de cáncer de pulmón, el de células no pequeñas, representa un 80% de los cánceres de pulmón, y la mayoría de los pacientes (60-80%) son diagnosticados en un estado avanzado (Son, 2012). A pesar de los avances considerables en la comprensión de la patogénesis del cáncer de pulmón, actualmente sólo uno de cada ocho pacientes diagnosticados con ésta enfermedad puede ser curado (Li et al., 2016), mientras el resto muere eventualmente por metástasis extensas (proliferación descontrolada de células, normalmente epiteliales) (Kozaki et al., 2001; Weidle et al., 2016).

1.2.2. Cáncer de cérvix

Es uno de los cánceres más frecuentes en mujeres, con mayor incidencia entre los 40 y 50 años. De manera general y gracias a los controles periódicos, en los países más desarrollados es menos común (Canavan and Doshi, 2000). El pronóstico del cáncer de cérvix metastásico es malo, con una supervivencia media actual de sólo 8 a 13 meses. En los casos en los que el cáncer es localizado, la supervivencia aumenta a 5 años en el 91.5% de pacientes. Es de destacar la importancia de los controles citológicos periódicos para detectar estadios tempranos y asintomáticos del cáncer, y evitar así la progresión de una fase pre-invasiva a invasiva (Li et al., 2016).

1.2.3. Cáncer de mama

Es la proliferación de células malignas en el tejido mamario y es el cáncer más común entre las mujeres, así como la primera causa de muerte relacionada con el cáncer. Está previsto que aumente su incidencia no sólo por el incremento de la población sino por la adopción de un estilo de vida con más factores de riesgo. A nivel mundial el cáncer de mama es el que presenta la mayor prevalencia a 5 años (Bray et al., 2013; Danny et al., 2016).

1.2.4. Cáncer hepatocelular

El cáncer hepatocelular es el más común de los cánceres de hígado, y en el global de todos los cánceres es el sexto más común y la tercera causa de muerte relacionada con el cáncer, siendo mucho más común en hombres que en mujeres (Forner et al., 2012; Torre et al., 2015). La única manera de hacer disminuir su mortalidad es a través de los controles continuos, para poder detectar el cáncer en estadios tempranos, cuando la terapéutica puede ser efectiva (Bruix and Llovet, 2002). El cáncer hepatocelular es relativamente resistente a la quimioterapia. Para ello se está utilizando la estrategia de la quimio-sensibilización, que consiste en el uso de un fármaco para mejorar la actividad del otro modulando los mecanismos de sensibilidad (Amiri et al., 2013).

Tabla 1: Factores de riesgo, datos estadísticos y tratamiento quimioterapéutico de los cánceres de pulmón, mama, cérvix y hepatocelular.

FACTORES DE RIESGO	DATOS ESTADÍSTICOS ¹				TRATAMIENTO QUIMIOTERAPÉUTICO	REFERENCIAS
	<i>Portugal</i>		<i>España</i>			
	<i>Incidencia</i>	<i>Mortalidad</i>	<i>Incidencia</i>	<i>Mortalidad</i>		
Cáncer de pulmón						
Tabaco; gases atmosféricos; contaminación ambiental.	H: 49.1 M: 11.7	H: 39.4 M: 9.1	H: 76.8 M: 15.7	H: 60.0 M: 11.3	A base de derivados de platino, como la CDDP y carboplatino, combinados con agentes antineoplásicos de tercera generación, como el VP-16 o la EL.	(De Groot and Munden, 2012; Teixeira and Guimarães, 2013)
Cáncer de cérvix						
Virus del papiloma humano; tabaco; transmisión sexual; estatus socioeconómico bajo; inmunosupresión.	M: 10.8	M: 4.9	M: 9.1	M: 2.7	CDDP sólo o en combinaciones (con carboplatino o gemcitabina) han resultado con éxito. Estudios demuestran la citotoxicidad VP-16 y El en HeLa.	(Bae et al., 2008; Canavan and Doshi, 2000; Colombo et al., 2012; Friedlander and Grogan, 2002; Li et al., 2016; Lukka et al., 2002)
Cáncer de mama						
Alcohol; sedentarismo; cambios reproductivos; factores hereditarios; obesidad; terapias de reemplazo hormonal.	M: 85.6	M: 18.4	M: 84.9	M: 16.7	Doxorubicina; paclitaxel; docetaxel; tioridazina; disulfiram; camptotecina; curcumina. Estudios demuestran la citotoxicidad del VP-16, la EL o la CDDP para el cáncer de mama.	(Goldhirsch et al., 2013; Hortobagyi et al., 2005; Núñez et al., 2016)
Cáncer hígado						
Hepatitis B y C; diabetes; tabaco; el consumo de alcohol; Pacientes con sobrepeso tienen índices de mortalidad superiores.	H: 11.9 M: 2.5	H: 9.5 M: 2.5	H: 14.2 M: 3.7	H: 10.3 M: 3.3	Quimio-sensibilización con el VP-16 en HepG2. Estudios demuestran la citotoxicidad de CDDP por infusión arterial hepática.	(Amiri et al., 2013; Ando et al., 2002; Bruix and Llovet, 2002; Bruix and Sherman, 2011; Forner et al., 2012)
¹ Tasas de incidencia y mortalidad por sexo (H: hombres, M: mujeres) ajustadas por edades (utilizando el estándar europeo) por 100 000 habitantes extraídas de (Ferlay et al., 2013).						

1.3. Origen y mecanismo de acción de agentes individuales antitumorales de procedencia sintética

En este estudio vamos a enfocar el estudio en tres agentes antitumorales sintéticos, cuya estructura molecular se presenta en la **Figura 1**: la Elipticina (EL), el Etopósido (VP-16) y el Cisplatino (CDDP).

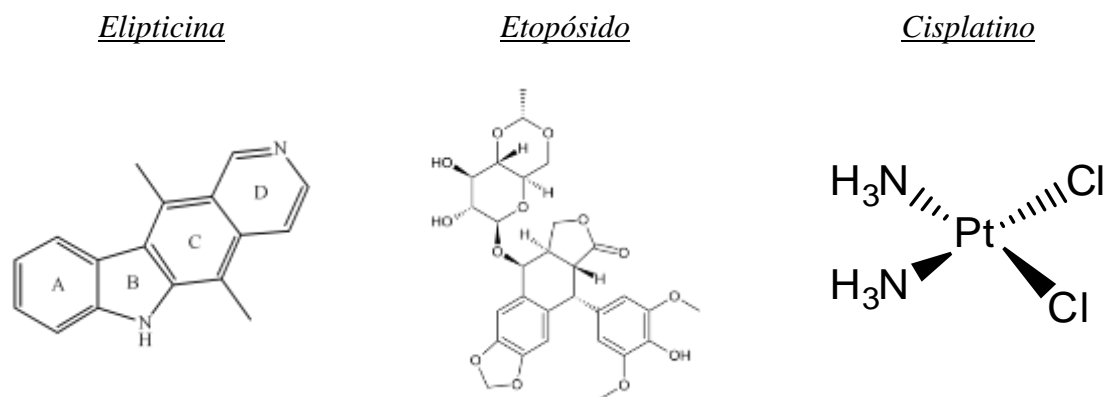


Figura 1: Representación molecular de los agentes individuales utilizados como efectores para la evaluación de respuestas interactivas.

1.3.1. Elipticina

La EL (**Figura 1**: 5,11-dimetil-6H-pirido[4,3-*b*]carbazol) es una molécula tetracíclica aislada por primera vez en 1959 a partir de las hojas del árbol tropical perenne *Ochrosia elliptica* Labyll, perteneciente a la familia Apocynaceae. Desde entonces, la EL ha sido aislada de diferentes plantas de la familia Apocynaceae (*Ochrosia vieillardii* Guil., *Ochrosia acuminata* Trimen ex Valetony *Ochrosia moorei* F.Muell. ex Benth.) y de la familia Loganiaceae (Miller and McCarthy, 2012).

Los principales problemas de la molécula de EL que han impedido su expansión en el entorno clínico, son su baja solubilidad y biodisponibilidad. Para tal fin, se han preparado una amplia gama de derivados de la EL, incluyendo sales, glicósidos, dímeros, híbridos y conjugados (Miller and McCarthy, 2012). Estos compuestos, ejercen su actividad biológica a través de diferentes modos de acción. En la **Tabla 2** se presenta una detallada descripción de los principales mecanismos de acción, siendo los más conocidos la intercalación con el ADN y la inhibición de las enzimas topoisomerasas II. Más recientemente, se han revelado otros sistemas de acción como la inhibición de la quinasa, la interacción con el factor de transcripción p53, la bio-oxidación, y la formación de aductos (Miller and McCarthy, 2012).

La EL y sus derivados presentan una alta eficiencia contra diversos tipos de cáncer, se han obtenido resultados prometedores para el tratamiento de la metástasis de cáncer de mama osteolítico, cáncer de riñón, tumores cerebrales y leucemia mieloblástica aguda (Miller and McCarthy, 2012; Stiborová et al., 2011), por lo que se admite como agente multimodal (Miller and McCarthy, 2012). Además, presenta limitados efectos secundarios, aunque posee un potente efecto mutagénico (Stiborová et al., 2011).

1.3.2. Etopósido

El VP-16 (**Figura 1**) es un derivado semisintético de la podofilotoxina, una toxina que se encuentra en el podófilo (*Podophyllum peltatum* L.), y que ha sido utilizado durante más de 20 años en el tratamiento de varios tipos de neoplasias, incluyendo el cáncer de pulmón de células pequeñas, el cáncer testicular y linfomas. Desde su aprobación para la terapia contra el cáncer por la Food And Drug Administration en 1983, el VP-16 ha sido usado ampliamente como un poderoso inductor de la apoptosis en numerosos protocolos experimentales *in vitro* (Rello-Varona et al., 2006).

El VP-16, al igual que la EL, es un miembro de los inhibidores de las enzimas topoisomerasas II y actúa estabilizando el complejo covalente ADN-topoisomerasa II, perjudicando la actividad enzimática de re-ligación de las hebras de ADN, haciendo que las roturas en la doble hebra permanezcan en lugar de ser reparadas. El VP-16 puede retrasar la progresión del ciclo celular en la fase S tardía o G2 temprana, pero no tiene efecto en el ensamblaje de la tubulina (Moitra et al., 2012; Rello-Varona et al., 2006).

Al ser el principal mecanismo de acción la inhibición de las topoisomerasas II, consideraremos que el VP-16 tiene mecanismos de acción similares a los de la EL, aunque no sean exactamente los mismos. En la **Tabla 2** podemos ver resumidamente los mecanismos recopilados en la bibliografía científica.

1.3.3. Cisplatino

Aproximadamente el 50% de todos los programas de quimioterapia incluyen un fármaco con platino que son usados para tratar una amplia variedad de cánceres, incluyendo algunos relacionados con el sistema endocrino (carcinomas testiculares y ováricos). También son usados para tratar melanoma, cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas, mielomas y linfomas (Apps et al., 2015). Así, el cisplatino sintetizado por primera vez en 1844 (**Figura 1**: $\text{cis-[Pt(II)(NH}_3)_2\text{Cl}_2]$, $[\text{PtCl}_2(\text{NH}_3)_2]$ o CDDP) es uno de los fármacos más potentes en la quimioterapia para el tratamiento del cáncer. El descubrimiento de la CDDP fue la base que

indujo el interés en los compuestos de platino y otros que contienen metales como potenciales fármacos antitumorales (Florea and Büsselberg, 2011). Su uso fue aprobado en 1978, y desde entonces, 25 fármacos a base de platino han entrado en la fase de ensayo clínico (Apps et al., 2015). A pesar de su éxito, los fármacos con platino tienen dos limitaciones principales: (1) sus severos efectos secundarios; y (2) la capacidad de los cánceres para desarrollar resistencia a estos fármacos (Apps et al., 2015; Florea and Büsselberg, 2011).

En general, los fármacos con platino actúan causando apoptosis celular (**Tabla 2**) a través de dos tipos de enlaces (portadores de amina o imina y cloruro o carboxilato lábiles) unidos al catión platino central formando enlaces con las bases guanina o adenosina, paralizando la replicación y transcripción del ADN, induciéndose así la apoptosis celular (Apps et al., 2015). Los fármacos con platino como el CDDP, son usados frecuentemente en combinación aditiva con otros fármacos, con resultados positivos sin producir efectos adicionales (Florea and Büsselberg, 2011).

Tabla 2: Mecanismos de acción de los compuestos de la familia de la EL y VP-16 conocidos hasta la fecha y breve descripción.

MECANISMO DE ACCIÓN	BREVE DESCRIPCIÓN DEL MECANISMO DE ACCIÓN	REFERENCIA
<i>Mecanismos de acción de los compuestos de la familia de la EL y VP-16</i>		
<i>Intercalación con el ADN</i>	El tamaño y la forma del cromóforo EL, se asemejan a las de los pares de bases complementarias purina-pirimidina, proporcionando condiciones favorables para su intercalación con la doble hebra de ADN, lo que resulta en un cambio sustancial en la estructura del ADN, causando alargamiento, rigidez y desenrollado de la hélice de ADN; además de profundas alteraciones en la estructura secundaria nucleotídica	(Miller and McCarthy, 2012; Rescifina et al., 2014)
<i>Inhibición de la topoisomerasa II</i>	Tanto la EL como el VP-16 inhiben la topoisomerasa II, una enzima con función catalítica envuelta en el metabolismo del ADN y juega un papel muy importante en la organización y segregación cromosómica, siendo esencial para la supervivencia de todo organismo eucariótico. Puede realizar tres tipos de reacciones: la relajación del ADN, la catenación/descatenación y anudamiento / desanudamiento (específicas de la topoisomerasa II)	(Burden and Osheroﬀ, 1998)
<i>Formación de aductos</i>	Los aductos son piezas de ADN unidas covalentemente a algún agente químico que dañan al ADN cuando éste, conllevando una replicación anormal pudiendo ser el inicio de una mutación que, sin la reparación apropiada, puede llevar al cáncer o muerte celular. Se sabe que la EL forma aductos después de su oxidación por el citocromo P450 (enzima que metaboliza el fármaco en el hígado).	(Miller and McCarthy, 2012)
<i>Bio-oxidación</i>	La bio-oxidación de la EL a través de las peroxidasas abundantes en algunas células de leucemia.	(Stiborová et al., 2004).
<i>Inhibición quinasa</i>	Se han estudiado las interacciones de la EL con varias enzimas, incluyendo la inhibición de la c-Kit quinasa y la AKT, enzimas que regulan las vías que controlan el crecimiento y la proliferación celular. En el caso del VP-16 se sabe que activa la ATM quinasa, enzima que inicia la activación del reparo celular o apoptosis.	(Miller and McCarthy, 2012; Montecucco et al., 2015)
<i>Restauración de la función de la p53</i>	El gen TP53, que codifica la proteína p53, está mutado o eliminado en aproximadamente el 55% de los cánceres y la EL (más concretamente, uno de sus derivados, la 9-hidroxielipticina) induce la apoptosis en la fase G1 del ciclo celular de las células con la p53 mutada, sugiriendo que ésta actividad podría ser por restauración de la función de la p53. En el caso del VP-16, éste induce la fosforilación de la p53 y otras moléculas llevando finalmente a la muerte celular apoptótica.	(Montecucco et al., 2015; Stiborová et al., 2004)
<i>Mecanismos de acción de los compuestos de la familia de la CDDP</i>		
<i>Inducción de la apoptosis por vía extrínseca.</i>	Se especula que este efecto está relacionado con la inhibición de la síntesis de ADN y su reparación, que puede resultar en la detención del ciclo celular en las fases G1, S o G2-M, induciendo así la apoptosis.	(Floreana and Büsselberg, 2011; Rojas et al., 2009)
<i>Inducción de la apoptosis por la vía intrínseca</i>	Se desencadena en respuesta a una amplia variedad de estímulos que son generados dentro de la célula. Por ejemplo, por la permeabilización de las membranas mitocondriales.	(Rojas et al., 2009)

1.4. Agentes naturales para el tratamiento del cáncer

Hoy en día, aunque la quimioterapia es la terapia más utilizada, estos tratamientos convencionales contra el cáncer suelen complementarse con otras alternativas, (como el uso de plantas medicinales con efectos beneficiosos reconocidos por criterios científicos), para intentar reducir los efectos secundarios de las convencionales. Con ello se intenta prolongar el tiempo de supervivencia de los pacientes mejorando su calidad de vida (Fridlender et al., 2015; Monteiro et al., 2014).

Probablemente el producto natural anticancerígeno derivado de plantas más conocido sea el paclitaxel, obtenido de las hojas de varias especies de *Taxus*, como el *Taxus brevifolia* Nutt. La citotoxicidad de sus extractos ha sido demostrado en diversos tipos cánceres, tales como el de pulmón, entre otros (Fridlender et al., 2015). También han sido ampliamente reconocidos, los alcaloides de vinblastina y vincristina, derivados de plantas como la *Catharanthus roseus* L. y la *Selaginella tamariscina* P. Beauv, presentando efectos antimetastásicos contra células tumorales (Monteiro et al., 2014).

El uso de estos tratamientos alternativos con plantas se realiza mayoritariamente a través de infusiones (extracto acuoso) o en comprimidos (extractos con distintos solventes, siendo los más comunes los extractos alcohólicos). Diferentes estudios clínicos y preclínicos han demostrado su actividad anticancerígena contra diversas formas de cáncer, señalando la inducción de la apoptosis como su principal mecanismo de acción (Monteiro et al., 2014).

El grupo de investigación BioChemCore del Instituto Politécnico de Bragança (www.esa.ipb.pt/biochemcore) ha identificado prometedoras actividades antitumorales en extractos de plantas procedentes de distintas regiones de Portugal fundamentalmente, aunque no exclusivamente. A modo de ejemplo se puede reseñar: *Castanea sativa* Mill., *Melissa officinalis* L., *Chamaemelum nobile* L., *Crataegus monogyna* Jacq., *Euterpe oleracea* Mart., *Matricaria recutita* L., *Rosa canina* L., *Arbutus unedo* L., *Prunus spinosa* L., *Rosa micrantha* Borrer ex Sm, *Achillea millefolium* L., etc. Los extractos de esta última, *Achillea millefolium* L., produjeron resultados potencialmente interesantes.

La *Achillea millefolium* L., llamada comúnmente milenrama por la múltiple división de sus hojas, es una planta herbácea de la familia de las compuestas, muy común en los prados de montaña, senderos, campos de cultivo y jardines caseros que florece entre junio y septiembre, momento en el que es recolectada. Las partes de la milenrama utilizadas con fines medicinales son las flores, hojas, y tallos y su infusión o extracto alcohólico es ampliamente utilizado en

Europa como remedio para tratar problemas digestivos, enfermedades hepatobiliares y amenorrea, además de ser utilizada por sus propiedades antitumorales, antimicrobianas, antiinflamatorias y antioxidantes, entre otras. La decocción es utilizada para tratar desórdenes intestinales y digestivos, pero también es utilizada externamente para inflamaciones de piel y mucosas (Dias et al., 2013; Linamaría et al., 2009).

En la **Tabla 3** se resumen los resultados experimentales del grupo BioChemCore con extractos acuosos y alcohólicos de *Achillea millefolium* L. en las líneas celulares tumorales humanas de NCI-H460, HeLa (cáncer de cérvix), MCF-7 (cáncer de mama) y HepG2 (cáncer hepatocelular), así como en cultivos primarios de células hepáticas no tumorales (PLP2). La actividad antitumoral y la hepatotoxicidad es determinada en valores de LD_{50} ($\mu\text{g/mL}$) (media \pm SD), que corresponde a la concentración de la muestra que logra el 50% de la inhibición del crecimiento, cuyos resultados ya han sido publicados (Teixeira and Guimarães, 2013). De modo general, se observaron mejores resultados en el extracto metanólico.

Tabla 3: Bioactividad (en términos de LD_{50}) del extracto metanólico y extracto acuoso de la planta de *Achillea millefolium* L. (Dias et al., 2013).

Líneas Celulares	<i>Achillea millefolium</i> L.	
	Extracto metanólico ($\mu\text{g/mL}$)	Extracto acuoso ($\mu\text{g/mL}$)
NCI-H460	24.64 \pm 0.80	56.26 \pm 1.15
HeLa	19.68 \pm 0.47	47.31 \pm 4.84
MCF-7	48.30 \pm 6.07	64.90 \pm 0.79
HepG2	41.12 \pm 0.54	67.46 \pm 4.47
PLP2	250.42 \pm 3.30	118.95 \pm 0.29

En concordancia con estos resultados, otros autores ya han demostrado que los extractos de varias Achilleas, entre los cuales está *A. millefolium* L., tienen efectos citotóxicos o citostáticos en varias líneas celulares tumorales (Csupor-Löffler et al., 2009). Además, el efecto de la combinación de extractos de la milenrama con antitumorales sintéticos ya ha sido abordado. Por ejemplo, en un estudio realizado recientemente (Shahani et al., 2015), se investigó el efecto sinérgico del extracto metanólico de *A. millefolium* L. con el compuesto de bleomicina (agente anticancerígeno) y se observó un incremento de la inhibición del crecimiento celular en las células cancerígenas sin toxicidad significativa en células normales.

Por estas razones y otras los extractos metanólicos y acuosos de *Achillea millefolium* L. son seleccionados como casos prácticos de estudio de agentes naturales para el trabajo aquí desarrollado.

1.5. Técnicas analíticas *in vitro* comunes para la determinación en líneas celulares tumorales de los efectos citotóxicos o antitumorales

Para comprobar el actividad antitumoral o citotoxicidad en líneas celulares tumorales *in vitro*, se utilizan un amplio abanico de técnicas experimentales que comparten ciertos criterios comunes (Riss et al., 2004). Son ensayos que utilizan células cancerígenas provenientes de pacientes humanos o animales para la determinación inicial de los efectos de una gran variedad de agentes (tanto individuales como mixtos provenientes de extractos naturales) en un corto período de tiempo y las cuales se pueden agrupar en dos grandes grupos:

1.5.1. Reducción de sales de tetrazolio

Aquellos que miden la función metabólica de las células usando las sales de tetrazolio: bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT); (3-[4,5,dimetiltiazol-2-il]-5-[3-carboximetoxi-fenil]-2-[4-sulfofenil]-2H-tetrazolio) (MTS) y (23-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazolio-5-carboxanilido) (XTT), los cuales al ser reducidos a formazán producen una intensa coloración cuantificable y extrapolable al número de células viables (Arencibia et al., 2003).

1.5.2. Colorimétricos no tetrazólicos

Son aquellos ensayos que usan colorantes tales como cristal violeta y sulforodamina B (SRB), que colorean componentes específicos de las células y permiten medir residuos celulares después de un tiempo de incubación con el compuesto evaluado. El más utilizado en esta sección es la tinción con SRB, desarrollado como una alternativa al empleo del método de MTT (Linamaría et al., 2009). La SRB es un colorante de aminoxantano, rosado brillante, que posee dos grupos sulfónicos cargados negativamente, capaces de unirse electrostáticamente a cationes. En condiciones ácidas, la SRB aumenta su afinidad por los aminoácidos básicos de las proteínas, y se fija selectivamente a éstos, proporcionando así un índice del contenido de proteína celular. Después de eliminar el colorante no fijado, el colorante unido a las proteínas celulares se extrae con medio alcalino y se lee la absorbancia para su cuantificación, correlativa con el número de células presente (Vichai & Kirtikara, 2006). La tinción con SRB es tan intensa que permite realizar el ensayo en un formato de 96 pocillos. Además, este método ha demostrado ser práctico por el hecho de poder almacenarse indefinidamente las monocapas de células una vez teñidas y fijadas (Vichai and Kirtikara, 2006).

1.5.3. Aplicación para la determinación/cuantificación de respuestas interactivas

En este estudio, para la cuantificación de las células viables de nuestra línea celular tumoral, una vez aplicadas las combinaciones de agentes antitumorales, hemos elegido utilizar el método de la SRB, ya que es el recomendado por el National Cancer Institute. Además, en comparación con el MTT, éste requiere actividad celular metabólica, por lo que sólo detecta células viables. En cambio, el ensayo de SRB no distingue entre células viables y no viables, pero eso no compromete la habilidad del ensayo SRB para detectar los efectos citotóxicos de los fármacos. Asimismo, otra ventaja del ensayo con SRB respecto al MTT es que algunos compuestos pueden interferir en la reducción del MTT, sin embargo el SRB no tiene este tipo de interferencias, y el hecho de ser independiente de la actividad metabólica hace que el SRB necesite de menos pasos, y por lo tanto sea más fácil obtener buenos resultados (Vichai and Kirtikara, 2006).

1.6. Modelos matemáticos de distintas áreas de estudio útiles para la caracterización, identificación y cuantificación de la dosis-respuesta de células tumorales a la acción d un agente

Inicialmente, muchos de los ELCT fueron realizados en un formato simplista, y la viabilidad/mortalidad celular era determinada después de varios procedimientos, limitando la realización de ensayos con un gran número de muestras o implicando esfuerzos experimentales excesivos. Desde el desarrollo de los lectores de microplacas, se han desarrollado nuevos protocolos para reconfigurar los métodos tradicionales a formatos de microplaca, extendiendo la aplicabilidad de las metodologías, permitiendo así trabajar con un gran número de muestras, reduciendo la cantidad de reactivos e incrementando la precisión y reproducibilidad.

A pesar de la existencia de resultados rigurosos, los avances en la manipulación de las líneas celulares, la sofisticación del equipamiento para determinar los cambios celulares a nivel molecular y la mecanización de la respuesta de los ELCT, la cuantificación de los resultados DR es definida tal como se expresaron hace dos o tres décadas, cuando el acceso a sistemas computarizados era limitado. Exceptuando el caso particular de respuestas linealmente dependientes, en casi todos los otros casos, que son los más frecuentes en biología, se deben usar expresiones no-lineales para describir apropiadamente los efectos de las variables. Eludir la aplicación explícita de los modelos matemáticos para el análisis de los ELCT causa una menor reproducibilidad de los resultados, lo que conlleva a un aumento excesivo de las restricciones en la aplicación de los protocolos. Tal como otros autores han hecho en otras áreas de investigación relacionadas con el cáncer (Basse et al., 2004; Chignola et al., 2011;

Cohen et al., 2015; Ganguly and Puri, 2007; Gerlee and Anderson, 2009; Sahai and Marshall, 2003; Shoemaker, 2006; Waclaw et al., 2015), en este trabajo se rechazan las maneras simplistas de caracterización de las respuestas citotóxicas de los ELCT, y abordamos este problema usando conceptos matemáticos de áreas relacionadas, para sortear las dificultades de cuantificación existentes debidas a la falta de modelos estándar que nos sirvan como criterios globales de evaluación de las respuestas.

1.7. Modos de acción y modelos matemáticos representativos para la caracterización, identificación y cuantificación de las interacciones sinérgicas, antagónicas o de acción nula

Cuando se utiliza más de un fármaco para tratar cualquier enfermedad, éstos pueden interactuar de diferentes modos, ya sea por ausencia de efectos, es decir con interacción nula, afectándose de manera negativa (con resultados inferiores de manera combinada que cada uno independientemente, lo que llamamos antagonismo), o interactuando positivamente (con resultados superiores a los esperados de la aplicación de cada uno individualmente, lo que llamamos sinergia) (Breitinger, 2012; Yin et al., 2014). Así, en el caso de fármacos, los efectos de interacción sinérgica son de interés desde un punto de vista clínico, ya que permiten el uso de concentraciones menores, que a su vez pueden ayudar a disminuir los efectos adversos de estos (Tallarida, 2011). Estas y otras razones son las que han llevado a la comunidad científica desde hace más de un siglo a la búsqueda de métodos eficaces para cuantificar las interacciones entre distintos agentes (Breitinger, 2012; Yin et al., 2014).

Desde una perspectiva de DR y utilizando conceptos de áreas distantes de estudio, se conoce que en sistemas con varios agentes efectores, la interacción entre estos se evalúa habitualmente a través de sus resultados, contrastándolos con dos hipótesis: AI (Bliss, 1939) y AC (Berenbaum, 1985a, 1985b; Loewe & Muischnek, 1926). Ambas hipótesis postulan modos de acción diferentes, esto es, pueden asociarse a mecanismos generales definidos por condiciones microscópicas. En términos generales se pueden definir tal como:

- La AI, que supone que los efectores actúan a través de diferentes mecanismos, cuyos máximos asintóticos se alcanzan como resultado de fenómenos estadísticamente independientes. Con esta premisa, la teoría de la probabilidad permite definir la respuesta como la suma de las probabilidades de los fenómenos individuales menos la probabilidad de su ocurrencia conjunta (Bliss, 1935, 1937, 1939). La hipótesis AI propone un modelo explícito para la superficie de respuesta, pero no existe acuerdo general acerca del modo en que deben formularse sinergia y antagonismo.

- La AC, quizá el método más usado y extendido, que en su formulación clásica (Berenbaum, 1985a, 1985b; Loewe & Muischnek, 1926) no define la interacción nula como una relación entre las respuestas individuales. Sino que supone que la respuesta a una combinación de concentraciones de dos agentes se comporta como la respuesta a una “combinación” de concentraciones del mismo agente. En este caso la práctica habitual elude una formulación algebraica explícita para la respuesta conjunta y recurre al análisis de isobolas, o líneas que representan, sobre el plano de las dosis, las combinaciones de dosis que producen igual respuesta. Más recientemente otros autores (Murado & Prieto, 2013; Sørensen, Cedergreen, Skovgaard, & Streibig, 2007), han reformulado este análisis gráfico, estableciendo criterios matemáticos que responde a los modos establecidos por la hipótesis.

En algunos casos, los modelos AC/AI han proporcionado descripciones consistentes de respuestas conjuntas a efectores químicamente similares/disimilares, respectivamente (Faust et al., 2001, 2003). Sin embargo, existen asimismo evidencias de que la realidad no siempre obedece estos modos de acción. Jonker et al. (2005) han propuesto en cada caso, además de sinergia y antagonismo, otras desviaciones de la interacción nula, definidas *a priori* como efectos dependientes de los niveles absolutos de las dosis o de sus relaciones, lo que permite manifestaciones sinérgicas y antagónicas en diferentes regiones de la misma superficie de respuesta. Pero la realidad parece todavía más rica: en la revisión de 158 casos, Cedergreen et al. (2008) encontraron que un 20% se ajustaba sólo al modelo AI, un 10% sólo al AC, un 20% admitía ambos, y aproximadamente en la mitad de los casos ningún modelo era adecuado. Además, ningún modelo fue significativamente superior en las predicciones de sinergia o antagonismo correspondientes a la dosis eficaz al 50%.

En los sistemas analíticos previamente descritos para la determinación de la actividad antitumoral (SRB, MTT, etc.), el análisis de las respuestas entre dos agentes o más efectores prescinde de la interpretación inicial del modo de acción, utilizando casi unánimemente el modo de acción aditivo (AC), Pese a las críticas a este respecto (Murado & Prieto, 2013; Sørensen, Cedergreen, Skovgaard, & Streibig, 2007), a mayores, tal caracterización prescinde frecuentemente de los aspectos claves del proceso para definir cualquier interacción. En este sentido, estudios más críticos (Murado & Prieto, 2013; Prieto, Murado, & Vázquez, 2014; M. Prieto, Curran, Gowen, & Vázquez, 2015; Rial et al., 2013) propusieron y utilizaron modelos explícitos para ambas hipótesis y demostraron una buena capacidad para describir la acción conjunta de varios pares de agentes en sistemas biológicos claramente diferenciados. Su aplicación permite, en primer lugar, tipificar la interacción en términos de los dos modos de

acción conjunta usualmente admitidos en el contexto de las relaciones DR. En segundo lugar, condujo a la detección y cuantificación de efectos sinérgicos y antagónicos, comparando, en cada modo de acción, los ajustes obtenidos bajo diferentes hipótesis de interacción con los correspondientes a la interacción nula.

Si aceptamos estos modelos como sistemas generalizados de las hipótesis AI y AC respectivamente, disponemos de un marco algebraico que permite caracterizar sinergia y antagonismo en términos de las variaciones que las perturbaciones imponen en cada caso a los parámetros y la respuesta. Por lo tanto, creemos que es posible diseñar ensayos celulares de la actividad antitumoral *in vitro* capaces de evaluar las interacciones entre un máximo de dos agentes con un control muy estricto y obtener un criterio racional y estadísticamente consistente para predecir la respuesta y su variabilidad.

2. Objetivos

El presente proyecto tiene como objetivo desarrollar una metodología general para evaluar en ELCT los efectos: 1) citotóxicos de agentes tumorales desde una visión de DR; y 2) interactivos entre combinaciones binarias de agentes efectores. Dado que las líneas celulares, como las técnicas de determinación, como los agentes efectores son abundantes y de heterogénea complejidad, y abarcar todos ellos es experimentalmente laborioso e impráctico, en esta etapa inicial del desarrollo, para la determinación de las respuestas necesarias para probar los avances metodológicos, se utilizará como caso práctico, tres agentes sintéticos (EL, CDDP y VP-16) utilizados habitualmente como fármacos y dos extractos (EA y EM) de la planta de *Achillea millefolium* L. con reconocida actividad antitumoral, en las líneas celulares tumorales de NCI-H460, MCF-7, HeLa y HepG2 por la técnica de la SRB.

La elección del ensayo colorimétrico de la SRB para los propósitos 1 y 2, en varias líneas celulares, no debe ser entendida como una simplificación a un sólo sistema de reacción, ni como una limitación de las conclusiones derivadas, ya que los principales objetivos y requerimientos operativos son compartidos por la mayoría de ELCT. Además, el ensayo de la SRB es un modelo bien aceptado para testar la citotoxicidad de muestras y es un procedimiento altamente reproducible, actualmente realizado en lectores de microplacas, proporcionando una herramienta apropiada que asegura que tanto las muestras como los controles de las reacciones pueden ser evaluados simultáneamente, así como producir abundantes datos con bajo error experimental. Es por ello, un ejemplo de estudio robusto y significativo, que puede ser fácilmente generalizable a otros ELCT, estableciendo así criterios para evaluar y comparar los efectos citotóxicos de agentes en respuestas individuales y los efectos interactivos (sinérgicos/antagónicos) entre combinaciones binarias de agentes tumorales.

2.1. Efectos citotóxicos de agentes tumorales individuales desde una visión de dosis respuesta

Inicialmente, la evaluación de la citotoxicidad de agentes antitumorales en ELCT fue realizada en un formato simplista. Actualmente el uso de nuevas las tecnologías permite trabajar con un gran número alto de muestras de una forma más precisa. Sin embargo, la cuantificación de los resultados se ha dejado como en los sistemas de formato más antiguos. El criterio de cuantificación se basa en la determinación de la dosis que reduciría la población

de las células tumorales al 50%, comúnmente llamado LD_{50} . Sólo raramente expresiones matemáticas son aplicadas para tal fin y casi nunca se realiza un análisis comprensivo de la DR.

Desde los enfoques de las teorías de DR, diversas ecuaciones de dos y de tres parámetros son soluciones válidas para analizar los perfiles DR correspondientes a la mortalidad/viabilidad de las células tumorales. En general, el uso de modelos apropiados mejoraría y guiaría en el cálculo de una manera más precisa los resultados obtenidos en ELCT. Estos modelos serían capaces de producir parámetros clave para resumir las respuestas, como la asíntota, el LD_{50} , la tasa máxima y media del proceso o los valores de la fase de latencia, entre otros. En este trabajo, los modelos matemáticos de DR no lineales, biológicamente más relevantes y prácticos, son usados para evaluar los datos experimentales. Los resultados de estos ajustes son evaluados con diferentes criterios estadísticos para categorizar la adecuación de las ecuaciones matemáticas para describir las respuestas de los ELCT. La solución más satisfactoria fue encontrada y si fuese aplicada apropiadamente, ciertamente mejoraría la descripción, cuantificación y evaluación de ELCT de una manera más eficiente y precisa. Adicionalmente, se prueban que la reducción para estudiar la DR exclusivamente en valores de LD_{50} podría conllevar frecuentemente a resultados no fiables. Por lo que, para solucionar este problema, se debería establecer obligatoriamente la presentación de otros valores paramétricos adicionales, tales como las tasas máxima y media del proceso, valores del período de latencia, entre otros, juntamente con información de la LD_{50} para describir apropiadamente los efectos citotóxicos de los agentes. Los resultados presentados pueden ser extrapolados fácilmente a ensayos *in vitro* e *in vivo* generalmente utilizados para determinar patrones de mortalidad.

2.2. Efectos citotóxicos interactivos entre combinaciones binarias de agentes antitumorales

Para la evaluación y selección de los mecanismos de acción (AI o AC) y para la cuantificación de las interacciones entre los efectores (sinérgica, antagónica o nula), se utilizan dos modelos matemáticos aplicables a este problema, que dan forma algebraica explícita y generalizan las hipótesis clásicas de la AI y AC tal como se definen en el contexto de las relaciones DR. Estos modelos proporcionan significados inequívocos de los conceptos de sinergia y antagonismo, permiten describir y tipificar de modo estadísticamente consistente las interacciones entre diversos pares de conocidos agentes efectores.

A partir del diseño experimental propuesto, el análisis de los resultados permite relacionar algunas regularidades fenomenológicas con principios mecanísticos muy generales e identificar comportamientos experimentalmente diferenciadores del dualismo AI/AC. Para ello, inicialmente se utilizan combinaciones binarias de agentes individuales de origen sintético, dónde se conocen con exactitud los mecanismos intermediarios de acción a nivel celular y a continuación se procederá a la evaluación de combinaciones binarias entre agentes individuales y extractos naturales. Se proponen sistemas de análisis con modelos algebraicos explícitos que describen con precisión un amplio conjunto de respuestas de la realidad experimental de las metodologías de determinación de la actividad antitumoral.

3. Materiales y métodos

3.1. Reactivos

La SRB, el ácido acético, el TCA 10% (peso/volumen), y el Tris (10 mM, pH 10.5) fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. (Saint Louis, USA). El DMSO, el ácido acético 1% (volumen / volumen) la glutamina, la penicilina, la estreptomina, los aminoácidos no esenciales, el suero fetal bovino (SFB), la solución salina balanceada de Hanks (HBSS) y el medio de cultivo RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute 1640) fueron obtenidos de Hyclone (Logan, Utah, EUA). El TrypLE Express fue obtenido de Gibco (Massachusetts, USA)

3.2. Preparación de soluciones

La SRB se preparó en ácido acético al 1% en una proporción del 0.057% (wt/vol).

El trypan blue se preparó en NaCl (en 0.81% (wt/vol) NaCl) y KH_2PO_4 (0.61% (wt/vol), en una proporción del 0.4% (wt/vol).

El medio de cultivo RPMI-1640 fue enriquecido con 1% glutamina, 1% penicilina/estreptomina (100 U/mL y 100 mg/mL respectivamente), 1% de aminoácidos no esenciales y 10% de SFB.

3.3. Agentes antitumorales

3.3.1. Agentes comerciales

Los antitumorales sintéticos de EL, CDDP y VP-16 fueron obtenidos de Adooq Bioscience (Irvine, CA.). Se prepararon para cada agente comercial soluciones patrón de 10 mM. El solvente utilizado para la EL y VP-16 fue el DMSO, mientras que para la CDDP se utilizó una solución de tampón de fosfato (PBS, 1M).

3.3.2. Agentes naturales

Disponemos de una muestra comercial de *Achillea millefolium* L. (obtenida en Ervital, Castro Daire, Portugal), una empresa local que produce hierbas mediterráneas utilizando principios orgánicos. La planta se secó, redujo a un polvo fino (20 mesh), mezcló para homogeneizar la muestra y se conservó a -20 °C en oscuridad.

3.3.2.a) *Extracto metanólico*

El material pulverizado de *A. millefolium* fue extraído en 30 mL de metanol (CH₃OH). La relación sólido-líquido fue de 33 g/L. Para maximizar el rendimiento se realizaron dos extracciones en serie. Las condiciones de extracción fueron: temperatura ambiente (~25 °C); agitación (150 rpm); tiempo de 60 min. El resultante fue filtrado con un papel Whatman No. 4. El solvente de los dos extractos metanólicos (EM) fue eliminado por evaporación a 40°C (rotavapor Buchi R-210, Flawil, Suiza). Para los ensayos de efectos interactivos se prepararon soluciones patrón del EM en agua destilada (concentración final de 10 mg/mL).

3.3.2.b) *Extracto acuoso*

Para la preparación de la infusión el material pulverizado de *A. millefolium* (1 g) fue extraído con 50 mL de agua destilada en ebullición (~100°C) y dejado en reposo 5 min a temperatura ambiente (~25 °C). El extracto acuoso (EA) resultante fue filtrado y congelado (-20°C) para poder ser liofilizado posteriormente. Para los ensayos de efectos interactivos se prepararon soluciones patrón del EA liofilizado en agua destilada (concentración final de 10 mg/mL).

3.4. Descripción, conservación y mantenimiento de las líneas celulares

3.4.1. *Líneas celulares tumorales utilizadas y origen*

Las líneas utilizadas para nuestro trabajo experimental fueron NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2, todas ellas obtenidas del DSMZ (Instituto Leibniz DSMZ Colección Alemana de Microorganismos y Cultivos Celulares).

3.4.1.a) *Línea celular tumoral NCI-H460*

En el 1975 se inició la creación de las primeras líneas celulares con el fin de ser utilizadas en la terapéutica del cáncer de pulmón en el NCI (de sus siglas en inglés, National Cancer Institute, que dan el prefijo al nombre de las líneas, en Washington, DC). Posteriormente, continuaron sus esfuerzos en mejorar las líneas celulares tumorales en el Hospital Naval Bethesda (Bethesda, MD), considerado el centro médico más importante de EEUU. Gracias a la financiación, al elevado número de pacientes que proporcionaron muestras para biopsias como material tumoral fresco y a la dedicación de las personas envueltas en el proyecto, se pudo establecer las líneas con éxito; hoy en día más de 250 líneas celulares de cáncer de pulmón (Gazdar, LDrard, Lockwood, Lam, & Minna, 2010).

3.4.1.b) *Línea celular tumoral HeLa*

La línea celular tumoral de cáncer de cérvix, HeLa, es una de las líneas más usadas en la investigación por su capacidad de división celular y su resistencia como línea al no tener muchos requerimientos en cuanto a medio. Fue la primera línea celular tumoral establecida en cultivo celular y es originaria de un tumor de cáncer cervical de una paciente llamada Henrietta Lacks, a la cual le debe el nombre la línea celular. Henrietta murió finalmente debido al cáncer en 1951, pero un cirujano le extrajo una muestra de su tumor antes de que falleciera, y la puso en una placa de Petri, viendo cómo se reproducen sus células cada 24 horas sin parar, volviéndose así las primeras células inmortales cultivadas en el laboratorio (Lacks, 2003; Landry et al., 2013).

3.4.1.c) Línea celular tumoral MCF-7

La línea celular tumoral de cáncer de mama, MCF-7, es una de las más utilizadas en el cáncer de mama, y fue establecida en el 1973 en la “Michigan Cancer Foundation”, de la cual surgió el acrónimo MCF-7, por sus siglas. La línea celular deriva de una muestra de efusión pleural tomada de una paciente de 69 años con cáncer de mama metastásico. Se considera una buena línea celular tumoral debido a que la sensibilidad hormonal permite estudiar las respuestas tumorales a terapias endocrinas (Holliday & Speirs, 2011; Jordan, 1997).

3.4.1.d) Línea celular tumoral HepG2

La línea celular tumoral de cáncer hepatocelular, HepG2, fue establecida en el 1979, en Filadelfia (Instituto Wistar), y deriva de la lobectomía hepática de un joven caucásico de 15 años de edad con carcinoma hepatocelular bien diferenciado (López-Terrada, Cheung, Finegold, & Knowles, 2009). La línea HepG2 ha estado bien caracterizada, y tiene la capacidad de llevar a cabo reacciones de biotransformación del hígado normales esenciales para el proceso de detoxificación, haciendo que sea un buen modelo para ensayos relacionados el metabolismo hepático y la hepatotoxicidad (Dehn et al., 2004; López-Terrada et al., 2009).

3.4.2. Conservación y mantenimiento de las líneas celulares

Las células fueron mantenidas rutinariamente como cultivos celulares adherentes en frascos de cultivo celular con medio RPMI-1640, al que se le añadieron 1% L-glutamina, 1% penicilina/ estreptomina (100 U/mL y 100 mg/mL respectivamente), 1% aminoácidos no esenciales y 10% suero fetal bovino (SFB). Las condiciones del cultivo fueron una temperatura de 37°C en una incubadora con aire húmedo y un 5% de CO₂.

Cada línea celular fue cultivada hasta permitir la confluencia celular, aproximadamente 48h. Una vez llegada a la confluencia, los medios fueron removidos, las células tripsinizadas y retiradas. El residuo celular de los frascos de cultivo fue de nuevo cultivado con medio RPMI-1640.

3.5. Preparación de la suspensión celular

Para los ensayos con líneas celulares tumorales en microplacas se utilizó una suspensión celular de 50 000 células/mL en la solución final (10 000 células en cada pocillo con 190 μ L de medio RPMI-1640 y 10 μ L de agente). Para la obtención de la suspensión celular se siguieron los siguientes pasos:

- Se retiró el medio RPMI-1640 de las cajas de cultivo, quedando las células adheridas en su base.
- Se añadió HBSS (solución de lavado) para eliminar restos celulares y permitir una mejor acción del reactivo triplex (reactivo de desagregación).
- Se retiró la solución de HBSS y se añadió el reactivo triplex con el fin de romper los enlaces proteicos entre células y entre las células y la superficie de la base.
- Se permitió la reacción durante 3 min a 37°C para facilitar la acción del triplex.
- Se comprobó visualmente en microscopio de contraste de fases que las células estaban desagregadas.
- Se añadió medio RPMI-1640 para inhibir el efecto del triplex y se centrifugó (1200 rpm, 5 min) para separar las células de la solución restante.
- Se realizó una suspensión inicial de las células resultantes en el precipitado.
- Se estimó la densidad celular a través de un recuento celular (cámara de Neubauer) tiñendo una muestra de la suspensión inicial celular con trypan blue.
- Se ajustó la suspensión inicial celular añadiendo la cantidad de medio necesaria hasta obtener la concentración requerida de 50 000 células/mL.

3.6. Determinación de la actividad antitumoral por el método de la sulforrodamina B para la evaluación de la proliferación celular

Para la determinación de la proliferación celular fue utilizado el método colorimétrico de la SRB basado en la tinción del contenido proteico de las membranas celulares. La SRB es un

tinte aniónico de color rosado, que posee dos grupos sulfónicos que se unen electrostáticamente a los aminoácidos básicos de las proteínas en condiciones moderadamente ácidas, y se disocia de estos en condiciones básicas. El método de la SRB tiene una sensibilidad comparable a métodos que utilizan tinción fluorescente (detecta densidades de hasta 1000-2000 células/pocillo), y tiene la ventaja de tener varios puntos “stop” donde el proceso se puede parar indefinidamente. Sin embargo, está limitado a ser utilizado manualmente por los múltiples pasos de lavado y secado.

Para la determinación de la actividad antitumoral por el método SRB se siguieron los siguientes pasos:

- Se aplicaron 10 μ L de cada dosis del agente (en el solvente adecuado) por duplicado en cada microplaca 96 pocillos y esta fue a su vez duplicada (réplicas independientes), utilizando DMSO como blanco.
- Se añadieron 190 μ L de la suspensión celular.
- Se incubaron las células con los agentes antitumorales por un período de 48 h (37°C, 5% CO₂) después del cual fueron fijadas con TCA frío al 10% y dejadas a 4 °C durante 60 min.
- Se lavaron las microplacas con agua destilada y se sacaron para después proceder a la tinción incubando durante 30 minutos con SRB (0.1% en 1% de ácido acético) a temperatura ambiente.
- Se eliminó la SRB no ligada a las proteínas lavando las microplacas con ácido acético al 1%, y la SRB ligada fue solubilizada con Tris (10 mM).
- Se evaluó la actividad antitumoral a través de la lectura de las absorbancias en lector de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc; Winooski, USA) a 540 nm y posteriormente se cuantificó el porcentaje de inhibición de cada agente.

3.7. Modelos matemáticos de distintas áreas de estudio útiles para la caracterización, identificación y cuantificación de la dosis-respuesta de agentes individuales en células tumorales

En teoría, cualquier modelo DR algebraicamente explícito predice la respuesta a cualquier dosis, y puede reparametrizarse para que la concentración correspondiente a cualquier respuesta deseada sea un parámetro explícito de la expresión, lo que permite el cálculo directo de su intervalo de confianza. Todos los modelos matemáticos se reparametrizaron para

mostrar explícitamente el valor asintótico de K , la dosis correspondiente a la mitad de la respuesta de máxima inhibición ($K/2$), conocida como valor LD_{50} (Lethal Dose en sus siglas en inglés) y un parámetro de forma a (el cual no aparece en las ecuaciones de dos parámetros).

3.7.1. Funciones potenciales y de primer orden sin ordenada en el origen

3.7.1.a) Ecuación de Michaelis–Menten

Michaelis y Menten (Michaelis and Menten, 1913) mostraron que la velocidad de una reacción enzimática es proporcional a la concentración del complejo enzima/sustrato, predicha por la ecuación de Michaelis-Menten con rigor y precisión (Johnson and Goody, 2011). Desde entonces, la ecuación se ha utilizado con éxito en muchos otros campos de estudio para describir respuestas no lineales hiperbólicas simétricas. La expresión se puede escribir tal que:

$$R(D) = K \left[\frac{D}{(LD_{50} + D)} \right] \quad [1]$$

3.7.1.b) Ecuación de Bertalanffy

Como simplificación de una ecuación más compleja de cuatro parámetros, la ecuación de Bertalanffy se ha sido utilizada para describir respuestas potenciales y de primer orden en numerosos campos de estudio (Vázquez et al., 2012). La expresión puede ser escrita del siguiente modo:

$$R(D) = K \left(1 - 2^{-D/LD_{50}} \right) \quad [2]$$

3.7.2. Funciones sigmoidales con ordenada en el origen (valor inicial $R_0 \neq 0$)

3.7.2.a) Ecuación de crecimiento de Verhulst

El llamado modelo Verhulst (primeramente propuesto como modelo de crecimiento poblacional (Verhulst, 1845, 1838)), o curva de crecimiento logística, es una de las curvas de crecimiento en forma de S más simples. Muchos autores (Huang et al., 2005; Melton, 1983; Murado and Vázquez, 2010; Özilgen and Özilgen, 1990) han utilizado la ecuación de Verhulst en diferentes campos de estudio, incluyendo el de DR, y puede ser escrita en la siguiente forma funcional:

$$R(D) = K / \{1 + \exp[a(LD_{50} - D)]\} \quad [3]$$

3.7.2.b) Ecuación de crecimiento de Gompertz

Ecuación muy conocida, desarrollada inicialmente por Gompertz (1825), ha sido utilizada en diversos campos para el análisis la descripción del crecimiento de tumores, microorganismos, entre otras variadas respuestas biológicas (Winsor, 1932). La ecuación, conocida como curva de Gompertz, ahora es utilizada en muchas áreas para modelar series de tiempo dónde el crecimiento es más lento al principio y al final del período. La ecuación se puede describir como sigue:

$$R(D) = K \left\{ 1 - 2^{-\exp[-a(D-LD_{50})]} \right\} \quad [4]$$

3.7.3. Funciones sigmoidales sin ordenada en el origen (valor inicial $R_0 = 0$)

3.7.3.a) Ecuación de Weibüll

Desarrollada por primera vez por Fréchet (1927) y aplicada por primer vez por Rosin & Rammler (1933) para describir la distribución del tamaño de partícula, es hoy conocida como la distribución de Weibüll, denominada así en honor al autor que describió sus capacidades en detalle (Weibüll, 1939) y que después la aplicó para analizar el fallo mecánico de máquinas complejas (Weibüll and Sweden, 1951). La ecuación de distribución para describir los perfiles de DR puede ser escrita en la siguiente forma funcional:

$$R(D) = K \left\{ 1 - \exp \left[-\ln 2 \left(D / LD_{50} \right)^a \right] \right\} \quad [5]$$

3.7.3.b) Ecuación de Hill

Hossfeld IV (1822) sugirió una manera de describir el crecimiento del tronco de los árboles y posteriormente fue reinterpretada para medir la tasa de mortalidad (Peschel, 1938). La ecuación fue popularizada después de la aplicación de A.V. Hill (Hill, 1913) para describir la relación de equilibrio entre la tensión del oxígeno y la saturación de la hemoglobina. En farmacología, la ecuación de Hill es utilizada extensamente para analizar las relaciones cuantitativas de los receptores de los fármacos describiendo las relaciones DR no-lineales (Goutelle et al., 2008). Su forma funcional puede escribirse de la siguiente manera:

$$R(D) = K / \left[1 + (LD_{50}/D)^a \right] \quad [6]$$

3.7.3.c) Ecuación modificada de Verhulst

La ecuación de Verhulst (Verhulst, 1845, 1838) se puede transferir de su formulación habitual (como modelo para describir una cinética autocatalítica, o un crecimiento biológico) al contexto de relaciones DR (Vazquez et al., 2011), eliminando la ordenada en el origen (para hacer $R_0=0$) y adquiriendo la forma siguiente:

$$R(D) = K / \left\{ 1 + \exp \left[a(LD_{50} - D) \right] \right\} - K / \left\{ 1 + \exp(aLD_{50}) \right\} \quad [7]$$

3.7.3.d) Ecuación modificada de Gompertz

Gompertz (1825) sugirió una la ley de la mortalidad humana o tasa de mortalidad a través de una modificación de su ecuación inicial. Esta ecuación, diseñada para describir la distribución por edades de la población humana, ha sido aplicada con éxito a muchos procesos biológicos demostrando suficiente flexibilidad y también es conocida como la función de decrecimiento exponencial (Laird et al., 1965). La ecuación se puede presentar como sigue:

$$R(D) = K \left\{ 1 - 2^{-\left[\frac{\exp(aD)-1}{\exp(aLD_{50})-1} \right]} \right\} \quad [8]$$

3.7.3.e) Ecuación Richards-Chapman

La ecuación de Chapman-Richards tiene como característica principal su flexibilidad. Aunque fue diseñada por Mitscherlich (1919), tomó nombre después de la aplicación por Richards (1959). La función de Richards-Chapman es una modificación de la función de Bertalanffy. Ha sido utilizada para diferentes propósitos y en diferentes campos incluyendo el de DR, encontrando un desempeño exitoso (Tjørve and College, 2003). La ecuación puede ser escrita de la siguiente manera:

$$R(D) = K \left[1 - \left(1 - 2^{-1/a} \right)^{D/LD_{50}} \right]^a \quad [9]$$

3.8. Teoría y modelos matemáticos para la caracterización, identificación y cuantificación de la dosis-respuesta de células tumorales a la acción binaria de dos agentes

3.8.1. Las formas de la interacción nula

En el caso de las relaciones DR se admiten dos tipos básicos de interacción nula, que se definen, para dos agentes, en los siguientes términos:

3.8.1.a) Acción independiente

Supone que los agentes actúan a través de diferentes mecanismos, cada uno de los cuales alcanza el máximo asintótico como resultado de un fenómeno estadísticamente independiente. Con esta premisa, la teoría de la probabilidad permite definir la respuesta como la suma de las probabilidades de los fenómenos individuales menos la probabilidad de su ocurrencia conjunta (Bliss, 1939). Así, siendo R_c la respuesta a la acción conjunta de las concentraciones c_1 y c_2 , y R_{c_1} y R_{c_2} las respuestas a las mismas concentraciones individualmente consideradas, se tiene:

$$R_c = R_{c_1} + R_{c_2} - R_{c_1}R_{c_2} ; \text{ o, equivalentemente: } R_c = R_{c_1} + R_{c_2}(1 - R_{c_1}) \quad [10]$$

Una formulación fácilmente generalizable a más de dos agentes se obtiene escribiendo R_{c_1} como $1 - (1 - R_{c_1})$ y sustituyendo el primer R_{c_1} del segundo miembro de Ec. [10] por esa forma tal que:

$$R_c = 1 - (1 - R_{c_1}) + R_{c_2}(1 - R_{c_1}) = 1 - [(1 - R_{c_1}) - R_{c_2}(1 - R_{c_1})] \text{ y, finalmente:} \quad [11]$$

$$R_c = 1 - (1 - R_{c_1})(1 - R_{c_2})$$

3.8.1.b) Adición de concentraciones

Supone que los agentes actúan a través del mismo mecanismo. La formulación habitual (Berenbaum, 1985a, 1985b) no define la interacción nula como una relación entre las respuestas individuales, sino que utiliza el siguiente criterio: la concentración c de un agente cuya acción obedece la ecuación $R=f(c)$ puede considerarse como una combinación ficticia de las concentraciones c_1 y c_2 ($c=c_1+c_2$). En estas condiciones es obvio que la respuesta a c será la dada por la ecuación $R=f(c)$ con $c=c_1+c_2$. Si la respuesta a una combinación de concentraciones de dos agentes se comporta como la respuesta a una “combinación” de concentraciones del mismo agente, aceptamos que la interacción entre ambos es nula. Ello implica que toda concentración de un agente puede sustituirse por la concentración equiefectiva del otro.

3.8.2. La acción conjunta de dos agentes antitumorales con y sin interacciones

Como se podrá comprobar en la primera parte de resultados, la ecuación de Weibüll (Ec. [5]) es seleccionada como modelo eficiente y más conveniente para la caracterización, identificación y cuantificación de respuestas tumorales a la acción DR de un agente. Por lo tanto, en esta sección para la descripción de los modelos de interacción de dos agentes utilizados para cuantificar los efectos interactivos entre dos agentes, utilizamos la Ec. [5] siendo el sistema de análisis de base utilizado para avanzar en la descripción de las herramientas matemáticas.

El efecto simultáneo de dos agentes antitumorales puede discurrir de acuerdo con cualquiera de los dos modelos descritos. Por tanto, proponer formas algebraicas explícitas para ambos en el caso de la acción antitumoral requiere situar la Ec. [5] en el marco de las hipótesis AI y AC. Para simplificar las notaciones matemáticas, en adelante escribiremos abreviadamente el modelo de la Ec. [5] obviando la forma funcional –que denotaremos W – y explicitando únicamente variables y parámetros, tal que:

$$R = W(A; K, m, a) ; \text{ siendo } m = LD_{50} \text{ por razones de extra simplificación del modelo} \quad [12]$$

3.8.2.a) Acción independiente

El modelo básico (interacción nula) se obtiene simplemente transfiriendo [12] a una de las ecuaciones equivalentes Ec. [10] o [11]. Utilizando la más breve forma Ec. [11]:

$$R = 1 - [1 - W(A_1; K_1, m_1, a_1)][1 - W(A_2; K_2, m_2, a_2)] \quad [13]$$

La existencia de interacciones sólo puede implicar que la presencia de un agente antitumoral altera los parámetros de la respuesta al otro, en una acción que puede ser unidireccional (afectando sólo una al otro) o recíproca (afectando mutuamente). En un trabajo anterior (Murado & Prieto, 2013; Prieto et al., 2014, 2015) probamos que las alteraciones de una respuesta descrita mediante la ecuación de Weibüll podían modelarse multiplicando los parámetros K y m por términos perturbadores hiperbólicos que incluían la variable responsable de la alteración. Como aquí la variable perturbadora de la respuesta a un agente antitumoral es el otro agente antitumoral, los términos perturbadores tendrán la forma:

$$\pi_{\theta_i} = (1 + b_{\theta_i} A_j) / (1 + c_{\theta_i} A_j); \quad (i \neq j) \quad [14]$$

cuya lectura es: el factor π_{θ_i} multiplica el parámetro θ de la respuesta al agente antitumoral A_j , y es función, con coeficientes de ajuste b_{θ_i} y c_{θ_i} , de la concentración del agente antitumoral A_j . Así, suponiendo alteraciones recíprocas en ambos parámetros, el modelo Ec. [13] se transforma en:

$$R = 1 - \left[1 - W(A_1; K_1, m_1 \pi_{m_1}, a_1 \pi_{a_1}) \right] \left[1 - W(A_2; K_2, m_2 \pi_{m_2}, a_2 \pi_{a_2}) \right] \quad [15]$$

Nótese que el parámetro K , no es perturbado por ninguna acción de ningún agente. Esto es consecuencia del marco conceptual del campo de los ELCT, dicho parámetro a incrementos de las dosis de los agentes siempre debería alcanzar su máximo asintótico del 100 % y las posibles variaciones intermediarias son obtenidas por la variación de los otros dos parámetros. No siendo necesaria su modificación.

Una posible modificación adicional se hace más clara utilizando la forma Ec. [10]. Denotando las respuestas individuales como W_i , se evidencia que el término $W_1 W_2$ de la respuesta conjunta $R = W_1 + W_2 - W_1 W_2$ está asociado a la hipótesis de independencia estadística. Por lo tanto, quedará modificado si dicha independencia es alterada por cualquier efecto global de tipo cooperativo o competitivo. Así, el modelo AI generalizado en su forma más compleja será:

$$R = W(D_1; K_1, m_1 \pi_{m_1}, a_1 \pi_{a_1}) + W(D_2; K_2, m_2 \pi_{m_2}, a_2 \pi_{a_2}) \left[1 - s \times W(D_1; K_1, m_1 \pi_{m_1}, a_1 \pi_{a_1}) \right] \quad [16]$$

donde el coeficiente s será mayor o menor que 1 según predominen los efectos cooperativos o competitivos, respectivamente. Debe notarse que el modelo Ec. [16] incluye todas las posibilidades teóricas de interacción para los ELCT, pero que en la práctica son previsibles situaciones mucho más simples (varios términos modificadores con valor $\pi_{\theta_i} = 1$).

3.8.2.b) Adición de concentraciones

La aplicación habitual de esta hipótesis elude la formulación de un modelo explícito para la superficie de respuesta, que es indirectamente analizada a través de isobolas, o proyecciones de líneas de igual respuesta sobre el plano de las variables independientes (Berenbaum, 1985a, 1985b; Nina Cedergreen, Kudsk, Mathiassen, Sørensen, & Streibig, 2007; Sørensen et al., 2007; Vølund, 1992). Sin embargo, el criterio de Berenbaum para definir la interacción nula puede también utilizarse para formular un modelo explícito (Murado & Prieto, 2013). En efecto, si la respuesta a las combinaciones de concentraciones de dos agentes debe

comportarse como la producida por las combinaciones ficticias de concentraciones de un único agente, necesariamente el modelo es:

$$R = W[(A_1 + A_2); K, m, a] \quad [17]$$

Cualquier interacción que se considere deberá conservar la noción clave de la AC, lo que significa que en la ecuación Ec. [17] las concentraciones deberán actuar como un bloque aditivo en el marco de una función con un único juego de parámetros (K, m, a). Así, las perturbaciones posibles son las que se describen a continuación.

1) *Agentes antitumorales de diferente potencia.* El modelo se obtiene introduciendo un factor p en una de las concentraciones ($p < 1$ si el agente antitumoral afectado es el más potente):

$$R = W[(pA_1 + A_2); K, m, a] \quad [18]$$

Debe notarse que este efecto no altera la condición de interacción nula, y que si una respuesta conjunta puede describirse mediante la ecuación Ec. [18], el valor m_1 de la respuesta individual a A_1 es $m_1 = m/p$.

2) *Interacciones que alteran las concentraciones efectivas.* Significa que un agente antitumoral A_1 interactúa con otro A_2 , recíprocamente o no, de tal modo que el efecto de A_2 es equivalente al de una concentración (efectiva) mayor o menor que la nominal. Utilizando términos π_{Ai} similares a los $\pi_{\theta i}$ definidos en Ec. [14], las diferentes alternativas pueden describirse con el modelo:

$$R = W\left[\left(A_1 \frac{1+b_1A_2}{1+c_1A_2} + A_2 \frac{1+b_2A_1}{1+c_2A_1}\right); K, m, a\right] \quad [19]$$

3) *Interacciones que afectan a los parámetros sigmoidales.* En principio, es posible considerar interacciones en las que cada agente antitumoral modifica específicamente los parámetros sigmoidales (K, m, a) de la respuesta conjunta, de acuerdo con un modelo como:

$$R = W[(A_1 + A_2); K, m\pi_{m1}\pi_{m2}, a\pi_{a1}\pi_{a2}] \quad [20]$$

Esta situación implica, en teoría, respuestas individuales crecientes no asintóticamente o descendentes después de un máximo, estas últimas similares a las que se producen en la cinética enzimática con inhibición por sustrato. En el campo de las relaciones DR existen

evidencias experimentales del segundo comportamiento (Cabo, Murado, González, & Pastoriza, 2000), pero es muy dudoso que cualquiera de los dos pueda darse en el contexto de la acción agentes antitumorales. En cualquier caso, el modelo AC generalizado en su forma más compleja será:

$$R = W \left[(pA_1\pi_{A1} + A_2\pi_{A2}); K, m\pi_{m1}\pi_{m2}, a\pi_{a1}\pi_{a2} \right] \quad [21]$$

Como se señaló en relación con la ecuación Ec. [16], la mayoría de las situaciones prácticas deberán resolverse con casos particulares más simples. Nótese que al igual que en el caso anterior, el parámetro K no es perturbado por ninguna acción de ningún agente.

3.8.3. Nociones de sinergia, antagonismo y acción nula

Si aceptamos las ecuaciones Ec. [16] y [21] como modelos generalizados de las hipótesis AI y AC respectivamente, disponemos de un marco algebraico que permite caracterizar sinergia y antagonismo en términos de las variaciones que las perturbaciones imponen en cada caso a los parámetros y la respuesta.

Así, en un sentido amplio, las interacciones son sinérgicas o antagónicas si aumentan o reducen, respectivamente, la *respuesta esperada en la interacción nula*. En el modelo AI Ec. [16], la sinergia eleva al menos un a_i , reduce al menos un m_i , reduce el coeficiente s , o produce todos los efectos simultáneamente, mientras el antagonismo genera los efectos opuestos. En el modelo AC plasmado en la Ec. [21] traduce las modificaciones de las concentraciones efectivas de acuerdo con la ecuación Ec. [19], a las que, al menos en teoría, pueden añadirse las variaciones de los parámetros a y m , con el mismo significado que en el modelo AI. Debe señalarse que la forma matemática del modelo AI impide formular las modificaciones de las concentraciones efectivas como en el modelo AC, y que los correspondientes efectos se traducen en variaciones de los parámetros m_i .

Estas definiciones pueden restringirse algo más si se acepta el tratamiento habitual del modelo AC en la tradición toxicológica. Como ya se dijo, en este campo el modelo AC se analiza recurriendo a las isobolas, aceptándose que éstas son rectas en la interacción nula y cóncavas o convexas hacia las concentraciones crecientes en la sinergia o el antagonismo, respectivamente. Ahora bien, este comportamiento se produce sólo en las perturbaciones que tipifica la Ec. [19], por lo que sinergia y antagonismo, al menos en el marco de las hipótesis AC, podrían limitarse a los efectos que aumentan o disminuyen las concentraciones efectivas.

Sin embargo, esta restricción no tiene demasiado sentido por dos motivos: 1) existen otros efectos que, sin alterar las concentraciones efectivas, aumentan o disminuyen la respuesta con respecto a la propia de la interacción nula y que no deben excluirse de las definiciones de sinergia y antagonismo; 2) no existe un criterio paralelo claro en el marco de la hipótesis AI, donde no se aplica el análisis de isobolas porque éstas son en general más complejas y no permiten una discriminación basada simplemente en su concavidad o convexidad. Así pues, aquí utilizaremos las nociones de sinergia y antagonismo en el sentido amplio antes definido.

3.8.4. Índice global para la cuantificación de los efectos interactivos

Una vez las relaciones previas han sido aceptadas como modelo generalizado para las hipótesis AC y AI, se establece un encuadre algebraico que caracteriza los escenarios de sinergia y antagonismo a través de variaciones específicas impuestas por las perturbaciones, traducido en cambios en las concentraciones efectivas, así como en variaciones de m y a . Sin embargo, todos esos complejos posibles efectos descritos hasta ahora podrían obstruir la comprensión de la totalidad de los efectos considerados, y un valor numérico único que resumiera la naturaleza e intensidad de las interacciones sinérgicas e antagónicas podría ser de mucha ayuda. La mejor alternativa sería resumir los efectos complejos descritos anteriormente en un índice global indicativo. Este puede ser postulado a través del cálculo del porcentaje de unidad de volumen relativa (RUV) entre el volumen de la superficie producida por la interacción nula (SV_{NI}) y el volumen de la superficie con interacciones (SV_I). Este puede ser expresado en los siguientes términos:

$$RUV = \frac{SV_I - SV_{NI}}{SV_I} \times 100 ; \text{ siendo } SV = h_i h_j \sum_{i=0}^n \sum_{j=0}^m f(A_i A_j) \phi_{i,j} \quad [22]$$

donde A_i y A_j son las variables dependientes que representan las concentraciones n y m de los dos agentes antitumorales, h_i y h_j son los conjuntos de intervalos de concentración y Φ_i es el producto de los coeficientes trapezoidales compuestos anidados. Por lo tanto, los valores positivos y negativos de RUV describen los efectos de las interacciones predominantemente sinérgicas o antagónicas entre los agentes antitumorales del rango de estudio. Este índice resume el efecto producido, pero cambia proporcionalmente a los cambios del rango de concentraciones. Sin embargo, creemos que tal valor puede servir como guía, al ser por lo menos más informativo que suministrar números proporcionales de flechas hacia arriba y hacia abajo.

3.9. Ajuste de los datos a los modelos

Todos los procedimientos de ajuste, estimaciones de los coeficientes y cálculos estadísticos fueron realizados en una hoja de cálculo de Microsoft Excel. El ajuste y los análisis estadísticos de los resultados experimentales a las ecuaciones propuestas fueron realizados bajo las siguientes directrices:

3.9.1. Coeficientes de determinación

Las estimaciones paramétricas fueron obtenidas por la minimización de la suma de las diferencias cuadráticas entre los valores observados del modelo y los predichos, utilizando el método no lineal de los mínimos cuadrados de Newton proporcionado por el macro 'Solver' disponible en hojas de cálculo de *Microsoft Excel 2003* (Kemmer and Keller, 2010), que permite una estimación rápida de las hipótesis y sus consecuencias (Murado and Prieto, 2013a).

3.9.2. Significancia de los coeficientes paramétricos y consistencia de los modelos

La determinación de los intervalos de confianza (IC) paramétricos fue realizado a través de la incorporación del macro 'SolverAid' (Prieto et al., 2012b; Prikler, 2009) a las hojas de cálculo de *Microsoft Excel 2003*. El modelo fue simplificado eliminando aquellos términos que no fueron estadísticamente significativos $p\text{-value (p)} > 0.05$. El test de F Fisher ($\alpha=0.05$) fue utilizado para determinar si los modelos construidos eran adecuados para describir los datos observados (Shi and Tsai, 2002). Finalmente, el coeficiente de correlación R^2 es interpretado como la proporción de variabilidad de la variable dependiente explicada por el modelo y es utilizado como guía de la viabilidad del ajuste realizado.

3.9.3. Desarrollo de un software para llevar a cabo un método de regresión automático por etapas de las acciones interactivas entre agentes antitumorales

Para el análisis de las respuestas interactivas de los modelos de las hipótesis AI y AC, fue programado un método automático por etapas en Excel para evaluar todas las posibles combinaciones de parámetros. Fueron aplicados los siguientes pasos rutinariamente:

- 1) Ajuste de los parámetros sigmoidales para las respuestas individuales (sin interacciones), utilizando la Ec. [13] (o Ec. [16] considerando todos los parámetros interactivos 0) y Ec. [21] (o Ec. [17] considerando todos los parámetros interactivos 0) para las hipótesis de AI y AC, respectivamente.

- (2) Utilizar los estimativos como valores iniciales para analizar todas las combinaciones de parámetros posibles de la Ec. [16] (AI, 9 parámetros y 511 combinaciones) y de la Ec. [21] (AC, 13 parámetros y 8 191 combinaciones).
- (3) Rechazar aquellas opciones que llevaron al menos a un coeficiente no significativo estadísticamente.
- (4) Seleccionar la hipótesis y (si ocurre) los parámetros interactivos más apropiados para la evaluación de varios modelos de selección de criterios (**Tabla 4**) que están basados en estadísticos de ajuste comunes (intervalos de confianza paramétricos, coeficientes de correlación, sesgos residuales, etc.) para discriminar la solución “más verdadera” basada en la bondad de ajuste, complejidad, sobreajuste y generalización.

Aunque el número inicial de combinaciones paramétricas (modelos con interacciones de las Ec. [16] y [21]) es alto, sólo significa un alto número de alternativas potenciales, algunas de las cuales son mutuamente exclusivas, y otras fácilmente rechazadas en el curso de ajuste, para concretar el conjunto de datos. En realidad, los casos más complejos encontrados envuelven un máximo de cuatro parámetros interactivos más los de las respuestas individuales (6 y 4 para AI y AC).

3.10. Criterios utilizados para evaluar la selección del modelo más eficiente

3.10.1. Criterio basado en el modelo de selección de criterios (MSC)

En el presente trabajo, los criterios AICc, BIC, RIC, Cp, R^2_{adj} , FPE, MSIC y MA^2 (**Tabla 4**) fueron obtenidos directamente utilizando la hoja de cálculo Excel utilizando el macro add-in *Solverstat* (Comuzzi et al., 2003). Este grupo seleccionado es la combinación de diferentes criterios que pueden discriminar los modelos basados en función de la bondad, la complejidad, el exceso y la generalización del ajuste.

3.10.2. Criterios estadísticos adicionales

Fueron utilizados criterios adicionales basados en las siguientes características para evaluar los modelos matemáticos (Prieto et al., 2012): a) la distribución residual; y b) el número de parámetros no significativos.

Tabla 4: Comparación de diferentes criterios de selección de modelos (MSC) típicamente utilizados para comparar los modelos basados en su complejidad, bondad de ajuste o exceso de ajuste, proporcionando el criterio que elige la solución más verdadera.

Criterio	Ranking	Objeto	Fórmula	Información adicional	Referencias
<i>Criterio de Información de Akaike (AIC)</i>	Valor menor	complejidad (eficiente)	$AIC = n \ln \left(\frac{RSS}{n} \right) + 2k$	Favorece modelos con muchas variables.	(Gang & George, 1988; Shi & Tsai, 2002)
<i>Criterio de Información de Akaike Corregido (AICc)</i>	Valor menor	complejidad (eficiente)	$AIC_c = n \ln \left(\frac{RSS}{n} \right) + \left(\frac{2(k+1)}{n-k-2} \right)$	Favorece modelos con muchas variables, pero penaliza más la complejidad de los modelos que el AIC.	(Gang & George, 1988; Shi & Tsai, 2002)
<i>Criterio de Información de Schwartz o Bayesiano (BIC o SIC)</i>	Valor menor	complejidad (consistente)	$BIC = n \ln (RSS) + \ln (n)k$	El BIC está diseñado como un índice de la evidencia en favor de un modelo.	(Schwarz, 1978)
<i>Error de predicción final de Akaike (FPE)</i>	Valor menor	bondad de ajuste	$FPE = n \frac{RSS(n+k)}{(n-k)}$	--	(Shi & Tsai, 2002)
<i>Criterio de Mallows (Cp)</i>	Valor menor	bondad de ajuste	$C_p = n \left[\frac{RSS}{ESS/n-1} \right] - n + 2k$	--	(Gang & George, 1988; Shi & Tsai, 2002)
<i>Coeficiente de determinación Ajustado (R²_{adj})</i>	Valor mayor	bondad de ajuste	$R_{adj}^2 = \frac{(n-1)R^2 - k}{n-1-k}$	Penaliza el problema de la sobreestimación de los coeficientes ajustados.	(Shi & Tsai, 2002)
<i>Criterio de Información Residual (RIC)</i>	Valor menor	bondad de ajuste/sobreajuste	$RIC = (n-k) \ln (RSS) + k \left[\ln (n) - 1 \right] + \frac{4}{n-k-2}$	Actúa bien excepto cuando el tamaño de la muestra es pequeño y la ratio de la señal de ruido es débil.	(Shi & Tsai, 2002)
<i>Criterio de Selección del Modelo (MSIC)</i>	Valor mayor	bondad de ajuste	$MSC = \ln \left(\frac{ESS}{RSS} \right) - \frac{2k}{n}$	--	(Schwarz, 1978)
<i>Análisis del Modelo Cuadrado (MA²)</i>	Valor menor	bondad de ajuste/complejidad	$MA^2 = \left(1 - \frac{n-k-\bar{I}_k/10}{n-1+n(k-p)} \right) \times RSS$	El único criterio que tiene en cuenta el intervalo de confianza del parámetro evaluado.	(Prieto and Murado, 2014)

n: número de medidas independientes consideradas en el ajuste. *k*: número de parámetros ajustados. *RSS*: suma residual de cuadrados. *ESS*: suma de cuadrados explicada.

4. Resultados y discusión

Para el análisis de las propiedades de los agentes (como entidades individuales en compuestos puros o como matrices de extractos naturales) se han desarrollado una amplia gama de ELCT *in vitro* para preseleccionar aquellos con los efectos más prometedores (Riss et al., 2004). En general, estos ensayos utilizan líneas celulares tumorales de pacientes humanos o animales establecidas y difieren en el mecanismo utilizado para mostrar la respuesta celular y/o moléculas diana y en la manera en que los productos finales son medidos. Los métodos descritos incluyen la reducción del tetrazolio (MTT, MTS, XTT y WST-1) (Arencibia, Rosario, & Curveco, 2003), reducción de la resazurina (Linamaría et al., 2009), SRB (Vichai & Kirtikara, 2006), marcadores de proteasas y detección de ATP. Cada ensayo de viabilidad celular tiene sus propias ventajas e inconvenientes, y es difícil indicar el ensayo más conveniente que permita una evaluación mejor. Esas técnicas presentan muchas incógnitas y teóricamente sólo pueden clasificar la actividad citotóxica en su sistema particular de reacción, mientras que la relevancia biológica de sus resultados en sistemas *in vivo* es cuando menos dudosa.

Como ya se ha indicado, el análisis de todos los problemas particulares de los ELCT con los diferentes criterios de cuantificación utilizados para cada método no es factible (Keepers et al., 1991; Longo-Sorbello et al., 2006; Vichai and Kirtikara, 2006). Sin embargo, como muchos métodos comparten los principales objetivos y requerimientos operativos, el ensayo colorimétrico de la SRB para la evaluación de la citotoxicidad en las líneas celulares tumorales ha sido elegido en este trabajo como caso de estudio. El ensayo de la SRB es un modelo bien aceptado para testar la citotoxicidad de muestras y es un procedimiento altamente reproducible, actualmente realizado en lectores de microplacas y proporciona una herramienta apropiada que asegura que las muestras y los controles de las reacciones pueden ser evaluados simultáneamente, así como producir abundantes datos con un error experimental inferior (Vichai and Kirtikara, 2006). Es por ello, una herramienta apropiada, robusta y significativa que puede ser utilizada como caso ideal de estudio para desarrollar criterios para evaluar y comparar el proceso de citotoxicidad.

4.1. Selección del modelo matemático más apropiado para la caracterización, identificación y cuantificación de la dosis-respuesta de los efectos citotóxicos en líneas celulares tumorales de agentes individuales. Evaluación crítica de la aplicación de un valor paramétrico como único criterio estándar

Aunque se han obtenido resultados consistentes en la viabilidad/mortalidad de las líneas celulares tumorales, la cuantificación de los resultados se ha dejado como en los sistemas de formato más antiguos, con formalismos de cálculo simples para abreviar el procedimiento. La cuantificación se basa en la determinación de la dosis que reduce la población de las células tumorales al 50%, comúnmente llamado LD_{50} . Normalmente, su cálculo se obtiene por el análisis gráfico y/o por interpolaciones lineales, no exento de controversia, porque los valores de LD_{50} son menos reproducibles y dependen fuertemente de la respuesta de la pendiente, evita la cuantificación y su fiabilidad estadística, incrementando la acumulación de restricciones de procedimiento que aumentan las estandarizaciones del protocolo y pierde una parte de la información relevante que puede ser extraída de los resultados experimentales. Sólo raramente las expresiones matemáticas que traducen un modelo mecanístico son aplicadas y casi nunca se realiza un análisis comprensivo de la DR.

4.1.1. Selección del modelo matemático para la caracterización, identificación y cuantificación de las respuestas de citotoxicidad en ensayos in vitro en líneas celulares tumorales

En términos matemáticos, varios enfoques que se pueden transferir de los campos teóricos de la DR, microbiología, enzimología, farmacología y otros sistemas biológicos, son soluciones más apropiadas para describir los procesos de mortalidad de las líneas celulares tumorales. De hecho, las ecuaciones de dos parámetros (2P) (como las ecuaciones de Bertalanffy y Michaelis-Menten) y grupo de funciones sigmoidales de tres parámetros (3P) (como las ecuaciones de Logística, Weibull, Hill, Gompertz, Richards-Chapman, etc.) son, en general, soluciones aceptables para ajustar individualmente los perfiles DR correspondientes a la mortalidad de las células tumorales después de ser tratados con agentes individuales o mezclas complejas. En general, estos modelos mejoran, ayudan y guían al investigador a calcular y en ocasiones a predecir de una manera más precisa los resultados obtenidos en ELCT. La utilización de modelos produce parámetros clave para resumir las respuestas, como la asíntota, el LD_{50} , la tasa máxima y promedia del proceso o los valores de la fase de latencia, entre otros. En este trabajo, los modelos matemáticos de DR no lineales, biológicamente más relevantes y prácticos, son testados con los datos experimentales obtenidos y los resultados de

sus ajustes son evaluados con diferentes criterios estadísticos para categorizar la adecuación de las ecuaciones matemáticas para describir las respuestas de los ELCT.

4.1.2. Modelos estadísticos para la caracterización, identificación y cuantificación de respuestas biológicas

Actualmente, el mecanismo de reacción de citotoxicidad de las células tumorales *in vitro* es conocido (Keepers et al., 1991; Longo-Sorbello et al., 2006; Vichai and Kirtikara, 2006). Sin embargo, el desarrollo de un modelo mecanístico para evaluar los efectos citotóxicos de diferentes agentes es muy sofisticado y con frecuencia difícil de llevar a cabo debido a la cantidad de componentes intermediarios que necesitan ser evaluados (Fitzgerald et al., 2006). Además, la descripción mecanística detallada de las respuestas de los ELCT es aún más compleja por la heterogeneidad de las líneas celulares utilizadas, que varían de un ensayo a otro haciendo difícil caracterizar en términos mecanísticos las vías moleculares, y quizás es inviable proponer un sólo sistema mecanístico para todas las técnicas de ELCT. Así, se tiende a buscar modelos empíricos generales, capaces de cuantificar y evaluar las complejas respuestas y resumir los resultados en parámetros simples. A este respecto, artículos previos de campos de estudio relacionados (Berger, 1981; De Lean et al., 1978; Murado et al., 2002; Murado and Vázquez, 2010; Olinick, 2009; Trogl and Benediktova, 2011; Tsoularis and Wallace, 2002; Zwietering et al., 1990), han revisado diferentes expresiones matemáticas empíricas no lineales útiles en sistemas biológicos (como microbiología, toxicología, farmacología, inmunología, dinámica de poblaciones, etc.). Esos estudios proporcionan conceptos clave para guiar el desarrollo y la solución estándar para los ELCT.

El rango de expresiones empíricas no-lineales es amplio (Tsoularis and Wallace, 2002). Las opciones preferibles son siempre modelos con un número de parámetros bajo y modelos con parámetros que proporcionan el significado directo del proceso en estudio (De Lean et al., 1978; Prieto et al., 2012). En este sentido, para la descripción de las tasas DR de la mortalidad (inhibición) o supervivencia (viabilidad) de las células tumorales, se pueden utilizar un grupo de alternativas previamente bien descritas por la bibliografía cubriendo un amplio espectro de perfiles de respuestas, de potenciales a sigmoidales, con y sin ordenada en el origen (Berger, 1981; Buchanan et al., 1997; Tjørve and College, 2003; Wilson, 1994). Independientemente del proceso intrínseco y mecanístico que esos modelos traducen, la descripción empírica del efecto citotóxico de esos procesos muestra un amplio rango de respuestas 2D (hiperbólica, potencial, de primer orden y sigmoidal).

Sin embargo, actualmente no está claro qué modelo o modelos son consistentes o inconsistentes con los datos experimentalmente obtenidos. Un problema clave es que no se ha llevado a cabo una comparación directa entre modelos, en parte porque se han formulado en diferentes contextos (Lever et al., 2014). Para dar sentido a la variedad de criterios de cuantificación de ELCT, en este trabajo, una serie de expresiones matemáticas son evaluadas rigurosamente. A continuación, las dos ecuaciones de dos parámetros (ecuaciones de Bertalanffy y Michaelis-Menten) y el grupo de funciones sigmoidales de tres parámetros con ordenada en el origen (ecuaciones de Verhulst y Gompertz) y sin ordenada en el origen (Weibüll, Hill, Gompertz modificada, Richards-Chapman y Verhulst modificada) son analizados con criterios estadísticos rigurosos y selectivos usando datos experimentales obtenidos específicamente para determinar la solución del modelo más eficiente.

4.1.3. Análisis de los modelos matemáticos dosis-respuesta más comunes para la caracterización, identificación y cuantificación de respuestas citotóxicas de los ELCT con criterios estadísticos selectivos.

Al existir una gama amplia de modelos capaces de ajustarse razonablemente bien a la citotoxicidad en los ELCT, como herramienta de selección se utilizan criterios estadísticos para determinar el modelo que describe y predice más eficientemente los efectos DR de los agentes (estadísticos e intuitivos, descritos detalladamente en la sección de materiales y métodos).

4.1.3.a) Aplicación de los criterios estadísticos de selección de modelos

La utilidad de los MSC para elegir la mejor solución está bien documentada (Rivers & Vuong, 2002). Un modelo debería ser lo suficientemente complejo para extraer las regularidades de los datos, pero suficientemente simple para no sobre ajustar y con ello reducir la predictibilidad. Los MSC evalúan la bondad del ajuste, el sobreajuste y la falta de generalización para penalizar la complejidad del modelo. Actualmente, hay una amplia variedad de MSC disponibles (Forster, 2000; Myung & Pitt, 2004), pero no hay ni un criterio que lleve a la elección perfecta (Rust, Simester, Brodie, & Nilikant, 1995).

En la **Tabla 4** se muestra un resumen de los MSC utilizados para evaluar los resultados obtenidos de los nueve modelos (criterios AIC, AICc, BIC, RIC, Cp, R^2_{adj} , FPE, MSIC, y MA^2). Los datos experimentales utilizados para testar los modelos fueron las DR de tres agentes comerciales (EL, VP-16 y CDDP, como compuestos puros) y dos extractos naturales (EM y EA como mezclas de compuestos) en cuatro líneas celulares tumorales (NCI-H460,

HeLa, MCF-7 y HepG2) con una de las técnicas más comunes, el ensayo colorimétrico de la SRB. Para tal fin se produjeron 125 datos independientes por cada uno de los agentes y por cada una de las líneas celulares tumorales utilizados.

La **Tabla 5** proporciona los valores numéricos de los parámetros estimados (K , LD_{50} y a) y los IC correspondientes (al 95% de confianza) de las Ecs. [1] a [9], después de ajustar los valores DR de las cuatro líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2) por el ensayo colorimétrico de la SRB para evaluar los efectos de 3 agentes comerciales (EL, VP-16 y CDDP, como compuestos puros) y 2 extractos naturales (EM y EA como mezcla de compuestos). Estos valores paramétricos fueron utilizados para clasificar los modelos previamente seleccionados de la bibliografía (Ecs. [1] a [9]). El valor estadístico del coeficiente de correlación R^2 se presenta como prueba de ajuste de los resultados obtenidos. Los valores paramétricos subrayados son no significativos, y por lo tanto, el resultado de ajuste debería ser considerado como análisis no válido.

La **Tabla 6**, **Tabla 7**, **Tabla 8** y **Tabla 9** muestra el ranking de los modelos (R_k) obtenido para cada MSC y el ranking global basado en el ranking de la suma de cada MSC ($\sum R_k$) para los cinco agentes utilizados en todas líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2, respectivamente). El modelo de selección de criterios ayuda a diferenciar la solución “más verdadera”. En general, todos los MSC estadísticos se unen en soluciones similares. Esta conclusión se puede explicar porque una vez las soluciones que no presentan parámetros significativos son excluidas, cualquiera de los MSC presentados soluciona de manera similar y precisa la selección más apropiada.

Finalmente, la **Tabla 10**, informa del ranking global ($\sum R_k$) para las cuatro líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2) y para todos los agentes testados experimentalmente en el ensayo de la SRB (EL, VP-16, CDDP, EM y EA). Esos valores del ranking fueron utilizados para clasificar los nueve modelos seleccionados de la bibliografía (Ecs. [1] a [9]) desde la más al menos eficiente para cada línea celular tumoral y finalmente para todas ellas. El ranking global ($\sum R_k$) denota la eficiencia del análisis de ajuste para cada una de las líneas celulares tumorales evaluadas en el siguiente orden decreciente:

- Para la línea NCI-H460: Weibüll > Hill > Chapman > VerlhustM > GompertzM > Bertalanffy > Verhulst > Michaelis > Gompertz.
- Para la línea HeLa: Hill > Weibüll > Chapman > VerlhustM > Bertalanffy > GompertzM > Michaelis > Verhulst > Gompertz.

- Para la línea MFC-7: Weibüll > VerlhustM > Chapman > Hill > GompertzM > Bertalanffy > Verhulst > Michaelis > Gompertz.
- Para la línea HepG2: VerlhustM > Weibüll > Chapman > Hill > GompertzM > Bertalanffy > Michaelis > Verhulst > Gompertz.

Finalmente, los modelos que tienen más probabilidades de ser correctos de manera globalizada pueden ordenarse de forma decreciente como sigue: Weibüll > Hill > VerlhustM > Chapman > GompertzM > Bertalanffy > Verhulst > Michaelis > Gompertz.

Tabla 5: Valores numéricos de los parámetros estimados y IC correspondientes de las Ecs. [1] a [9], después de ajustar los valores DR de cuatro líneas tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2) determinados por el ensayo colorimétrico de la SRB para hacer un análisis de los efectos de 3 agentes comerciales (EL, VP-16 y CDDP, compuestos puros) y 2 extractos naturales (EM y EA, mezcla de compuestos). Estos datos fueron utilizados para evaluar los nueve modelos seleccionados de la bibliografía (Ecs. [1] a [9]). El valor de R² se presenta como prueba de los resultados de ajuste obtenidos. Los valores paramétricos subrayados son no significativos y por ello el resultado de los ajustes debería ser considerado como no válido.

		NCI-H460				HeLa				MFC-7				HepG2			
		K	LD ₅₀	a	R ²	K	LD ₅₀	a	R ²	K	LD ₅₀	a	R ²	K	LD ₅₀	a	R ²
EXTRACTO METANOLICO (EM)	Weibüll	100.0±9.3	58.83±6.42	1.98±0.39	0.9785	100.0±21.5	50.16±14.78	1.27±0.50	0.9359	100.0±12.2	57.89±8.79	1.53±0.34	0.9772	100.0±60.4	96.02±71.64	1.28±0.44	0.9639
	Hill	100.0±11.6	56.59±7.46	2.88±0.76	0.9776	100.0±20.7	48.39±13.19	2.01±0.94	0.9377	100.0±13.7	55.48±9.37	2.31±0.67	0.9752	100.0±43.8	92.96±55.09	1.68±0.67	0.9593
	Chapman	100.0±10.0	57.34±7.06	3.77±1.83	0.9781	100.0±18.8	49.81±13.40	1.62±1.19	0.9370	100.0±11.9	56.83±8.85	2.27±1.07	0.9767	100.0±48.2	95.31±58.89	1.49±0.79	0.9634
	VerlhustM	100.0±8.7	59.45±6.22	0.05±0.01	0.9788	100.0±20.5	50.46±14.20	<u>0.02±0.02</u>	0.9350	100.0±10.7	58.57±8.00	0.03±0.01	0.9771	100.0±62.8	97.37±73.11	<u>0.01±0.02</u>	0.9641
	GompertzM	100.0±9.0	60.92±6.50	0.03±0.01	0.9752	100.0±27.7	50.49±18.24	<u>0.01±0.02</u>	0.9327	100.0±10.4	59.44±7.88	<u>0.01±0.01</u>	0.9760	100.0±108.2	<u>98.57±122.51</u>	<u>0.01±0.02</u>	0.9644
	Verhulst	100.0±8.5	60.11±6.16	26.3±14.4	0.9761	100.0±12.8	53.49±10.84	8.21±5.1	0.9104	100.0±8.6	60.86±6.66	19.8±12.8	0.9640	100.0±34.8	101.68±38.13	9.92±3.52	0.9342
	Gompertz	100.0±9.2	62.26±6.48	0.04±0.01	0.9679	100.0±12.4	56.28±11.35	0.03±0.01	0.8831	100.0±8.4	63.69±6.42	0.04±0.01	0.9502	100.0±58.0	106.78±60.16	0.02±0.01	0.9124
	Michaelis	100.0±42.3	<u>20.00±25.82</u>	--	0.7003	100.0±29.8	41.32±33.83	--	0.8721	100.0±28.7	48.58±35.55	--	0.9173	100.0±45.7	105.33±89.01	--	0.9108
	Bertalanffy	100.0±34.6	55.38±34.56	--	0.9333	100.0±18.6	47.28±17.85	--	0.9272	100.0±18.9	53.21±18.97	--	0.9588	100.0±40.0	98.40±58.18	--	0.9521
EXTRACTO ACUOSO (EA)	Weibüll	100.0±8.1	46.96±5.23	1.73±0.31	0.9347	100.0±4.5	21.16±1.43	1.32±0.19	0.9696	100.0±12.9	44.32±7.11	1.35±0.15	0.9683	100.0±17.6	38.22±9.00	1.25±0.22	0.9772
	Hill	100.0±19.2	49.31±12.99	2.20±0.83	0.9325	100.0±7.9	22.00±2.11	2.50±0.69	0.9749	100.0±20.3	39.04±9.71	2.15±0.66	0.9705	100.0±25.4	36.60±12.93	1.78±0.65	0.9642
	Chapman	100.0±15.6	50.41±11.31	2.32±1.33	0.9324	100.0±6.5	22.28±2.10	2.52±1.33	0.9745	100.0±20.0	40.16±10.03	2.11±1.04	0.9704	100.0±21.7	37.83±11.55	1.40±0.64	0.9750
	VerlhustM	100.0±13.9	52.24±9.93	0.04±0.02	0.9304	100.0±6.2	22.58±2.18	0.08±0.03	0.9737	100.0±21.3	41.47±10.55	0.04±0.03	0.9682	100.0±21.5	38.81±10.89	0.03±0.02	0.9792
	GompertzM	100.0±13.2	53.49±9.61	0.02±0.01	0.9254	100.0±6.1	22.59±2.41	0.03±0.02	0.9709	100.0±32.1	42.24±15.51	<u>0.02±0.02</u>	0.9657	100.0±28.6	39.36±13.93	<u>0.01±0.02</u>	0.9813
	Verhulst	100.0±12.4	53.39±9.17	17.0±11.5	0.9196	100.0±5.9	23.34±2.27	12.1±7.15	0.9659	100.0±13.4	42.85±6.53	18.6±11.7	0.9470	100.0±14.2	41.42±8.06	7.99±2.59	0.9587
	Gompertz	100.0±12.6	55.97±9.10	0.04±0.01	0.9012	100.0±6.4	24.17±2.62	0.07±0.02	0.9518	100.0±12.3	45.12±5.90	0.05±0.01	0.9237	100.0±15.3	43.84±8.83	0.03±0.01	0.9387
	Michaelis	100.0±43.4	55.70±52.68	--	0.8641	100.0±23.7	15.52±12.49	--	0.8842	100.0±36.0	39.42±30.76	--	0.9065	100.0±32.5	35.67±26.22	--	0.9101
	Bertalanffy	100.0±29.9	52.42±28.83	--	0.9038	100.0±11.3	19.68±5.30	--	0.9511	100.0±28.3	39.59±18.89	--	0.9477	100.0±19.7	37.09±12.67	--	0.9673
ELIPTICINA (EL)	Weibüll	100.0±12.3	0.78±0.34	0.65±0.16	0.9546	100.0±26.7	1.21±0.51	0.94±0.46	0.9474	100.0±21.0	1.42±0.43	1.12±0.42	0.9685	100.0±82.2	1.16±0.89	0.72±0.51	0.8775
	Hill	100.0±14.7	0.72±0.35	0.98±0.33	0.9550	100.0±23.2	1.20±0.40	1.56±0.90	0.9479	100.0±20.8	1.38±0.40	1.77±0.85	0.9661	100.0±61.6	1.17±0.26	1.16±0.50	0.8774
	Chapman	100.0±10.8	0.82±0.33	0.52±0.16	0.9519	100.0±22.5	1.21±0.45	0.90±0.67	0.9472	100.0±18.6	1.42±0.40	1.22±0.80	0.9682	100.0±73.5	1.17±0.79	0.57±0.16	0.8779
	VerlhustM	100.0±111.3	<u>0.74±1.62</u>	<u>0.04±3.38</u>	0.9554	100.0±33.4	1.20±0.60	<u>0.47±1.10</u>	0.9475	100.0±21.0	1.43±0.43	<u>0.65±0.73</u>	0.9684	100.0±260.7	<u>1.17±5.53</u>	<u>0.15±5.41</u>	0.8784
	GompertzM	100.0±12.7	0.96±0.32	<u>0.00±0.65</u>	0.9406	100.0±37.6	1.24±0.68	<u>0.01±0.66</u>	0.9470	100.0±29.5	1.43±0.57	<u>0.11±0.53</u>	0.9684	100.0±72.0	<u>1.34±1.46</u>	<u>0.01±1.07</u>	0.8638
	Verhulst	100.0±13.1	1.11±0.45	5.65±3.21	0.8791	100.0±12.6	1.39±0.34	5.45±3.3	0.8888	100.0±10.6	1.61±0.24	14.3±12.3	0.9365	100.0±24.0	1.49±0.73	3.90±2.54	0.7615
	Gompertz	100.0±14.9	1.20±0.53	1.11±0.56	0.8461	100.0±12.3	1.46±0.36	0.81±0.33	0.8533	100.0±10.5	1.70±0.25	1.26±0.47	0.9154	100.0±22.5	<u>1.58±1.77</u>	0.57±0.32	0.7107
	Michaelis	100.0±9.6	0.73±0.26	--	0.9551	100.0±17.4	1.00±0.55	--	0.9238	100.0±19.4	1.14±0.65	--	0.9462	100.0±21.1	<u>1.10±1.69</u>	--	0.8754
	Bertalanffy	100.0±10.5	0.96±0.32	--	0.9406	100.0±11.4	1.24±0.31	--	0.9470	100.0±12.7	1.37±0.37	--	0.9674	100.0±19.7	<u>1.34±1.56</u>	--	0.8638
ETOPOSIDEO (VP-16)	Weibüll	100.0±6.4	18.84±2.60	1.25±0.26	0.9667	100.0±26.8	15.43±7.37	0.66±0.36	0.9751	100.0±10.2	25.02±3.64	1.18±0.29	0.9847	100.0±38.7	43.40±28.53	0.92±0.27	0.9831
	Hill	100.0±7.2	18.23±2.52	1.99±0.47	0.9688	100.0±22.6	15.43±5.01	1.08±0.72	0.9795	100.0±10.6	24.67±3.36	1.97±0.61	0.9850	100.0±28.0	41.75±20.34	1.30±0.44	0.9816
	Chapman	100.0±6.1	18.75±2.53	1.57±0.59	0.9678	100.0±21.8	15.42±6.42	0.50±0.33	0.9737	100.0±9.1	25.02±3.40	1.43±0.68	0.9848	100.0±33.1	43.55±24.86	0.88±0.33	0.9830
	VerlhustM	100.0±6.4	18.95±2.67	0.06±0.03	0.9657	100.0±136.0	<u>15.42±38.75</u>	<u>0.01±0.20</u>	0.9790	100.0±9.8	25.07±3.56	0.04±0.03	0.9845	100.0±71.5	<u>43.13±49.98</u>	<u>0.01±0.04</u>	0.9831
	GompertzM	100.0±6.8	18.78±2.84	<u>0.01±0.02</u>	0.9635	100.0±22.8	18.78±5.58	<u>0.01±0.04</u>	0.9536	100.0±13.2	24.80±4.39	<u>0.01±0.02</u>	0.9839	100.0±93.4	<u>43.76±60.41</u>	<u>0.01±0.03</u>	0.9816
	Verhulst	100.0±6.7	20.46±3.03	9.11±5.01	0.9498	100.0±11.8	20.46±6.17	3.91±2.61	0.8436	100.0±7.4	27.75±3.04	17.2±14.3	0.9651	100.0±30.9	48.89±22.76	5.44±1.91	0.8990
	Gompertz	100.0±7.6	21.45±3.50	0.07±0.02	0.9293	100.0±12.0	21.74±7.27	0.04±0.02	0.7900	100.0±7.8	28.98±3.18	0.08±0.03	0.9497	100.0±49.9	52.34±37.46	0.02±0.01	0.8561
	Michaelis	100.0±14.4	13.86±6.94	--	0.9195	100.0±7.0	14.92±3.83	--	0.9787	100.0±15.6	18.70±9.48	--	0.9616	100.0±16.3	41.75±15.01	--	0.9688
	Bertalanffy	100.0±7.1	17.52±3.39	--	0.9594	100.0±8.6	18.42±4.14	--	0.9557	100.0±8.1	23.54±4.34	--	0.9827	100.0±12.7	43.75±9.38	--	0.9817
CISPLATINO (CDDP)	Weibüll	100.0±7.1	6.49±1.30	0.93±0.17	0.9817	100.0±12.4	6.80±1.24	1.08±0.34	0.9690	100.0±14.7	12.17±2.17	1.50±0.31	0.9810	100.0±17.3	1.45±0.94	0.50±0.41	0.9851
	Hill	100.0±9.5	6.28±1.50	1.47±0.40	0.9787	100.0±11.8	6.82±1.03	1.87±0.69	0.9723	100.0±16.1	11.63±2.32	2.18±0.62	0.9765	100.0±17.6	1.84±1.29	0.98±0.81	0.9870
	Chapman	100.0±6.7	6.51±1.30	0.88±0.23	0.9818	100.0±10.7	6.84±1.13	1.21±0.69	0.9695	100.0±14.0	11.93±2.17	2.09±0.89	0.9797	100.0±8.3	2.26±1.40	0.50±0.49	0.9777
	VerlhustM	100.0±7.6	6.49±1.26	0.09±0.08	0.9817	100.0±12.7	6.78±1.26	0.12±0.11	0.9687	100.0±12.4	12.34±1.89	0.14±0.06	0.9813	100.0±334.6	<u>1.91±12.12</u>	<u>0.01±3.66</u>	0.9870
	GompertzM	100.0±8.0	6.67±1.24	<u>0.01±0.05</u>	0.9818	100.0±20.8	6.69±1.85	<u>0.01±0.09</u>	0.9679	100.0±13.5	12.57±1.99	0.06±0.04	0.9813	100.0±8.2	3.26±0.79	<u>0.01±0.15</u>	0.9720
	Verhulst	100.0±9.5	7.77±1.89	8.22±3.91	0.9481	100.0±8.4	7.55±1.19	7.08±4.26	0.9359	100.0±9.8	12.92±1.54	18.3±10.3	0.9639	100.0±6.1	4.23±0.92	<u>10.7±13.9</u>	0.9522
	Gompertz	100.0±11.2	8.28±2.00	0.20±0.06	0.9261	100.0±9.0	7.87±1.38	0.18±0.06	0.9080	100.0±9.7	13.63±1.51	0.17±0.04	0.9474	100.0±6.5	4.46±0.93	0.44±0.22	0.9413
	Michaelis	100.0±10.9	5.34±2.04	--	0.9660	100.0±16.8	5.14±2.95	--	0.9287	100.0±30.8	10.81±7.85	--	0.9181	100.0±4.5	1.88±0.55	--	0.9871
	Bertalanffy	100.0±6.2	6.67±1.23	--	0.9818	100.0±8.1	6.59±1.26	--	0.9677	100.0±20.9	11.39±4.28	--	0.9614	100.0±5.2	3.26±0.64	--	0.9720

Tabla 6: Respuestas estadísticas de ajuste y ranking de modelos (Rk) obtenidos para cada MSC para los efectos de cinco agentes (EL, VP-16, CDDP, EM y EA) para la línea celular tumoral NCI-H460. Los resultados obtenidos para cada MSC se presentan juntamente con el ranking individual (Rk) entre paréntesis. Finalmente, el ranking global (Σ Rk) basado en la suma de cada MSC para cada agente es presentado.

COMPUESTO & MODELO	DATOS ESTADISTICOS						CRITERIO DE SELECCION DEL MODELO										CLASIF. GLOBAL (Σ Rk)
	P	P-sig	RSS	R ²	ESS	S ²	AIC	AICc	BIC	FPE	R ² adj	RIC	Cp	MSIC	MA ²		
							Valor Rk	Valor Rk	Valor Rk	Valor Rk	Valor Rk	Valor Rk	Valor Rk	Valor Rk	Valor Rk	Valor Rk	
EXTRACTO METANOLICO (EM)	Weibull	3	3	3026.7	0.9785	151214.5	1219.5	404.4(1)	398.4(1)	1016.4(1)	396941(1)	0.9780(2)	989.4(1)	191.2(1)	3.86(1)	52.0(1)	(1)
	Hill	3	3	3449.8	0.9776	169859.2	1369.8	420.7(4)	414.8(4)	1032.7(4)	452430(4)	0.9771(4)	1005.3(4)	195.8(2)	3.85(2)	60.4(4)	(4)
	Chapman	3	3	3342.2	0.9781	145824.6	1176.0	416.8(3)	410.8(3)	1028.8(3)	438316(3)	0.9776(3)	1001.5(3)	236.2(4)	3.73(4)	60.3(3)	(3)
	VerlhustM	3	3	3299.5	0.9788	144547.6	1165.7	415.2(2)	409.2(2)	1027.2(2)	432721(2)	0.9783(1)	999.9(2)	234.8(3)	3.73(3)	57.5(2)	(2)
	GompertzM	3	3	4112.0	0.9752	143854.8	1160.1	442.7(6)	436.7(6)	1054.7(6)	539278(6)	0.9746(6)	1026.8(6)	324.1(6)	3.51(6)	72.6(6)	(6)
	Verhulst	3	3	3924.2	0.9761	143821.1	1159.8	436.8(5)	430.9(5)	1048.8(5)	514646(5)	0.9755(5)	1021.1(5)	303.9(5)	3.55(5)	71.0(5)	(5)
	Gompertz	3	3	5742.9	0.9679	143199.0	1154.8	484.4(7)	478.5(7)	1096.4(7)	753161(7)	0.9671(7)	1067.5(7)	502.6(7)	3.17(7)	99.0(7)	(7)
	Michaelis	2	1	86579.6	0.7003	172081.2	1387.8	821.6(9)	817.6(9)	1430.8(9)	11174399(9)	0.6954(9)	1406.1(9)	7677.6(9)	0.65(9)	44104(9)	(9)
	Bertalanffy	2	2	16380.2	0.9333	144316.7	1163.8	613.4(8)	609.5(8)	1222.6(8)	2114109(8)	0.9322(8)	1201.3(8)	1638.3(8)	2.14(8)	196.2(8)	(8)
EXTRACTO ACUOSO (EA)	Weibull	3	3	3023.0	0.9347	110994.2	895.1	404.2(1)	398.3(1)	1016.2(1)	396461(1)	0.9330(1)	989.2(1)	303.2(1)	3.56(1)	51.8(1)	(1)
	Hill	3	3	7431.9	0.9325	110000.1	887.1	516.7(2)	510.7(2)	1128.7(2)	974671(2)	0.9308(2)	1099.0(2)	928.2(2)	2.65(2)	136.5(2)	(2)
	Chapman	3	3	7445.0	0.9324	109469.1	882.8	516.9(3)	510.9(3)	1128.9(3)	976389(3)	0.9308(3)	1099.2(3)	935.2(3)	2.64(3)	139.1(3)	(3)
	VerlhustM	3	3	7752.5	0.9304	109776.1	885.3	521.9(4)	516.0(4)	1134.0(4)	1016715(4)	0.9287(4)	1104.1(4)	975.6(4)	2.60(4)	142.7(4)	(4)
	GompertzM	3	3	8396.1	0.9254	109995.8	887.1	531.9(5)	526.0(5)	1143.9(5)	1101130(5)	0.9236(5)	1113.9(5)	1064.1(5)	2.52(5)	157.6(5)	(5)
	Verhulst	3	3	9268.9	0.9196	110346.7	889.9	544.3(6)	538.3(6)	1156.3(6)	1215599(6)	0.9176(6)	1125.9(6)	1183.0(6)	2.43(6)	173.8(7)	(6)
	Gompertz	3	3	11755.1	0.9012	110940.4	894.7	574.0(7)	568.0(7)	1186.0(7)	1541648(7)	0.8987(8)	1154.9(7)	1242.4(7)	2.20(7)	208.2(8)	(7)
	Michaelis	2	2	22734.5	0.8641	109415.6	882.4	654.4(9)	650.5(9)	1263.6(9)	2934233(9)	0.8619(9)	1241.6(9)	3099.6(9)	1.54(9)	309.9(9)	(9)
	Bertalanffy	2	2	14057.0	0.9038	109868.7	886.0	594.3(8)	590.4(8)	1203.5(8)	1814269(8)	0.9022(7)	1182.4(8)	1862.1(8)	2.02(8)	161.5(6)	(8)
ELIPTICINA (EL)	Weibull	3	3	5834.6	0.9546	132833.5	1071.2	486.4(1)	480.5(1)	1098.4(2)	765189(1)	0.9535(4)	1069.4(1)	561.8(2)	3.08(2)	106.8(3)	(1)
	Hill	3	3	6013.2	0.9550	159292.9	1284.6	490.2(4)	484.2(3)	1102.2(4)	788620(4)	0.9539(3)	1073.1(3)	466.1(1)	3.23(1)	112.7(4)	(3)
	Chapman	3	3	6435.1	0.9519	121286.9	978.1	498.7(5)	492.7(5)	1110.7(5)	843953(5)	0.9507(5)	1081.4(5)	703.4(5)	2.89(5)	117.9(5)	(5)
	VerlhustM	3	0	6001.9	0.9554	122683.1	989.4	489.9(3)	484.0(2)	1102.0(3)	787139(3)	0.9543(2)	1072.9(2)	639.3(4)	2.97(4)	4932.6(8)	(4)
	GompertzM	3	2	10370.3	0.9406	121790.2	982.2	558.3(7)	552.4(7)	1170.3(7)	1360044(7)	0.9391(7)	1139.6(6)	1200.8(7)	2.42(7)	185517(9)	(7)
	Verhulst	3	3	19380.2	0.8791	117360.4	946.5	636.5(8)	630.5(8)	1248.5(8)	2541667(8)	0.8761(8)	1215.9(8)	2440.6(8)	1.75(8)	370.2(6)	(8)
	Gompertz	3	3	24906.9	0.8461	117480.8	947.4	667.8(9)	661.9(9)	1279.8(9)	3266479(9)	0.8423(9)	1246.5(9)	3167.1(9)	1.50(9)	475.9(7)	(9)
	Michaelis	2	2	6020.9	0.9551	122799.8	990.3	488.3(2)	484.4(4)	1097.5(1)	777081(2)	0.9544(1)	1078.2(4)	639.0(3)	2.98(3)	59.7(1)	(2)
	Bertalanffy	2	2	10369.6	0.9406	121790.5	982.2	556.3(6)	552.3(6)	1165.5(6)	1338352(6)	0.9396(6)	1145.0(7)	1198.7(6)	2.43(6)	102.0(2)	(6)
ETOPOSIDEO (VP-16)	Weibull	3	3	3874.1	0.9667	129575.9	1045.0	435.2(1)	429.3(1)	1047.2(1)	508078(1)	0.9658(3)	1019.5(1)	344.4(1)	3.46(1)	66.7(2)	(1)
	Hill	3	3	4049.0	0.9688	134177.8	1082.1	440.7(2)	434.8(2)	1052.8(2)	531010(2)	0.9680(1)	1024.9(2)	348.7(2)	3.45(2)	70.2(3)	(2)
	Chapman	3	3	4297.8	0.9678	125255.8	1010.1	448.2(3)	442.3(3)	1060.2(3)	563643(3)	0.9670(2)	1032.2(3)	412.8(3)	3.32(3)	75.9(4)	(3)
	VerlhustM	3	3	4601.6	0.9657	125309.0	1010.6	456.7(4)	450.8(4)	1068.8(4)	603494(4)	0.9649(4)	1040.5(4)	450.2(4)	3.26(4)	82.9(5)	(4)
	GompertzM	3	2	4910.3	0.9635	125387.1	1011.2	464.8(5)	458.9(5)	1076.9(5)	643979(5)	0.9626(5)	1048.4(5)	488.0(5)	3.19(5)	2515.6(9)	(5)
	Verhulst	3	3	7558.6	0.9498	124573.0	1004.6	518.8(7)	512.8(7)	1130.8(7)	991287(7)	0.9486(7)	1101.0(7)	821.5(7)	2.75(7)	137.5(6)	(7)
	Gompertz	3	3	10932.8	0.9293	124691.4	1005.6	564.9(8)	559.0(8)	1176.9(8)	1433810(8)	0.9275(8)	1146.1(8)	1240.0(8)	2.39(8)	192.6(8)	(8)
	Michaelis	2	2	14312.1	0.9195	128022.9	1032.4	596.6(9)	592.6(9)	1205.8(9)	1847194(9)	0.9182(9)	1184.7(9)	1611.8(9)	2.16(9)	152.6(7)	(9)
	Bertalanffy	2	2	5510.2	0.9594	125984.6	1016.0	477.3(6)	473.3(6)	1086.5(6)	711172(6)	0.9588(6)	1067.3(6)	556.9(6)	3.10(6)	50.3(1)	(5)
CISPLATINO (CDDP)	Weibull	3	3	2427.8	0.9817	147973.2	1193.3	376.8(1)	370.9(1)	988.8(1)	318396(1)	0.9813(4)	962.5(1)	135.3(1)	4.06(1)	42.1(2)	(1)
	Hill	3	3	3321.8	0.9787	186457.7	1503.7	416.0(6)	410.1(6)	1028.0(6)	435651(6)	0.9781(6)	1000.7(6)	157.1(2)	3.98(2)	59.0(6)	(6)
	Chapman	3	3	2718.1	0.9818	132974.4	1072.4	390.9(2)	385.0(2)	1002.9(2)	356477(2)	0.9813(3)	976.3(2)	197.8(3)	3.84(3)	47.7(3)	(2)
	VerlhustM	3	3	2756.2	0.9817	133239.0	1074.5	392.7(3)	386.7(3)	1004.7(4)	361462(3)	0.9812(5)	978.0(3)	201.6(4)	3.83(4)	52.7(4)	(4)
	GompertzM	3	2	2830.9	0.9818	133155.9	1073.8	396.0(5)	390.1(5)	1008.0(5)	371266(5)	0.9813(2)	981.2(4)	210.5(6)	3.80(6)	5386.3(9)	(6)
	Verhulst	3	3	9153.9	0.9481	128873.8	1039.3	542.7(8)	536.8(8)	1154.7(8)	1200517(8)	0.9468(8)	1124.4(8)	982.0(8)	2.60(8)	167.7(7)	(8)
	Gompertz	3	3	13188.9	0.9261	128580.6	1036.9	588.4(9)	582.4(9)	1200.4(9)	1729693(9)	0.9243(9)	1168.9(9)	1470.9(9)	2.23(9)	236.5(8)	(9)
	Michaelis	2	2	5862.2	0.9660	134697.6	1086.3	485.0(7)	481.0(7)	1094.2(7)	756605(7)	0.9655(7)	1074.9(9)	553.6(7)	3.10(7)	58.9(5)	(7)
	Bertalanffy	2	2	2830.2	0.9818	133156.9	1073.8	394.0(4)	390.0(4)	1003.2(3)	365281(4)	0.9815(1)	985.3(5)	208.4(5)	3.82(5)	25.6(1)	(3)

Otras notaciones: *P*, número de parámetros ajustados; *P-sig*, número de parámetros ajustados significativos; *RSS*, suma residual de cuadrados; *ESS*, suma explicada de cuadrados; *S*², desviación estándar.

Tabla 7: Respuestas estadísticas de ajuste y ranking de modelos (Rk) obtenidos para cada MSC para los efectos de cinco agentes (EL, VP-16, CDDP, EM y EA) para la línea celular tumoral HeLa. Los resultados obtenidos para cada MSC se presentan juntamente con el ranking individuales (Rk) entre paréntesis. Finalmente, el ranking global ($\sum Rk$) basado en la suma de cada MSC para cada agente es presentado.

COMPUESTO & MODELO		DATOS ESTADISTICOS					CRITERIO DE SELECCION DEL MODELO												CLASIF. GLOBAL ($\sum Rk$)							
		P	P-sig	RSS	R ²	ESS	S ²	AIC		AICc		BIC		FPE		R ² _{adj}		RIC		Cp		MSIC		MA ²		
							Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk
EXTRACTO METANOLICO (EM)	Weibull	3	3	7178.4	0.9359	111839.3	901.9	512.3	(3)	506.4	(3)	1124.3	(3)	941425	(3)	0.9343	(3)	1094.7	(3)	875.9	(3)	2.70	(3)	133	(3)	(3)
	Hill	3	3	6963.3	0.9377	111910.6	902.5	508.5	(1)	502.6	(1)	1120.5	(1)	913224	(1)	0.9362	(1)	1091.0	(1)	845.4	(1)	2.73	(1)	130	(2)	(1)
	Chapman	3	3	7046.3	0.9370	111655.9	900.5	510.0	(2)	504.1	(2)	1122.0	(2)	924101	(2)	0.9354	(2)	1092.5	(2)	859.2	(2)	2.71	(2)	136	(4)	(2)
	VerlhustM	3	3	7281.4	0.9350	111649.1	900.4	514.1	(4)	508.2	(4)	1126.1	(4)	954936	(4)	0.9334	(4)	1096.5	(4)	891.9	(4)	2.68	(4)	146	(5)	(4)
	GompertzM	3	2	7540.2	0.9327	111647.9	900.4	518.5	(5)	512.5	(5)	1130.5	(5)	988874	(5)	0.9310	(5)	1100.7	(5)	927.8	(5)	2.65	(5)	3879	(9)	(5)
	Verhulst	3	3	10583.5	0.9104	111971.7	903.0	560.8	(7)	554.9	(7)	1172.9	(7)	1387994	(7)	0.9081	(7)	1142.1	(7)	1346.0	(7)	2.31	(7)	198	(6)	(7)
	Gompertz	3	3	14175.5	0.8831	112315.4	905.8	597.4	(8)	591.4	(8)	1209.4	(8)	1859083	(8)	0.8802	(8)	1177.7	(8)	1837.3	(8)	2.02	(8)	255	(8)	(8)
	Michaelis	2	2	17556.8	0.8721	111880.6	902.3	622.1	(9)	618.2	(9)	1231.3	(9)	2265971	(9)	0.8701	(9)	1209.8	(9)	2311.3	(9)	1.82	(9)	221	(7)	(9)
	Bertalanffy	2	2	8764.0	0.9272	111666.2	900.5	535.3	(6)	531.3	(6)	1144.5	(6)	1131127	(6)	0.9260	(6)	1124.3	(6)	1095.5	(6)	2.51	(6)	91	(1)	(5)
EXTRACTO ACUOSO (EA)	Weibull	3	3	1078.8	0.9696	124432.7	1003.5	275.4	(1)	269.5	(1)	887.4	(1)	141479	(1)	0.9688	(5)	863.5	(1)	15.4	(1)	4.70	(1)	18	(1)	(1)
	Hill	3	3	3116.0	0.9749	124228.6	1001.8	408.0	(2)	402.1	(2)	1020.0	(2)	406853	(2)	0.9743	(1)	992.9	(2)	269.8	(2)	3.64	(2)	54	(2)	(2)
	Chapman	3	3	3239.0	0.9745	123889.1	999.1	412.8	(3)	406.9	(3)	1024.9	(3)	424792	(3)	0.9739	(2)	997.6	(3)	286.2	(3)	3.60	(3)	58	(3)	(3)
	VerlhustM	3	3	3411.1	0.9737	123898.3	999.2	419.3	(4)	413.4	(4)	1031.3	(4)	447355	(4)	0.9731	(3)	1004.0	(4)	307.7	(4)	3.54	(4)	60	(4)	(4)
	GompertzM	3	3	3888.1	0.9709	123939.3	999.5	435.7	(5)	429.7	(5)	1047.7	(5)	509915	(5)	0.9702	(4)	1019.9	(5)	367.3	(5)	3.41	(5)	71	(6)	(5)
	Verhulst	3	3	4832.4	0.9659	124217.6	1001.8	462.8	(6)	456.9	(6)	1074.9	(6)	633756	(6)	0.9650	(6)	1046.5	(6)	484.0	(6)	3.20	(6)	88	(7)	(6)
	Gompertz	3	3	7280.5	0.9518	124685.7	1005.5	514.1	(8)	508.1	(8)	1126.1	(8)	954815	(8)	0.9506	(7)	1096.5	(8)	786.1	(8)	2.79	(8)	126	(8)	(8)
	Michaelis	2	2	17767.4	0.8842	124520.6	1004.2	623.6	(9)	619.7	(9)	1232.8	(9)	2293146	(9)	0.8823	(9)	1211.3	(9)	2090.6	(9)	1.92	(9)	218	(9)	(9)
	Bertalanffy	2	2	6805.9	0.9511	123957.3	999.7	503.7	(7)	499.7	(7)	1112.9	(7)	878408	(7)	0.9503	(8)	1093.2	(7)	730.0	(7)	2.87	(7)	65	(5)	(7)
ELIPTICINA (EL)	Weibull	3	3	5068.4	0.9474	96262.9	776.3	468.8	(3)	462.9	(3)	1080.8	(4)	664702	(3)	0.9461	(4)	1052.3	(3)	697.1	(3)	2.90	(3)	98	(4)	(3)
	Hill	3	3	5015.1	0.9479	96285.9	776.5	467.5	(1)	461.6	(1)	1079.5	(2)	657719	(1)	0.9466	(1)	1051.0	(1)	688.3	(1)	2.91	(1)	96	(3)	(1)
	Chapman	3	3	5086.3	0.9472	96103.0	775.0	469.2	(5)	463.3	(4)	1081.3	(5)	667060	(5)	0.9459	(5)	1052.7	(4)	701.4	(4)	2.89	(5)	100	(5)	(5)
	VerlhustM	3	2	5055.2	0.9475	96106.0	775.0	468.5	(2)	462.5	(2)	1080.5	(3)	662978	(2)	0.9461	(2)	1052.0	(2)	696.3	(2)	2.90	(2)	2600	(8)	(2)
	GompertzM	3	2	5160.0	0.9470	96097.8	775.0	471.0	(6)	465.1	(6)	1083.1	(6)	676718	(6)	0.9457	(6)	1054.5	(5)	713.3	(6)	2.88	(6)	93316	(9)	(6)
	Verhulst	3	3	11803.5	0.8888	96813.1	780.8	574.5	(8)	568.5	(8)	1186.5	(8)	1548003	(8)	0.8860	(8)	1155.4	(8)	1770.8	(8)	2.06	(8)	221	(6)	(8)
	Gompertz	3	3	16236.2	0.8533	97378.1	785.3	614.3	(9)	608.4	(9)	1226.4	(9)	2129336	(9)	0.8497	(9)	1194.3	(9)	2465.4	(9)	1.74	(9)	295	(7)	(9)
	Michaelis	2	2	8231.8	0.9238	96269.9	776.4	527.4	(7)	523.5	(7)	1136.6	(7)	1062438	(7)	0.9225	(7)	1116.6	(7)	1204.4	(7)	2.43	(7)	90	(2)	(7)
	Bertalanffy	2	2	5159.8	0.9470	96097.8	775.0	469.0	(4)	465.1	(5)	1078.2	(1)	665948	(4)	0.9461	(3)	1059.2	(6)	711.2	(5)	2.89	(4)	49	(1)	(4)
ETOPOSIDEO (VP-16)	Weibull	3	3	2034.1	0.9751	81527.4	657.5	354.7	(4)	348.8	(4)	966.7	(4)	266770	(4)	0.9745	(4)	940.9	(4)	267.7	(4)	3.64	(4)	40	(3)	(4)
	Hill	3	3	1673.1	0.9795	84734.1	683.3	330.3	(1)	324.3	(1)	942.3	(1)	219425	(1)	0.9790	(1)	917.1	(1)	187.1	(1)	3.88	(1)	32	(2)	(1)
	Chapman	3	3	2156.8	0.9737	79043.7	637.4	362.0	(5)	356.1	(5)	974.0	(5)	282854	(5)	0.9730	(5)	948.0	(5)	303.9	(5)	3.55	(5)	42	(4)	(5)
	VerlhustM	3	0	1712.5	0.9790	78950.6	636.7	333.2	(2)	327.2	(2)	945.2	(3)	224585	(2)	0.9785	(2)	919.9	(2)	217.2	(2)	3.78	(2)	1345	(8)	(3)
	GompertzM	3	2	5555.2	0.9536	79044.1	637.5	480.3	(7)	474.3	(7)	1092.3	(7)	728554	(7)	0.9524	(7)	1063.5	(6)	970.3	(7)	2.61	(7)	8271	(9)	(7)
	Verhulst	3	3	14605.2	0.8436	82868.8	668.3	601.1	(8)	595.2	(8)	1213.1	(8)	1915432	(8)	0.8397	(8)	1181.4	(8)	2612.8	(8)	1.69	(8)	278	(6)	(8)
	Gompertz	3	3	19596.3	0.7900	83402.1	672.6	637.8	(9)	631.9	(9)	1249.9	(9)	2570005	(9)	0.7848	(9)	1217.3	(9)	3522.9	(9)	1.40	(9)	364	(7)	(9)
	Michaelis	2	2	1762.2	0.9787	78927.0	636.5	334.8	(3)	330.8	(3)	943.9	(2)	227438	(3)	0.9783	(3)	927.0	(3)	225.1	(3)	3.77	(3)	17	(1)	(2)
	Bertalanffy	2	2	5510.6	0.9557	79481.6	641.0	477.3	(6)	473.3	(6)	1086.5	(6)	711227	(6)	0.9550	(6)	1067.3	(7)	953.6	(6)	2.64	(6)	51	(5)	(6)
CISPLATINO (CDDP)	Weibull	3	3	3313.9	0.9690	105914.0	854.1	415.7	(3)	409.8	(3)	1027.7	(4)	434606	(3)	0.9682	(3)	1000.4	(3)	366.0	(3)	3.42	(3)	59	(3)	(3)
	Hill	3	3	2925.7	0.9723	105827.9	853.5	400.1	(1)	394.2	(1)	1012.1	(1)	383702	(1)	0.9716	(1)	985.2	(1)	309.5	(1)	3.54	(1)	52	(2)	(1)
	Chapman	3	3	3258.8	0.9695	105909.2	854.1	413.6	(2)	407.7	(2)	1025.6	(2)	427385	(2)	0.9688	(2)	998.4	(2)	357.9	(2)	3.43	(2)	60	(4)	(2)
	VerlhustM	3	3	3333.7	0.9687	105907.3	854.1	416.4	(4)	410.5	(4)	1028.5	(5)	437208	(4)	0.9679	(4)	1001.2	(4)	368.9	(4)	3.41	(4)	65	(5)	(4)
	GompertzM	3	2	3401.4	0.9679	105905.3	854.1	419.0	(6)	413.0	(5)	1031.0	(6)	446080	(6)	0.9671	(6)	1003.6	(5)	378.8	(5)	3.39	(6)	1797	(9)	(6)
	Verhulst	3	3	7972.9	0.9359	106734.6	860.8	525.4	(7)	519.5	(7)	1137.5	(7)	1045624	(7)	0.9343	(7)	1107.5	(7)	1038.8	(7)	2.55	(7)	147	(7)	(7)
	Gompertz	3	3	11941.3	0.9080	107402.1	866.1	575.9	(9)	570.0	(9)	1188.0	(9)	1566072	(9)	0.9057	(9)	1156.8	(9)	1604.3	(9)	2.15	(9)	212	(8)	(9)
	Michaelis	2	2	9063.3	0.9287	106159.0	856.1	539.5	(8)	535.5	(8)	1148.7	(8)	1169759	(8)	0.9275	(8)	1128.5	(8)	1202.3	(8)	2.43	(8)	100	(6)	(8)
	Bertalanffy	2	2	3430.8	0.9677	105906.4	854.1	418.0	(5)	414.1	(6)	1027.2	(3)	442791	(5)	0.9672	(5)	1009.0	(6)	381.1	(6)	3.40	(5)	31	(1)	(5)

Otras notaciones: P , número de parámetros ajustados; P -sig, número de parámetros ajustados significativos; RSS , suma residual de cuadrados; ESS , suma explicada de cuadrados; S^2 , desviación estándar.

Tabla 8: Respuestas estadísticas de ajuste y ranking de modelos (Rk) obtenidos para cada MSC para los efectos de cinco agentes (EL, VP-16, CDDP, EM y EA) para la línea celular tumoral MCF-7. Los resultados obtenidos para cada MSC se presentan juntamente con el ranking individuales (Rk) entre paréntesis. Finalmente, el ranking global ($\sum Rk$) basado en la suma de cada MSC para cada agente es presentado.

COMPUESTO & MODELO		DATOS ESTADISTICOS					CRITERIO DE SELECCION DEL MODELO												CLASIF. GLOBAL ($\sum Rk$)							
		P	P-sig	RSS	R ²	ESS	S ²	AIC		AICc		BIC		FPE		R ² _{adj}		RIC		Cp		MSIC		MA ²		
								Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor		Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk
EXTRACTO METANOLICO (EM)	Weibull	3	3	3271.5	0.9772	143087.2	1153.9	414.1	(2)	408.2	(2)	1026.1	(2)	429054	(2)	0.9766	(1)	998.9	(2)	235.4	(2)	3.73	(2)	3.73	(8)	(2)
	Hill	3	3	3576.8	0.9752	192286.1	1550.7	425.2	(5)	419.3	(5)	1037.3	(5)	469083	(5)	0.9746	(5)	1009.7	(5)	169.3	(1)	3.94	(1)	3.94	(9)	(5)
	Chapman	3	3	3310.4	0.9767	118476.9	955.5	415.6	(3)	409.6	(3)	1027.6	(3)	434156	(3)	0.9762	(3)	1000.3	(3)	314.1	(4)	3.53	(4)	3.53	(6)	(3)
	VerhulstM	3	3	3258.9	0.9771	118889.7	958.8	413.6	(1)	407.7	(1)	1025.6	(1)	427394	(1)	0.9766	(2)	998.4	(1)	305.9	(3)	3.55	(3)	3.55	(7)	(1)
	GompertzM	3	3	3456.6	0.9760	119402.0	962.9	421.0	(4)	415.0	(4)	1033.0	(4)	453330	(4)	0.9754	(4)	1005.6	(4)	329.7	(5)	3.49	(5)	3.49	(5)	(4)
	Verhulst	3	3	5894.7	0.9640	124774.9	1006.2	487.7	(6)	481.8	(6)	1099.7	(6)	773078	(6)	0.9631	(6)	1070.7	(6)	613.3	(6)	3.00	(6)	3.00	(4)	(6)
	Gompertz	3	3	8483.2	0.9502	126710.1	1021.9	533.2	(8)	527.3	(8)	1145.2	(8)	1112553	(8)	0.9489	(8)	1115.1	(8)	918.7	(8)	2.66	(8)	2.66	(2)	(8)
	Michaelis	2	2	13076.9	0.9173	117474.7	947.4	585.3	(9)	581.3	(9)	1194.5	(9)	1687772	(9)	0.9159	(9)	1173.6	(9)	1604.4	(9)	2.16	(9)	2.16	(1)	(9)
Bertalanffy	2	2	6299.5	0.9588	118909.8	959.0	494.0	(7)	490.0	(7)	1103.2	(7)	813042	(7)	0.9581	(7)	1083.7	(7)	700.1	(7)	2.91	(7)	2.91	(3)	(7)	
EXTRACTO ACUOSO (EA)	Weibull	3	3	379.3	0.9683	110710.2	892.8	144.7	(1)	138.8	(1)	756.8	(1)	49743	(1)	0.9676	(3)	736.0	(1)	-65.9	(1)	5.63	(1)	5.63	(9)	(1)
	Hill	3	3	3259.9	0.9705	145629.5	1174.4	413.6	(2)	407.7	(2)	1025.7	(2)	427531	(2)	0.9698	(1)	998.4	(2)	228.0	(2)	3.75	(2)	3.75	(8)	(2)
	Chapman	3	3	3260.5	0.9704	93208.8	751.7	413.7	(3)	407.7	(3)	1025.7	(3)	427608	(3)	0.9696	(2)	998.5	(3)	423.2	(3)	3.30	(3)	3.30	(7)	(3)
	VerhulstM	3	3	3504.5	0.9682	93554.8	754.5	422.7	(4)	416.8	(4)	1034.7	(4)	459606	(4)	0.9674	(4)	1007.3	(4)	461.6	(4)	3.24	(4)	3.24	(6)	(4)
	GompertzM	3	2	3784.2	0.9657	93734.0	755.9	432.3	(5)	426.3	(5)	1044.3	(5)	496238	(5)	0.9649	(5)	1016.6	(5)	506.8	(5)	3.16	(5)	3.16	(5)	(5)
	Verhulst	3	3	6715.8	0.9470	98675.3	795.8	504.0	(7)	498.1	(7)	1116.0	(7)	880764	(7)	0.9457	(7)	1086.6	(7)	935.9	(7)	2.64	(7)	2.64	(3)	(7)
	Gompertz	3	3	9945.4	0.9237	100262.7	808.6	553.1	(8)	547.1	(8)	1165.1	(8)	1304316	(8)	0.9218	(8)	1134.5	(8)	1418.5	(8)	2.26	(8)	2.26	(2)	(8)
	Michaelis	2	2	11318.6	0.9065	93120.8	751.0	567.2	(9)	563.3	(9)	1176.4	(9)	1460830	(9)	0.9049	(9)	1155.8	(9)	1763.0	(9)	2.08	(9)	2.08	(1)	(9)
Bertalanffy	2	2	6144.1	0.9477	94057.8	758.5	490.9	(6)	486.9	(6)	1100.1	(6)	792985	(6)	0.9469	(6)	1080.6	(6)	891.5	(6)	2.70	(6)	2.70	(4)	(6)	
ELIPTICINA (EL)	Weibull	3	3	4831.8	0.9685	153234.9	1235.8	462.8	(3)	456.9	(3)	1074.9	(4)	633673	(3)	0.9677	(1)	1046.4	(3)	369.7	(2)	3.41	(2)	3.41	(8)	(3)
	Hill	3	3	5213.1	0.9661	217856.2	1756.9	472.3	(6)	466.4	(6)	1084.4	(6)	683685	(6)	0.9653	(6)	1055.7	(6)	251.9	(1)	3.68	(1)	3.68	(9)	(6)
	Chapman	3	3	4850.3	0.9682	119439.0	963.2	463.3	(4)	457.4	(4)	1075.3	(5)	636101	(4)	0.9674	(4)	1046.9	(4)	510.4	(5)	3.16	(5)	3.16	(5)	(4)
	VerhulstM	3	2	4817.3	0.9684	119513.5	963.8	462.5	(2)	456.5	(2)	1074.5	(3)	631772	(2)	0.9676	(3)	1046.1	(2)	505.8	(4)	3.16	(4)	3.16	(6)	(2)
	GompertzM	3	2	4807.8	0.9684	119601.2	964.5	462.2	(1)	456.3	(1)	1074.2	(1)	630528	(1)	0.9676	(2)	1045.8	(1)	504.1	(3)	3.17	(3)	3.17	(7)	(1)
	Verhulst	3	3	11254.6	0.9365	129899.1	1047.6	568.5	(8)	562.6	(8)	1180.6	(8)	1476013	(8)	0.9349	(8)	1149.6	(8)	1223.9	(8)	2.40	(8)	2.40	(2)	(8)
	Gompertz	3	3	15306.2	0.9154	132100.2	1065.3	607.0	(9)	601.0	(9)	1219.0	(9)	2007369	(9)	0.9134	(9)	1187.1	(9)	1677.0	(9)	2.11	(9)	2.11	(1)	(9)
	Michaelis	2	2	8772.3	0.9462	118107.1	952.5	535.4	(7)	531.4	(7)	1144.6	(7)	1132192	(7)	0.9453	(7)	1124.4	(7)	1030.2	(7)	2.57	(7)	2.57	(3)	(7)
Bertalanffy	2	2	5001.1	0.9674	119382.2	962.8	465.1	(5)	461.2	(5)	1074.3	(2)	645473	(5)	0.9668	(5)	1055.3	(5)	528.3	(6)	3.14	(6)	3.14	(4)	(5)	
ETOPOSIDEO (VP-16)	Weibull	3	3	2594.6	0.9847	168340.0	1357.6	385.1	(3)	379.2	(3)	997.1	(3)	340279	(3)	0.9843	(3)	970.6	(3)	119.9	(2)	4.12	(2)	4.12	(8)	(3)
	Hill	3	3	2529.8	0.9850	244766.4	1973.9	381.9	(1)	376.0	(1)	994.0	(1)	331772	(1)	0.9846	(1)	967.5	(1)	41.2	(1)	4.52	(1)	4.52	(9)	(1)
	Chapman	3	3	2556.5	0.9848	136093.8	1097.5	383.3	(2)	377.3	(2)	995.3	(2)	335275	(2)	0.9844	(2)	968.8	(2)	172.2	(3)	3.93	(3)	3.93	(7)	(2)
	VerhulstM	3	3	2607.3	0.9845	136227.0	1098.6	385.7	(4)	379.8	(4)	997.7	(4)	341946	(4)	0.9841	(4)	971.2	(4)	177.7	(4)	3.91	(4)	3.91	(6)	(4)
	GompertzM	3	2	2698.7	0.9839	136297.9	1099.2	390.0	(5)	384.1	(5)	1002.0	(5)	353926	(5)	0.9835	(5)	975.4	(5)	187.9	(5)	3.87	(5)	3.87	(5)	(5)
	Verhulst	3	3	7632.0	0.9651	146748.6	1183.5	520.0	(8)	514.0	(8)	1132.0	(8)	1000916	(8)	0.9642	(7)	1102.2	(8)	687.1	(7)	2.91	(7)	2.91	(3)	(8)
	Gompertz	3	3	11231.0	0.9497	149271.6	1203.8	568.3	(9)	562.3	(9)	1180.3	(9)	1472916	(9)	0.9485	(9)	1149.3	(9)	1047.2	(9)	2.54	(9)	2.54	(1)	(9)
	Michaelis	2	2	7078.4	0.9616	133661.4	1077.9	508.6	(7)	504.6	(7)	1117.8	(7)	913577	(7)	0.9609	(8)	1098.1	(7)	699.8	(8)	2.91	(8)	2.91	(2)	(7)
Bertalanffy	2	2	2929.4	0.9827	135672.9	1094.1	398.3	(6)	394.3	(6)	1007.5	(6)	378081	(6)	0.9824	(6)	989.5	(6)	213.7	(6)	3.80	(6)	3.80	(4)	(6)	
CISPLATINO (CDDP)	Weibull	3	3	2414.9	0.9810	127061.5	1024.7	376.1	(3)	370.2	(3)	988.2	(3)	316715	(3)	0.9805	(3)	961.8	(3)	175.6	(2)	3.91	(2)	3.91	(8)	(3)
	Hill	3	3	3037.1	0.9765	167800.8	1353.2	404.8	(5)	398.9	(5)	1016.8	(5)	398314	(5)	0.9759	(5)	989.8	(5)	161.5	(1)	3.96	(1)	3.96	(9)	(5)
	Chapman	3	3	2574.0	0.9797	104408.8	842.0	384.1	(4)	378.2	(4)	996.1	(4)	337575	(4)	0.9792	(4)	969.6	(4)	263.1	(5)	3.65	(5)	3.65	(5)	(4)
	VerhulstM	3	3	2358.6	0.9813	104667.2	844.1	373.2	(1)	367.3	(1)	985.2	(1)	309320	(1)	0.9809	(1)	958.9	(1)	230.3	(4)	3.74	(4)	3.74	(6)	(1)
	GompertzM	3	3	2365.4	0.9813	105016.0	846.9	373.5	(2)	367.6	(2)	985.6	(2)	310219	(2)	0.9808	(2)	959.3	(2)	230.1	(3)	3.75	(3)	3.75	(7)	(2)
	Verhulst	3	3	5202.9	0.9639	110150.9	888.3	472.1	(6)	466.1	(6)	1084.1	(7)	682350	(6)	0.9630	(6)	1055.5	(6)	613.1	(6)	3.00	(6)	3.00	(4)	(6)
	Gompertz	3	3	7744.1	0.9474	111833.5	901.9	521.8	(8)	515.9	(8)	1133.8	(8)	1015614	(8)	0.9461	(8)	1104.0	(8)	954.3	(8)	2.62	(8)	2.62	(2)	(8)
	Michaelis	2	2	11550.7	0.9181	104108.0	839.6	569.8	(9)	565.8	(9)	1179.0	(9)	1490787	(9)	0.9167	(9)	1158.3	(9)	1598.7	(9)	2.17	(9)	2.17	(1)	(9)
Bertalanffy	2	2	5323.8	0.9614	105190.7	848.3	473.0	(7)	469.0	(7)	1082.1	(6)	687116	(7)	0.9608	(7)	1063.0	(7)	663.5	(7)	2.95	(7)	2.95	(3)	(7)	

Otras notaciones: *P*, número de parámetros ajustados; *P-sig*, número de parámetros ajustados significativos; *RSS*, suma residual de cuadrados; *ESS*, suma explicada de cuadrados; *S²*, desviación estándar.

Tabla 9: Respuestas estadísticas de ajuste y ranking de modelos (Rk) obtenidos para cada MSC para los efectos de cinco agentes (EL, VP-16, CDDP, EM y EA) para la línea celular tumoral HepG2. Los resultados obtenidos para cada MSC se presentan juntamente con el ranking individuales (Rk) entre paréntesis. Finalmente, el ranking global ($\sum Rk$) basado en la suma de cada MSC para cada agente es presentado.

COMPUESTO & MODELO		DATOS ESTADISTICOS					CRITERIO DE SELECCION DEL MODELO												CLASIF. GLOBAL ($\sum Rk$)							
		P	P-sig	RSS	R ²	ESS	S ²	AIC		AICc		BIC		FPE		R ² adj		RIC		Cp		MSIC		MA ²		
							Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk	Valor	Rk
EXTRACTO METANOLICO (EM)	Weibull	3	3	2339.6	0.9639	64730.3	522.0	372.2	(3)	366.2	(3)	984.2	(3)	306830	(3)	0.9630	(3)	958.0	(3)	441.2	(3)	3.27	(3)	48	(2)	(3)
	Hill	3	3	2637.9	0.9593	64866.2	523.1	387.2	(5)	381.2	(5)	999.2	(5)	345956	(5)	0.9583	(5)	972.6	(5)	511.3	(5)	3.15	(5)	53	(4)	(5)
	Chapman	3	3	2370.3	0.9634	64708.1	521.8	373.8	(4)	367.9	(4)	985.8	(4)	310865	(4)	0.9625	(4)	959.6	(4)	448.8	(4)	3.26	(4)	49	(3)	(4)
	VerhulstM	3	2	2324.7	0.9641	64698.9	521.8	371.4	(2)	365.4	(2)	983.4	(2)	304883	(2)	0.9632	(2)	957.2	(2)	437.9	(2)	3.28	(2)	1194	(8)	(2)
	GompertzM	3	0	2308.4	0.9644	64694.7	521.7	370.5	(1)	364.6	(1)	982.5	(1)	302739	(1)	0.9635	(1)	956.3	(1)	434.1	(1)	3.29	(1)	1752	(9)	(1)
	Verhulst	3	3	4382.7	0.9342	64724.5	522.0	450.6	(7)	444.7	(7)	1062.7	(7)	574777	(7)	0.9326	(7)	1034.5	(7)	930.5	(7)	2.64	(7)	83	(5)	(7)
	Gompertz	3	3	5846.8	0.9124	64745.6	522.1	486.7	(8)	480.7	(8)	1098.7	(8)	766788	(8)	0.9102	(8)	1069.7	(8)	1280.7	(8)	2.36	(8)	119	(7)	(8)
	Michaelis	2	2	8119.9	0.9108	64697.9	521.8	525.7	(9)	521.8	(9)	1134.9	(9)	1047996	(9)	0.9094	(9)	1114.9	(9)	1824.3	(9)	2.04	(9)	108	(6)	(9)
	Bertalanffy	2	2	3915.5	0.9521	64709.7	521.9	434.5	(6)	430.6	(6)	1043.7	(6)	505353	(6)	0.9514	(6)	1025.2	(6)	816.9	(6)	2.77	(6)	47	(1)	(6)
EXTRACTO ACUOSO (EA)	Weibull	3	3	1069.9	0.9772	89207.3	719.4	274.4	(1)	268.4	(1)	886.4	(1)	140313	(1)	0.9766	(3)	862.5	(1)	66.9	(1)	4.38	(1)	19	(1)	(1)
	Hill	3	3	3259.4	0.9642	89548.6	722.2	413.6	(5)	407.7	(5)	1025.6	(5)	427457	(5)	0.9633	(6)	998.4	(5)	445.2	(5)	3.27	(5)	61	(5)	(5)
	Chapman	3	3	2249.5	0.9750	89156.5	719.0	367.3	(4)	361.3	(4)	979.3	(4)	295018	(4)	0.9744	(4)	953.2	(4)	272.1	(4)	3.63	(4)	42	(4)	(4)
	VerhulstM	3	3	1868.1	0.9792	89148.7	718.9	344.0	(3)	338.1	(3)	956.1	(3)	244997	(3)	0.9787	(2)	930.5	(3)	205.8	(3)	3.82	(3)	36	(2)	(3)
	GompertzM	3	2	1672.0	0.9813	89130.3	718.8	330.2	(2)	324.3	(2)	942.2	(2)	219282	(2)	0.9809	(1)	917.0	(2)	171.8	(2)	3.93	(2)	857	(9)	(2)
	Verhulst	3	3	3808.2	0.9587	89105.9	718.6	433.1	(7)	427.1	(7)	1045.1	(7)	499430	(7)	0.9576	(7)	1017.0	(7)	543.4	(7)	3.10	(7)	68	(6)	(7)
	Gompertz	3	3	5700.2	0.9387	89196.1	719.3	483.5	(8)	477.6	(8)	1095.5	(8)	747561	(8)	0.9372	(8)	1066.6	(8)	871.5	(8)	2.70	(8)	101	(7)	(8)
	Michaelis	2	2	10986.8	0.9101	89146.7	718.9	563.5	(9)	559.6	(9)	1172.7	(9)	1418014	(9)	0.9086	(9)	1152.1	(9)	1789.3	(9)	2.06	(9)	136	(8)	(9)
	Bertalanffy	2	2	3668.2	0.9673	89092.4	718.5	426.4	(6)	422.4	(6)	1035.6	(6)	473438	(6)	0.9668	(5)	1017.2	(6)	517.2	(6)	3.16	(6)	38	(3)	(6)
ELIPTICINA (EL)	Weibull	3	3	10574.4	0.8775	86327.4	696.2	560.7	(3)	554.8	(3)	1172.8	(4)	1386806	(3)	0.8745	(3)	1142.0	(3)	1779.6	(4)	2.05	(4)	7159	(6)	(3)
	Hill	3	3	10583.6	0.8774	86431.6	697.0	560.8	(4)	554.9	(4)	1172.9	(5)	1388018	(4)	0.8744	(4)	1142.1	(4)	1779.0	(2)	2.05	(2)	7159	(7)	(4)
	Chapman	3	3	10490.0	0.8779	85662.1	690.8	559.7	(2)	553.8	(2)	1171.8	(3)	1375737	(2)	0.8749	(2)	1141.0	(2)	1779.1	(3)	2.05	(3)	7102	(5)	(2)
	VerhulstM	3	0	10449.8	0.8784	85666.2	690.9	559.3	(1)	553.3	(1)	1171.3	(2)	1370470	(1)	0.8754	(1)	1140.5	(1)	1771.7	(1)	2.06	(1)	8203	(8)	(1)
	GompertzM	3	1	12709.2	0.8638	85600.7	690.3	583.7	(7)	577.8	(7)	1195.7	(7)	1666775	(7)	0.8604	(7)	1164.4	(6)	2182.3	(7)	1.86	(7)	251810	(9)	(7)
	Verhulst	3	3	21447.7	0.7615	86222.3	695.3	649.1	(8)	643.2	(8)	1261.2	(8)	2812810	(8)	0.7556	(8)	1228.3	(8)	3736.6	(8)	1.34	(8)	426	(3)	(8)
	Gompertz	3	3	26407.8	0.7107	86485.0	697.5	675.1	(9)	669.2	(9)	1287.2	(9)	3463312	(9)	0.7035	(9)	1253.7	(9)	4613.8	(9)	1.14	(9)	516	(4)	(9)
	Michaelis	2	2	10805.9	0.8754	85713.2	691.2	561.4	(5)	557.5	(5)	1170.6	(1)	1394663	(5)	0.8734	(5)	1150.1	(5)	1833.1	(5)	2.04	(5)	124	(1)	(5)
	Bertalanffy	2	2	12708.3	0.8638	85600.7	690.3	581.7	(6)	577.8	(6)	1190.9	(6)	1640203	(6)	0.8616	(6)	1170.0	(7)	2180.1	(6)	1.88	(6)	134	(2)	(6)
ETOPOSIDEO (VP-16)	Weibull	3	3	1089.9	0.9831	64333.4	518.8	276.7	(2)	270.8	(2)	888.7	(2)	142942	(2)	0.9826	(2)	864.8	(2)	143.6	(2)	4.03	(2)	22	(3)	(1)
	Hill	3	3	1186.3	0.9816	64444.1	519.7	287.3	(4)	281.4	(4)	899.3	(4)	155579	(4)	0.9811	(6)	875.1	(4)	166.3	(4)	3.95	(4)	23	(4)	(5)
	Chapman	3	3	1093.6	0.9830	64296.4	518.5	277.1	(3)	271.2	(3)	889.1	(3)	143426	(3)	0.9826	(3)	865.2	(3)	144.6	(3)	4.03	(3)	21	(2)	(4)
	VerhulstM	3	1	1087.5	0.9831	64298.0	518.5	276.4	(1)	270.5	(1)	888.4	(1)	142620	(1)	0.9827	(1)	864.5	(1)	143.2	(1)	4.03	(1)	738	(8)	(3)
	GompertzM	3	1	1262.0	0.9816	64313.2	518.7	295.0	(6)	289.1	(6)	907.0	(6)	165508	(6)	0.9812	(5)	882.7	(5)	185.2	(6)	3.88	(6)	1519	(9)	(2)
	Verhulst	3	3	6701.8	0.8990	64394.0	519.3	503.7	(8)	497.8	(8)	1115.8	(8)	878927	(8)	0.8965	(8)	1086.4	(8)	1494.2	(8)	2.21	(8)	128	(6)	(7)
	Gompertz	3	3	9466.9	0.8561	64392.1	519.3	546.9	(9)	541.0	(9)	1158.9	(9)	1241564	(9)	0.8525	(9)	1128.5	(9)	2159.8	(9)	1.87	(9)	196	(7)	(8)
	Michaelis	2	2	2511.8	0.9688	64299.1	518.5	379.1	(7)	375.1	(7)	988.3	(7)	324185	(7)	0.9683	(7)	970.6	(7)	484.5	(7)	3.21	(7)	26	(5)	(9)
	Bertalanffy	2	2	1256.7	0.9817	64312.9	518.7	292.5	(5)	288.5	(5)	901.7	(5)	162197	(5)	0.9814	(4)	885.4	(6)	181.9	(5)	3.90	(5)	12	(1)	(6)
CISPLATINO (CDDP)	Weibull	3	3	1529.3	0.9851	100884.0	813.6	319.0	(4)	313.1	(4)	931.1	(4)	200559	(4)	0.9848	(4)	906.1	(4)	116.0	(4)	4.14	(4)	31	(2)	(4)
	Hill	3	2	1317.1	0.9870	100931.2	814.0	300.4	(2)	294.4	(2)	912.4	(2)	172738	(2)	0.9866	(3)	887.9	(1)	83.3	(2)	4.29	(2)	675	(6)	(2)
	Chapman	3	3	2714.1	0.9777	100789.9	812.8	390.7	(5)	384.8	(5)	1002.8	(5)	355951	(5)	0.9772	(5)	976.1	(5)	298.4	(5)	3.57	(5)	56	(4)	(5)
	VerhulstM	3	0	1317.4	0.9870	100687.7	812.0	300.3	(3)	294.3	(3)	912.4	(3)	172771	(3)	0.9867	(2)	887.9	(2)	83.8	(3)	4.29	(3)	1648	(7)	(3)
	GompertzM	3	2	4378.6	0.9720	101301.3	816.9	450.5	(7)	444.6	(7)	1062.5	(7)	574240	(7)	0.9713	(7)	1034.4	(6)	551.0	(7)	3.09	(7)	19263	(9)	(7)
	Verhulst	3	2	9812.8	0.9522	104935.4	846.3	551.4	(8)	545.5	(8)	1163.4	(8)	1286924	(8)	0.9510	(8)	1132.9	(8)	1330.4	(8)	2.32	(8)	5026	(8)	(8)
	Gompertz	3	3	13447.6	0.9413	107225.5	864.7	590.8	(9)	584.9	(9)	1202.8	(9)	1763620	(9)	0.9398	(9)	1171.3	(9)	1824.9	(9)	2.03	(9)	245	(5)	(9)
	Michaelis	2	2	1301.2	0.9871	100690.6	812.0	296.8	(1)	292.9	(1)	906.0	(1)	167942	(1)	0.9869	(1)	889.7	(3)	79.3	(1)	4.32	(1)	12	(1)	(1)
	Bertalanffy	2	2	4376.9	0.9720	101300.6	816.9	448.5	(6)	444.5	(6)	1057.7	(6)	564909	(6)	0.9715	(6)	1038.9	(7)	548.7	(6)	3.11	(6)	40	(3)	(6)

Otras notaciones: P , número de parámetros ajustados; P -sig, número de parámetros ajustados significativos; RSS , suma residual de cuadrados; ESS , suma explicada de cuadrados; S^2 , desviación estándar.

Tabla 10: Ranking global ($\sum R_k$) basado en la suma de ranking de cada MSC para las cuatro líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2) para hacer un análisis de los efectos de 3 agentes comerciales (EL, VP-16 y CDDP, como compuestos puros) y 2 extractos naturales (EM y EA como mezclas de compuestos). Estos valores del ranking paramétrico fueron utilizados para clasificar los nueve modelos seleccionados de la bibliografía (Ecs. [1] a [9]) de más al menos eficiente para cada línea celular tumoral (ranking parcial) y finalmente para todas ellas (ranking final global).

LÍNEA CELULAR & COMPUESTO		ECUACIONES-3P SIN ORDENADA DE ORIGEN					ECUACIONES-3P CON ORDENADA DE ORIGEN		ECUACIONES-2P SIN ORDENADA DE ORIGEN	
		<i>Weibüll</i>	<i>Hill</i>	<i>Chapman</i>	<i>VerhulstM</i>	<i>GompertzM</i>	<i>Verhulst</i>	<i>Gompertz</i>	<i>Michaelis</i>	<i>Bertalanffy</i>
NCI-H460	EM	(1)	(4)	(3)	(2)	(6)	(5)	(7)	(9)	(8)
	EA	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(9)	(8)
	EL	(1)	(3)	(5)	(4)	(7)	(8)	(9)	(2)	(6)
	VP-16	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(7)	(8)	(9)	(5)
	CDDP	(1)	(5)	(2)	(4)	(6)	(8)	(9)	(7)	(3)
	<i>Ranking parcial</i>	<i>(1)</i>	<i>(2)</i>	<i>(3)</i>	<i>(4)</i>	<i>(5)</i>	<i>(7)</i>	<i>(9)</i>	<i>(8)</i>	<i>(6)</i>
HeLa	EM	(3)	(1)	(2)	(4)	(5)	(7)	(8)	(9)	(6)
	EA	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(8)	(9)	(7)
	EL	(3)	(1)	(5)	(2)	(6)	(8)	(9)	(7)	(3)
	VP-16	(4)	(1)	(5)	(3)	(7)	(8)	(9)	(2)	(6)
	CDDP	(3)	(1)	(2)	(4)	(6)	(7)	(9)	(8)	(5)
	<i>Ranking parcial</i>	<i>(2)</i>	<i>(1)</i>	<i>(3)</i>	<i>(4)</i>	<i>(6)</i>	<i>(8)</i>	<i>(9)</i>	<i>(7)</i>	<i>(5)</i>
MFC-7	EM	(2)	(5)	(3)	(1)	(4)	(6)	(8)	(9)	(7)
	EA	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(7)	(8)	(9)	(6)
	EL	(2)	(6)	(4)	(3)	(1)	(8)	(9)	(7)	(5)
	VP-16	(3)	(1)	(2)	(4)	(6)	(8)	(9)	(7)	(5)
	CDDP	(3)	(5)	(4)	(1)	(2)	(6)	(8)	(9)	(7)
	<i>Ranking parcial</i>	<i>(1)</i>	<i>(4)</i>	<i>(3)</i>	<i>(2)</i>	<i>(5)</i>	<i>(7)</i>	<i>(9)</i>	<i>(8)</i>	<i>(6)</i>
HepG2	EM	(3)	(5)	(4)	(2)	(1)	(7)	(8)	(9)	(6)
	EA	(1)	(6)	(4)	(3)	(2)	(7)	(8)	(9)	(5)
	EL	(3)	(5)	(2)	(1)	(7)	(8)	(9)	(4)	(6)
	VP-16	(2)	(5)	(3)	(1)	(6)	(8)	(9)	(7)	(4)
	CDDP	(4)	(2)	(5)	(3)	(7)	(8)	(9)	(1)	(6)
	<i>Ranking parcial</i>	<i>(2)</i>	<i>(4)</i>	<i>(3)</i>	<i>(1)</i>	<i>(5)</i>	<i>(8)</i>	<i>(9)</i>	<i>(7)</i>	<i>(6)</i>
<i>Ranking Final Global</i>		<i>(1)</i>	<i>(2)</i>	<i>(4)</i>	<i>(3)</i>	<i>(5)</i>	<i>(7)</i>	<i>(9)</i>	<i>(8)</i>	<i>(6)</i>

4.1.3.b) Criterio intuitivo adicional

Los residuos deberían estar aleatoriamente distribuidos alrededor del cero, para evitar la autocorrelación (Prieto et al., 2015, 2012; Vázquez et al., 2012). Estos residuos no deberían aparecer en grupo y no deberían incrementar o decrecer en función de la variable independiente. Además, un grupo grande de valores en ciertas zonas del gráfico de residuos indica una distribución sesgada sugiriendo una falta de estimación o sobreestimaciones. En términos generales todos los modelos utilizados mostraron una distribución relativamente buena de los residuos. Sólo los modelos de Bertalanffy y Michaelis mostraron autocorrelaciones cuando las respuestas presentaron perfiles sigmoidales o potenciales. Todos los otros modelos mostraron una buena distribución de los residuos y no se observaron autocorrelaciones (datos no mostrados).

Otro aspecto importante es el intervalo de confianza ($\alpha=0.05$) de cada parámetro (**Tabla 5**). Los estimativos paramétricos en muchos casos fueron considerados no significativos (valores subrayados en la **Tabla 5**). Por ejemplo, los modelos VerlhustM y GompertzM mostraron uno o dos parámetros no significativos. Sólo los modelos de Weibüll, Hill y Chapman mostraron todos los parámetros estadísticamente significativos en todos los casos ($\alpha=0.05$).

4.1.4. Selección del modelo y discusión de las principales ventajas e inconvenientes

El modelo no lineal de Michaelis-Menten y Bertalanffy, es una solución de dos parámetros que sólo describe un caso simétrico hiperbólico muy particular capaz de ajustar sólo a perfiles de primer orden, pero falla para lograr soluciones más complejas con órdenes de diferentes niveles como el potencial y el sigmoidal, que por otra parte, son muy comunes en las respuestas de ELCT.

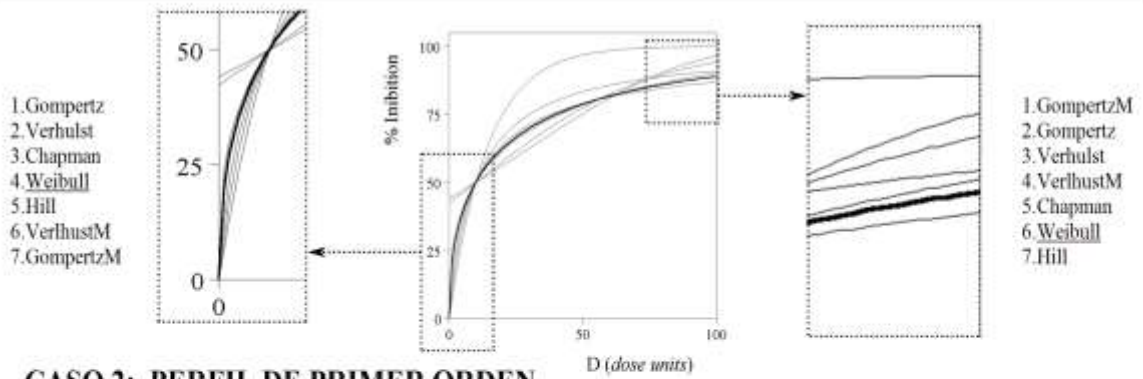
Las otras alternativas evaluadas, el grupo sigmoidal sin ordenada en el origen (Weibüll, Hill, Chapman, VerlhustM y GompertzM) y el grupo sigmoidal con ordenada en el origen (Verhulst y Gompertz) son modelos que cubren el número máximo de posibles respuestas en un marco 2D (desde perfiles potenciales a sigmoidales, incluyendo los de primer orden). Sin embargo, tal y como ya fue subrayado por otros autores (Prieto and Murado, 2014) y destacado por los resultados de selección de modelos (**Tabla 10**), las ecuaciones con ordenada en el origen (Verhulst y Gompertz) causan algunos problemas y, en general, es preferible considerar la respuesta nula como cero. Los problemas principales de las ecuaciones con ordenada en el origen surgen cuando los modelos describen los estados iniciales y la parte final de la reacción. Esta desviación desaparece cuando se realiza el ajuste con

aproximaciones matemáticas sin ordenada en el origen. En general, la función sigmoideal sin ordenada en el origen es la mejor solución para ajustar individualmente los perfiles correspondientes a una serie de aumento de niveles de un agente. No obstante, los modelos sin ordenada en el origen de VerlhustM y GompertzM muestran otros problemas tales como: IC paramétricos muy elevados (muchos de ellos no significativos) y altos valores de ranking para los MSC (ver **Tabla 6** y **Tabla 10**).

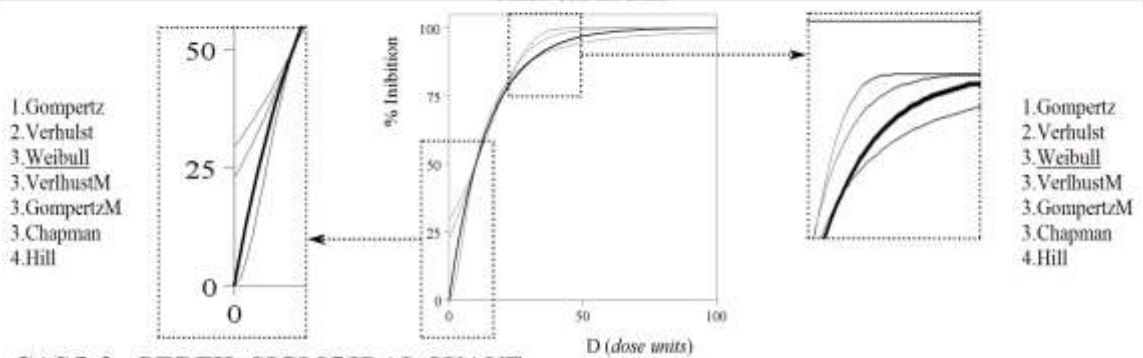
Los modelos del grupo sigmoideal sin ordenada en el origen (Weibüll, Hill, Chapman, VerlhustM y GompertzM) y con ordenada en el origen (Verhulst y Gompertz), son aquellos que cubren el número máximo de posibles respuestas en un marco 2D (desde perfiles potenciales a sigmoideales, incluyendo los de primer orden). No obstante, muestran algunas diferencias relevantes que pueden terminar siendo características clave que pueden marcar la diferencia cuando se analizan ELCT. Así, para poder concebir e ilustrar adecuadamente las diferentes capacidades de aplicar uno u otro grupo de funciones sigmoideales, la **Figura 2** muestra la aplicación de esos siete modelos en cuatro casos específicos típicos en el análisis de DR: Caso 1, un perfil potencial; Caso 2, un perfil de primer orden; Caso 3, un perfil ligeramente sigmoideal; y Caso 4, un perfil fuertemente sigmoideal. Los modelos son simulados en las mismas condiciones paramétricas para cada caso para poder comparar las diferencias en los perfiles. Así, el valor asintótico K se establece para todos los casos a un valor de la inhibición del 100%. El LD_{50} es igual para todos los modelos y se localiza en zonas específicas en cada caso para magnificar al máximo las diferencias de perfil (para los Casos 1&2 y 3&4, el valor LD_{50} es el valor hipotético del 10% y 50% de las unidades de dosis totales, respectivamente). Mientras que el parámetro de forma a es ajustado por medio de los mínimos cuadrados para minimizar las diferencias entre cada modelo.

Las principales diferencias sólo se presentan en los estadios iniciales y finales. Esas diferencias son en muchos casos difíciles de visualizar, y por ello, para ilustrar las diferencias, se incluye una sección gráfica aumentada de los estadios inicial y final de cada caso. Además, cada línea es identificada en orden decreciente en cada una de las secciones gráficas aumentadas. Como ya fue resaltado por otros autores (Prieto and Murado, 2014), demostrado por los resultados del MSC (**Tabla 10**) e ilustrado visualmente en la **Figura 2**, las ecuaciones con intercepción (Verhulst y Gompertz) causan algunos problemas, y en general, es preferible considerar la respuesta nula como cero. Los mayores problemas aparecen cuando esos modelos (con ordenada en el origen) describen los estadios iniciales y la parte final de la reacción.

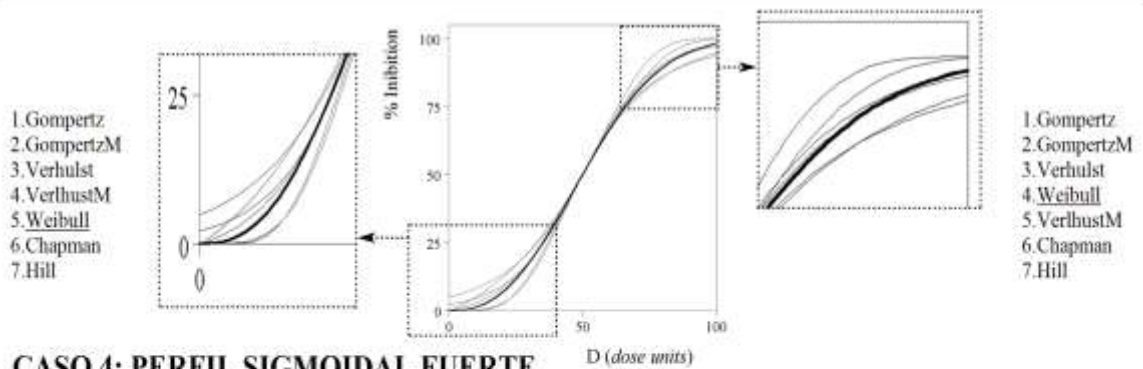
CASO 1: PERFIL POTENCIAL



CASO 2: PERFIL DE PRIMER ORDEN



CASO 3: PERFIL SIGMOIDAL SUAVE



CASO 4: PERFIL SIGMOIDAL FUERTE

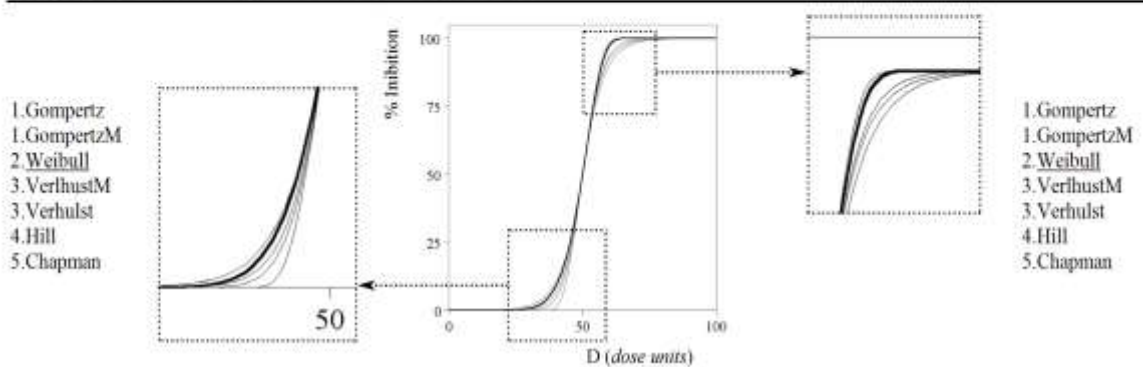


Figura 2: Diferencias entre los 7 mejores modelos para ajustar las DR de los ELCT. Son presentados cuatro casos diferentes: Caso 1: un perfil potencial; Caso 2, un perfil de primer orden; Caso 3, un perfil ligeramente sigmoidal, y Caso 4, un perfil fuertemente sigmoidal.

Si estos modelos con ordenada en el origen se utilizaran en un análisis real de DR de cualquier ELCT causaría que la distribución residual y las correlaciones entre los datos observados y predichos mostrarán desviaciones en función de la variable dependiente, lo que terminaría incrementando el intervalo de confianza de los parámetros, reduciendo la correlación de los coeficientes (como la R^2) y dificultando la producción de resultados robustos. Tales desviaciones desaparecen cuando el ajuste se realiza con modelos sin ordenada en el origen. En general, la función sigmoideal sin ordenada en el origen es la mejor solución para ajustar individualmente los perfiles correspondientes a series incrementales de un agente.

Por consiguiente, se prueba y se justifica que los modelos sigmoideales de Weibüll, Hill y Chapman sin ordenada en el origen son los más eficientes con resultados de ranking globales mejores que otras alternativas. Aunque las diferencias son estrechas, el modelo de Weibüll (Ec. [5]) muestra mejores resultados y por ello, sin duda alguna, se puede considerar la solución más apropiada para los ELCT.

A modo de ejemplo de la bondad de ajuste y la fiabilidad de la aplicación del modelo de Weibüll (Ec. [5]) en los ELCT, la **Figura 3** muestra los resultados experimentales de la línea tumoral NCI-H460 de todos los agentes por el ensayo de la SRB (EL, VP-16, CDDP, EM y EA). Los resultados de DR experimentales son los puntos (O, 125 puntos de datos por agente utilizado). Las líneas (—) representan los ajustes conseguidos con el modelo matemático de Weibüll (Ec. [5]). Los valores del ajuste paramétrico y sus datos estadísticos correspondientes para la línea NCI-H460 están presentes en la **Tabla 12**. Se puede observar que la distribución residual no muestra desviaciones en función de la variable dependiente ni agrupaciones de residuos en zonas específicas. Adicionalmente, las correlaciones entre los datos observados y predichos muestran una tendencia lineal con ángulo de inclinación intermedio de 45° entre los datos obtenidos experimentalmente y aquellos predichos por el modelo.

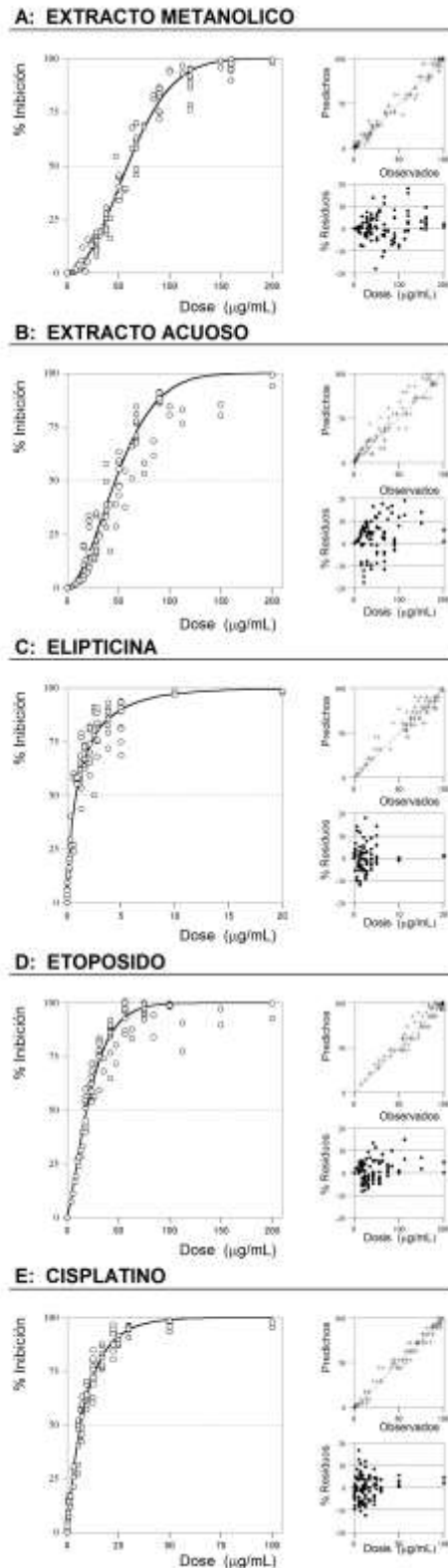


Figura 3: Dosis-respuestas (puntos: ○) experimentales de la línea celular tumoral de NCI-H460 del ensayo colorimétrico de la SRB para hacer un barrido de los efectos de 3 agentes comerciales (compuestos puros de EL, VP-16 y CDDP) y 2 extractos naturales (mezcla de compuestos procedentes del EM y EA). Las líneas (—) representan los ajustes conseguidos con el modelo matemático seleccionado. Los valores del ajuste paramétrico y sus datos estadísticos correspondientes para la línea NCI-H460 están presentes en la **Tabla 12**.

4.1.5. Descripción extensiva de las capacidades del modelo matemático seleccionado para la sección gráfica aumentada de la dosis-respuesta de la inhibición celular de líneas celulares tumorales

El modelo de Weibüll o la función de potencia descritas en detalle por Weibüll & Sweden (1951) no fue la mejor solución por casualidad. De hecho, el modelo fue desarrollado para analizar el fallo mecánico de instrumentos complejos. Sin embargo, si consideramos la distribución de los tiempos de fallo de una máquina como órganos corporales o incluso como el daño a regiones específicas de las células que pueden conducir a la muerte, y suponemos la muerte como el resultado cuando el primer fallo mecánico ocurre, tenemos la analogía con la mortalidad o la inhibición en ELCT. Este modelo explicativo transcribe el siguiente escenario de tasa de mortalidad en función de la dosis (D):

$$r(D) = bD^{(c-1)} \quad [23]$$

donde r es la tasa de mortalidad del proceso y b y c son valores paramétricos.

Sabiendo que la tasa de cambio de una población R en función de D (dR/dD) se puede definir inicialmente con la siguiente expresión:

$$dR/dD = -rR \quad [24]$$

Entonces, insertando la Ec. [23] en la [24] e integrando la expresión resultante, se puede obtener la base del modelo de Weibüll. Multiplicando la función resultante por un parámetro asintótico K y reorganizado (Murado and Vazquez, 2007) para mostrar explícitamente el parámetro LD_{50} , se puede encontrar (como fue descrito en la Ec. [5]) el siguiente modelo para describir la inhibición o mortalidad de una población celular;

$$R(D) = K \left\{ 1 - \exp \left[-\ln 2 \left(D/LD_{50} \right)^a \right] \right\} \quad [5]$$

Además, el modelo de Weibüll es una ecuación versátil y flexible con un parámetro intuitivo para definir los posibles tipos de perfiles que se pueden ajustar: 1) cuando $a < 1$ describe cinéticas de orden fraccionario; 2) cuando $a = 1$ describe cinéticas de primer orden; y 3) cuando $a > 1$ produce una variedad de perfiles sigmoidales.

Aunque el uso de todo ello no es frecuente, a partir de esta ecuación base, otros valores esenciales paramétricos pueden ser obtenidos para caracterizar el proceso de inhibición de las

células tumorales de ELCT. El análisis se puede obtener directamente de los parámetros de la Ec. [5] o con algunas modificaciones algebraicas de la Ec. [5], reparametrizandola para hacer tales valores explícitos en una ecuación independiente y así poder obtener los IC de estos parámetros reparametrizados.

A continuación, se detallan los valores más útiles para los análisis de citotoxicidad de las respuestas de inhibición en ELCT:

1) La velocidad media del proceso (V_m) que traduce el % de inhibición conseguido por incremento de cada unidad de dosis, y se puede computar directa o explícitamente de la siguiente manera:

$$v_m = \frac{Ka \ln 2}{2LD_{50}}; \text{ entonces } R(D) = K \exp \left[-(\ln 2)^{1-a} \left(\frac{2v_m D}{Ka} \right)^a \right] \quad [25]$$

2) El parámetro de fase de latencia (λ , unidades de dosis), que aporta el valor de la dosis en la cual la tasa del proceso se puede considerar despreciable y corresponde a la intersección obtenida al eje de la variable dependiente (unidades de dosis) con una extrapolación linear tangente a la curva en el punto de inflexión.

$$\lambda = \frac{LD_{50}}{\sqrt[a]{\ln 2}} \left[G^{1/a} + \frac{e^{-G} - 1}{aG^G e^{-G}} \right]; \text{ donde: } G = \frac{a-1}{a}; \quad [26]$$

$$\text{entonces } R(D) = K \exp \left[- \left(\left(G^{1/a} + \frac{e^{-G} - 1}{aG^G e^{-G}} \right) \frac{t}{\lambda} \right)^a \right]$$

3) Cualquier dosis correspondiente a cualquier respuesta R representando cualquier fracción menor de K (o LD_n) se puede obtener con la siguiente expresión:

$$LD_n = LD_{50} \left\{ \ln \left[1 - (R_n/K) \right] / -\ln 2 \right\}^{1/a} \quad [27]$$

Proporcionando los n valores de Ec. [27] entre 0 y 100% cualquier nivel de dosis a una respuesta dada puede ser calculado (LD_{10} , LD_{25} , LD_{75} , LD_{95} , etc.). Como en los valores paramétricos previos, estos pueden ser reparametrizados en ecuaciones explícitas para calcular los IC. En general, para el análisis de LD_n correspondiente a la respuesta equivalente al n% del máximo ($nK/100$), la ecuación reparametrizada es:

$$R(D) = K \left\{ 1 - \exp \left[\ln(1 - 0.01n) \left(\frac{D}{LD_n} \right)^a \right] \right\} \quad [28]$$

4) Otro valor particular de interés y estrechamente relacionado con la forma funcional anterior, es la dosis que produce el 100% de la inhibición de las células tumorales o, en otras palabras, la dosis en la cual la respuesta llega al valor paramétrico asintótico de K (LD_K). Este valor puede ser obtenido reestructurando la Ec. [28] con un artefacto matemático (considerando el 100% de la respuesta, como el ~99.995 %) tal que:

$$R(D) = K \left\{ 1 - \exp \left[-10 \left(\frac{D}{LD_K} \right)^a \right] \right\} \quad [29]$$

Así, la caracterización global de la inhibición del proceso de las células de ELCT puede ser descrita rigurosamente con la información combinatoria proporcionada por los criterios de LD_{50} , V_m , λ , LD_K o cualquier valor deseado LD_n . Aunque las ecuaciones explícitas Ecs. [25], [26], [28] y [29] tienen el mismo número total de parámetros que Ec. [5], la manipulación algebraica es menos operativa y menos práctica que la ecuación estándar Ec. [5] con el parámetro D_{50} (Murado and Prieto, 2013b).

4.1.6. Problemas de cada uno de los parámetros posibles del análisis matemático que podrían ser utilizados como criterio único para analizar los resultados dosis-respuesta de ELCT

Cuando se describe la citotoxicidad de nuevos agentes, gran parte del esfuerzo de investigación se centra sólo en la producción de LD_{50} , pero este valor paramétrico por sí sólo es menos fiable de lo que generalmente se anticipa. De hecho, por sí sólo cualquiera de los valores de los criterios señalados anteriormente (LD_{50} , V_m , λ , LD_K o cualquier valor deseado LD_n) no puede producir valores de confianza en términos comparativos con otros agentes incluso si los resultados son muy reproducibles.

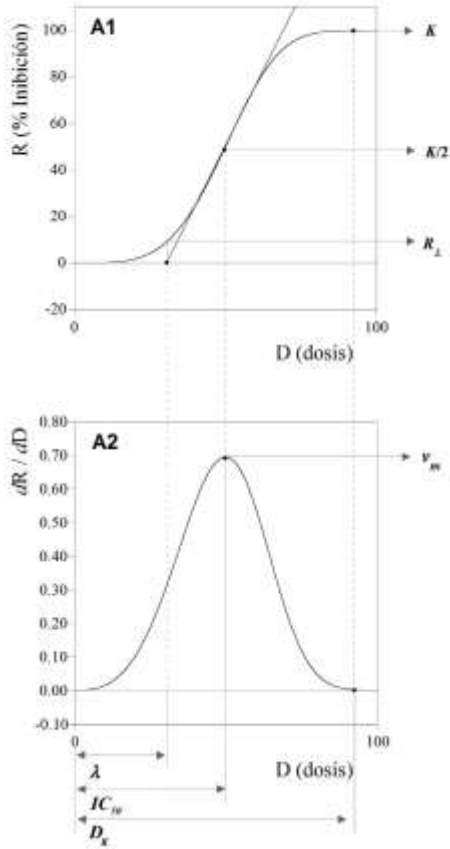
Para ilustrar este hecho, la **Figura 4** muestra la representación de los problemas asociados con la aplicación de los posibles valores paramétricos para describir la inhibición DR de las células tumorales. En la primera parte de la **Figura 4** (parte A), se presenta una identificación gráfica de los posibles parámetros característicos para el análisis de los ELCT (incluyendo LD_{50} , V_m , λ y LD_K). En la segunda parte de la **Figura 4** (parte B) se ilustra la falta de fiabilidad de todos los valores de los criterios paramétricos por medio de la simulación con las Ec. [25], [26], [28] y [29]. Simulando y comparando la actividad de inhibición de 5 agentes

hipotéticos (X_1 a X_5) para cada uno de los parámetros característicos, cuatro escenarios diferentes (caso B1 a B4) ilustran los problemas asociados y son representados en detalle de la siguiente manera:

- Para el criterio paramétrico LD_{50} (Caso B1): la ilustración gráfica muestra como 5 respuestas de perfiles bien diferenciados de agentes (X_1 a X_5) presentarían valores de LD_{50} idénticos, pero diferentes valores paramétricos V_m , λ y LD_K .
- Para el criterio paramétrico V_m (Caso B2): la ilustración presenta 5 perfiles de respuestas bien diferenciadas (X_1 a X_5) que llevarían a valores idénticos de V_m , pero diferentes valores paramétricos LD_{50} , λ y LD_K .
- Para el criterio paramétrico λ (Caso B3): la ilustración presenta 5 perfiles de respuestas diferenciados (X_1 a X_5) que llevarían a valores idénticos de λ , pero diferentes valores paramétricos LD_{50} , V_m y LD_K .
- Para LD_K o cualquier criterio paramétrico deseado LD_n (Caso B4): la ilustración presenta 5 perfiles de respuestas diferenciadas (X_1 a X_5) que terminarían en valores idénticos de LD_K , pero diferentes valores paramétricos LD_{50} , V_m y λ . Esta tendencia puede ser aplicada a cualquier valor de LD_n que produce un porcentaje específico de respuesta de mortalidad.

Estos problemas han sido estudiados en profundidad en otros campos, notablemente en el campo de estudio de la biología teórica, en el cual las estimaciones son propuestas en base al análisis combinatorio de muchos valores paramétricos para propósitos comparativos. Probablemente por ello, no se han encontrado soluciones fiables, como las ilustradas en la **Figura 4** (parte B), cuando se tiene en cuenta la respuesta de un sólo valor paramétrico. Para añadir más complejidad a la caracterización analítica de las respuestas, diferentes hipótesis podrían proporcionar escenarios más complejos con estimativos similares. La imprecisión de los estimativos generalmente es mayor que las diferencias entre los enfoques utilizados. Además, todos los resultados paramétricos son altamente dependientes de la calidad del conjunto de datos. Así, está claro que cualquiera de los criterios utilizados por si solos como valor de respuesta global única de la acción de un agente son dependientes de la forma de la curva y podría producir fácilmente conclusiones comparativas no dignas de confianza. Por lo tanto, todo el análisis paramétrico es necesario para ser presentado en conjunto para poder comparar la actividad inhibitoria de los agentes rigurosamente, y como más criterios se utilicen menos probabilidades va a haber de ser fallado por los efectos representados.

A: ANALISIS PARAMETRICO



B: ILUSTRACIÓN DE LOS PROBLEMAS CON LOS PARAMETROS

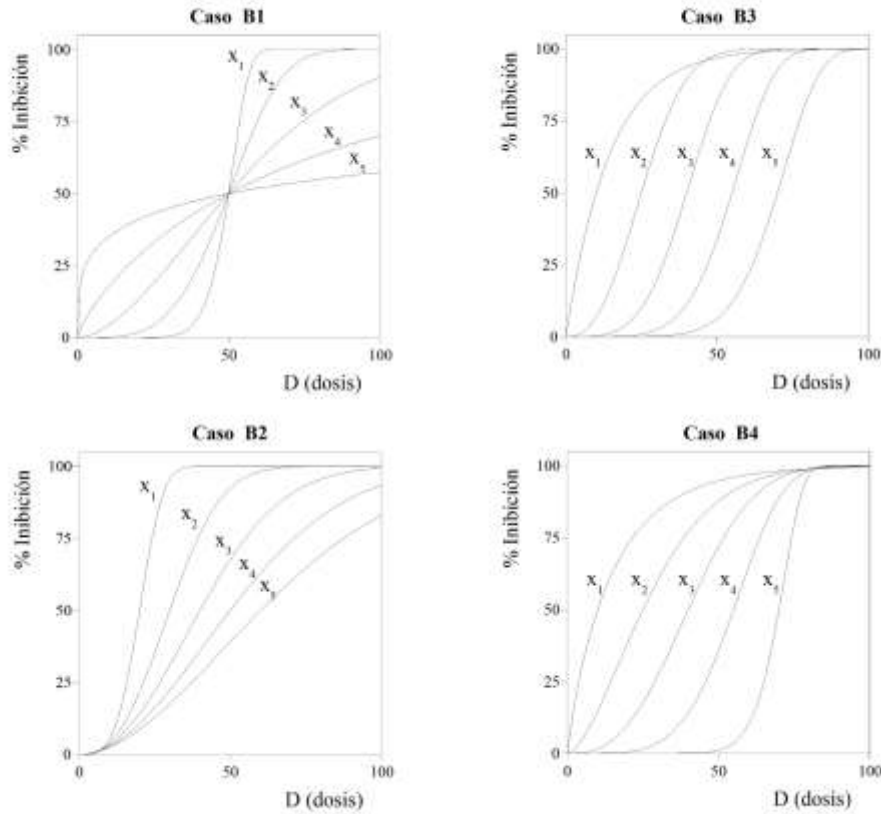


Figura 4: *Parte A:* Identificación de los posibles parámetros para el análisis de las respuestas de los ELCT por representación gráfica convencional. En la parte superior, el porcentaje de inhibición de las células tumorales se representa frente a la DR de un agente simulado. En la parte inferior, se presenta la tasa de inhibición (derivada numérica). *Parte B:* Ilustración de los problemas asociados con la aplicación de los posibles valores paramétricos para describir la inhibición DR de las células tumorales: Caso B1, todos los perfiles presentan los mismos valores de LD_{50} ; Caso B2, todos los perfiles presentan los mismos valores de V_m ; Caso B3, todos los perfiles presentan los mismos valores de λ ; y Caso B4, todos los perfiles presentan los mismos valores de LD_K .

4.1.7. Formulación metodológica para el diseño experimental óptimo del estudio dosis-respuesta de agentes individuales con la finalidad de controlar los intervalos de confianza de los parámetros del modelo de Weibull

Pese a numerosas objeciones, se dice a menudo que estos formatos simples de cálculo y cuantificación de respuestas en ELCT, al igual que en otras áreas de estudio, se conservan por falta de alternativas a su supuesto interés práctico. En la práctica, sin embargo, significa renunciar al modelo DR y utilizar un criterio único que, con el error habitual de los bioensayos en este campo, además de inconcluyente, como se ha demostrado en el apartado anterior, es poco sensible, demasiado dependiente de las condiciones de ejecución y carente de criterios que informen acerca de su precisión real.

Sin embargo una vez aceptados los conceptos DR, es posible diseñar ensayos DR con un control muy estricto de los efectos del error, y que cuando se dispone de un modelo explícito adecuado como el proporcionado por la Ec. [5] (todos sus parámetros estadísticamente significativos, alta correlación entre observaciones y predicciones, residuos no sesgados), es posible obtener un criterio racional y estadísticamente consistente para predecir la respuesta y su variabilidad.

La solución de cualquier función mediante un sistema sobre determinado debe satisfacer dos necesidades básicas: oponer grados de libertad al error y cubrir el dominio de tal modo que las regiones importantes para definir los parámetros del modelo estén bien representadas. Si además se desea minimizar el trabajo experimental, debe prestarse atención a la distribución de las observaciones (el diseño), ya que ningún espacio es homogéneo en cuanto a la información que proporciona para calcular los parámetros de una función dada. Así, en el caso de una función sigmoideal como la Ec. [5], las respuestas altas son esenciales para definir el parámetro de escala (K), las intermedias para definir los de posición (LD_{50}) y forma (a), mientras que las bajas –en una función sin ordenada en el origen– aportan muy poca información.

Para un error (σ) y un número de observaciones totales ($N=n \times r$, donde N es el número de observaciones totales, n el número de observaciones genuinas y r el número de réplicas) dados se puede realizar un tabulado de un diseño Q para predecir *a priori* los IC de los parámetros.

Así se simularon 2 000 repeticiones realizadas con la Ec. [5] variando el error y el número de observaciones (genuinas y réplicas). Estos ensayos de simulación mostraron que el error afecta a las estimaciones paramétricas en el orden $K < LD_{50} < a$, y que tiende a generar

sobreestimación. Además, cuando las tres estimaciones son significativas ($\alpha=0.05$) en el 100% de las repeticiones, sus IC dependen del número y el error de las observaciones según pautas muy regulares. Para una desviación típica de una muestra (σ) constante, los IC decrecen hipérbolicamente al aumentar las observaciones, y para un número de observaciones constante aumentan linealmente con σ (el aumento se hace hipérbólico, pero pierde regularidad, si la proporción de estimaciones significativas desciende por debajo del 100%).

Las réplicas reducen los efectos del error experimental, pero no contribuyen a mejorar la representación de las regiones clave para las estimaciones paramétricas. Así, al menos hasta observaciones de 8 a 12, a igualdad de grados de libertad es más eficiente aumentar el número de dosis n , que el de réplicas r (un diseño 9×2 , por ejemplo, produce IC menores que un diseño 6×3 , y un diseño 22×2 es también preferible a 12×4 , pese a su menor número de grados de libertad). Con $n > 15$ la diferencia pierde importancia e incluso tiende a invertirse, ya que, una vez que se consigue una suficiente representación de las regiones clave, la reducción de los efectos del error experimental gana importancia.

Cuando se sabe el error experimental típico de un sistema, esta regularidad hace posible una tabulación que oriente el trabajo experimental para controlar los IC. Los IC de las estimaciones paramétricas dependen del error de las observaciones, el perfil funcional (los valores paramétricos) y el diseño experimental. Puesto que error y perfil son datos *a posteriori*, tabular las regularidades de este sistema parece una tarea tediosa y poco útil. Sin embargo, los ensayos DR van usualmente precedidos por pruebas preliminares que proporcionan información acerca del error experimental (como desviación típica de una muestra, σ), así como una primera aproximación a los valores paramétricos del modelo que describirá la respuesta.

Ahora bien, conociendo esta información y habiendo probado que el modelo Weibull de la Ec. [5] es el idóneo para resolver eficientemente la descripción de los efectos citotóxicos de agentes en ELCT se puede diseñar una tabla que permite al investigador guiarse en el diseño experimental del marco de trabajo aquí propuesto. Así suponiendo distintos valores paramétricos de a de la Ec. [5] (observar variaciones en **Figura 5**), se puede determinar los IC de los parámetros K , LD_{50} y a en función del número de desviación típica de la muestra experimental (σ), número de dosis n a utilizar y réplicas r a aplicar. Esta tabla presentada en la **Tabla 11**, denominada tabla Q, puede utilizarse para formular un ensayo definitivo sensiblemente más preciso que el derivado de consideraciones intuitivas.

Así, las pruebas preliminares que exige cualquier análisis DR permiten aproximarse al diseño más óptimo, haciendo del modelo de la Ec. [5] una herramienta robusta frente al error experimental. Por otra parte, debe señalarse que las condiciones de simulación aquí utilizadas fueron especialmente duras, ya que numerosos indicios experimentales como los mostrados en la **Figura 3**, sugieren que el error real en el contexto DR es heteroscedástico, y más alto en las respuestas medias que en las extremas (inicial y final). Ello produce desviaciones más suaves que las debidas al error homoscedástico aplicado, con independencia de que en el cálculo se utilicen mínimos cuadrados ordinarios o ponderados.

A la vista de los resultados obtenidos, se toma $a = 3$ de la **Figura 5** como valor de perfil promedio de las respuestas típicas en los ensayos de SRB, usando como guía los perfiles presentados en la **Figura 3**, estableciendo una σ para el peor de los casos (0.2), entonces siguiendo las directrices de la tabla Q (**Tabla 11**), se selecciona un diseño experimental con un número total de valores genuinos de 30 ($n=30$) con cuatro réplicas por coordenada ($r = 4$). Asegurándose así, que el IC de todos los parámetros (K , LD_{50} y a) de la Ec. [5] será inferior al 15 % del valor numérico del parámetro.

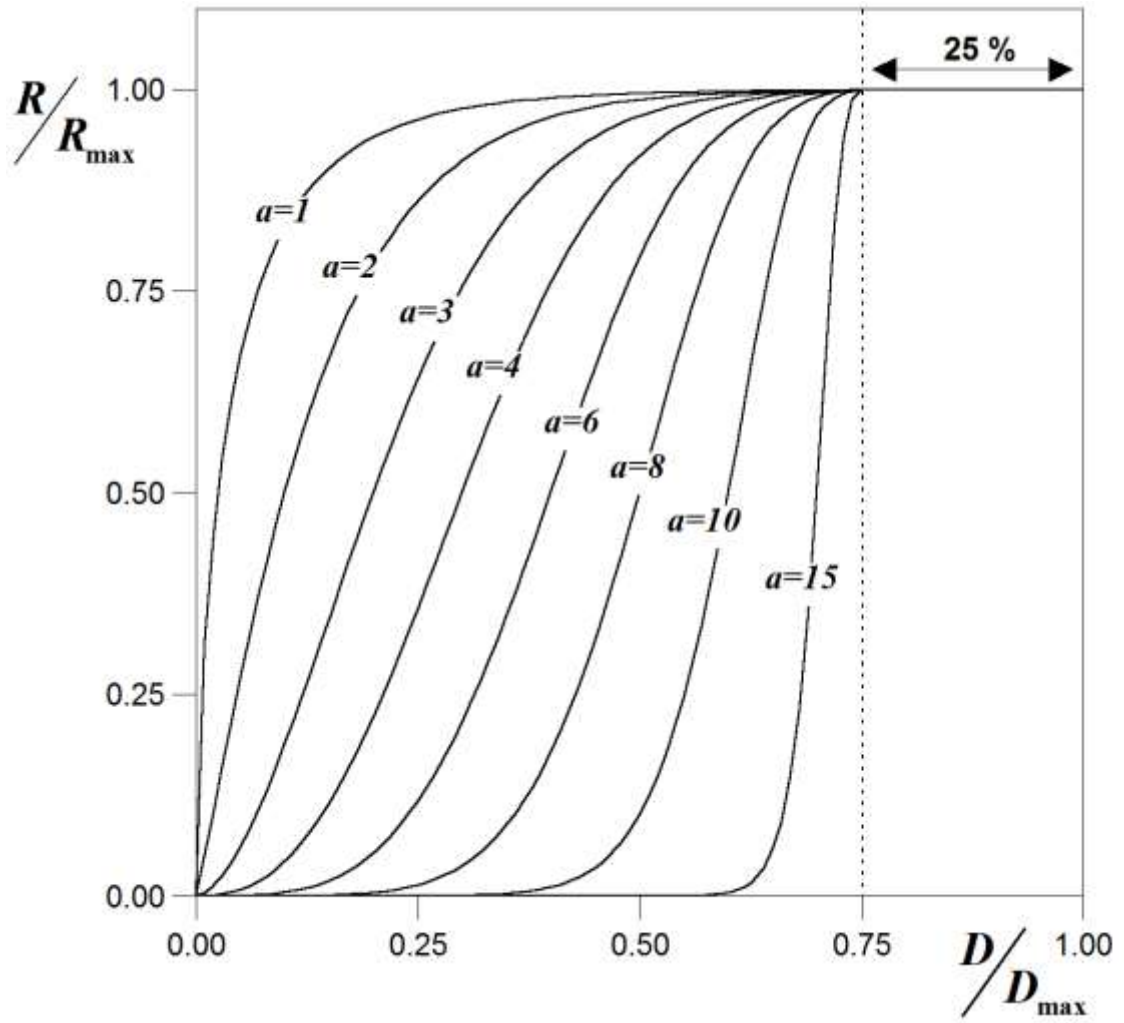


Figura 5: Posibles distintos perfiles en función del valor paramétrico a del modelo de la Ec. [5] para cubrir el máximo grado de posibles en perfiles en una respuesta de una sola variable.

Tabla 11: Tabla Q, herramienta que nos sirve para seleccionar un diseño óptimo experimental a partir del conocimiento de los IC paramétricos de K , LD_{50} y a en función de los distintos perfiles de a de la Ec. [5] (observar variaciones en **Figura 5**), del número de desviación típica de la muestra experimental (σ), número de dosis n a utilizar y réplicas r a aplicar.

		Número de réplicas por ensayo																																				
		r = 1							r = 2							r = 3							r = 4															
σ	n	8	10	12	14	16	20	30	8	10	12	14	16	20	30	8	10	12	14	16	20	30	8	10	12	14	16	20	30	8	10	12	14	16	20	30		
0.050	I	27.9	22.4	19.4	17.4	15.9	14.8	10.9	19.5	16.1	13.8	12.2	11.3	10.5	7.7	15.9	13.0	11.1	10.1	9.1	8.6	6.3	13.8	11.2	9.8	8.7	7.9	7.4	5.4	13.8	11.2	9.8	8.7	7.9	7.4	5.4		
	2	13.5	11.2	9.7	8.7	7.9	7.5	5.5	9.6	8.1	6.8	6.2	5.7	5.3	3.9	7.9	6.5	5.6	5.0	4.6	4.3	3.2	6.9	5.6	4.9	4.3	4.0	3.7	2.7	6.9	5.6	4.9	4.3	4.0	3.7	2.7		
	3	9.2	7.5	6.6	5.8	5.4	5.0	3.6	6.6	5.2	4.6	4.1	3.7	3.5	2.6	5.3	4.3	3.8	3.4	3.1	2.8	2.1	4.5	3.8	3.3	2.9	2.7	2.4	1.8	4.5	3.8	3.3	2.9	2.7	2.4	1.8		
	4	6.9	5.8	4.9	4.4	4.0	3.7	2.7	4.8	4.0	3.5	3.1	2.9	2.6	1.9	4.0	3.2	2.8	2.5	2.3	2.1	1.6	3.5	2.8	2.4	2.2	2.0	1.9	1.4	3.5	2.8	2.4	2.2	2.0	1.9	1.4		
	6	4.6	3.8	3.2	3.0	2.7	2.5	1.8	3.3	2.6	2.3	2.1	1.9	1.7	1.3	2.6	2.1	1.9	1.7	1.5	1.4	1.1	2.3	1.8	1.6	1.5	1.3	1.2	0.9	2.3	1.8	1.6	1.5	1.3	1.2	0.9		
	8	3.4	2.8	2.5	2.2	2.0	1.9	1.4	2.4	2.0	1.7	1.6	1.4	1.3	1.0	2.0	1.6	1.4	1.3	1.2	1.1	0.8	1.7	1.4	1.2	1.1	1.0	0.9	0.7	1.7	1.4	1.2	1.1	1.0	0.9	0.7		
	10	2.8	2.2	2.0	1.8	1.6	1.5	1.1	1.9	1.6	1.4	1.2	1.1	1.1	0.8	1.6	1.3	1.1	1.0	0.9	0.9	0.6	1.4	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	1.4	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6		
	15	1.9	1.5	1.3	1.2	1.1	1.0	0.7	1.3	1.1	0.9	0.8	0.8	0.7	0.5	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	0.6	0.4	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.5	0.4	0.9	0.8	0.7	0.6	0.5	0.5	0.4		
	CI (K)		9.0	6.7	6.3	5.3	5.1	4.6	3.2	6.3	4.7	4.4	3.7	3.6	3.2	2.3	5.2	3.8	3.6	3.1	3.0	2.6	1.9	4.5	3.3	3.1	2.6	2.6	2.3	1.6	4.5	3.3	3.1	2.6	2.6	2.3	1.6	
	CI (a)		31.2	26.3	22.6	20.6	18.6	17.6	13.2	22.0	18.7	15.9	14.6	13.2	12.4	9.4	17.9	15.1	13.0	12.0	10.8	10.2	7.6	15.6	13.2	11.3	10.3	9.3	8.8	6.6	15.6	13.2	11.3	10.3	9.3	8.8	6.6	
0.075	I		33.4	29.3	26.1	24.1	22.1	16.4	30.0	23.7	20.8	18.8	17.2	15.8	11.6	23.9	19.5	17.0	15.3	13.8	12.7	9.5	20.4	16.8	14.7	13.1	12.0	11.1	8.2	20.4	16.8	14.7	13.1	12.0	11.1	8.2		
	2		21.3	16.7	15.0	13.3	12.1	11.2	8.3	14.9	11.9	10.4	9.3	8.5	7.8	5.8	11.8	9.7	8.4	7.6	7.0	6.4	4.7	10.4	8.4	7.3	6.6	6.1	5.5	4.1	10.4	8.4	7.3	6.6	6.1	5.5	4.1	
	3		14.0	11.4	9.9	8.7	8.1	7.5	5.4	9.7	8.0	7.0	6.2	5.6	5.2	3.9	7.9	6.6	5.6	5.0	4.7	4.3	3.2	6.9	5.5	4.9	4.3	4.0	3.7	2.7	6.9	5.5	4.9	4.3	4.0	3.7	2.7	
	4		10.6	8.3	7.5	6.6	6.0	5.5	4.1	7.4	6.1	5.2	4.6	4.3	4.0	2.9	6.0	4.9	4.2	3.8	3.4	3.2	2.4	5.3	4.2	3.6	3.2	2.9	2.8	2.1	5.3	4.2	3.6	3.2	2.9	2.8	2.1	
	6		7.1	5.7	4.9	4.4	4.0	3.7	2.8	4.8	4.0	3.5	3.1	2.8	2.6	1.9	4.0	3.3	2.8	2.5	2.3	2.1	1.6	3.5	2.8	2.4	2.2	2.0	1.8	1.4	3.5	2.8	2.4	2.2	2.0	1.8	1.4	
	8		5.3	4.2	3.7	3.3	3.0	2.8	2.0	3.7	3.0	2.6	2.3	2.1	2.0	1.5	3.0	2.4	2.1	1.9	1.7	1.6	1.2	2.6	2.1	1.8	1.6	1.5	1.4	1.0	2.6	2.1	1.8	1.6	1.5	1.4	1.0	
	10		4.3	3.4	2.9	2.7	2.4	2.2	1.6	2.9	2.4	2.1	1.9	1.7	1.6	1.2	2.3	2.0	1.7	1.5	1.4	1.3	1.0	2.1	1.7	1.5	1.3	1.2	1.1	0.8	2.1	1.7	1.5	1.3	1.2	1.1	0.8	
	15		2.9	2.3	2.0	1.8	1.6	1.5	1.1	2.0	1.6	1.4	1.2	1.1	1.1	0.8	1.6	1.3	1.2	1.0	0.9	0.9	0.6	1.4	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	1.4	1.1	1.0	0.9	0.8	0.7	0.6	
	CI (K)		13.9	10.0	9.6	8.0	7.7	6.8	4.8	9.6	7.1	6.7	5.6	5.4	4.8	3.4	7.7	5.8	5.4	4.6	4.4	3.9	2.8	6.8	5.0	4.7	4.0	3.8	3.4	2.4	6.8	5.0	4.7	4.0	3.8	3.4	2.4	
	CI (a)		47.5	39.7	34.1	31.1	28.0	26.3	19.8	33.4	28.1	24.0	21.9	19.8	18.7	14.0	27.0	22.9	19.5	17.9	16.1	15.1	11.5	23.5	19.8	16.9	15.4	14.0	13.1	9.9	23.5	19.8	16.9	15.4	14.0	13.1	9.9	
0.100	I				35.2	32.1	29.9	21.9		32.1	27.6	24.5	22.5	20.8	15.6	32.0	26.2	22.7	20.2	18.5	17.1	12.7	27.7	22.2	19.6	17.6	16.0	14.8	11.0	27.7	22.2	19.6	17.6	16.0	14.8	11.0		
	2				19.6	17.7	16.3	14.8	11.0	20.0	16.0	13.8	12.5	11.3	10.5	7.7	16.4	13.1	11.3	10.1	9.2	8.5	6.3	14.0	11.4	9.6	8.8	8.0	7.4	5.4	14.0	11.4	9.6	8.8	8.0	7.4	5.4	
	3				13.4	11.7	11.0	9.8	7.3	13.4	10.8	9.2	8.3	7.5	6.9	5.2	10.7	8.7	7.5	6.6	6.1	5.7	4.2	9.1	7.5	6.5	5.9	5.3	4.9	3.7	9.1	7.5	6.5	5.9	5.3	4.9	3.7	
	4				9.8	9.0	8.0	7.4	5.5	10.1	7.9	6.9	6.2	5.7	5.3	3.9	8.0	6.5	5.6	5.0	4.6	4.2	3.2	7.0	5.6	4.9	4.3	4.0	3.7	2.8	7.0	5.6	4.9	4.3	4.0	3.7	2.8	
	6				6.7	5.9	5.3	5.0	3.7	6.6	5.4	4.7	4.1	3.8	3.5	2.6	5.4	4.3	3.8	3.4	3.1	2.8	2.1	4.7	3.7	3.2	2.9	2.6	2.5	1.8	4.7	3.7	3.2	2.9	2.6	2.5	1.8	
	8				5.0	4.5	4.1	3.8	2.7	4.9	4.0	3.5	3.1	2.8	2.6	1.9	4.0	3.2	2.8	2.5	2.3	2.1	1.6	3.4	2.8	2.4	2.2	2.0	1.8	1.4	3.4	2.8	2.4	2.2	2.0	1.8	1.4	
	10				4.1	3.5	3.2	3.0	2.2	4.0	3.2	2.8	2.5	2.3	2.1	1.6	3.2	2.5	2.2	2.1	1.9	1.7	1.3	2.8	2.3	2.0	1.8	1.6	1.5	1.1	2.8	2.3	2.0	1.8	1.6	1.5	1.1	
	15				2.7	2.4	2.2	2.0	1.5	2.6	2.1	1.9	1.6	1.5	1.4	1.0	2.2	1.8	1.5	1.4	1.2	1.1	0.9	1.8	1.5	1.3	1.2	1.1	1.0	0.7	1.8	1.5	1.3	1.2	1.1	1.0	0.7	
	CI (K)				12.9	10.8	10.4	9.2	6.5	13.1	9.5	9.0	7.5	7.2	6.4	4.6	10.5	7.7	7.3	6.1	5.9	5.2	3.7	9.0	6.7	6.3	5.3	5.1	4.5	3.2	9.0	6.7	6.3	5.3	5.1	4.5	3.2	
	CI (a)				45.8	41.9	37.6	35.3	26.4	45.0	37.5	32.1	29.2	26.3	24.8	18.8	36.5	30.5	26.0	23.9	21.6	20.2	15.3	31.2	26.5	22.5	20.7	18.6	17.5	13.2	31.2	26.5	22.5	20.7	18.6	17.5	13.2	
0.125	I						38.6	27.7		39.7	35.0	30.9	28.5	26.0	19.3		32.3	28.1	25.5	23.3	21.3	15.9	34.8	28.2	24.4	21.7	20.0	18.4	13.7	34.8	28.2	24.4	21.7	20.0	18.4	13.7		
	2						21.1	19.8	13.8		20.3	17.4	15.8	14.2	13.1	9.6		16.5	14.4	12.7	11.5	10.7	8.0	17.3	14.2	12.2	10.9	9.9	9.3	6.8	17.3	14.2	12.2	10.9	9.9	9.3	6.8	
	3						13.6	12.6	9.2		13.3	11.5	10.5	9.5	8.9	6.4		10.7	9.6	8.4	7.7	7.1	5.3	11.9	9.4	8.2	7.3	6.6	6.2	4.5	10.7	9.6	8.4	7.7	7.1	5.3	4.5	
	4						10.2	9.5	6.9		10.1	8.8	7.8	7.2	6.6	4.9	10.1	8.1	7.2	6.2	5.7	5.4	4.0	8.8	7.0	6.1	5.5	5.0	4.7	3.4	8.8	7.0	6.1	5.5	5.0	4.7	3.4	
	6						7.5	6.9	4.6		6.6	5.9	5.1	4.8	4.4	3.3	6.7	5.5	4.8	4.2	3.9	3.6	2.7	5.9	4.7	4.1	3.6	3.4	3.1	2.3	5.9	4.7	4.1	3.6	3.4	3.1	2.3	
	8						5.7	5.3	4.8	3.4		5.0	4.3	3.8	3.5	3.3	2.4	5.1	4.1	3.6	3.2	2.9	2.7	2.0	4.3	3.5	3.1	2.7	2.5	2.3	1.7	4.3	3.5	3.1	2.7	2.5	2.3	1.7
	10						4.5	4.1	3.7	2.8		4.0	3.5	3.1	2.9	2.7	2.0		3.3	2.8	2.5	2.3	2.1	1.6	3.5	2.8	2.5	2.2	2.0	1.9	1.4	3.3	2.8	2.5	2.2	2.0	1.9	1.4
	15						3.0	2.9	2.5	1.8		2.7	2.4	2.0	1.9	1.7	1.3		2.2	1.9	1.7	1.5	1.4	1.1	2.3	1.9	1.6	1.5	1.3	1.2	0.9	2.3	1.9	1.6	1.5	1.3	1.2	0.9
	CI (K)				13.8	13.5	11.7	8.2		11.9	11.4	9.4	9.2	8.1	5.7	13.3	9.7	9.2	7.7	7.4	6.5																	

4.1.8. Aplicación del modelo

Una vez se realizó un análisis detallado (en términos estadísticos) de la solución más efectiva para ELCT en un formato DR, se aplicó una descripción extensiva de los valores paramétricos que pueden ser derivados de ese modelo, y se hizo una discusión de las ventajas e inconvenientes de utilizar un valor paramétrico u otro para caracterizar las DR de los ELCT (en nuestro caso la solución modelo de la Ec. [5]), se procede a describir, caracterizar, cuantificar y predecir rigurosamente los efectos DR en las cuatro líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2) para todos los agentes testados (EL, VP-16, CDDP, EM y EA) por el ensayo de la SRB.

La **Figura 6** muestra los resultados gráficos derivados de dicho análisis, dónde los valores experimentales de DR son los puntos (○). Para cada compuesto en cada línea se utilizan ~125 puntos ($n \sim 30$ y $r \sim 4$). Las líneas (—) representan los ajustes conseguidos con el modelo matemático seleccionado. La **Tabla 12** presenta los valores del ajuste paramétrico obtenido por el modelo seleccionado de Weibüll de la Ec. [5] y sus derivaciones expresadas en las Ec. [25], [26], [28] y [29] para proporcionar el conjunto de criterios paramétricos (LD_{50} , V_m , λ y LD_K) de interés para definir la respuesta y caracterizar el proceso de inhibición de las células tumorales. Finalmente, **Figura 7** muestra los resultados paramétricos de la **Tabla 12** (LD_{50} , V_m , λ y LD_K) en un formato gráfico que nos permita compararlos rápidamente.

Obsérvese ahora, las capacidades analíticas del proceso citotóxico de cada agente en cada línea y la facilidad para comparar los efectos entre agentes en una misma línea. Tomando como ejemplo práctico de la línea tumoral de NCI-H460, se puede observar que los parámetros LD_{50} , V_m y LD_K convergen en una solución similar. Dónde los agentes se pueden clasificar según el siguiente orden descendente en función de capacidad antitumoral: EL>CDDP>VP-16>EA>EM. Siendo estos resultados extrapolables al resto de líneas tumorales.

Como consecuencia, los resultados prueban que:

- 1) La preferencia para ensayos aparentemente simples, rutinariamente aplicables con requerimientos mínimos de cálculos, no es muy justificable hoy en día, dada la posibilidad de utilizar aplicaciones computacionales y lectores de microplacas, cuya combinación proporciona herramientas adecuadas para trabajar con conjuntos de datos que permiten realizar evaluaciones precisas con modelos matemáticos no-lineales.

2) El modelo matemático más eficiente para la caracterización, identificación y cuantificación de respuestas citotóxicas de los métodos ELCT es seleccionado después de un análisis detallado de modelos DR típicamente aplicados a un conjunto de datos elaborados para tal fin.

3) La reducción para estudiar la DR sólo en valores de LD_{50} podría llevar frecuentemente a resultados no fiables.

4) Se confirma la necesidad de presentar otros valores paramétricos adicionales como las tasas máxima y media del proceso, valores del período de latencia, entre otros, juntamente con la LD_{50} para describir apropiadamente los efectos citotóxicos de los agentes.

La solución más satisfactoria fue encontrada y si fuera aplicada apropiadamente ciertamente mejoraría la caracterización, identificación y cuantificación de ELCT de una manera más eficiente y precisa. Sus ventajas son la aplicación simple, provisión de estimativos paramétricos que caracterizan la respuesta, simplificación del protocolo, economización del esfuerzo experimental y facilitación de comparaciones rigurosas entre los efectos de diferentes compuestos y enfoques experimentales. Tales resultados pueden ser extrapolados fácilmente a ensayos *in vitro* e *in vivo* generalmente utilizados para determinar los ELCT de patrones de mortalidad.

Tabla 12: Valores paramétricos de LD_{50} , V_m , λ y LD_K obtenidos de la Ec. [5] y sus derivaciones expresadas en las Ec. [25], [26], [28] y [29] para analizar, describir y cuantificar de una manera rigurosa los resultados obtenidos en las cuatro líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2) para todos los agentes testados experimentalmente en el ensayo de la SRB (EL, VP-16, CDDP, EM y EA). Resultados gráficos en la **Figura 6** y **Figura 7**.

LÍNEA CELULAR & AGENTE	PRINCIPALES PARÁMETROS DE AJUSTE			OTROS PARÁMETROS			ESTADÍSTICA	
	K (% Inh)	LD_{50} (D)	a --	V_m (% Inh/D)	LD_K (D)	λ (D)	R^2	
NCI-H460	EM	100.0±9.3	58.8±6.4	1.98±0.39	1.17±0.1	152.9±9.6	11.91±3.00	0.9785
	EA	100.0±8.1	47.0±5.2	1.73±0.31	1.28±0.2	122.1±8.8	6.50±1.88	0.9347
	EL	100.0±12.3	0.8±0.3	0.65±0.16	28.85±11.2	2.0±0.4	0	0.9546
	VP-16	100.0±6.4	18.8±2.6	1.25±0.26	2.29±0.5	49.0±4.9	0.43±0.17	0.9667
	CDDP	100.0±7.1	6.5±1.3	0.93±0.17	4.98±1.3	16.9±2.3	0	0.9817
HeLa	EM	100.0±21.5	50.2±14.8	1.27±0.50	0.88±0.2	130.4±12.8	1.38±0.54	0.9359
	EA	100.0±4.5	21.2±1.4	1.32±0.19	2.16±0.4	55.0±5.2	0.79±0.30	0.9696
	EL	100.0±26.7	1.2±0.5	0.94±0.46	26.92±7.2	3.1±0.4	0	0.9474
	VP-16	100.0±26.8	15.4±7.4	0.66±0.36	1.48±0.6	40.1±7.6	0	0.9751
	CDDP	100.0±12.4	6.8±1.2	1.08±0.34	5.52±1.3	17.7±2.0	0.02±0.01	0.9690
MFC-7	EM	100.0±12.2	57.9±8.8	1.53±0.34	0.92±0.1	150.5±12.3	5.06±1.65	0.9772
	EA	100.0±12.9	44.3±7.1	1.35±0.15	1.05±0.2	115.2±10.7	1.89±0.70	0.9683
	EL	100.0±21.0	1.4±0.4	1.12±0.42	27.18±6.1	3.7±0.4	0.01±0.00	0.9685
	VP-16	100.0±10.2	25.0±3.6	1.18±0.29	1.64±0.3	65.0±6.9	0.33±0.14	0.9847
	CDDP	100.0±14.7	12.2±2.2	1.50±0.31	4.28±0.7	31.6±2.6	0.97±0.32	0.9810
HepG2	EM	100.0±60.4	96.0±71.6	1.28±0.44	0.46±0.1	249.6±24.3	2.86±1.11	0.9639
	EA	100.0±17.6	38.2±9.0	1.25±0.22	1.14±0.2	99.4±9.9	0.92±0.37	0.9772
	EL	100.0±82.2	1.2±1.9	0.72±0.81	21.41±7.5	3.0±0.5	0	0.8775
	VP-16	100.0±38.7	43.4±28.5	0.92±0.27	0.74±0.2	112.8±15.3	0	0.9831
	CDDP	100.0±17.3	1.5±0.9	0.50±0.41	11.93±6.0	3.8±0.9	0	0.9851

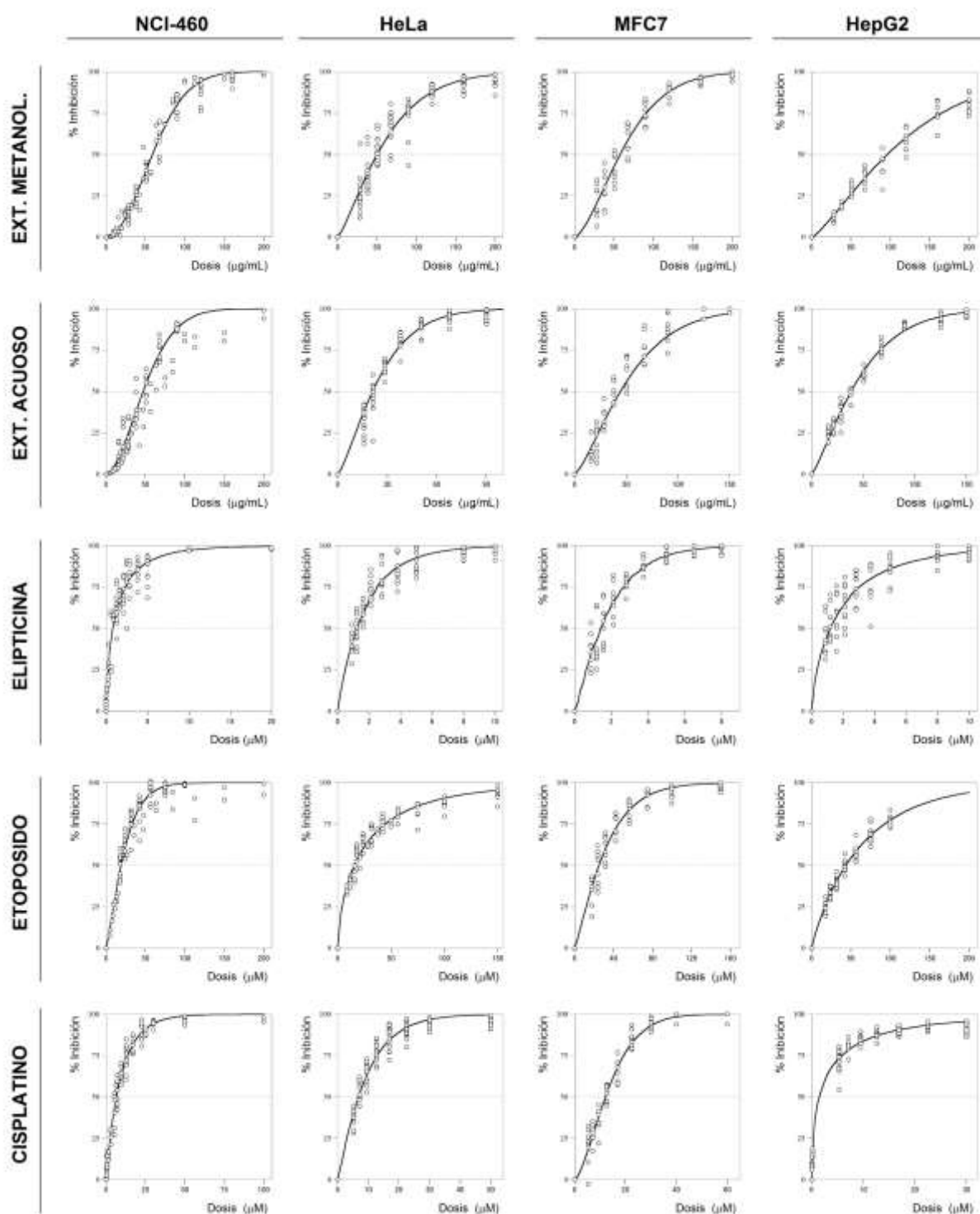
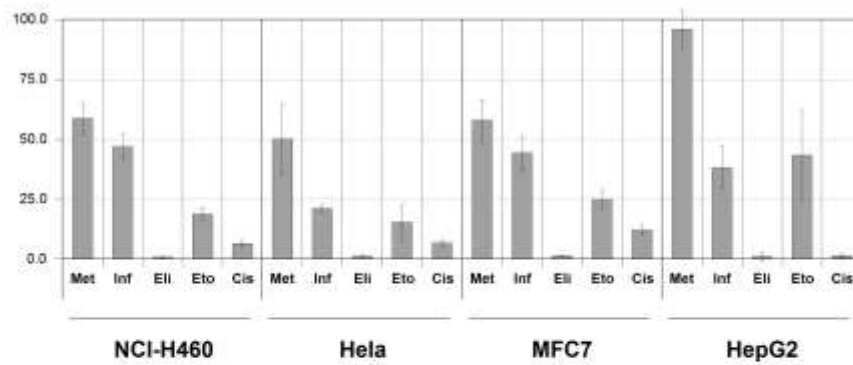
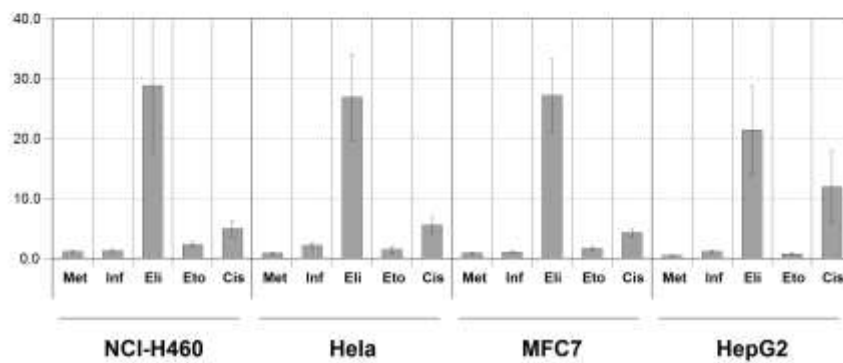


Figura 6: Dosis-respuestas (puntos: ○) experimentales de cuatro líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2) por el ensayo colorimétrico de la sulforodamina B para hacer una evaluación de los efectos de 3 agentes comerciales (compuestos puros) y 2 extractos naturales (mezcla de compuestos). Estos datos (125 puntos de datos por agente y línea celular tumoral) fueron utilizados para clasificar los nueve modelos seleccionados de la bibliografía. Las líneas (—) representan los ajustes conseguidos con el modelo matemático seleccionado. Los valores del ajuste paramétrico obtenido son obtenidos en la **Tabla 12**.

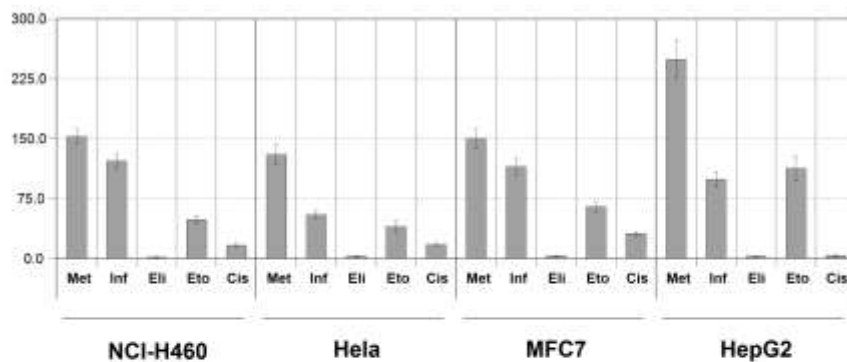
A: Parámetro de LD_{50}



B: Parámetro de V_m



C: Parámetro de λ



D: Parámetro de LD_{κ}

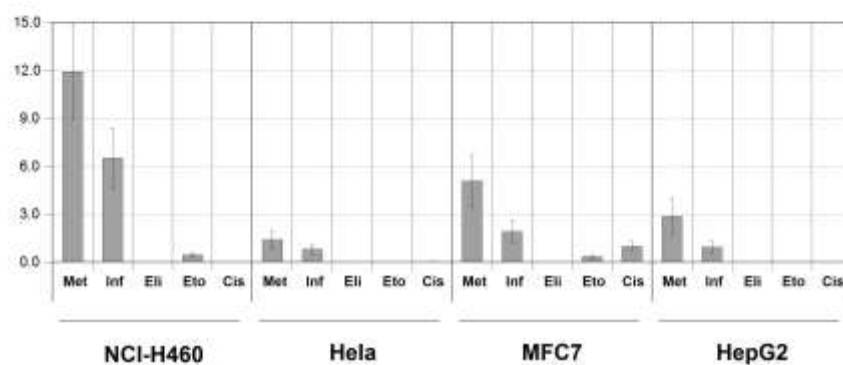


Figura 7: Comparación gráfica de los principales valores paramétricos para conseguir las respuestas experimentales.

4.2. Formulación de una metodología para la identificación del modo de acción y la cuantificación del tipo de interacción

Previamente diversos autores (Berenbaum, 1985a; Bliss, 1937; Breitinger, 2012; Cedergreen et al., 2008; Murado and Prieto, 2013a; Yin et al., 2014) han desarrollado herramientas matemáticas para proporcionar un ambiente algebraico para traducir las hipótesis interactivas clásicas de combinaciones binaria de agentes efectores de una respuesta. Estos sistemas de relaciones matemática han sido recientemente utilizados para describir, identificar y cuantificar los efectos interactivos entre dos agentes antioxidantes comerciales puros (Prieto et al., 2014, para investigar los mecanismos interactivos en mezclas complejas de antioxidantes naturales obtenidos a partir de extractos de plantas (Prieto and Vázquez, 2014) o investigar los mecanismos interactivos entre agentes tóxicos derivados del petróleo en algas y erizos marinos (Murado and Prieto, 2013a; Prieto et al., 2015; Rial et al., 2013). Estos estudios sirven de guía para la transferencia y posterior desarrollo de la metodología en los sistemas aquí analizados para el estudio de la citotoxicidad de agentes tumorales en ELCT. Así, en este apartado, continuamos su utilidad para determinar los efectos sinérgicos y antagónicos de la combinación de mezclas binarias de agentes antitumorales. Por la tanto es de resaltar que se están utilizando los avances más recientes en la cuantificación de la DR de agentes puros y el efecto conjunto de mezclas binarias a través del análisis matemático de las superficies de respuesta derivadas.

El procedimiento fue aplicado en varias líneas celulares del ensayo de la SRB como caso práctico de estudio del conjunto de posibilidades de una amplia variabilidad de ELCT disponibles. Como se ha indicado anteriormente, el ensayo de la SRB fue seleccionado porque proporciona un sistema de respuesta óptima, especialmente preciso, reproducible y conlleva un error experimental bajo (Keepers et al., 1991; Longo-Sorbello et al., 2006; Ma et al., 1998; Vichai and Kirtikara, 2006), ya que este sistema de reacción es utilizado extensivamente para cuantificar la capacidad potencial de los agentes antitumorales, y además la operatividad del protocolo ha sido repetidamente revisado y reformado, pudiéndose decir que está optimizado y actualizado (Linamaría et al., 2009).

A pesar del esfuerzo de los investigadores (Bae-Jump et al., 2009; Liu et al., 2012; Ma et al., 1998; Murai et al., 2014; Poma et al., 2006) para describir los efectos sinérgicos/antagónicos en ELCT, la falta de perspectivas proporcionadas por enfoques clásicos de otros campos de estudio, puede ser la principal causa que limita encontrar soluciones más concluyentes (Greco et al., 1995; Groten, 2000; Hertzberg and MacDonell, 2002; Sørensen et al., 2007; Vølund,

1992). Este trabajo ilustra un procedimiento metodológico para ELCT para determinar los efectos sinérgicos y antagonicos de combinaciones binarias de agentes antitumorales. Como norma general, los sistemas analíticos típicos de ELCT, utilizan respuestas entre dos o más agentes efectores prescindiendo de la interpretación inicial para la determinación del modo de acción (AC y AI).

Para aportar pruebas contundentes de estas afirmaciones, en la **Tabla 13** podemos observar la recopilación bibliográfica de los sistemas analíticos, líneas celulares, agentes antitumorales y una breve descripción de los objetivos, dónde se tenía como objeto primordial estudiar la combinación de agentes para identificar los efectos interactivos. Se observa que todos los estudios utilizan un índice combinatorio (ICb) para analizar la respuesta interactiva de agentes. Este índice no es más que una simplificación restrictiva del modo de acción aditivo (hipótesis interactiva de AC).

Pese a las críticas a este respecto (Murado & Prieto, 2013; Sørensen, Cedergreen, Skovgaard, & Streibig, 2007), tal caracterización prescinde frecuentemente de los aspectos claves del proceso para definir cualquier interacción. Sin embargo, el significado fáctico de esta propiedad formal no puede asociarse a sinergia o antagonismo, y sólo significa que la probabilidad de que al menos una de las dosis sea letal es alta a dosis altas y baja a dosis bajas.

A mayores, si estos resultados hipotéticos fuesen estudiados desde una perspectiva diferente (tal como el modo de acción AI o AC desde una perspectiva más completa como se ha descrito en la sección de material y métodos), las conclusiones podrían ser perfectamente distintas o incluso opuestas. Por lo tanto, un primer aspecto insatisfactorio de esta aproximación es la ausencia de criterios formales transferidos desde otras áreas de investigación (Gessner, 1988; Hertzberg and MacDonell, 2002; Jonker et al., 2005) tales como aquellas hipótesis concebidas en el área de la DR típicamente aplicadas en la determinación de efectos tóxicos (clínicos o ambientales) de agentes (como ejemplo plausible, agentes altamente carcinogénicos).

Tabla 13: Estudios más recientes de interacciones sinérgicas/antagónicas de agentes en líneas celulares tumorales de ELCT típicos.

TÉCNICA ANÁLISIS	LÍNEAS CELULARES	AGENTES UTILIZADOS	ANÁLISIS	OBJETIVO DEL ESTUDIO	REFERENCIA
MTT	Línea celular de hepatocarcinoma: Hepa1-6.	Curcumina y resveratrol.	IC	Synergistic anticancer effects of curcumin and resveratrol in Hepa1-6 hepatocellular carcinoma cells.	(Du et al., 2013)
	Melanoma maligno.	Análogos de KPT.	IC	CRM1 and BRAF inhibition synergize and induce tumor regression in BRAF-mutant melanoma.	(Salas Fragomeni et al., 2013)
	Líneas celulares de cáncer de mama: BT474, MCF7, HCC1806, hs578t y MDAMB468.	Inhibidores de PARP.	IC	Synergistic chemosensitivity of triple-negative breast cancer cell lines to poly (ADP-Ribose) polymerase inhibition, gemcitabine, and cisplatin.	(Hastak, Alli, & Ford, 2010)
	Linfoma de células del manto: JeKo-1 y Granta-519.	Inhibidores del proteasoma y de la histona desacetilasa	IC	Synergistic interaction of the histone deacetylase inhibitor SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib in mantle cell lymphoma.	(Heider et al., 2008)
	Líneas celulares de cáncer de colon humano: HCT116 y HT29.	Estatinas y Fármacos anti-inflamatorios no esteroideos	IC	Combination of atorvastatin and celecoxib synergistically induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells.	(Xiao, Zhang, Lin, Reddy, & Yang, 2008)
	Carcinoma colon humano: FET6AS26X.	Inhibidores de la tirosina quinasa.	IC	Synergy of epidermal growth factor receptor kinase inhibitor AG1478 and ErbB2 kinase inhibitor AG879 in human colon carcinoma cells is associated with induction of apoptosis.	(Zhou & Brattain, 2005)
	Cáncer de próstata humana: DU 145, PC 3 y LnCaP	Diecisiete agentes antitumorales.	IC	Unique synergism or antagonism of combinations of chemotherapeutic and hormonal agents in human prostate cancer cell lines.	(Kreis, Budman, & Calabro, 1997)
	Cáncer de pulmón de células pequeñas: H1618, y no pequeñas: H1395, H2347, H520, H226, H358 y H2126.	Vinorelbina y doxorubicina.	IC	RLIP76 Transports Vinorelbine and Mediates Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer.	(Stuckler, Singhal, & Singhal, 2005)
Carcinoma de células de ovário: A2780.	Agentes sintéticos y terapia fotodinámica.	IC	Angiostatic treatment prior to chemo-or photodynamic therapy improves anti-tumor efficacy.	(Weiss et al., 2015)	
MTS	Carcinoma nasofaríngeo: HK1 y C666-1.	Quercetina y cisplatina.	IC	Quercetin-induced inhibition and synergistic activity with cisplatin-a chemotherapeutic strategy for nasopharyngeal carcinoma cells.	(Daker, Ahmad, & Khoo, 2012)
	Cáncer de páncreas: BxPC-3 y Panc-1.	Garcinol y curcumina	IC	Synergistic effect of garcinol and curcumin on antiproliferative and apoptotic activity in pancreatic cancer cells.	(Parasramka & Gupta, 2012)
	Cáncer de mama: MDA-MB-231, SKBr3, MCF10A y MCF7.	Inhibidores de: S-adenosilhomocisteína hidrolasa y histona desacetilasa.	IC	S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibition by 3-deazaneplanocin A analogues induces anti-cancer effects in breast cancer cell lines and synergy with both histone deacetylase and HER2 inhibition.	(Hayden, Johnson, Packham, & Crabb, 2011)
	Cáncer de endometrio: Ishikawa y ECC-1.	Rapamicina y cisplatina.	IC	Synergistic effect of rapamycin and cisplatin in endometrial cancer cells.	(Bae-Jump, Zhou & Gehrig, 2009)
	Cáncer de hígado: HepG2, HA22T/VGH y HuH-6.	Inhibidor de NF-κB y cisplatina.	IC	Antitumor effects of the novel NF-κB inhibitor dehydroxymethyl-epoxyquinomicin on human hepatic cancer cells: Analysis of synergy with cisplatin.	(Poma et al., 2006)
	Cáncer de pulmón de células pequeñas: H82, H146, H526 y H446.	Romidepsina, cisplatina y etoposideo. Metformin y trametinib.	IC IC	Schedule-dependent synergy of histone deacetylase inhibitors with DNA damaging agents in small cell lung cancer. Metformin and trametinib have synergistic effects on cell viability and	(Luchenko et al., 2014) (Vujic, Sanlorenzo, &

				tumor growth in NRAS mutant cancer.	Posch, 2015)
SRB	Cáncer de pulmón de células no pequeñas: NCI-H460/R.	Sulfinosina y curcumina..	IC	Synergistic effects of the purine analog sulfinosine and curcumin on the multidrug resistant human non-small cell lung carcinoma cell line.	(Andjelkovic et al., 2014)
	Ocho líneas celulares de tumores sólidos: IGROV-1, IGROV, MCF7, EVSAT, M-19, H226, A498 y WiDr.	Cisplatina e inhibidores de la topoisomerasa II.	IC	Synergistic cytotoxicity of cisplatin and topotecan or SN-38 in a panel of eight solid-tumor cell lines in vitro	(Ma, Maliepaard, & Nooter, 1998)
	Cáncer de pulmón: H322, LL. Cancer ovárico: A2780, ADDP y AG6000.	Cisplatina y gemcitabina.	IC	Mechanisms of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small-cell lung cancer cell lines.	(Moorsel & Pinedo, 1999)
Trypan blue dye	Cáncer de pulmón: A549, Calu-1 y Calu-6.	Pemetrexed y gemcitabina.	IC	Cellular and pharmacogenetics foundation of synergistic interaction of pemetrexed and gemcitabine in human non-small-cell lung cancer cells.	(Giovannetti, Mey, & Nannizzi, 2005)
	Leucemia: HL60, ML-1, Raji y Jurkat.	Cytarabina y decitabina.	IC	Effect of cytarabine and decitabine in combination in human leukemic cell lines.	(Qin et al., 2007)
	Glioma maligno: U87-MG, T98G y U373-MG.	Inhibidores de quinasas y rapamicina.	IC	Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors.	(Takeuchi, Kondo, & Kanzawa, 2005)
	Cáncer mama Her2 positivo: SKBR-3, MDA-MB-453 y MCF-7.	Bortezomib y trastuzumab.	IC	Bortezomib (PS-341, Velcade) increases the efficacy of trastuzumab (Herceptin) in HER-2-positive breast cancer cells in a synergistic manner.	(Cardoso et al., 2006)
	Cáncer ovárico: OVCAR3, CAOV3, SKOV3, PA-1, A2780 y A2780cis.	Metformina fenetil isotiocianato.	IC	Metformin and phenethylisothiocyanate combined treatment in vitro is cytotoxic to ovarian cancer cultures.	(Chan & Miskimins, 2012)
	Cáncer gástrico: HGC27, AGS, SNU-601, NCI-N87, S7901, MKN28, MKN45 y GES-1.	Everolimus e inhibidor quinasa.	IC	The combination of RAD001 and MK-2206 exerts synergistic cytotoxic effects against PTEN mutant gastric cancer cells: Involvement of MAPK-dependent autophagic, but not apoptotic cell death pathway.	(Ji et al., 2014)
	Cáncer de pulmón: H82, H146, H196, H526, DMS114, SW1271, H1688 y H2195.	Inhibidores de la ADN metiltransferasa y de la histona desacetilasa.	IC	Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN-stimulated gene expression.	(Luszczek, Cheriya, & Borden, 2010)
Cell Titer-Go	Lineas mutadas de linfoma no Hodgkin: WSU-DLCL2 y SUDHL10.	Inhibidor metiltransferasa.	IC	Synergistic anti-tumor activity of EZH2 inhibitors and glucocorticoid receptor agonists in models of non-Hodgkin lymphomas.	(Knutson et al., 2014)
	Cáncer prostate: PC3 y C4-2.	Derivado rapamicina y propachlor.	IC	Combination of Rad001 (everolimus) and propachlor synergistically induces apoptosis through enhanced autophagy in prostate cancer cells.	(Tai et al., 2012)
	Leucemia con reordenamiento del gen MLL: MOLM-13, MV4-11 y SKM-1.	Un inhibidor de la protein metiltransferasa DOT1L.	IC	DOT1L inhibitor EPZ-5676 displays synergistic antiproliferative activity in combination with standard of care drugs and hypomethylating agents in MLL-rearranged leukemia cells.	(Klaus et al., 2014)
	Cáncer ovárico: SKOV3 y OV2008.	Derivado rapamicina ,trióxido de arsénico.	IC	Arsenic trioxide synergizes with everolimus (Rad001) to induce cytotoxicity of ovarian cancer cells.	(Liu et al., 2012)

4.2.1. Algunos apuntes en relación a posibles diseños experimentales

Antes de iniciar ningún abordaje de las necesidades matemáticas para la cuantificación de interacciones en ELCT, es necesario tener un diseño experimental apropiado. En este sentido, aquí se darán las bases que permiten optimizar las respuestas desde una perspectiva estadística y matemática a través de los distintos diseños experimentales.

En cualquier diseño, una práctica conveniente es la de codificar las dosis (dividiéndolas entre la máxima) de manera que las dos series individuales tengan los mismos valores (D_i) entre el intervalo $[0, 1]$. Juntamente con la codificación de la respuesta en el mismo intervalo, esto facilita el proceso de ajuste y proporciona estimativos paramétricos estandarizados. Una vez definida la serie D_i hay varios métodos razonables para establecer las mezclas de dosis cubriendo el dominio experimental (**Figura 8**).

4.2.1.a) Diseño radial simple

A parte de la serie individual $D_{1i}, 0$ y $D_{2i}, 0$ ($D_{1i}=D_{2i}=D_i$), esta opción incluye conjuntos adicionales de dosis mixtas (d_{1i}, d_{2i}), cada uno definido por una ratio constante ($d_{1i}/d_{2i}=Q$) entre la concentración de los dos efectores. Así, el conjunto dosis mixta situada a lo largo del radio definido por Q_n es:

$$\text{Si } Q_n \leq 1: d_{1i[Q_n]} = D_i \quad ; \quad d_{2i[Q_n]} = D_i \times Q_n$$

$$\text{Si } Q_n > 1: d_{1i[Q_n]} = D_i / Q_n \quad ; \quad d_{2i[Q_n]} = D_i$$

4.2.1.b) Diseño radial concéntrico

Similar al anterior, pero con las mezclas de dosis definidas por el (φ_n) que hace cada radio con la variable representando la serie:

$$d_{1i[\varphi_n]} = D_i \times \cos \varphi_n \quad ; \quad d_{2i[\varphi_n]} = D_i \times \sin \varphi_n$$

El número y valor de los radios de φ_j (o Q) puede ser fijado libremente, teniendo en cuenta que valores de φ_j superiores a ($\sim 75^\circ$) y por debajo ($\sim 15^\circ$) favorecen la detección de interacciones.

4.2.1.c) Diseño equiaditivo

Las mezclas de dosis son agrupadas en series definidas por una suma constante ($d_{1i}+d_{2i}=S$). Así, siendo v el número deseado de dosis por serie:

$$\text{Si } S_n \leq 1: d_{1i[S_n]} = S_n - h_v \left(\frac{S_n}{v-1} \right) \quad ; \quad d_{2i[S_n]} = S_n - d_{1i[S_n]} \quad ; \quad (h_v=0, 1, \dots, v-1)$$

$$\text{Si } S_n > 1: d_{1i[S_n]} = (S_n - 1) + h_v \left(\frac{1 - S_n + 1}{v-1} \right) \quad ; \quad d_{2i[S_n]} = S_n - d_{1i[S_n]} \quad ; \quad (h_v=0, 1, \dots, v-1)$$

4.2.1.d) Diseño completo

Es el plan experimental más intuitivo, puede ser definido simplemente por la combinación de todas las dosis de un efector con todas las dosis del otro.

En principio, cada diseño ofrece ventajas específicas para identificar los modos de acción concretos comparando, a través de criterios estadísticos, las respuestas observadas a ciertas series de dosis con las esperadas bajo la hipótesis AI, AC o interacción nula.

Sin embargo, en nuestra experiencia las propiedades de la superficie de respuesta en acciones conjuntas implican:

- 1) Numerosas situaciones indistinguibles analizadas por medio de las series equitativa o radial.
- 2) Los comportamientos de las respuestas dadas en una determinada región del dominio experimental no representan necesariamente lo que ocurre en otras regiones.

De hecho, la herramienta más discriminativa es el modelo explícito, y para poder simular tales condiciones, se aconseja el diseño completo. Incluso si se quiere hacer caso omiso a funciones auxiliares dudosas, las respuestas a un mismo conjunto de datos de un efector en presencia de dosis crecientes de otro efector, forma secuencias sistemáticas muy específicas. Estas secuencias son más informativas que la radial o equitativa, y pueden ser sometidas ventajosamente al criterio comparativo mencionado arriba.

Además, es más eficiente una buena cobertura del dominio completo (diseño completo) que un incremento del número de réplicas, con el fin de minimizar los efectos del error experimental.

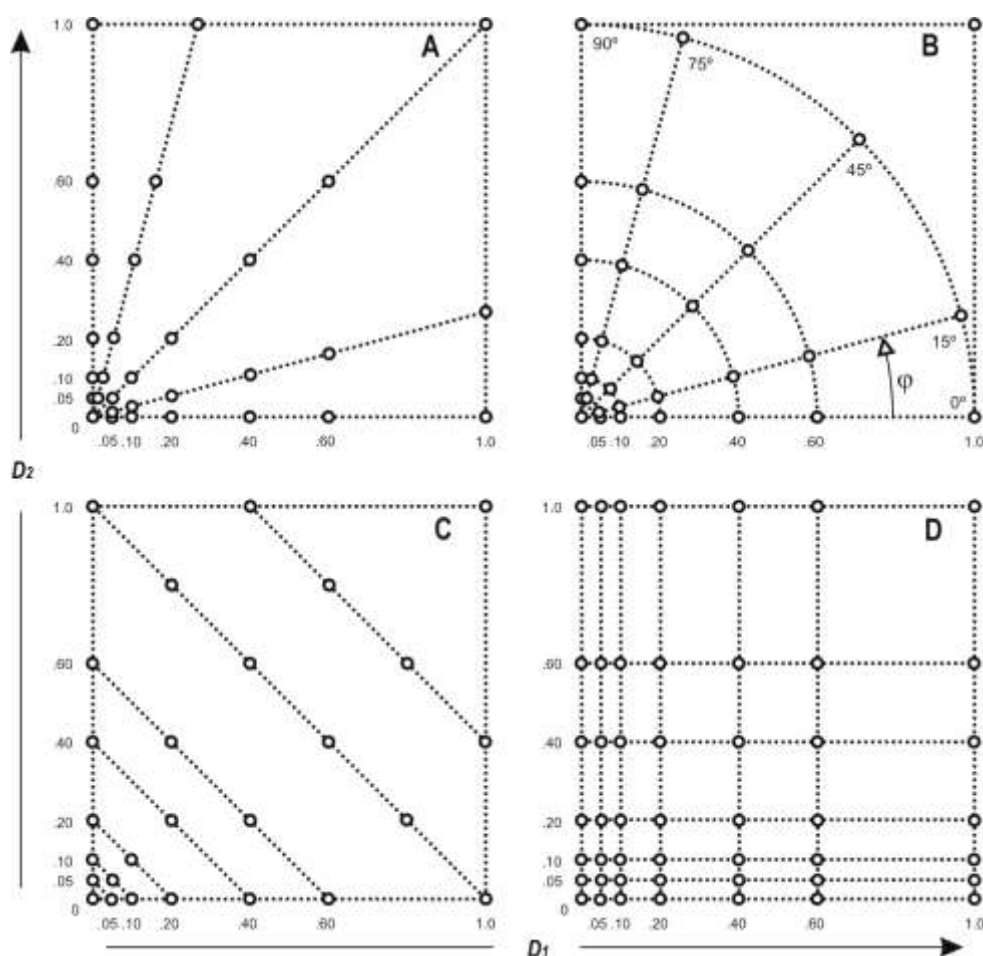


Figura 8: Posibles diseños experimentales utilizados para la evaluación de efectos interactivos de la combinación de dosis de dos agentes: Radial simple (A), Radial concéntrico (B), Equiaditivo (C) y Completo (D).

4.2.2. Diseño experimental para la combinación de dos agentes antitumorales, número de concentraciones y rangos más adecuados para el análisis eficiente.

Cuando se analizan los efectos de dosis individuales de un agente con modelos DR (Murado and Prieto, 2013b), el enfoque debería esforzarse en cubrir un buen rango experimental, más que incrementar el número de réplicas, con el fin de minimizar los efectos del error experimental, ya que desde el punto de significancia estadística de un modelo, eso es más eficiente (Kane, 2004; Murado et al., 2002; Tamhane et al., 1996). Para incrementar la precisión de las predicciones del modelo y la significancia de las estimaciones de los parámetros, debemos realizar al menos entre 8 y 12 dosis independientes bien distribuidas de cada uno de los agentes produciendo un mínimo de un 20-30 % de respuestas totales en la asíntota. Así, si se selecciona un diseño con 8 dosis por agente (incluido el control), en un diseño completo tendríamos un total de 64 combinaciones, de las cuales 18-22 de ellas deberían posicionarse en el entorno de la asíntota de la respuesta (100 % de inhibición). Al

igual que en el apartado anterior para una única dosis, aseguramos que todas las estimaciones paramétricas obtenidas con relevancia en la respuesta producida serán estadísticamente consistentes, con un error inferior al 35 % del valor numérico del parámetro. Para obtener los rangos de concentración que producirán el 20-30% de las DR en la asíntota, se deben realizar experimentos iniciales para identificar el rango de las dosis adecuado. Para los resultados experimentales aquí utilizados, los rangos finales usados para los agentes individuales para las líneas celulares objeto por el método de la SRB, son derivados de los resultados del apartado de resultados 4.1 y expresados en la **Figura 6**, **Figura 7** y **Tabla 12**. Siendo estos más que suficientes para establecer los rangos adecuados de trabajo en los términos expresados.

En principio, hay un amplio rango de diseños experimentales, la **Figura 8** escenifica aquellos más utilizados. Cada diseño ofrece ventajas específicas, pero en nuestra experiencia, el diseño completo es el más efectivo, que es simplemente combinando todas las dosis de un agente con todas las dosis del otro. Así, cuando ajustamos los datos experimentales a una caracterización multivariable, el modelo se vuelve más consistente e informativo y proporciona mejores estimaciones de parámetros reduciendo su intervalo de confianza. Siempre y cuando las curvas experimentales obtenidas abarquen el rango completo de la respuesta (0-100 %) y algunas de ellas fracasen en proporcionar información sobre uno o más de los parámetros de la ecuación, la aplicación combinada del modelo de superficie describirá de manera simple y precisa todas las respuestas.

Cuando se analizan los efectos de las dosis combinadas de dos agentes con un modelo de superficie de DR, la esencia del agente individual se debe mantener, pero son las variables multicomponentes que afectan la eficiencia de los análisis matemáticos. Para cuantificar, caracterizar y predecir con precisión el comportamiento aditivo de los compuestos como nulo, sinérgico o antagónico en ELCT, depende fuertemente de diseños apropiados. Desde este punto individual, se puede especular como se comportarían los compuestos en una mezcla de experimentos de dosis únicas. Sin embargo, estas son reducciones simplistas del problema (Groten, 2000). La única manera de describir la acción combinada de los componentes en una mezcla es realizar estudios experimentales combinando un máximo de dos agentes y comparando el efecto de la mezcla con el efecto de la respuesta de los compuestos individuales en ausencia del otro agente (Hertzberg and MacDonell, 2002; Hewlett and Plackett, 1964; Murado and Prieto, 2013a; Vølund, 1992).

4.2.3. Significado, juicio y etapas para el análisis de interacciones en función de las hipótesis AI y AC de interacción aceptadas

La hipótesis de AC (Adición de Concentraciones) a través de la Ec. [17] (asumiendo falta de interacción) y Ec. [21] (asumiendo mecanismos interactivos), y la hipótesis de AI (Acción Independiente) a través de la Ec. [13] (asumiendo falta de interacción) y Ec. [16] (asumiendo mecanismos interactivos), traducen significados complejos de los mecanismos de interacción entre los agentes. Para seleccionar la hipótesis de efecto interactivo, se realiza un análisis de los valores de las matrices de 64 datos (triplicado) resultantes de la interacción de dos agentes con un programa matemático-estadístico elaborado en el grupo de BioChemCore para tal fin (para más información véase la sección de material y métodos). En este sentido, tanto con el supuesto hipotético de AI como el de AC es aplicado empleando en cada caso distintas ecuaciones descritas. En función de los resultados numéricos derivados se procede a elegir la hipótesis más eficiente. Una vez seleccionada, comparamos la respuesta de interacción en dicha hipótesis (AI o AC), con la hipotética respuesta sin interacción (bajo las condiciones de la misma hipótesis), pudiendo así cuantificar y determinar el tipo de interacción.

Estas hipótesis y sus resultantes valores paramétricos nos sirven para identificar los siguientes puntos clave:

1) Desde un punto fenomenológico a través de modelos matemáticos se evalúa la hipótesis de acción interactiva que describe con mejor precisión la respuesta celular a la combinación de dos agentes. Este análisis puede producir los siguientes casos:

- 1.a) Se obtiene un mecanismo de acción puro, una interacción puramente AI o AC.
- 1.b) Se obtiene un mecanismo predominante, es decir ambas soluciones son viables, pero una de ellas es dominante, identificándose tal realidad como predominantemente AI o AC.
- 1.c) Se obtiene una descripción fallida por ambas hipótesis, deteniéndose el análisis, posible pero poco habitual.

2) Una vez identificado el modo de acción interactiva se procede a identificar el tipo de efecto interactivo: Existen tres modos fundamentales, pudiéndonos encontrar efectos puros sinérgicos, antagónicas o de acción nula. A estos hay que añadir casos de efecto predominantemente sinérgico o antagónico, cuando coexisten ambas interacciones en una misma respuesta.

3) Cuantificación del efecto interactivo. Dado que las respuestas son no-lineales, es decir el efecto varía a lo largo de la concentración, no existe una concentración ideal capaz de describir el efecto interactivo por sí sola. Tanto el tipo como la cantidad de efecto interactivo

producido pueden variar a lo largo de las distintas combinaciones de los agentes involucrados. Independientemente del modo de acción (AI o AC), existen dos sistemas posibles de cuantificación basados en la divergencia de las respuestas entre aquella acción experimentalmente derivada con efecto interactivo (sinergia o antagónica) y aquella esperada en ausencia de un efecto interactivo (acción nula), o bien describimos el efecto en su conjunto o bien indicamos los rangos máximos y mínimos de la acción. En este trabajo se opta por globalizar los efectos complejos descritos en el punto 1 y 2 anterior, a través de un índice % *RUV* (Ec. [22]) indicativo de las interacciones globales registradas. Donde valores positivos y negativos describen los efectos de las interacciones predominantemente sinérgicas o antagónicas (en términos porcentuales) entre los agentes antitumorales del rango de estudio, respectivamente.

4.2.4. Número de agentes antitumorales y tipo (puros o mezclas) que son teóricamente significativos dentro del marco de trabajo descrito

Cuando se evalúa los efectos tóxicos de compuestos en sistemas de mortalidad/viabilidad de organismos, raramente son una combinación de dos agentes puros. Estos argumentos pueden ser igualmente válidos en el análisis de efectos conjuntos de agentes antitumorales. Aunque muchos estudios en la bibliografía han ilustrado procedimientos para evaluar la mezcla multi-componentes de entidades químicas no puras (Faust et al., 2003), en este estudio sólo hemos discutido mezclas binaras, ya que numerosos autores señalan que experimentos con tres compuestos químicos o más no parecen tener una resolución satisfactoria (Murado and Prieto, 2013a; Sørensen et al., 2007).

Los agentes antitumorales que teóricamente son válidos para evaluar sus efectos combinados, una vez las hipótesis de AI y AC son establecidas como solución general para ELCT, son aceptables las siguientes combinaciones binarias: (1) dos agentes químicos puros, y (2) un agente químico puro con una mezcla de agentes químicos desconocidos (como un extracto complejo de agentes antitumorales). En el primero, estableceríamos los efectos de su respuesta combinada y podrían ser dibujadas algunas conjeturas posibles de su interacción mecanística. En el segundo, incluso si la combinación de agentes químicos puros similares o diferentes con extractos de agentes antitumorales, formados por una mezcla de agentes, aunque no ausente de controversia, podríamos ser capaces de determinar los efectos generales de su acción conjunta. La tercera opción de combinación de dos compuestos formados por mezclas de agentes no estaría dentro del marco teórico de los modos de acción AI y AC propuestos, aunque tampoco existen restricciones hacia tal fin.

4.2.5. Nociones de las respuestas interactivas nula, sinérgica o antagónica del efecto conjunto de la acción de dos agentes: Ejemplo ilustrativo del proceso metodológico

El procedimiento metodológico y los modelos matemáticos propuestos en las secciones anteriores dieron resultados consistentes cuando se combinaron todos los agentes antitumorales que figuran en la sección de materiales para cada una de las líneas en estudio. Esos resultados no sólo permitieron la decisión entre el modo de interacción (AI o AC) o el tipo de interacción (nula, sinergia y antagonismo), sino que también revelaron algunos aspectos interesantes de las reacciones del sistema. Para ilustrar el procedimiento metodológico de este enfoque y el significado de los resultados derivados, a continuación, se describe con detalle la acción conjunta de una mezcla binaria de los agentes antitumorales puros (EL vs CDDP en la línea tumoral de MFC-7) en un formato ilustrativo para comprender visualmente el proceso de análisis.

Los datos promediados de las 3 réplicas de las 64 combinaciones de dosis (8x8 en una microplaca) de la acción de estos agentes, es introducida en el programa especialmente desarrollado para seleccionar el modo de acción que rige esta respuesta binaria. En este caso concreto la hipótesis obtenida fue la de AC en un modo predominante, con una respuesta antagónica predominante con unos valores globales de -6.4 %. Cuando un gran conjunto de datos necesita ser analizado, el proceso intuitivo de encontrar la solución más apropiada puede ser muy laborioso. Para sortear este obstáculo, el programa desarrollado a través del lenguaje de programación de VBA (Visual Basic for Applications) en *Microsoft Excel 2003* generando una rutina dónde todas las combinaciones posibles de parámetros son testadas para clasificar y seleccionar la solución más apropiada (para la Ec. [16] de AI son 9 parámetros y 511 combinaciones y para la Ec. [21] de AC son 13 parámetros y 8 191 combinaciones). La solución encontrada fue idéntica a la encontrada intuitivamente por un proceso manual, lo que demuestra la fiabilidad de las dos opciones para seleccionar la solución correcta. Sin embargo, ya que el sistema automático es indudablemente más rápido y fiable, fue el procedimiento utilizado para evaluar los siguientes pares de agentes antitumorales. Este análisis de programación sencillo, se producen en varias etapas que a continuación tratamos de detallar.

Así, la **Figura 9** (gráfico A) muestra la aplicación de la hipótesis de la interacción nula de la acción conjunta, descrita ajustando la superficie de respuesta a la hipótesis de AC a través de la Ec. [17] (asumiendo falta de interacción). Procediendo de este modo, los valores de R^2 y R^2_{adj} , así como el test de t -Student y F -Fisher (ambos con $\alpha=0.05$), aplicados a las estimaciones paramétricas y a la varianza explicada, respectivamente, mostraron un ajuste

estadísticamente poco aceptable, con valores entorno 0.78. Adicionalmente, la distribución entre los resultados observados y predichos fue sesgada, y los residuos mostraron que la superficie de la respuesta calculada predice valores superiores que los obtenidos experimentalmente, lo que sugiere una interacción antagonista.

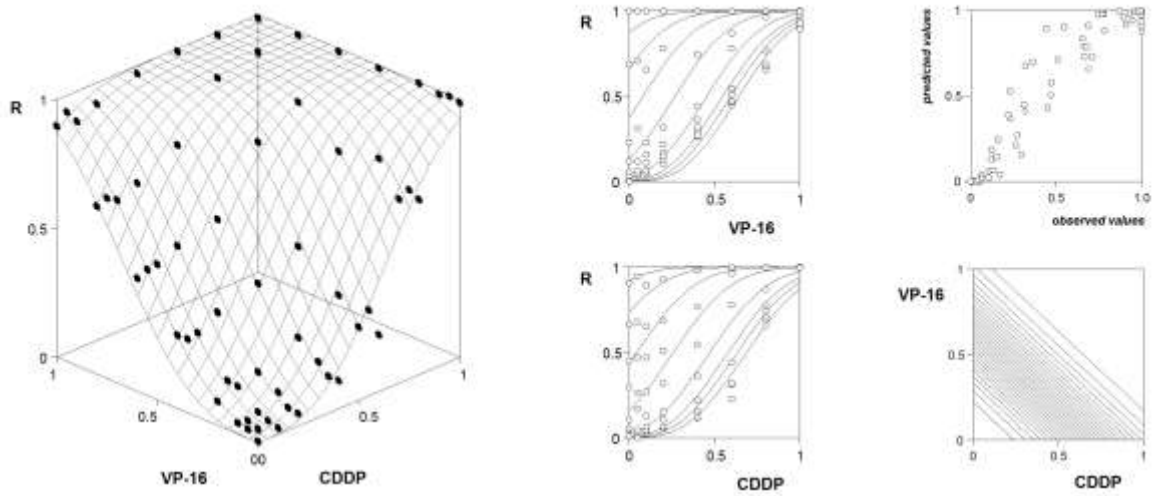
Cuando permitimos que la hipótesis AC asuma mecanismos interactivos (**Figura 9**, gráfico B) como se describe la Ec. [21], se obtuvo un decrecimiento en el sesgo y una mejora en los otros criterios de ajuste (valores de R^2 y $R^2_{adj} > 0.96$) debido a un incremento interactivo en el parámetro m de la respuesta de un agente antitumoral debido a la presencia del otro (incrementando la potencia del agente antitumoral: antagonista en sentido estricto). Todos los criterios de ajuste mejoran significativamente cuando los efectos antagonistas fueron incluidos en comparación a los mostrados asumiendo falta de interacción en la Ec. [17] (obsérvese figuras de correlación y de residuos). Por lo tanto, se debe concluir que el efecto de la respuesta conjunta entre agentes antitumorales muestra una interacción antagonista.

Una vez determinada la modelización de las respuestas de la superficie experimental, pudimos cuantificar el grado de efecto de interacción (% RUV) como se describe en la Ec. [22]. Las variaciones en los valores paramétricos de la respuesta a un agente antitumoral como función de la concentración de la otro o el enfoque global de calcular el RUV , permiten una breve descripción razonable de los efectos interactivos. Las consecuencias sinérgicas y antagónicas pueden variar a lo largo de la superficie de respuesta, produciendo efectos con signos opuestos en diferentes subdominios de la superficie. Así, un dato de interés práctico es la posible diferencia entre la interacción nula y el resultado experimental en un dominio. Sólo el escenario de esas diferencias a través del dominio experimental permite declaraciones eficaces y estadísticamente correctas. Finalmente, en la **Figura 9** (gráfico C) presenta el % RUV (-6.4 %), primero en dos gráficos separados 2D que muestran la respuesta para los efectos individuales causados para cada agente antitumoral, y después en un gráfico único 3D como respuesta a las dosis de los agentes antitumorales presentados.

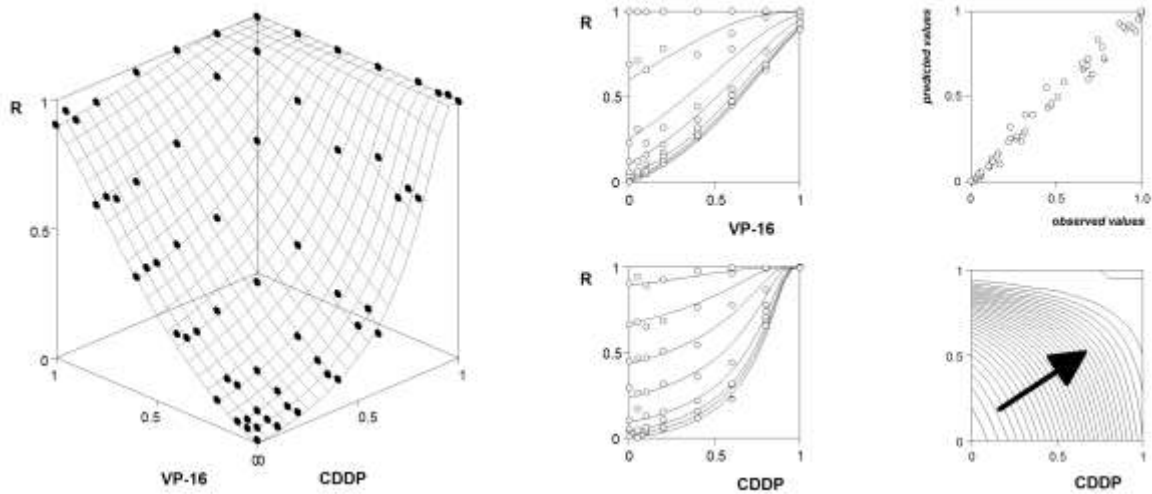
4.2.6. Reproducibilidad de la metodología y límite de confianza de la determinación de RUV

La reproducibilidad y el límite de confianza del procedimiento metodológico fue evaluado analizando la interacción binaria entre un agente antitumoral varias veces y determinando el intervalo de confianza del % RUV de la respuesta resultante. El intervalo de confianza global fue ± 1.95 %. Como normal general para ambos ensayos, se puede establecer que cualquier valor de % RUV entre -2,00 y 2,00 % no se puede considerar como estadísticamente consistente. Así, se obtiene el valor de RUV basado en sus límites de confianza.

A: CONCENTRATION ADDITION WITHOUT INTERACTIONS



B: CONCENTRATION ADDITION WITH INTERACTIONS



C: VOLUMETRIC DIFFERENCE BETWEEN BOTH ASSUMPTIONS

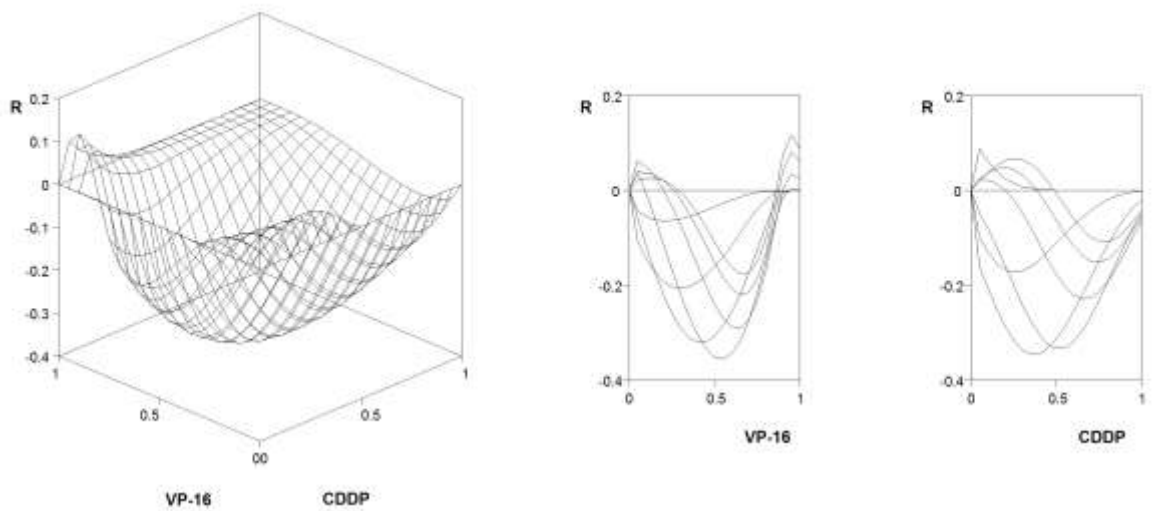


Figura 9: Procedimiento ilustrativo para obtener las respuestas utilizando dos hipotéticas combinaciones de agentes, como ejemplo. El valor final *RUV* de tal interacción fue -4.94 %.

4.2.7. Aplicación para la acción conjunta entre diversos pares de agentes

Utilizando los agentes antitumorales enumerados en la sección de materiales y métodos, se realizaron 15 combinaciones de agentes para cada una de las cuatro líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2) por el ensayo colorimétrico de la SRB. De esta manera, se realizó la evaluación de los efectos de tres agentes comerciales (EL, VP-16 y CDDP, como compuestos puros) y 2 extractos naturales (EM y EA, como mezcla de compuestos), incluyendo aquellas en las cuales el par de agente antitumorales es el mismo (utilizadas simplemente como control). Para cada par de agentes se usaron 64 combinaciones de concentraciones, usando los rangos en los términos descritos anteriormente. Todas las respuestas binarias de los agentes son sujetas al análisis de regresión en etapas automáticas descrito en la sección anterior y en la de material y métodos.

En este sentido, fueron evaluados los efectos interactivos de todos los agentes antitumorales. La **Figura 10**, **Figura 11** y **Figura 12** muestran la matriz de combinaciones de 15 agentes binarios para cada una de las líneas celulares tumorales en estudio, incluyendo esas en las cuales cada agente antitumoral es se combina consigo mismo (usado como control). Los modos de interacción, estimaciones paramétricas, IC e información estadística de los resultados del mejor ajuste derivado para cada una de las combinaciones binarias testadas se presentan en la **Tabla 14** y **Tabla 15**. Una vez identificado el modo de interacción, se cuantificaron los efectos interactivos en términos de % *RUV* por medio de la Ec. [22] y presentado en la **Tabla 16**.

Todos los coeficientes de determinación ajustados R^2_{adj} de todas las soluciones de ajuste fueron siempre mayores que 0.91, con una amplia mayoría de los ajustes superiores a 0.97. En algunos casos excepcionales, si su comportamiento se describe y confirma por otras áreas de estudio, puede mostrar algunos conceptos interesantes en el campo de los efectos interactivos de los compuestos.

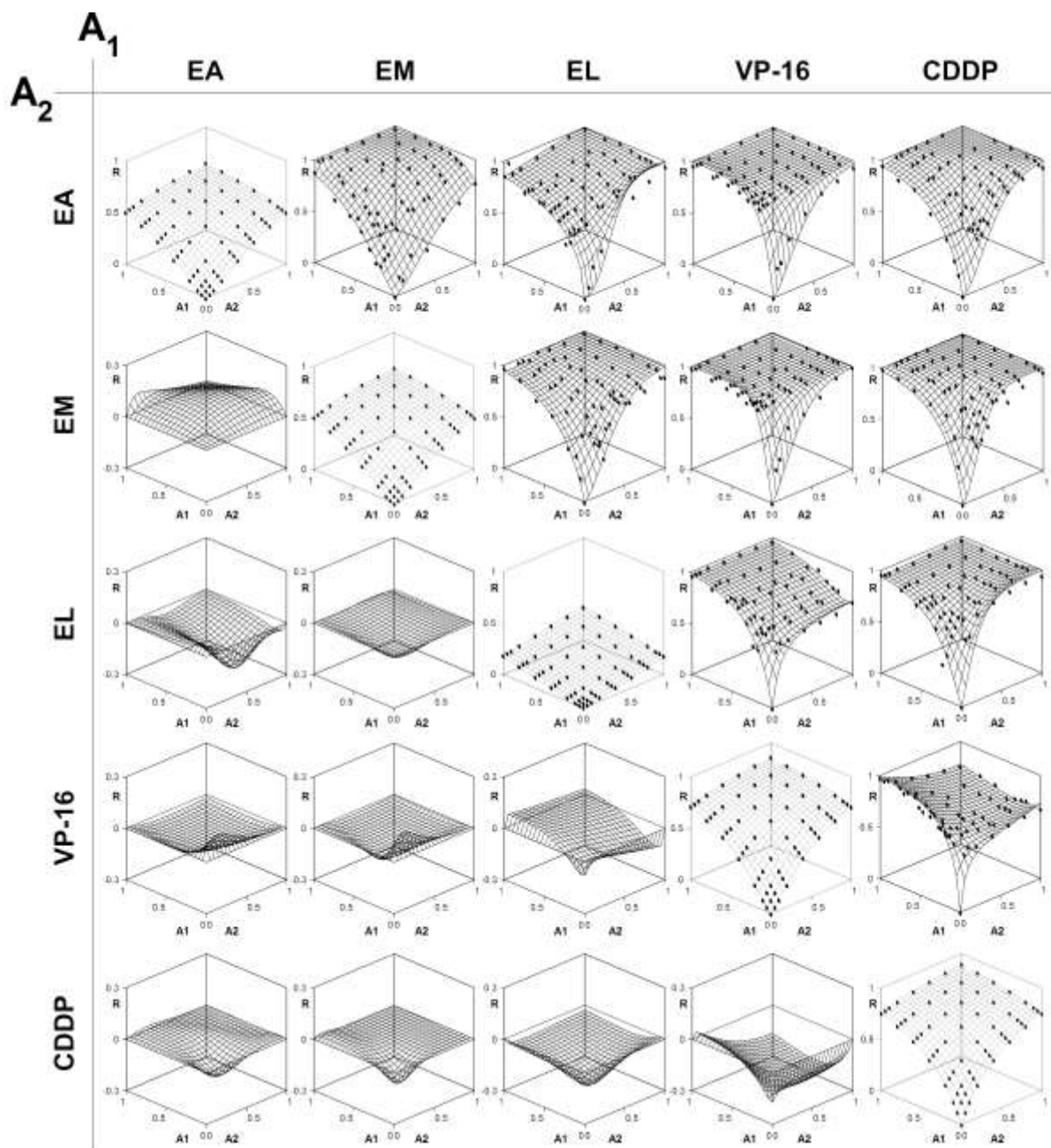


Figura 10: Matriz de combinación de respuestas para la línea NCI-H460, que se organiza de la siguiente manera: a) en la diagonal se pueden ver los resultados obtenidos para los controles; b) en la parte superior de la diagonal, se presenta la superficie de respuestas para cada par de agentes antitumorales; y c) en la parte inferior de la diagonal se presenta el “escenario” de diferencias entre sus respectivas interacciones nulas y la respuesta obtenida. Los resultados numéricos están en la **Tabla 14**, **Tabla 15** y **Tabla 16**. En todos los casos los puntos (●) son los resultados experimentales obtenidos, mientras que las superficies son los resultados derivados por los modelos utilizados.

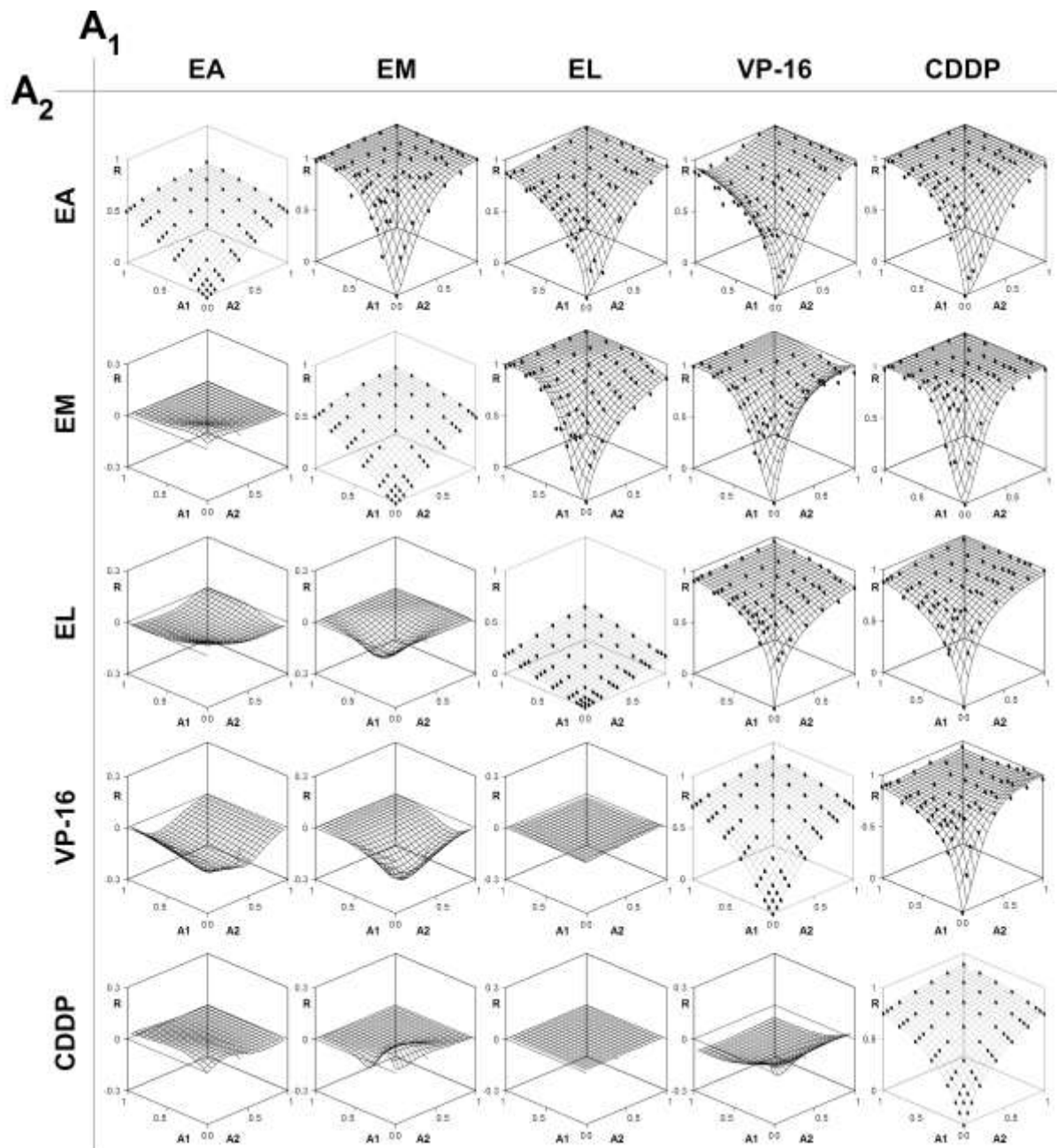


Figura 11: Matriz de combinación de respuestas para la línea HeLa, que se organiza de la siguiente manera: a) en la diagonal se pueden ver los resultados obtenidos para los controles; b) en la parte superior de la diagonal, se presenta la superficie de respuestas para cada par de agentes antitumorales; y c) en la parte inferior de la diagonal se presenta el “escenario” de diferencias entre sus respectivas interacciones nulas y la respuesta obtenida. Los resultados numéricos están en la **Tabla 14**, **Tabla 15** y **Tabla 16**. En todos los casos los puntos (●) son los resultados experimentales obtenidos, mientras que las superficies son los resultados derivados por los modelos utilizados.

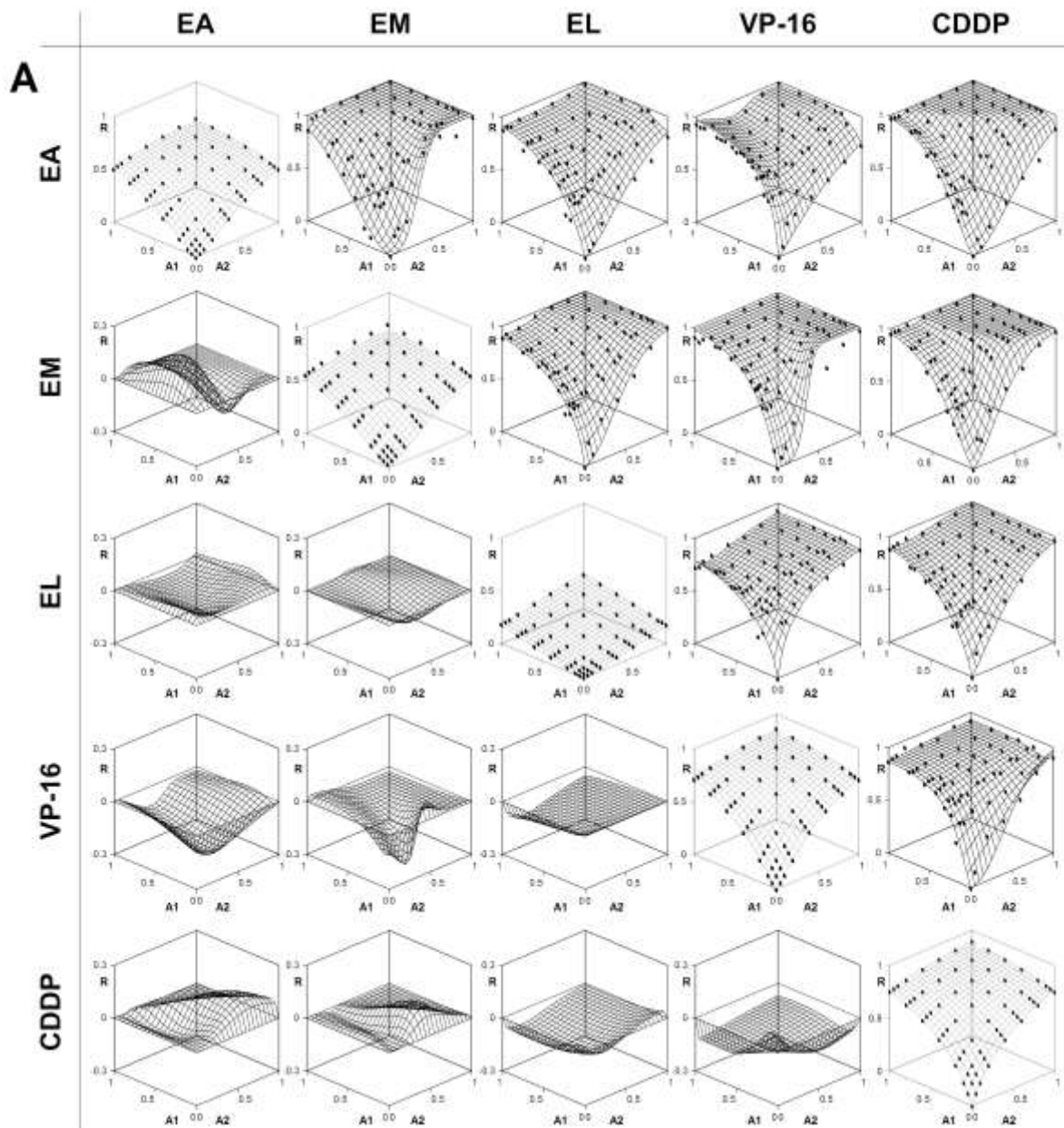


Figura 12: Matriz de combinación de respuestas para la línea MCF-7, que se organiza de la siguiente manera: a) en la diagonal se pueden ver los resultados obtenidos para los controles; b) en la parte superior de la diagonal, se presenta la superficie de respuestas para cada par de agentes antitumorales; y c) en la parte inferior de la diagonal se presenta el “escenario” de diferencias entre sus respectivas interacciones nulas y la respuesta obtenida. Los resultados numéricos están en la **Tabla 14**, **Tabla 15** y **Tabla 16**. En todos los casos los puntos (●) son los resultados experimentales obtenidos, mientras que las superficies son los resultados derivados por los modelos utilizados.

Tabla 14: Valores paramétricos de la acción conjunta de diferentes agentes y dos extractos naturales ajustando los resultados experimentales a la Ec.[17] (asumiendo falta de interacción) y [21] (asumiendo mecanismos interactivos) de la hipótesis de AC (Adición de Concentraciones). El grado de efecto interactivo (% *RUV*) se calculó como está descrito en la Ec. [22]. Para todos los parámetros presentados sus estimaciones son significativos.

Agent combiantion		ASSUMING NO INTERACTIONS					ASSUMING INTERACTIONS															degree of inter.			
		joint response		relative potency		fitting analysis	joint response		relative potency	A1 altering eff. conc. of A2		A2 altering eff. conc. of A1		A1 as perturbing factor for params. of the joint response				A2 as perturbing factor for params. of the joint response					fitting analysis		
A1	A2	<i>K</i>	<i>m</i>	α	<i>p</i>	R^2_{adj}	<i>K</i>	<i>m</i>	α	<i>p</i>	<i>b</i> _{D2}	<i>c</i> _{D2}	<i>b</i> _{D1}	<i>c</i> _{D1}	<i>b</i> _{m2}	<i>c</i> _{m2}	<i>b</i> _{a2}	<i>c</i> _{a2}	<i>b</i> _{m1}	<i>c</i> _{m1}	<i>b</i> _{a1}	<i>c</i> _{a1}	R^2_{adj}	% <i>RUV</i>	
A: RESPUESTAS PARA LA LÍNEA CELULAR TUMORAL NCI-H460																									
<i>EA</i>	<i>EA</i>	1.0	0.441	1.216	1.0	0.9777	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>EM</i>	<i>EM</i>	1.0	0.219	0.897	1.0	0.9818	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>EL</i>	<i>EL</i>	1.0	0.311	1.517	1.0	0.9704	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>VP-16</i>	<i>VP-16</i>	1.0	0.264	1.451	1.0	0.9891	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>CDDP</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.206	1.667	1.0	0.9788	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>EL</i>	<i>VP-16</i>	1.0	0.207	0.504	2.113	0.8660	1.0	0.100	0.921	0.570	--	5.501	3.848	--	--	--	--	--	4.252	--	--	--	0.9662	-0.64	
<i>EL</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.139	1.081	0.591	0.8845	1.0	0.145	1.160	0.668	--	5.249	--	--	--	--	-0.323	--	--	--	--	--	0.9533	-7.39	
<i>VP-16</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.168	0.367	7.174	0.6030	1.0	0.100	0.761	0.999	--	3.266	--	--	--	--	--	--	-0.471	--	--	4.028	0.9238	-19.44	
B: RESPUESTAS PARA LA LÍNEA CELULAR TUMORAL HeLa																									
<i>EA</i>	<i>EA</i>	1.0	0.229	1.346	1.0	0.9997	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>EM</i>	<i>EM</i>	1.0	0.263	1.810	1.0	0.9731	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>EL</i>	<i>EL</i>	1.0	0.287	0.883	1.0	0.9882	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>VP-16</i>	<i>VP-16</i>	1.0	0.135	0.989	1.0	0.9722	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>CDDP</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.207	1.377	1.0	0.9867	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>EL</i>	<i>VP-16</i>	1.0	0.203	0.580	1.968	0.9828	1.0	0.212	0.602	1.819	--	--	--	0.594	--	--	--	--	--	--	0.027	--	0.9867	-2.20	
<i>EL</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.143	0.748	0.659	0.8838	1.0	0.143	0.748	0.659	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.9838	--	
<i>VP-16</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.175	0.901	0.912	0.9232	1.0	0.204	1.487	2.371	--	--	--	--	5.990	0.280	--	--	--	--	--	0.374	0.9804	-6.70	
C: RESPUESTAS PARA LA LÍNEA CELULAR TUMORAL MCF-7																									
<i>EA</i>	<i>EA</i>	1.0	0.541	2.040	1.0	0.9855	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>EM</i>	<i>EM</i>	1.0	0.233	0.864	1.0	0.9814	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>EL</i>	<i>EL</i>	1.0	0.420	1.870	1.0	0.9856	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>VP-16</i>	<i>VP-16</i>	1.0	0.352	2.653	1.0	0.9882	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>CDDP</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.338	1.560	1.0	0.9829	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--
<i>EL</i>	<i>VP-16</i>	1.0	0.191	0.719	0.621	0.9205	1.0	0.193	0.697	0.555	--	--	--	5.741	--	-0.543	0.801	--	--	--	--	--	0.9632	-6.12	
<i>EL</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.331	1.133	1.137	0.9190	1.0	0.691	0.888	2.570	--	--	--	3.823	--	--	--	--	--	--	2.116	--	0.9678	-6.39	
<i>VP-16</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.453	1.572	1.890	0.8977	1.0	0.457	2.074	6.935	--	--	--	--	--	-0.355	--	38.33	--	--	--	--	0.9383	-11.70	

Tabla 15: Valores paramétricos de la acción conjunta de diferentes agentes y dos extractos naturales ajustando los resultados experimentales a la Ec [13] (asumiendo falta de interacción) y [21] (asumiendo mecanismos interactivos) de la hipótesis de AI (Acción Independiente). El grado de efecto interactivo (% *RUV*) se calculó como está descrito en la Ec. [22]. Para todos los parámetros presentados sus estimaciones son significativos.

Agent combiacion		ASSUMING NO INTERACTIONS							ASSUMING INTERACTIONS													degree of inter. % <i>RUV</i>				
		response to A ₁		response to A ₂		fitting analysis			response to A ₁			response to A ₂			A1 as perturbing factor for params. of the joint response				A2 as perturbing factor for params. of the joint response				comp / coop	fitting analysis		
A1	A2	<i>K</i> ₁	<i>m</i> ₁	<i>a</i> ₁	<i>K</i> ₂	<i>m</i> ₂	<i>a</i> ₂	<i>R</i> ² _{adj}	<i>K</i> ₁	<i>m</i> ₁	<i>a</i> ₁	<i>K</i> ₂	<i>m</i> ₂	<i>a</i> ₂	<i>b</i> _{m2}	<i>c</i> _{m2}	<i>b</i> _{a2}	<i>c</i> _{a2}	<i>b</i> _{m1}	<i>c</i> _{m1}	<i>b</i> _{a1}	<i>c</i> _{a1}	<i>s</i>	<i>R</i> ² _{adj}	% <i>RUV</i>	
A: RESPUESTAS PARA LA LÍNEA CELULAR TUMORAL NCI-H460																										
<i>EA</i>	<i>EM</i>	1.0	0.441	1.216	1.0	0.548	1.337	0.9400	1.0	0.437	1.233	1.0	0.547	1.360	-0.986	-0.872	--	--	-0.718	--	--	--	--	--	0.9551	8.45
<i>EA</i>	<i>EL</i>	1.0	0.201	0.671	1.0	0.330	2.434	0.9084	1.0	0.190	0.606	1.0	0.330	2.348	5.260	--	--	--	-0.918	--	--	--	--	--	0.9518	-6.85
<i>EA</i>	<i>VP-16</i>	1.0	0.100	0.976	1.0	0.316	1.457	0.9662	1.0	0.100	0.958	1.0	0.316	1.418	-0.934	--	--	3.942	-0.980	--	--	4.121	--	0.9713	-3.47	
<i>EA</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.194	0.865	1.0	0.328	1.673	0.9597	1.0	0.196	0.857	1.0	0.329	1.643	--	-0.990	2.694	--	--	--	--	-0.880	--	0.9778	-0.65	
<i>EM</i>	<i>EL</i>	1.0	0.219	0.897	1.0	0.311	1.517	0.9278	1.0	0.226	0.942	1.0	0.319	1.566	--	--	--	--	--	-0.990	--	--	--	0.9335	-2.15	
<i>EM</i>	<i>VP-16</i>	1.0	0.100	1.320	1.0	0.264	1.451	0.9586	1.0	0.100	1.319	1.0	0.261	1.419	-0.896	--	--	2.598	-0.990	--	--	6.000	--	0.9703	-2.52	
<i>EM</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.178	0.907	1.0	0.206	1.667	0.9548	1.0	0.180	0.915	1.0	0.208	1.676	--	--	--	--	2.628	--	3.392	--	--	0.9783	1.35	
B: RESPUESTAS PARA LA LÍNEA CELULAR TUMORAL HeLa																										
<i>EA</i>	<i>EM</i>	1.0	0.229	1.346	1.0	0.255	1.319	0.9543	1.0	0.228	1.326	1.0	0.255	1.326	--	1.159	-0.900	--	--	--	--	--	--	0.9619	0.59	
<i>EA</i>	<i>EL</i>	1.0	0.238	0.840	1.0	0.395	1.603	0.9197	1.0	0.221	0.720	1.0	0.401	1.527	--	-0.799	--	--	--	--	-0.735	-0.900	--	0.9264	-4.14	
<i>EA</i>	<i>VP-16</i>	1.0	0.137	0.596	1.0	0.371	2.488	0.8459	1.0	0.162	0.718	1.0	0.390	1.822	--	--	--	--	4.628	--	--	--	--	0.9077	-9.63	
<i>EA</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.153	0.842	1.0	0.425	2.081	0.9692	1.0	0.151	0.974	1.0	0.400	1.719	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.9784	1.40	
<i>EM</i>	<i>EL</i>	1.0	0.263	1.810	1.0	0.287	0.883	0.9501	1.0	0.264	1.870	1.0	0.271	0.818	--	--	--	-0.900	1.449	--	--	--	--	0.9706	-2.32	
<i>EM</i>	<i>VP-16</i>	1.0	0.266	1.788	1.0	0.135	0.989	0.8555	1.0	0.262	1.633	1.0	0.147	1.020	5.613	--	--	--	--	--	--	--	--	0.9734	-6.30	
<i>EM</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.247	2.785	1.0	0.207	1.377	0.9303	1.0	0.241	1.998	1.0	0.215	1.499	--	--	--	--	-0.774	--	--	--	--	0.9487	0.05	
C: RESPUESTAS PARA LA LÍNEA CELULAR TUMORAL MCF-7																										
<i>EA</i>	<i>EM</i>	1.0	0.541	2.040	1.0	0.344	3.538	0.9124	1.0	0.553	1.796	1.000	0.338	3.192	--	--	--	4.442	-0.780	--	--	--	--	0.9622	2.01	
<i>EA</i>	<i>EL</i>	1.0	0.309	1.022	1.0	0.521	1.541	0.9444	1.0	0.269	0.930	1.000	0.514	1.516	--	-0.517	2.682	--	--	--	-0.953	-0.985	--	0.9558	-1.40	
<i>EA</i>	<i>VP-16</i>	1.0	0.108	0.649	1.0	0.529	1.122	0.8324	1.0	0.123	0.749	1.000	0.555	1.146	--	--	3.740	--	2.905	--	--	--	--	0.9509	-10.51	
<i>EA</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.320	1.371	1.0	0.556	1.781	0.9490	1.0	0.321	1.426	1.000	0.542	1.780	-0.734	--	2.395	--	--	--	-0.900	--	--	0.9870	5.31	
<i>EM</i>	<i>EL</i>	1.0	0.233	0.864	1.0	0.420	1.870	0.9650	1.0	0.217	0.782	1.000	0.420	1.826	--	--	--	-0.671	--	-0.859	--	-0.873	--	0.9783	-1.79	
<i>EM</i>	<i>VP-16</i>	1.0	0.139	0.724	1.0	0.352	2.653	0.8004	1.0	0.198	1.013	1.000	0.346	5.028	1.218	--	--	--	--	--	--	--	--	0.9480	-4.64	
<i>EM</i>	<i>CDDP</i>	1.0	0.334	1.366	1.0	0.338	1.560	0.9330	1.0	0.331	1.346	1.000	0.337	1.537	--	--	6.672	--	--	1.437	-0.900	--	--	0.9629	2.48	

Tabla 16: Efecto de la combinación de 45 pares de combinaciones de agentes antitumorales para cada una de las líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa y MCF-7) con el ensayo colorimétrico SRB evaluando los efectos de 3 agentes comerciales (EL, VP-16 y CDDP, como compuestos puros) y 2 extractos naturales (EM y EA, como mezcla de compuestos), incluyendo aquellos en los que un agente antitumoral se combina consigo mismo, que se usan como control. Para cada caso, el *RUV* (%) se calcula como está descrito en la Ec. [22]. Nótese las diferencias en el escalado en los rangos de concentraciones presentado a la izquierda en cada una de las líneas celulares testadas.

A: RESPUESTAS PARA LA LÍNEA CELULAR TUMORAL NCI-H460

		<i>EA</i>	<i>EM</i>	<i>EL</i>	<i>VP-16</i>	<i>CDDP</i>
0-160 µg/mL)	<i>EA</i>	<i>NI-AC</i>	<i>S-AI</i> (8.5%)	<i>A-AI</i> (-6.9%)	<i>A-AI</i> (-3.4%)	<i>NI-AI</i>
(0-90 µg/mL)	<i>EM</i>	-	<i>NI-AC</i>	<i>A-AI</i> (-2.1%)	<i>A-AI</i> (-2.5%)	<i>NI-AI</i>
(0-5 µM)	<i>EL</i>	-		<i>NI-AC</i>	<i>NI-AC</i>	<i>A-AC</i> (-7.4%)
(0-200 µM)	<i>VP-16</i>	-			<i>NI-AC</i>	<i>A-AC</i> (-19.5%)
(0-30 µM)	<i>CDDP</i>	-				<i>NI-AC</i>

B: RESPUESTAS PARA LA LÍNEA CELULAR TUMORAL HeLa

		<i>EA</i>	<i>EM</i>	<i>EL</i>	<i>VP-16</i>	<i>CDDP</i>
0-160 µg/mL)	<i>EA</i>	<i>NI-AC</i>	<i>NI-AI</i>	<i>A-AI</i> (-4.1%)	<i>A-AI</i> (-9.6%)	<i>NI-AI</i>
(0-90 µg/mL)	<i>EM</i>	-	<i>NI-AC</i>	<i>A-AI</i> (-2.3%)	<i>A-AI</i> (-6.3%)	<i>NI-AI</i>
(0-5 µM)	<i>EL</i>	-	-	<i>NI-AC</i>	<i>A-AC</i> (-2.2%)	<i>NI-AC</i>
(0-100 µM)	<i>VP-16</i>	-	-	-	<i>NI-AC</i>	<i>A-AC</i> (-6.7%)
(0-30 µM)	<i>CDDP</i>	-	-	-	-	<i>NI-AC</i>

C: RESPUESTAS PARA LA LÍNEA CELULAR TUMORAL MCF-7

		<i>EA</i>	<i>EM</i>	<i>EL</i>	<i>VP-16</i>	<i>CDDP</i>
0-160 µg/mL)	<i>EA</i>	<i>NI-AC</i>	<i>S-AI</i> (2.0%)	<i>NI-AI</i>	<i>A-AI</i> (-10.5%)	<i>S-AI</i> (5.3%)
(0-90 µg/mL)	<i>EM</i>	-	<i>NI-AC</i>	<i>A-AI</i> (-2.0%)	<i>A-AI</i> (-4.6%)	<i>S-AI</i> (2.5%)
(0-5 µM)	<i>EL</i>	-	-	<i>NI-AC</i>	<i>A-AC</i> (-6.1%)	<i>A-AC</i> (-6.4%)
(0-100 µM)	<i>VP-16</i>	-	-	-	<i>NI-AC</i>	<i>A-AC</i> (-11.7%)
(0-30 µM)	<i>CDDP</i>	-	-	-	-	<i>NI-AC</i>

Otras notaciones: *S*, sinergia; *A*, antagonismo; *NI*, interacción nula; *AI*, acción independiente; y *AC*, adición de concentraciones.

4.2.8. Significados de la acción interactiva y tipo de todas las interacciones de las mezclas binarias evaluadas

Todas las demás mezclas binarias no produjeron importantes respuestas menores o mayores de lo esperado (interacción nula). Sin embargo, hubo algunos casos en los que sus efectos sinérgicos / antagónicos, en ambas reacciones, estaban dentro de $\pm 2.0\%$ del límite de confianza, por lo que la hipótesis interactiva podría ser posiblemente admitida, debido al comportamiento de la diferencia con superficie de respuesta. Se debería llevar a cabo un análisis más profundo para confirmar si hay o no una interacción. En términos del significado de la acción interactiva y el tipo de interacción (sinérgica/antagónica/interacción nula) las respuestas fueron las siguientes:

4.2.8.a) Línea celular tumoral NCI-H460

Resultados presentes en **Figura 10** y **Tabla 16**, dónde se observa que los 5 casos control (combinando el mismo agente entre sí) respondieron al modelo esperado (acción nula en un modo de AC), de los 10 casos de mezclas binarias de agentes diferentes, 6 mostraron respuestas interactivas antagonistas, mientras que 1 caso mostró una respuesta interactiva sinérgica. En los otros 3 casos, no pudieron determinarse significativamente ningún efecto. De manera específica los significados de las respuestas de mezclas binarias de agentes diferentes mostraron las siguientes características:

- EA vs EM: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto sinérgico puro y con un valor general de 8.5 % RUV.
- EA vs EL: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto antagónico puro y con un valor general de -6.9 % RUV.
- EA vs VP-16: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto antagónico predominante y con un valor general de -3.4 % RUV.
- EA vs CDDP: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto interactivo no significativo.
- EM vs EL: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto antagónico puro y con un valor general de -2.1 % RUV.
- EM vs VP-16: Mecanismo de acción puro IA con un efecto antagónico predominante y con un valor general de -2.5 % RUV.

- EM vs CDDP: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto interactivo no significativo.
- EL vs VP-16: Mecanismo de acción predominante CA con un efecto interactivo no significativo.
- EL vs CDDP: Mecanismo de acción predominante CA con un efecto antagónico puro y con un valor general de -7.4 % RUV.
- VP-16 vs CDDP: Mecanismo de acción predominante CA con un efecto antagónico predominante y con un valor general de -19.5 % RUV.

4.2.8.b) Línea celular tumoral HeLa

Resultados presentes en **Figura 11** y **Tabla 16**, dónde se observa que los 5 casos control (combinando el mismo agente entre sí) respondieron al modelo esperado (acción nula en un modo de AC), todos los casos de mezclas binarias de agentes diferentes (10 casos) mostraron respuestas interactivas antagonistas siendo sólo significativas en 6 casos. De manera específica los significados de las respuestas de mezclas binarias de agentes diferentes mostraron las siguientes características:

- EA vs EM: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto interactivo no significativo.
- EA vs EL: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto antagónico predominante y con un valor general de -4.1 % RUV.
- EA vs VP-16: Mecanismo de acción puro IA con un efecto antagónico puro y con un valor general de -9.6 % RUV.
- EA vs CDDP: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto interactivo no significativo.
- EM vs EL: Mecanismo de acción puro IA con un efecto antagónico puro y con un valor general de -2.3 % RUV.
- EM vs VP-16: Mecanismo de acción puro IA con un efecto antagónico puro y con un valor general de -6.3 % RUV.
- EM vs CDDP: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto interactivo no significativo.

EL vs VP-16: Mecanismo de acción puro CA con un efecto antagónico puro y con un valor general de -2.2 % RUV.

EL vs CDDP: Mecanismo de acción predominante CA con un efecto interactivo no significativo.

VP-16 vs CDDP: Mecanismo de acción puro CA con un efecto antagónico puro y con un valor general de -6.7 % RUV.

4.2.8.c) Línea celular tumoral MFC-7

Resultados presentes en **Figura 12** y **Tabla 16**, dónde se observa que los 5 casos control (combinando el mismo agente entre sí) respondieron al modelo esperado (acción nula en un modo de AC), de los 10 casos de mezclas binarias de agentes diferentes, 6 mostraron respuestas interactivas antagonistas, mientras que 3 casos mostraron respuestas interactivas sinérgicas. Sólo en un caso no se pudo determinar significativamente ningún efecto. De manera específica los significados de las respuestas de mezclas binarias de agentes diferentes mostraron las siguientes características:

EA vs EM: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto sinérgico predominante y con un valor general de 2.0 % RUV.

EA vs EL: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto interactivo no significativo.

EA vs VP-16: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto antagónico puro y con un valor general de -10.5 % RUV.

EA vs CDDP: Mecanismo de acción predominante IA con un efecto sinérgico puro y con un valor general de 5.3 % RUV.

EM vs EL: Mecanismo de acción puro IA con un efecto antagónico predominante y con un valor general de -2.0 % RUV.

EM vs VP-16: Mecanismo de acción puro IA con un efecto antagónico predominante y con un valor general de -4.6 % RUV.

EM vs CDDP: Mecanismo de acción puro IA con un efecto sinérgico puro y con un valor general de 2.5 % RUV.

EL vs VP-16: Mecanismo de acción predominante CA con un efecto antagónico puro y con un valor general de -6.1 % RUV.

EL vs CDDP: Mecanismo de acción predominante CA con un efecto antagónico puro y con un valor general de -6.4 % RUV.

VP-16 vs CDDP: Mecanismo de acción predominante CA con un efecto antagónico puro y con un valor general de -11.7 % RUV.

4.2.8.d) Línea celular tumoral HepG2

Aunque se hicieron hasta tres repeticiones de los ensayos, para esta línea celular los resultados experimentales no fueron satisfactorios por lo que tuvimos que renunciar a su análisis detallado. Las causas pudieron ser origen variado pero los resultados eran de muy baja reproducibilidad y se prefirió excluir de los análisis finales.

4.2.9. Otras generalidades

Regularidades en todas las líneas celulares encontradas en los resultados derivados del análisis de los resultados experimentales de interacción:

- 1) Todas las interacciones entre entidades químicas puras en todas las líneas celulares produjeron interacciones antagonistas bajo hipótesis de AC. En los compuestos de EL vs VP-16 era de esperar tales resultados, ya que como se indicó en la introducción poseían mecanismos de acción similares (fundamentalmente inhibidores de las enzimas topoisomerasa II). Sin embargo, en las relaciones binarias de EL vs CDDP y VP-16 vs CDDP, los resultados fueron un tanto sorprendidos, ya que teóricamente estos compuestos poseen modos de acción diferentes. Es posible que en las respuestas macroscópicas del SRB tales diferencias no sean esclarecidas.
- 2) Todas las combinaciones de compuestos naturales con compuestos puros muestran mecanismos interactivos de AI. Existiendo dos grupos: a) Respuestas antagonistas, que son aquellas mezclas que se producen entre los compuestos naturales y los compuestos puros de EL y VP-16 (existiendo 2 casos no significativos); y b) Respuestas sinérgicas, que se producen cuando los compuestos naturales se combinan con el compuesto CDDP (existiendo 2 casos no significativos).

5. Conclusiones

Las diferencias entre los mecanismos por los que un agente citotóxico interfiere en las células puede ser diversa (Burden and Osherooff, 1998; Calhelha et al., 2014; Moorsel and Pinedo, 1999; Ooi et al., 2011; Stiborova et al., 2006), pero dónde existe un acuerdo generalizado es en la dudosa existencia de un método universal de determinación *in vitro* (Seethala, 2001; Weyermann et al., 2005). Es común la aplicación diversos ELCT en distintas líneas tumorales para evaluar las capacidades reales *in vitro* de un compuesto determinado. Los protocolos de los ELCT se basan en laboriosos ensayos, que en ocasiones entre distintos laboratorios presentan diferencias fundamentales en la preparación, proporciones y conservación de los reactivos, incluyendo variaciones en el pH y la temperatura de trabajo, lo que limita las comparaciones rigurosas de los resultados y además implica una pérdida importante de información y el riesgo de conclusiones erróneas.

Estos problemas, repetidamente señalados, multiplicados por la diversidad de técnicas suscitadas por el interés del tema, hacen que la situación actual sea compleja. Aunque en los últimos años se ha enfatizado el esfuerzo en la revisión y la transferencia de las metodologías *in vitro* habituales hacia modelos más sofisticados (Fotakis and Timbrell, 2006; Riss et al., 2004), que permiten análisis más sencillos, rápidos y probablemente precisos, ya que permiten, con un esfuerzo experimental bajo, un análisis de los efectos de la dosis de los compuestos en estudio.

Pero, aun así, la tendencia a la rápida acumulación de datos, ha favorecido la persistencia de formalismos de cálculo simples, que a menudo conducen a conclusiones dudosas. De este modo, no es raro que investigadores hayan reclamado una unidad de criterio y estandarizaciones (Riss et al., 2004; Seethala, 2001).

Los modelos matemáticos que aquí se proponen demostraron una buena capacidad para describir los efectos citotóxicos en líneas celulares tumorales de modo individual y para evaluar la acción conjunta de varios pares de agentes citotóxicos, tanto usando agentes comerciales puros como extractos de plantas. Su aplicación permitió, en primer lugar, tipificar la actividad citotóxica en términos admitidos en el contexto de las relaciones DR. En segundo lugar, condujo a la detección y cuantificación de efectos sinérgicos y antagónicos, permitiendo identificar además modos de acción y cuantificarlos.

5.1. Modelos matemáticos para los efectos citotóxicos en líneas celulares tumorales

Desde hace más de dos décadas diversos autores (Riss et al., 2004; Seethala, 2001) señalaban que, pese a la abundante bibliografía acerca de la citotoxicidad *in vitro* de agentes tumorales, no existían modelos matemáticos que permitieran formalizar el proceso. Recientemente, otros autores (Riss et al., 2004; Vichai and Kirtikara, 2006; Weyermann et al., 2005; Zhang et al., 2007) mostraban su preocupación por la falta de criterios de cuantificación estandarizados para la multiplicidad de métodos aplicados a la determinación de los agentes tumorales, y por los resultados a menudo confusos que se producen cuando se trabaja con reacciones complejas o, más aún, cuando se pretende transferir los resultados a sistemas *in vivo*. Aunque este segundo grupo de problemas tiene muy diversas vertientes, la más elemental continúa siendo la ausencia de modelos formales que permitan al menos definir lo que se espera extraer de los diseños experimentales, establecer los dominios más adecuados para las variables independientes que se incluyen, y cuantificar parámetros que lleven a comparaciones objetivas entre los efectos de diversos agentes tumorales y los resultados de diferentes aproximaciones.

En general, caracterizar efectos DR exige determinar la curva que lo describe. Si se dispone de un modelo mecanístico, se obtienen parámetros que tienen significados precisos. Desafortunadamente estos modelos mecanísticos son complejos, muy específicos y poco frecuentes. Si las herramientas utilizadas son modelos formales, deben proporcionar una descripción razonablemente aproximada del perfil, y los significados geométricos de sus parámetros deben representar estados del sistema que tipifiquen el proceso y los efectos de posibles factores que lo alteren.

En este sentido, las herramientas matemáticas aquí propuestas representan una transferencia formal desde el campo de las relaciones DR de diversas áreas biológicas y tecnológicas. Así se consigue de este modo una solución satisfactoria, minimizando posibles sesgos debidos al error experimental, tanto aleatorio como sistemático, y se facilita el cálculo de parámetros que caracterizan diversos aspectos de la acción de agentes antitumorales. Estos resultados permiten el cálculo de índices únicos que caracterizan tanto el proceso citotóxico como la acción del agente modificador, y facilitan las comparaciones objetivas entre diferentes compuestos y métodos. Todas las herramientas se ensayaron utilizando datos experimentales propios, obtenidos para tal finalidad, produciendo en todos los casos descripciones estadísticamente significativas

El error experimental, el perfil de la respuesta, el número de observaciones y el tipo de diseño afectan el análisis DR cuyo estudio en todos los ELCT –analíticamente complejo y experimentalmente inviable– fue resuelto seleccionando el ensayo colorimétrico SRB para el analizar los efectos de DR de tres agentes comerciales (EL, VP-16 y CDDP, como compuestos puros) y dos extractos naturales (EM y EA como mezcla de compuestos) en cuatro líneas celulares tumorales (NCI-H460, HeLa, MCF-7 y HepG2) como caso de estudio.

Los resultados revelaron las inconsistencias de aquellas nociones (tales como LD_{50} , V_m , λ , LD_K o cualquier valor deseado LD_n) derivados del análisis independiente de DR de ELCT, demostrando que por sí solos, son poco sensibles a la realidad experimental, con resultados necesariamente ambiguos. Pese a las abundantes críticas del uso de un criterio único, estos persisten en casi todos los campos de la biología. Investigadores prefieren concentrar el esfuerzo en la determinación de valores como LD_{50} , aduciendo la falta de alternativas claras. Sin embargo, este trabajo demuestra que el modelado DR mediante ecuaciones algebraicas explícitas permite más opciones para calcular con precisión un conjunto de criterios para estudiar de una forma más rigurosa la respuesta (LD_{50} , V_m , λ , LD_K o LD_n). En consecuencia, se confirma la viabilidad de las alternativas propuestas y permitió discutir las condiciones que minimizan las inconsistencias en los ensayos DR de los agentes y las líneas celulares tumorales estudiadas.

Adicionalmente, los resultados revelaron las inconsistencias de aquellas dudosas nociones, confirmaron la viabilidad de las alternativas propuestas y permitieron discutir las condiciones –a menudo violadas– que minimizan los IC paramétricos en los ensayos DR. De este modo pudo prepararse una tabla Q que, con el auxilio de las usuales pruebas previas a este tipo de ensayos, facilita la formulación de diseños que conducen con buena aproximación a los IC mínimos para unas condiciones de trabajo dadas, economizan experimentación y evitan los resultados desagradablemente inesperados que a veces producen los diseños intuitivos.

5.2. Metodología y sistemas matemáticos para la identificación del modo de acción y la cuantificación del tipo de interacción

Sinergia y antagonismo son comportamientos característicos de sistemas de muy diversa naturaleza, que han sido objeto de controversia en muchos campos (Breitinger, 2012; Greco et al., 1995; Hertzberg and MacDonell, 2002; Wagner and Ulrich-Merzenich, 2009). Pese a su importancia, la caracterización habitual de estos fenómenos en el contexto de la acción citotóxica es discutible tanto por motivos de definición, como del tipo de resultados a menudo

utilizados como base para las evaluaciones cuantitativas. A pesar de la abundancia de teorías y procedimientos para describir los efectos sinérgicos y antagónicos en ELCT, a la vista de lo expuesto parecen ser simplificaciones de procesos más complejos mal enfocados. Algunas de las características que dificultan los avances en este campo incluyen la falta de:

- 1) Diseño experimental, como resultado del uso extendido de procedimientos simplistas para cuantificar los efectos de las respuestas conjuntas, basados en valores de dosis simples.
- 2) Hipótesis matemáticas detalladas para cuantificar los valores DR, lo que además causa las dificultades asociadas para evaluar la consistencia estadística de los resultados.
- 3) Enfoques funcionales que consideren la posibilidad de los efectos interactivos.

Este trabajo, propone soluciones para cada una de estas limitaciones. Se utilizan ideas establecidas de campos existentes para reemplazar los procedimientos simplistas actuales, con el fin de cuantificar los efectos de las respuestas conjuntas y se establecen hipótesis conocidas para la descripción de los efectos combinados en ELCT.

Se aplica modelos matemáticos basados en funciones de probabilidad con parámetros significativos. Los efectos interactivos entre agentes antitumorales se introducen en el modelo con funciones auxiliares simples que describen las variaciones inducidas por cada agente antitumoral en los parámetros que definen los efectos del otro. Finalmente, se propuso un índice útil capaz de resumir en un único valor numérico la naturaleza e intensidad de las interacciones sinérgicas o antagónicas.

Los modelos que aquí se proponen demostraron una buena capacidad para describir la acción conjunta de varios pares de agentes antitumorales. Su aplicación permitió, en primer lugar, tipificar la actividad antitumoral en términos de los dos modos de acción conjunta usualmente admitidos en el contexto de las relaciones DR. En segundo lugar, condujo a la detección y cuantificación de efectos sinérgicos y antagónicos, comparando, en cada modo de acción, los ajustes obtenidos bajo diferentes hipótesis de interacción con los correspondientes a la interacción nula.

Un inconveniente de los modelos es la existencia de correlaciones lineales entre los coeficientes de los términos perturbadores, que penalizan los IC de sus estimaciones tanto más cuanto mayor es el error experimental y menor el número de observaciones. Afortunadamente, el uso de lectores de microplacas facilita la obtención de datos que minimizan ambos problemas. Es de lamentar que el planteamiento aquí propuesto resulte algo

más complejo que algunas soluciones relativamente frecuentes en la bibliografía. Sin embargo, creemos que está libre de los aspectos más controvertidos de tales soluciones.

Aunque el enfoque fue experimentalmente demostrado sólo en el ensayo de SRB, los resultados podrían ser directamente expandidos en un futuro a otros modelos, sino a todos los sistemas clásicos de ELCT. Finalmente, se encontraron respuestas estadísticamente consistentes de sinergia, antagonismo y efectos nulos, cuando se caracterizaron las interacciones entre varios pares de agentes químicos puros y mezclas de compuestos.

6. Perspectivas y proyecciones del trabajo realizado

Este trabajo sólo refleja el análisis de una (la dosis) de las dos vertientes (tiempo y dosis) causantes de los problemas básicos para la cuantificación de resultados derivados del análisis de respuestas en ELCT.

Pese a las críticas a este respecto, la caracterización de las respuestas en ELCT prescinde frecuentemente (por no decir casi siempre) de los aspectos cinéticos del proceso de citotoxicidad celular. Aunque esta objeción es de menor entidad teórica que la primera, su consecuencia práctica es la misma, pudiendo causar resultados poco adecuados para detectar de un modo representativo los efectos que se intentan discernir. Admitir que caracterizar las acciones de agentes antitumorales en ELCT de un modo útil desde una vertiente de dosis despreciando el efecto del tiempo, es una simplificación práctica pero un tanto arriesgada. En la bibliografía abundan recursos que prescinden de los perfiles cinéticos, lo cual ha multiplicado la divergencia de resultados y amplificado la idea de que no es necesario su uso riguroso para obtener resultados precisos. Sin embargo, los resultados obtenidos a un único tiempo citotóxico, no sólo generan graves problemas de reproducibilidad e impiden comparaciones útiles, sino que además dificultan la evaluación de los puntos críticos susceptibles de estandarización.

Por lo tanto, podemos afirmar que este trabajo, presenta las bases para abordar esta segunda vertiente, el tiempo, para poder establecer recursos matemáticos rigurosos para la caracterización, identificación y cuantificación de la acción de agentes antitumorales *in vitro* en ELCT.

Inicialmente, esta llamada crítica a una cuidadosa rigurosidad de los ensayos *in vitro* que teóricamente son únicamente los filtros para la identificación de compuestos o modos de acción de interés previo a su aplicación en estudios clínicos *in vivo* (incluyendo animales y seres humanos), puede parecer excesiva e incluso poco realista. Sin embargo, dos razones pueden ser aludidas para justificar una aproximación rigurosa en ambos, *in vitro* e *in vivo*, escenarios de trabajo:

- 1) La formulación y el modo de trabajo metodológico de los ensayos *in vitro* son la guía experimental de los estudios clínicos *in vivo*. Estos últimos con una menor capacidad de repetición, con errores experimentales sensiblemente superiores y susceptibles a sesgos procedentes de variables difíciles de controlar. Por lo tanto, es de esperar que el descuido en

la supervisión rigurosa de los estudios *in vitro* (más flexibles y controlables) sea la causa y/o excusa para relajar el control riguroso en los estudios *in vivo*.

2) Independientemente del ámbito de trabajo *in vitro* o *in vivo*, cuando se estudian los efectos citotóxicos de agentes antitumorales, tolerar respuestas muy detalladas experimentalmente pero poco precisas en los modos de cuantificación, es actualmente al menos cuestionable. Variaciones de los efectos de cualquier agente entre 1 y 2.5% de la respuesta real (considerando como ejemplo cualquiera de las nociones paramétricas de LD_{50} , V_m , λ , LD_K o cualquier valor deseado LD_n), pueden parecer poco exageradas. Y si el agente causal fuese metabólicamente recalcitrante, acumulativo, cancerígeno, capaz de interactuar con hormonas o de unirse al ADN, el límite error del 1% parecería INACEPTABLEMENTE ALTO. Es entonces cuando los análisis en condiciones de error bajo y ejecución INUSUALMENTE RIGUROSA, como el marco de trabajo aquí estudiado, adquieren una importancia exponencial y deben aplicarse rigurosamente para facilitar el control de los resultados en todas sus vertientes.

BIBLIOGRAFÍA

- Amiri, F., Zarnani, A.-H., Zand, H., Koohdani, F., Jeddi-Tehrani, M., Vafa, M., 2013. Synergistic anti-proliferative effect of resveratrol and etoposide on human hepatocellular and colon cancer cell lines. *Eur. J. Pharmacol.* 718, 34–40.
- Andjelkovic, T., Pesic, M., Bankovic, J., Tanic, N., Markovic, I.D., Ruzdijic, S., 2014. Synergistic effects of the purine analog sulfinosine and curcumin on the multidrug resistant human non-small cell lung carcinoma cell line (NCI-H460/R). *Cancer Biol. Ther.* 7, 1024–1032.
- Ando, E., Tanaka, M., Yamashita, F., Kuromatsu, R., Yutani, S., Fukumori, K., Sumie, S., Yano, Y., Okuda, K., Sata, M., 2002. Hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombosis: Analysis of 48 cases. *Cancer* 95, 588–595.
- Apps, M.G., Choi, E.H.Y., Wheate, N.J., 2015. The state-of-play and future of platinum drugs. *Endocr. Relat. Cancer* 22, R219-33.
- Arencibia, D., Rosario, L., Curveco, D., 2003. Principales ensayos para determinar la citotoxicidad de una sustancia, algunas consideraciones y su utilidad. *Rev. Toxicol.* 40–52.
- Bae-Jump, V.L., Zhou, C., Boggess, J.F., Gehrig, P., 2009. Synergistic effect of rapamycin and cisplatin in endometrial cancer cells. *Cancer* 115, 3887–96.
- Bae, J., Lee, S., Lee, A., Park, Y., Bae, S., Park, J., Namkoong, S., 2008. Neoadjuvant cisplatin and etoposide followed by radical hysterectomy for stage 1B – 2B cervical cancer. *Gynecol. Oncol.* 111, 444–448.
- Basse, B., Baguley, B.C., Marshall, E.S., Wake, G.C., Wall, D.J.N., 2004. Modelling cell population growth with applications to cancer therapy in human tumour cell lines, in: *Progress in Biophysics and Molecular Biology*. pp. 353–368.
- Berenbaum, M.C., 1985a. Consequences of synergy between environmental carcinogens. *Environ. Res.* 38, 310–318.
- Berenbaum, M.C., 1985b. The expected effect of a combination of agents: the general solution. *J. Theor. Biol.* 114, 413–31.
- Berger, R., 1981. Comparison of the Gompertz and Logistic Equations to Describe Plant Disease Progress. *Phytopathology*.
- Bliss, C.I., 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.* 26, 585–615.
- Bliss, C.I., 1937. The calculation of the time-mortality curve. *Ann. Appl. Biol.* 24, 815–824.
- Bliss, C.I., 1935. The comparison of dosage-mortality data. *Ann. Appl. Biol.* 22, 307–333.
- Bosetti, C., Bertuccio, P., Malvezzi, M., Levi, F., Chatenoud, L., Negri, E., La Vecchia, C., 2013. Cancer mortality in Europe, 2005-2009, and an overview of trends since 1980. *Ann. Oncol.* 24, 2657–2671.
- Bray, F., Ren, J.S., Masuyer, E., Ferlay, J., 2013. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int. J. Cancer* 132, 1133–1145.
- Breitinger, H., 2012. Drug Synergy – Mechanisms and Methods of Analysis, in: *Toxicity and Drug Testing*. pp. 143–166.
- Bruix, J., Llovet, J.M., 2002. Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular

- carcinoma. *Hepatology* 35, 519–524.
- Bruix, J., Sherman, M., 2011. Management of hepatocellular carcinoma: An update. *Hepatology* 53, 1020–1022.
- Buchanan, R.L., Whiting, R.C., Damert, W.C., 1997. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi, and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 313–326.
- Burden, D., Osheroff, N., 1998. Mechanism of action of eukaryotic topoisomerase II and drugs targeted to the enzyme. *Biochim. Biophys. Acta* 1400, 139–154.
- Cabo, M.L., Murado, M.A., González, M.P.P., Pastoriza, L., 2000. Dose–response relationships. A model for describing interactions, and its application to the combined effect of nisin and lactic acid on *Leuconostoc mesenteroides*. *J. Appl. Microbiol.* 88, 756–63.
- Calhella, R.C., Falcão, S., Queiroz, M.J.R.P., Vilas-Boas, M., Ferreira, I.C.F.R., 2014. Cytotoxicity of portuguese propolis: the proximity of the in vitro doses for tumor and normal cell lines. *Biomed Res. Int.* 2014, 897361.
- Canavan, T.P., Doshi, N.R., 2000. Cervical cancer. *Am. Fam. Physician* 61, 1369–76.
- Cardoso, F., Durbecq, V., Laes, J.-F., Badran, B., Lagneaux, L., Bex, F., Desmedt, C., Willard-Gallo, K., Ross, J.S., Burny, A., Piccart, M., Sotiriou, C., 2006. Bortezomib (PS-341, Velcade) increases the efficacy of trastuzumab (Herceptin) in HER-2-positive breast cancer cells in a synergistic manner. *Mol. Cancer Ther.* 5, 3042–51.
- Cedergreen, N., Christensen, A.M., Kamper, A., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Streibig, J.C., Sørensen, H., 2008. A review of independent action compared to concentration addition as reference models for mixtures of compounds with different molecular target sites. *Environmental* 27, 1621–1632.
- Cedergreen, N., Kudsk, P., Mathiassen, S.K., Sørensen, H., Streibig, J.C., 2007. Reproducibility of binary-mixture toxicity studies. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 149–56.
- Chan, D., Miskimins, W., 2012. Metformin and phenethyl isothiocyanate combined treatment in vitro is cytotoxic to ovarian cancer cultures. *J. Ovarian Res.* 5, 1–9.
- Chignola, R., Vyshemirsky, V., Farina, M., Del Fabbro, A., Milotti, E., 2011. Modular model of TNF α cytotoxicity. *Bioinformatics* 27, 1754–7. doi:10.1093/bioinformatics/btr297
- Cohen, D.P.A., Martignetti, L., Robine, S., Barillot, E., Zinovyev, A., Calzone, L., 2015. Mathematical Modelling of Molecular Pathways Enabling Tumour Cell Invasion and Migration. *PLoS Comput. Biol.* 11.
- Colombo, N., Carinelli, S., Colombo, A., Marini, C., Rollo, D., Sessa, C., 2012. Cervical cancer: ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann. Oncol.* 23.
- Comuzzi, C., Polese, P., Melchior, A., Portanova, R., Tolazzi, M., 2003. SOLVERSTAT: a new utility for multipurpose analysis. An application to the investigation of dioxygenated Co (II) complex formation in dimethylsulfoxide solution. *Talanta* 59, 67–80.
- Csupor-Löffler, B., Hajdú, Z., Zupkó, I., Réthy, B., Falkay, G., Forgo, P., Hohmann, J., 2009. Antiproliferative effect of flavonoids and sesquiterpenoids from *Achillea millefolium* sl on cultured human tumour cell lines. *Phyther. Res.* 23, 672–676.
- Daker, M., Ahmad, M., Khoo, A., 2012. Quercetin-induced inhibition and synergistic activity with cisplatin—a chemotherapeutic strategy for nasopharyngeal carcinoma cells. *Cancer Cell Int.* 12, 1–8.

- Danny R. Youlden, Susanna M. Cramba, Nathan A.M. Dunnb, Jennifer M. Muller b, Christopher M. Pyke c, P.D.B., 2012. The descriptive epidemiology of female breast cancer: An international comparison of screening, incidence, survival and mortality. *Cancer Epidemiol.* 36, 237–248.
- De Groot, P., Munden, R.F., 2012. Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention. *Radiol. Clin. North Am.* 50, 863–876.
- De Lean, A., Munson, P.J., Rodbard, D., 1978. Simultaneous analysis of families of sigmoidal curves: application to bioassay, radioligand assay, and physiological dose-response curves. *Am. J. Physiol.* 235, E97-102.
- Dehn, P., White, C., Connors, D., 2004. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *Vitr. Cell.* 40, 172–182.
- Dias, M.I., Barros, L., Dueñas, M., Pereira, E., Carvalho, A.M., Alves, R.C., Oliveira, M.B.P.P., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., 2013. Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. *Food Chem.* 141, 4152–60.
- Du, Q., Hu, B., An, H.M., Shen, K.P., Xu, L., Deng, S., Wei, M.-M., 2013. Synergistic anticancer effects of curcumin and resveratrol in Hepa1-6 hepatocellular carcinoma cells. *Oncol. Rep.* 29, 1851–8.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H., 2003. Joint algal toxicity of 16 dissimilarly acting chemicals is predictable by the concept of independent action. *Aquat. Toxicol.* 63, 43–63.
- Faust, M., Altenburger, R., Backhaus, T., Blanck, H., Boedeker, W., Gramatica, P., Hamer, V., Scholze, M., Vighi, M., Grimme, L.H., 2001. Predicting the joint algal toxicity of multi-component s-triazine mixtures at low-effect concentrations of individual toxicants. *Aquat. Toxicol.* 56, 13–32.
- Ferlay, J., Steliarova-Foucher, E., Lortet-Tieulent, J., Rosso, S., Coebergh, J.W.W., Comber, H., Forman, D., Bray, F., 2013. Cancer incidence and mortality patterns in Europe: Estimates for 40 countries in 2012. *Eur. J. Cancer* 49, 1374–1403.
- Fitzgerald, J.B., Schoeberl, B., Nielsen, U.B., Sorger, P.K., 2006. Systems biology and combination therapy in the quest for clinical efficacy. *Nat. Chem. Biol.* 2, 458–66.
- Florea, A.-M., Büsselberg, D., 2011. Cisplatin as an anti-tumor drug: cellular mechanisms of activity, drug resistance and induced side effects. *Cancers (Basel)*. 3, 1351–71.
- Forner, A., Llovet, J.M., Bruix, J., 2012. Hepatocellular carcinoma. *Lancet* 379, 1245–1255.
- Fotakis, G., Timbrell, J.A., 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicol. Lett.* 160, 171–177.
- Fréchet, M., 1927. Sur la loi de probabilité de l'écart maximum. *Ann. la Société Pol. Math.* 6, 93–116.
- Fridlender, M., Kapulnik, Y., Koltai, H., 2015. Plant derived substances with anti-cancer activity: from folklore to practice. *Front. Plant Sci.* 6, 799.
- Friedlander, M., Grogan, M., 2002. Guidelines for the treatment of recurrent and metastatic cervical cancer. *Oncologist* 7, 342–7.
- Ganguly, R., Puri, I.K., 2007. Mathematical model for chemotherapeutic drug efficacy in

- arresting tumour growth based on the cancer stem cell hypothesis. *Cell Prolif.* 40, 338–354.
- Gazdar, A.F., Girard, L., Lockwood, W.W., Lam, W.L., Minna, J.D., 2010. Lung cancer cell lines as tools for biomedical discovery and research. *J. Natl. Cancer Inst.* 102, 1310–21.
- Gerlee, P., Anderson, A.R.A., 2009. Evolution of cell motility in an individual-based model of tumour growth. *J. Theor. Biol.* 259, 67–83.
- Gessner, P.K., 1988. A straightforward method for the study of drug interactions: an isobolographic analysis primer. *Int. J. Toxicol.* 7, 987–1012.
- Giovannetti, E., Mey, V., Nannizzi, S., 2005. Cellular and pharmacogenetics foundation of synergistic interaction of pemetrexed and gemcitabine in human non-small-cell lung cancer cells. *Mol. Pharmacol.* 68, 110–118.
- Goldhirsch, A., Winer, E.P., Coates, A.S., Gelber, R.D., Piccart-Gebhart, M., Thrlimann, B., Senn, H.J., Albain, K.S., Andre, F., Bergh, J., Bonnefoi, H., Bretel-Morales, D., Burstein, H., Cardoso, F., Castiglione-Gertsch, M., Coates, A.S., Colleoni, M., Costa, A., Curigliano, G., Davidson, N.E., Leo, A. Di, Ejlertsen, B., Forbes, J.F., Gelber, R.D., Gnant, M., Goldhirsch, A., Goodwin, P., Goss, P.E., Harris, J.R., Hayes, D.F., Hudis, C.A., Ingle, J.N., Jassem, J., Jiang, Z., Karlsson, P., Loibl, S., Morrow, M., Namer, M., Osborne, C.K., Partridge, A.H., Penault-Llorca, F., Perou, C.M., Piccart-Gebhart, M.J., Pritchard, K.I., Rutgers, E.J.T., Sedlmayer, F., Semiglazov, V., Shao, Z.M., Smith, I., Thrlimann, B., Toi, M., Tutt, A., Untch, M., Viale, G., Watanabe, T., Wilcken, N., Winer, E.P., Wood, W.C., 2013. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: Highlights of the st gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast Cancer 2013. *Ann. Oncol.* 24, 2206–2223.
- Gompertz, B., 1825. On the Nature of the Function Expressive of the Law of Human Mortality, and on a New Mode of Determining the Value of Life Contingencies. *Philos. Trans. R. Soc. London* 115, 513–583.
- Goutelle, S., Maurin, M., Rougier, F., Barbaut, X., Bourguignon, L., Ducher, M., Maire, P., 2008. The Hill equation: a review of its capabilities in pharmacological modelling. *Fundam. Clin. Pharmacol.* 22, 633–48.
- Greco, W.R., Bravo, G., Parsons, J.C., 1995. The search for synergy: a critical review from a response surface perspective. *Pharmacol. Rev.* 47, 331–385.
- Groten, J.P., 2000. Mixtures and interactions. *Food Chem. Toxicol.* 38, S65-71.
- Hastak, K., Alli, E., Ford, J.M., 2010. Synergistic chemosensitivity of triple-negative breast cancer cell lines to poly(ADP-Ribose) polymerase inhibition, gemcitabine, and cisplatin. *Cancer Res.* 70, 7970–80.
- Hayden, A., Johnson, P.W.M., Packham, G., Crabb, S.J., 2011. S-adenosylhomocysteine hydrolase inhibition by 3-deazaneplanocin A analogues induces anti-cancer effects in breast cancer cell lines and synergy with both histone deacetylase and HER2 inhibition. *Breast Cancer Res. Treat.* 127, 109–19.
- Heider, U., Von Metzler, I., Kaiser, M., Rosche, M., Sterz, J., Rötzer, S., Rademacher, J., Jakob, C., Fleissner, C., Kuckelkorn, U., Kloetzl, P.-M., Sezer, O., 2008. Synergistic interaction of the histone deacetylase inhibitor SAHA with the proteasome inhibitor bortezomib in mantle cell lymphoma. *Eur. J. Haematol.* 80, 133–42.
- Hertzberg, R.C., MacDonell, M.M., 2002. Synergy and other ineffective mixture risk definitions. *Sci. Total Environ.* 288, 31–42.
- Hespanhol, V., Parente, B., Araújo, A., 2013. Lung cancer in Northern Portugal: A hospital-

- based study. *Rev. Port. Pneumol.* 19, 245–251.
- Hewlett, P., Plackett, R.L., 1964. A unified theory for quantal responses to mixtures of drugs: competitive action. *Biometrics* 20, 566–575.
- Hill, A.V., 1913. The combinations of haemoglobin with oxygen and with carbon monoxide. I. *Biochem. J.* 470–480.
- Holliday, D.L., Speirs, V., 2011. Choosing the right cell line for breast cancer research.
- Hortobagyi, G.N., De, J., Salazar, G., Amadori, D., Haidinger, R., Hudis, C.A., Khaled, H., Liu, M., Martin, M., Namer, M., Shaughnessy, J.A.O., Shen, Z.Z., 2005. Variations in Epidemiology and Survival review. *Clin. Breast Cancer* 6, 391–401.
- Huang, D., Ou, B., Prior, R.L., Ronald, L., 2005. The chemistry behind antioxidant capacity assays. *J. Agric. Food Chemistry* 53, 1841–56.
- Institute of Medicine, 2007. *Cancer Control Opportunities in Low- and Middle-Income Countries*, CA: A Cancer Journal for Clinicians.
- Jemal, A., Center, M.M., DeSantis, C., Ward, E.M., 2010. Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends. *Cancer Epidemiol. biomarkers Prev.* 19, 1893–907.
- Ji, D., Zhang, Z., Cheng, L., Chang, J., Wang, S., Zheng, B., Zheng, R., Sun, Z., Wang, C., Zhang, Z., Liu, R., Zhang, X., Liu, X., Wang, X., Li, J., 2014. The combination of RAD001 and MK-2206 exerts synergistic cytotoxic effects against PTEN mutant gastric cancer cells: involvement of MAPK-dependent autophagic, but not apoptotic cell death pathway. *PLoS One* 9, e85116.
- Johnson, K. a, Goody, R.S., 2011. The original Michaelis constant: translation of the 1913 Michaelis-Menten paper. *Biochemistry* 50, 8264–9.
- Jonker, M.J., Svendsen, C., Bedaux, J.J.M., Bongers, M., Kammenga, J.E., 2005. Significance testing of synergistic/antagonistic, dose level-dependent, or dose ratio-dependent effects in mixture dose-response analysis. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 2701–2713.
- Kane, A., 2004. Dose response concepts. *Toxicology* 1–14.
- Keepers, Y., Pizao, P., Peters, G., 1991. Comparison of the sulforhodamine B protein and tetrazolium (MTT) assays for in vitro chemosensitivity testing. *Eur. J. Cancer* 27, 897–900.
- Kemmer, G., Keller, S., 2010. Nonlinear least-squares data fitting in Excel spreadsheets. *Nat.Protocols* 5, 267–281.
- Klaus, C.R., Iwanowicz, D., Johnston, D., Campbell, C.A., Smith, J.J., Moyer, M.P., Copeland, R.A., Olhava, E.J., Scott, M.P., Pollock, R.M., Daigle, S.R., Raimondi, A., 2014. DOT1L Inhibitor EPZ-5676 Displays Synergistic Antiproliferative Activity in Combination with Standard of Care Drugs and Hypomethylating Agents in MLL - Rearranged Leukemia Cells s. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 350, 646–656.
- Knutson, S.K., Warholic, N.M., Johnston, L.D., Klaus, C.R., Wigle, T.J., Iwanowicz, D., Littlefield, B. a, Porter-Scott, M., Smith, J.J., Moyer, M.P., Copeland, R. a, Pollock, R.M., Kuntz, K.W., Raimondi, A., Keilhack, H., 2014. Synergistic Anti-Tumor Activity of EZH2 Inhibitors and Glucocorticoid Receptor Agonists in Models of Germinal Center Non-Hodgkin Lymphomas. *PLoS One* 9, e111840.
- Kozaki, K., Koshikawa, K., Tatematsu, Y., 2001. Multi-faceted analyses of a highly metastatic human lung cancer cell line NCI-H460-LNM35 suggest mimicry of inflammatory cells in metastasis. *Oncogene* 20, 4228–4234.
- Kreis, W., Budman, D., Calabro, A., 1997. Unique synergism or antagonism of combinations

- of chemotherapeutic and hormonal agents in human prostate cancer cell lines. *Br. J. Urol.* 79, 196–202.
- Lacks, H., n.d. Skloot, Rebecca - *The Immortal Life Of*.
- Laird, A., Tyler, S., Barton, A., 1965. Dynamics of normal growth. *Growth* 29, 233–48.
- Landry, J.J.M., Pyl, P.T., Rausch, T., Zichner, T., Tekkedil, M.M., Stütz, A.M., Jauch, A., Aiyar, R.S., Pau, G., Delhomme, N., Gagneur, J., Korbel, J.O., Huber, W., Steinmetz, L.M., 2013. The Genomic and Transcriptomic Landscape of a HeLa Cell Line 3, 1213–1224.
- Levenson, A., Jordan, V.C., 1997. MCF-7 : The First Hormone-responsive Breast Cancer Cell Line. *Cancer Res.* 57, 3071–3079.
- Lever, M., Maini, P.K., van der Merwe, P.A., Dushek, O., 2014. Phenotypic models of T cell activation. *Nat. Rev. Immunol.* 14, 619–629.
- Li, H., Wu, X., Cheng, X., 2016. Advances in diagnosis and treatment of metastatic cervical cancer 27, 1–20.
- Li, Z.Y., Luo, L., Hu, Y.H., Chen, H., Den, Y.K., Tang, L., Liu, B., Liu, D., Zhang, X.Y., 2016. Lung cancer screening: a systematic review of clinical practice guidelines. *Int. J. Clin. Pract.* 70, 20–30.
- Linamaría, E.M., Paola, A.A., Aristizábal, F.A., 2009. Valoración de dos métodos de tinción en ensayos de citotoxicidad sobre líneas celulares tumorales. *Rev. Colomb. Biotecnol.* XI, 49–56.
- Liu, N., Tai, S., Ding, B., Thor, R.K., Bhuta, S., Sun, Y., Huang, J., 2012. Arsenic trioxide synergizes with everolimus (Rad001) to induce cytotoxicity of ovarian cancer cells through increased autophagy and apoptosis. *Endocr. Relat. Cancer* 19, 711–23.
- Loewe, S., Muischnek, H., 1926. Über Kombinationswirkungen. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 114, 313–326.
- Longo-Sorbello, G.S.A., Saydam, G., Banerjee, D., Bertino, J.R., 2006. Cytotoxicity and cell growth assays, in: *Cell Biology, Four-Volume Set*. pp. 315–324.
- López-Terrada, D., Cheung, S.W., Finegold, M.J., Knowles, B.B., 2009. Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum. Pathol.* 40, 1512–1515.
- Luchenko, V.L., Salcido, C.D., Zhang, Y., Agama, K., Komlodi-Pasztor, E., Murphy, R.F., Giaccone, G., Pommier, Y., Bates, S.E., Varticovski, L., 2014. Schedule-dependent synergy of histone deacetylase inhibitors with DNA damaging agents in small cell lung cancer. *Cell Cycle* 10, 3119–3128.
- Lukka, H., Hirte, H., Fyles, A., Thomas, G., Elit, L., Johnston, M., 2002. Concurrent Cisplatin-based Chemotherapy plus Radiotherapy for Cervical Cancer – a Meta-analysis 203–212.
- Luszczek, W., Cheriya, V., Mekhail, T.M., Borden, E.C., 2010. Combinations of DNA methyltransferase and histone deacetylase inhibitors induce DNA damage in small cell lung cancer cells: correlation of resistance with IFN-stimulated gene expression. *Mol. Cancer Ther.* 9, 2309–21.
- Ma, J., Maliepaard, M., Nooter, K., 1998. Synergistic cytotoxicity of cisplatin and topotecan or SN-38 in a panel of eight solid-tumor cell lines in vitro. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 41, 307–316.
- Melton, S., 1983. Methodology for following lipid oxidation in muscle foods. *Food Technol.* 37, 105–111.

- Michaelis, L., Menten, M., 1913. Die kinetik der invertinwirkung. *Biochem. Zeitung* 49, 333–369.
- Miller, C.M., McCarthy, F.O., 2012. Isolation, biological activity and synthesis of the natural product ellipticine and related pyridocarbazoles. *RSC Adv.* 2, 8883.
- Mitscherlich, E.A., 1919. Ein Beitrag zum Gesetze des Pflanzenwachstums Fiihling's Landw. Zeit 68, 130–133.
- Moitra, K., Im, K., Limpert, K., Borsa, A., Sawitzke, J., Robey, R., Yuhki, N., Savan, R., Huang, D.W., Lempicki, R. a, Bates, S., Dean, M., 2012. Differential gene and microRNA expression between etoposide resistant and etoposide sensitive MCF7 breast cancer cell lines. *PLoS One* 7, e45268.
- Montecucco, A., Zanetta, F., Biamonti, G., 2015. Molecular mechanisms of etoposide. *EXCLI J.* 14, 95–108.
- Monteiro, L.D.S., Bastos, K.X., Barbosa-filho, J.M., Athayde-filho, P.F. De, Fátima, M. De, Diniz, F.M., Sobral, M.V., 2014. Medicinal Plants and Other Living Organisms with Antitumor Potential against Lung Cancer. Evidence-Based Complement. Altern. Med. ID 604152, 15.
- Moorsel, C.V., Pinedo, H., 1999. Mechanisms of synergism between cisplatin and gemcitabine in ovarian and non-small-cell lung cancer cell lines. *Br. J. Cancer* 80, 981–990.
- Murado, M.A., González, M.P., Vázquez, J.A., 2002. Dose-response relationships: an overview, a generative model and its application to the verification of descriptive models. *Enzyme Microb. Technol.* 31, 439–455.
- Murado, M.A., Prieto, M.A., 2013a. Dose-Response Analysis in the Joint Action of Two Effectors. A New Approach to Simulation, Identification and Modelling of Some Basic Interactions. *PLoS One* 8, e61391.
- Murado, M.A., Prieto, M.A., 2013b. NOEC and LOEC as merely concessive expedients: Two unambiguous alternatives and some criteria to maximize the efficiency of dose–response experimental designs. *Sci. Total Environ.* 461–462, 576–586.
- Murado, M.A., Vazquez, J.A., 2007. The notion of hormesis and the dose-response theory: a unified approach. *J. Theor. Biol.* 244, 489–499.
- Murado, M.A., Vázquez, J.A., 2010. Mathematical model for the characterization and objective comparison of antioxidant activities. *J. Agric. Food Chemistry* 58, 1622–1629.
- Murai, J., Zhang, Y., Morris, J., Ji, J., 2014. Rationale for poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibitors in combination therapy with camptothecins or temozolomide based on PARP trapping versus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 349, 408–416.
- Núñez, C., Capelo, J.L., Igrejas, G., Alfonso, A., Botana, L.M., Lodeiro, C., 2016. An overview of the effective combination therapies for the treatment of breast cancer. *Biomaterials* 97, 34–50.
- Olinick, M., 2009. Tumor Growth Models.
- Ooi, K.L., Muhammad, T.S.T., Tan, M.L., Sulaiman, S.F., 2011. Cytotoxic, apoptotic and anti- α -glucosidase activities of 3,4-di-O-caffeoyl quinic acid, an antioxidant isolated from the polyphenolic-rich extract of *Elephantopus mollis* Kunth. *J. Ethnopharmacol.* 135, 685–95.
- Özilgen, S., Özilgen, M., 1990. Kinetic Model of Lipid Oxidation in Foods. *J. Food Sci.* 55, 498–501.

- Parasramka, M., Gupta, S.V., 2012. Synergistic effect of garcinol and curcumin on antiproliferative and apoptotic activity in pancreatic cancer cells. *J. Oncol.* 2012, 709739.
- Parkin, D.M., Pisani, P., Ferlay, J., 1999. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int. J. Cancer* 80, 827–841.
- Peschel, W., 1938. Mathematical methods for growth studies of trees and forest stands and the results of their application. *Tharandter Forstl. Jahrbuch* 89, 169–247.
- Poma, P., Notarbartolo, M., Labbozzetta, M., Sanguedolce, R., Alaimo, A., Carina, V., Maurici, A., Cusimano, A., Cervello, M., D'alessandro, N., 2006. Antitumor effects of the novel NF- κ B inhibitor dehydroxymethyl-epoxyquinomicin on human hepatic cancer cells: Analysis of synergy with cisplatin and of possible. *Int. J. Oncol.* 28, 923–930.
- Prieto, M.A., Murado, M.A., 2014. Oversimplification and Overstandardization in Biological Methods: Sperm Bioassays in Ecotoxicology as a Case of Study and a Proposal for Their Reformulation,. *Sci. World J.* 13 pages.
- Prieto, M.A., Murado, M.A., Vázquez, J.A., 2014. Quantification, characterization and description of synergy and antagonism in the antioxidant response. *Food Res. Int.* 60, 218–229.
- Prieto, M.A., Vázquez, J.A., 2014. In vitro determination of the lipophilic and hydrophilic antioxidant capacity of unroasted coffee bean extracts and their synergistic and antagonistic effects. *Food Res. Int.* 64, 1183–1196.
- Prieto, M.A., Vázquez, J.A., Murado, M.A., 2015. A new and general model to describe, characterize, quantify and classify the interactive effects of temperature and pH on the activity of enzymes. *Analyst* 140, 3587–602.
- Prieto, M.A., Vázquez, J.A., Murado, M.A., 2012. Comparison of several mathematical models for describing the joint effect of temperature and ph on glucanex activity. *Biotechnol. Prog.* 28, 372–381.
- Prieto, M.A., Curran, T., Gowen, A., Vázquez, J., 2015. An efficient methodology for quantification of synergy and antagonism in single electron transfer antioxidant assays. *Food Res. Int.* 67, 284–298.
- Qin, T., Youssef, E.M., Jelinek, J., Chen, R., Yang, A.S., Garcia-Manero, G., Issa, J.-P.J., 2007. Effect of cytarabine and decitabine in combination in human leukemic cell lines. *Clin. Cancer Res.* 13, 4225–32.
- Rello-Varona, S., Gámez, A., Moreno, V., Stockert, J.C., Cristóbal, J., Pacheco, M., Cañete, M., Juarranz, A., Villanueva, A., 2006. Metaphase arrest and cell death induced by etoposide on HeLa cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 38, 2183–95.
- Rescifina, A., Zagni, C., Varrica, M.G., Pistarà, V., Corsaro, A., 2014. Recent advances in small organic molecules as DNA intercalating agents: synthesis, activity, and modeling. *Eur. J. Med. Chem.* 74, 95–115.
- Rial, D., Vázquez, J.A., Menduiña, A., García, A.M., González, M.P., Mirón, J., Murado, M.A., 2013. Toxicity of binary mixtures of oil fractions to sea urchin embryos. *J. Hazard. Mater.* 263 Pt 2, 431–40.
- Richards, F.J., 1959. A flexible growth function for empirical use. *J. Exp. Bot.* 10, 290–301.
- Riss, T., Moravec, R., Niles, A., Benink, H., 2004. Cell viability assays, in: *Assay Guidance Manual*. pp. 1–20.
- Rojas, M., Salmen, S., Berrueta, L., 2009. Muerte celular programada: I. Activación y mecanismos de regulación. *Rev. Médica la Extensión Port.* 3, 90–101.

- Rosin, P., Rammler, E., 1933. The laws governing the fineness of powdered coal. *J. Inst. Fuel* 7, 29–36.
- Sahai, E., Marshall, C.J., 2003. Differing modes of tumour cell invasion have distinct requirements for Rho/ROCK signalling and extracellular proteolysis. *Nat. Cell Biol.* 5, 711–719.
- Salas Fragomeni, R., Chung, H.W., Landesman, Y., Senapedis, W., Saint-Martin, J.-R., Tsao, H., Flaherty, K.T., Shacham, S., Kauffman, M., Cusack, J.C., 2013. CRM1 and BRAF inhibition synergize and induce tumor regression in BRAF-mutant melanoma. *Mol. Cancer Ther.* 12, 1171–9.
- Seethala, R., 2001. Handbook of drug screening, Drug discovery today.
- Shahani, S., Hamzkanlu, N., Zakeri, N., Hosseinimehr, S.J., 2015. Research in Molecular Medicine Synergistic Anti-tumoral Effect of *Achillea millefolium* Combined with Bleomycin on Prostate Cancer Cells. *Res. Mol. Med.* 3, 10–15.
- Shi, P., Tsai, C.-L., 2002. Regression Model Selection: A Residual Likelihood Approach. *J. R. Stat. Soc. B Statistical Methodol.* 64, 237–252.
- Shi, Y., Fu, X., Hua, Y., Han, Y., Lu, Y., Wang, J., 2012. The side population in human lung cancer cell line NCI-H460 is enriched in stem-like cancer cells. *PLoS One* 7, e33358.
- Shoemaker, R.H., 2006. The NCI60 human tumour cell line anticancer drug screen. *Nat. Rev. Cancer* 6, 813–823.
- Siegel, R., Desantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., Cooper, D., Gansler, T., Lerro, C., Fedewa, S., 2012. Cancer Treatment and Survivorship Statistics. CA: a cancer journal for clinicians 64, 1–22.
- Son, J.W., 2012. Year-in-Review of Lung Cancer. *Tuberc. Respir. Dis. (Seoul)*. 73, 137–142.
- Sørensen, H., Cedergreen, N., Skovgaard, I.M., Streibig, J.C., 2007. An isobole-based statistical model and test for synergism/antagonism in binary mixture toxicity experiments. *Environ. Ecol. Stat.* 14, 383–397.
- Stiborová, M., Poljaková, J., Martínková, E., Bořek-Dohalská, L., Eckschlager, T., Kizek, R., Frei, E., 2011. Ellipticine cytotoxicity to cancer cell lines - a comparative study. *Interdiscip. Toxicol.* 4, 98–105.
- Stiborova, M., Rupertovaa, M., Schmeiserb, H.H., Freib, E., 2006. Molecular mechanisms of antineoplastic action of an anticancer drug ellipticine. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 150, 13–23.
- Stiborová, M., Sejbal, J., Bořek-Dohalská, L., 2004. The anticancer drug ellipticine forms covalent DNA adducts, mediated by human cytochromes P450, through metabolism to 13-hydroxyellipticine and ellipticine N2-. *Cancer Res.* 64, 8374–8380.
- Stuckler, D., Singhal, J., Singhal, S., 2005. RLIP76 Transports Vinorelbine and Mediates Drug Resistance in Non-Small Cell Lung Cancer. *Cancer Res.* 65, 991–999.
- Tai, S., Sun, Y., Liu, N., Ding, B., Hsia, E., Bhuta, S., Thor, R.K., Damoiseaux, R., Liang, C., Huang, J., 2012. Combination of Rad001 (everolimus) and propachlor synergistically induces apoptosis through enhanced autophagy in prostate cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* 11, 1320–31.
- Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., 2005. Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res.* 65, 3336–3347.
- Tallarida, R.J., 2011. Quantitative methods for assessing drug synergism. *Genes Cancer* 2,

1003–8.

- Tamhane, C., Hochberg, Y., Dunnett, C.W., 1996. Multiple test procedures for dose finding. *Biometrics* 52, 21–37.
- Teixeira, S., Guimarães, I., 2013. Metformin synergistically enhances antiproliferative effects of cisplatin and etoposide in NCI-H460 human lung cancer cells. *J. Bras. Pneumology* 39, 644–649.
- Thun, M.J., DeLancey, J.O., Center, M.M., Jemal, A., Ward, E.M., 2009. The global burden of cancer: Priorities for prevention. *Carcinogenesis* 31, 100–110.
- Tjørve, E., Collette, L., 2003. Shapes and functions of species – area curves : a review of possible models 827–835.
- Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-tieulent, J., Jemal, A., 2015. Global Cancer Statistics, 2012. *CA a cancer J. Clin.* 65, 87–108.
- Trogl, J., Benediktova, K., 2011. Empirical comparison of seven two-parameter sigmoid equations for the evaluation of the concentration–response curves from standard acute ecotoxicity. *Int. J. Environ. Res* 5, 989–998.
- Tsoularis, A., Wallace, J., 2002. Analysis of logistic growth models. *Math. Biosci.* 179, 21–55.
- Vázquez, J.A., Lorenzo, J.M., Fuciños, P., Franco, D., 2012. Evaluation of non-linear equations to model different animal growths with mono and bisigmoid profiles. *J. Theor. Biol.* 314C, 95–105.
- Vazquez, J.A., Nogueira, M., Duran, A., Prieto, M.A., Rodriguez-Amado, I., Rial, D., Gonzalez, M.P., Murado, M.A., 2011. Preparation of marine silage of swordfish, ray and shark visceral waste by lactic acid bacteria. *J. Food Eng.* 103, 442–448.
- Verhulst, P., 1845. Recherches mathématiques sur la loi d'accroissement de la population. *Nouv. mémoires l'Academie R. des Sci. B.-lett. Bruxelles* 18, 1–41.
- Verhulst, P., 1838. Notice sur la loi que la population poursuit dans son accroissement. *Corresp. mathématique Phys.* 10, 113–121.
- Vichai, V., Kirtikara, K., 2006. Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nat. Protoc.* 1, 1112–6.
- Vølund, A., 1992. Dose response surface bioassay. Hamilton, New Zealand, p. In XVth Biometric Conference, vol II., 349.
- Vujic, I., Sanlorenzo, M., Posch, C., 2015. Metformin and trametinib have synergistic effects on cell viability and tumor growth in NRAS mutant cancer. *Oncotarget* 6.
- Waclaw, B., Bozic, I., Pittman, M.E., Hruban, R.H., Vogelstein, B., Nowak, M.A., 2015. A spatial model predicts that dispersal and cell turnover limit intratumour heterogeneity. *Nature* 525, 261–264.
- Wagner, H., Ulrich-Merzenich, G., 2009. Synergy research: approaching a new generation of phytopharmaceuticals. *Phytomedicine* 16, 97–110.
- Weibull, W., 1939. A statistical theory of the strength of materials.
- Weibull, W., Sweden, S., 1951. A statistical distribution function of wide applicability. *J. Appl. Mech.* 18, 293–297.
- Weidle, U.H., Birzele, F., Kollmorgen, G., Rüger, R., 2016. Molecular Basis of Lung Tropism of Metastasis. *Cancer Genomics Proteomics* 13, 129–140.
- Weiss, A., Bonvin, D., Berndsen, R.H., Scherrer, E., Wong, T.J., Dyson, P.J., Griffioen,

-
- A.W., Nowak-Sliwinska, P., 2015. Angiostatic treatment prior to chemo- or photodynamic therapy improves anti-tumor efficacy. *Sci. Rep.* 5, 8990.
- Weyermann, J., Lochmann, D., Zimmer, A., 2005. A practical note on the use of cytotoxicity assays. *Int. J. Pharm.* 288, 369–376.
- Wilson, D.L., 1994. The analysis of survival (mortality) data: fitting Gompertz, Weibull, and logistic functions. *Mech. Ageing Dev.* 74, 15–33.
- Winsor, C., 1932. The Gompertz curve as a growth curve. *Natl. Acad. Sci.* 18.
- Xiao, H., Zhang, Q., Lin, Y., Reddy, B.S., Yang, C.S., 2008. Combination of atorvastatin and celecoxib synergistically induces cell cycle arrest and apoptosis in colon cancer cells. *Int. J. cancer* 122, 2115–24.
- Yin, N., Ma, W., Pei, J., Ouyang, Q., Tang, C., Lai, L., 2014. Synergistic and antagonistic drug combinations depend on network topology. *PLoS One* 9, e93960.
- Zhang, M., Aguilera, D., Das, C., Vasquez, H., Zage, P., Gopalakrishnan, V., Wolff, J., 2007. Measuring Cytotoxicity : A New Perspective on LC 50. *Bioscience* 38, 35–38.
- Zhou, Y., Brattain, M., 2005. Synergy of epidermal growth factor receptor kinase inhibitor AG1478 and ErbB2 kinase inhibitor AG879 in human colon carcinoma cells is associated with. *Cancer Res.* 5848–5857.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Riet, K., 1990. Modeling of the bacterial growth curve. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1875–81.