



UNIVERSIDAD DE BELGRANO

# Las tesis de Belgrano

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Carrera de Licenciatura en Ciencias Biológicas

Efectos de drogas citotóxicas sobre células HEP-2  
y U-937

Nº 186

M. Paula Isolabella

Tutora: Inés M. I. Bignone

Departamento de Investigación  
Septiembre 2005



## Dedicatoria

A mamá y papá.

*A Sofía, Agustina y Gustavo*



## Resumen:

El objetivo del presente estudio fue analizar en forma comparativa distintos métodos para determinar muerte celular, paso previo a su aplicación en la investigación de nuevas drogas o procedimientos citotóxicos. Se eligió utilizar un conjunto de agentes bien caracterizados y otros en desarrollo, para evaluar la utilidad y limitaciones de cada método.

Se estudiaron dos líneas celulares: una adherente (la línea celular HEP-2, proveniente de un carcinoma epidérmico de la región oro faríngea humana) y otra en suspensión (la línea celular U937, proveniente de un linfoma histiocítico humano). Las mismas fueron enfrentadas con concentraciones variables de las drogas Doxorubicina, Mitomicina, Crotolina y Ciclofosfamida.

Los métodos para evaluar citotoxicidad fueron:

1. citomorfológico (mediante tinción con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio, evaluado por microscopía de fluorescencia)
2. citometría de flujo (mediante marcación con yoduro de propidio y anexina, evaluado en un citómetro FACSORT)
3. fragmentación del DNA (evaluado por electroforesis en geles de agarosa)
4. reducción del colorante MTT (con formación de formazan y lectura en espectrofotómetro).

Se analizó gráficamente, determinando  $IC_{50}$  para cada droga con los diferentes métodos. Los valores aquí presentados corresponden a los ensayos de reducción de MTT, para las células U937 son: DOR 0,5 mg/ml, MMC entre 12.5 mg/ml y 50 mg/ml, CT no se pudo determinar, CD 3 mg/ml, CT+CD 6.25  $\mu$ g/ml.

Para las células HEP-2 los valores de  $IC_{50}$  son: DOR: 2  $\mu$ g/ml, MMC: no se pudo determinar, CT: no se pudo determinar, CD: 6.25  $\mu$ g/ml, CT+CD: 3.125  $\mu$ g/ml y 6.25  $\mu$ g/ml.

De la comparación de ellos surge como preferible la reducción del MTT por su mayor objetividad (independencia del observador) y facilidad instrumental. Sin embargo, cada uno tiene alguna faceta aprovechable (bajo costo y simpleza para la microscopía), análisis detallado célula a célula (la citometría) o detección de un punto final no discutible (fragmentación del DNA).



# Índice

Resumen .....	5
Introducción .....	9
Citotoxicidad .....	9
Marco Referencial .....	10
Antibióticos antineoplásicos .....	11
Agentes Alquilantes .....	12
Crotoxina .....	13
Materiales y Métodos	
Células utilizadas .....	13
Drogas .....	14
Medición de citotoxicidad .....	15
Curvas dosis-respuesta .....	15
Viabilidad mediante NA y BE .....	15
Marcación para citometría de flujo .....	15
Ensayo de viabilidad MTT .....	15
Escalera ( <i>ladder</i> ) de DNA .....	16
Estadística .....	16
Resultados	
Cultivos celulares .....	17
Citometría de flujo .....	22
Curvas dosis-respuesta .....	26
Discusión .....	33
Agradecimientos .....	35
Bibliografía .....	36





## Introducción

La muerte celular por citotoxicidad es un mecanismo fisiológico crítico en múltiples procesos biológicos, que pueden ser útiles para el organismo (por ejemplo la defensa contra infecciones o tumores) como deletéreos (el daño causado por diferentes tóxicos ambientales). Su manipulación es una de las áreas más intensamente investigadas en farmacología, ya que su apropiada comprensión y control son considerados relevantes en áreas terapéuticas tan importantes como oncología, toxicología o neurología.

La citotoxicidad resulta usualmente en la muerte celular por apoptosis (frecuentemente descrita como muerte celular programada). Esta es una forma de muerte celular caracterizada por criterios morfológicos y bioquímicos.

Morfológicamente, la célula se contrae y se vuelve más densa, la cromatina se vuelve picnótica y se empaqueta cerca de la membrana creando imágenes descritas como en media luna o herradura de caballo. El núcleo se fragmenta y la célula emite brotes (proceso conocido como *blebbing*), que contienen fragmentos nucleares y citoplasmáticos, estos finalmente se desprenden de las células, formando los cuerpos apoptóticos.

Muchos de estos cambios morfológicos, son causados por un grupo de enzimas denominadas cistein-proteasas (el nombre se debe a que tienen una cisteína en su sitio activo).

Estas proteasas son parte de la gran familia de las caspasas, en los últimos años fueron identificadas más de una docena de caspasas y aproximadamente dos tercios de ellas tienen alguna función en el proceso de apoptosis.

El proceso de apoptosis fue descrito a fines de la década del '60 (Richard A, et al, 2001). Si bien las primeras descripciones fueron morfológicas, una de las primeras características en ser descubierta fue la fragmentación del DNA en segmentos de aproximadamente 180 pares de bases, entre nucleosomas. Pronto se verificó que este proceso está bajo control genético y puede ser iniciado por señales intra o extracelulares como por ejemplo la acción de carcinógenos, cambios en las concentraciones de calcio extracelular, irradiación con UV, etc.

Fisiológicamente el proceso de apoptosis, es importante para el mantenimiento de la homeostasis y la eliminación de células dañadas que de otro modo proliferarían indiscriminadamente ocasionando tumores.

En este trabajo nos ocuparemos particularmente de la apoptosis ocasionada por la acción de ciertas drogas sobre las células en cultivo.

## Citotoxicidad

La citotoxicidad, es la capacidad de producir una acción tóxica específica en una célula llegando en el extremo a su muerte, sea en forma inmediata o diferida. Este efecto puede ser causado por diversos tipos de injurias, incluyendo sustancias químicas, agentes físicos o mecanismos biológicos.

Para determinar la muerte celular, es necesario establecer primero, los parámetros atribuibles a una célula viva. Generalmente la vida es definida como la capacidad de un organismo de realizar diferentes actividades, a continuación se mencionan algunas de ellas:

- moverse
- metabolizar
- interactuar activamente con el medio
- reproducirse

Contrariamente, podría definirse la muerte como la ausencia de estas características.

Más adelante se detallarán los métodos utilizados y la base sobre la cual diferencian entre una célula viable (entendiendo como tal una célula que está y seguirá estando viva sino se cambian sus condiciones<sup>1</sup>) y una célula no viable. Cuando una célula es expuesta a un agente citotóxico, se pueden observar numerosos cambios, incluso morfológicos, en la misma; algunos son consecuencia de la acción específica que produce el agente citotóxico sobre la célula y otros parecen depender de la progenie en estudio por ejemplo, distintos tipos celulares presentan morfologías de muerte diferente, aún expuestos a la misma droga. Actualmente, esto se explica a través de la existencia de distintos tipos de muerte celular y de múltiples vías que se activan cuando la célula es expuesta a un estímulo letal. La existencia de estas vías que finalmente convergen en el estado de «cosa muerta» implica que hay una transición entre el estado de «vivo» y el de «muerto», que en ocasiones puede ser prolongado y que en algún momento tiene un punto de no retorno. Buena parte de la investigación biológica de los últimos 15 años ha estado dedicada a caracterizar ese proceso de muerte y el/los puntos de no retorno (con fuertes candidatos, como la salida de citocromo c de

la mitocondria y la permeabilización de la membrana mitocondrial, entre otros). Por otro lado, la contracara es que existen numerosos agentes citotóxicos que actúan en diferentes etapas del ciclo celular y en distintos puntos de las vías metabólicas involucradas en el proceso de muerte. Siendo un problema biológico apasionante, tiene además, una faceta práctica inmediata. En la investigación farmacológica tendiente a detectar u optimizar tratamientos que inducen muerte celular (por ejemplo, la quimioterapia de infecciones o tumores) o interfieren con la misma (por ejemplo, en eventos isquémicos o degenerativos) es importante conocer ese proceso y las herramientas metodológicas que permiten explorar sus diversos componentes, así como sus ventajas y limitaciones.

## Marco referencial

En este trabajo se analizarán varios de esos métodos, enfrentados a drogas con diferente acción, en algunos casos ya bastante conocidas y en otros no. En la presentación que sigue se introducirá primero un marco de referencia conceptual de estas drogas para luego explicitar Materiales y Métodos, Resultados, su discusión y las referencias bibliográficas pertinentes.

La apoptosis está caracterizada por la activación de una familia específica de cistein proteasas, caspasas, seguidas por una serie de cambios morfológicos mediados por caspasas, como encogimiento celular, condensación de la cromatina y desintegración de la célula en pequeños fragmentos que pueden ser fagocitados por células vecinas sin producir inflamación. Con respecto a la capacidad de algunas células de sobrevivir a la activación de caspasas, sería peligroso para el organismo el depender de una sola familia de proteasas para la eliminación de células dañadas o no deseadas (Jäättelä M, 2004). De hecho, hay datos suficientes que demuestran que la muerte celular programada (PCD), puede ocurrir en ausencia completa de caspasas y evidencias de rutas de muerte donde proteasas no caspasas y otros efectores de muerte cumplen esa función (Lockshin R, Zakeri Z., 2004). Experimentos usados en células cancerígenas con maquinaria apoptótica defectuosa, revelaron que muchos estímulos apoptóticos activados por caspasas, incluyendo oncogenes, p53, drogas que dañan DNA, miembros de la familia Bcl-2, linfocitos citotóxicos y en algunos casos receptores de muerte, no requieren caspasas conocidas para desencadenar la muerte celular.

Las vías de muerte pueden seguir diferentes subrutinas, que son clasificadas de acuerdo a criterios morfológicos. Las células pueden morir por diversos mecanismos: necrosis, oncosis y apoptosis entre otros. Apoptosis es el tipo de muerte celular más preponderante (muerte celular de tipo I), puede oponerse a otros tipos de muerte celular como autofagia (muerte celular de tipo II), catástrofe mitótica, así como necrosis (oncosis), de acuerdo con criterios morfológicos como condensación de la cromatina (presente en apoptosis), acumulación de vacuolas autofágicas (exclusivo de la muerte celular tipo II), características mitóticas (como se observan en la catástrofe mitótica), o la hinchazón masiva de las organelas citoplasmáticas (oncosis). Es de tener en cuenta también que la intensidad o concentración del agente citotóxico es determinante en cuanto al comportamiento de la célula y la incidencia de muerte sobre una población celular. Se correlaciona que a mayor concentración o intensidad, mayor es el número de células necróticas observadas.

Algunas de las drogas utilizadas en los ensayos de citotoxicidad de este trabajo se encuentran en la figura 1 y serán descriptos a continuación, enfatizando sus mecanismos de acción. Luego se mencionarán las drogas no incluidas en esta figura.

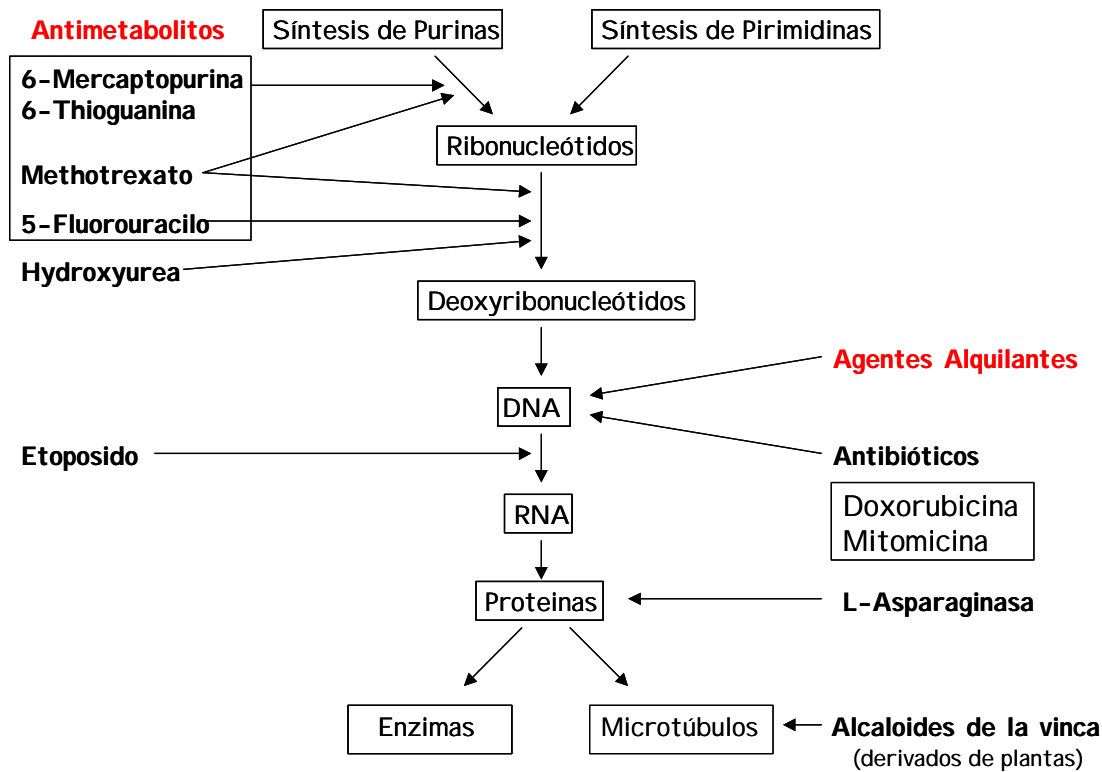


Figura 1: Pasos bioquímicos necesarios para la división celular (en células de mamíferos) y drogas que interfieren en los mismos. Adaptado de Haskell et al., 1999.

### Antibióticos

Son esencialmente sustancias químicas derivadas o producidas por microorganismos que tienen la capacidad, a bajas concentraciones de inhibir el crecimiento o de matar bacterias y otros microorganismos (Litter M, 1988). Aunque actualmente muchos de ellos sean producidos por síntesis química. En este trabajo, haremos referencia en particular a los antibióticos antineoplásicos.

Desde el punto de vista químico se dividen en 5 grupos:

- Antraciclinas
- Cromomicinas
- Glucopéptidos
- Cromopéptidos
- Mitosanos

Los utilizados en este trabajo fueron, doxorubicina que pertenece al grupo de antraciclinas y fue extraído inicialmente de *Streptomyces peucetius* y mitomicina que pertenece al grupo de los mitosanos y fue extraída de *Streptomyces caespitosus*.

### Doxorubicina:

Pertenece a la familia de las Antraciclinas, compuestos que se intercalan en el DNA y afectando muchas de sus funciones, incluyendo la síntesis de DNA y RNA. Son capaces de fracturar el DNA tanto de cadena simple como doble por ejemplo, en el entrecruzamiento de cromátidas hermanas. Así, las antraciclinas son tanto mutagénicas como carcinogénicas (Hardman et al, 2001). La escisión del DNA se cree que está mediada por la unión de drogas al DNA y por la inhibición de la enzima topoisomerasa II, cuya acción previene la ruptura del DNA. Las antraciclinas por medio de sus grupos quinona, generan además, radicales libres, tanto in vitro (en solución) como en tejidos (sean normales como malignos) que podrían contribuir al daño del DNA. Las antraciclinas reaccionan con la citocromo P450 reductasa en presencia de nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido (NADPH) para formar radicales intermedios de semiquinona que pue-

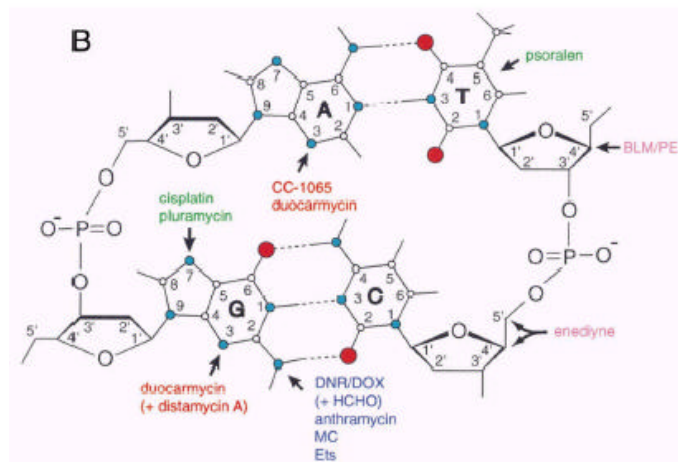
den reaccionar con el oxígeno para producir el radical aniónico superóxido. Éste a su vez puede generar peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo ( $\cdot\text{OH}$ ), que dañan el DNA oxidando las bases. La producción de radicales libres se ve significativamente amplificada por la interacción de doxorubicina con hierro. Adicionalmente, la reacción intracelular de transferencia de electrones del intermediario semiquinona resulta en la generación de peróxidos lipídicos, óxido nítrico y otros radicales igualmente nocivos para la célula.

Como resultado de estos y otros efectos, la exposición de células a antraciclinas, promueve su apoptosis. Este proceso estaría mediado por p53, censor de daño del DNA y la activación de caspasas.

### Mitomicina

Pertenece al grupo de belomicinas (antibióticos que cortan al DNA). A diferencia de la doxorubicina, esta droga forma uniones covalentes con el DNA. Para ello se requiere su activación intracelular (reducción). Una vez ligada al DNA, inhibe la neosíntesis de DNA e induce la ruptura de cromosomas y de DNA de cadena simple (Hardman et al 2001).

En el siguiente esquema se observan los pares de bases A:T y G:C ubicados en el surco menor de la doble hélice y los átomos específicamente atacados por las drogas antineoplásicas.



### Agentes Alquilantes

Estas drogas poseen la capacidad de formar uniones covalentes con sustancias nucleofílicas, el paso principal es la formación de un ion carbonio que reacciona instantáneamente con aminas y grupos oxhidrilos y sulfhidrilos.

La acción farmacológica más importante de los agentes alquilantes es interrumpir la síntesis del DNA y la división celular. Interferir con la integridad del DNA y su función en tejidos que proliferan rápidamente, proporciona las bases para sus aplicaciones terapéuticas y para la mayoría de sus propiedades tóxicas. Aunque muchos agentes alquilantes pueden tener efectos dañinos en tejidos con índices mitóticos normalmente bajos como hígado, riñón y linfocitos maduros, son mucho más citotóxicos en tejidos en rápida proliferación, en los que una gran proporción de las células se está dividiendo. Estos compuestos pueden alquilar células que no se dividen, pero su citotoxicidad se ve acentuada si el DNA es dañado en células que están programadas para dividirse.

Los efectos de las drogas alquilantes, no son ciclo específico y pueden actuar en células en cualquier estadio del ciclo celular. Sin embargo, la toxicidad es usualmente expresada cuando las células entran en la fase S y se ve interrumpida la progresión a través del ciclo. Las células parecen más sensibles en fase G1 tardía o S que en G2, mitosis o G1 temprana. Los polinucleótidos son más susceptibles a la alquilación en su estado desapareado que formando la doble hélice, situación que se produce durante la replicación del DNA, en que porciones de la molécula están desapareadas.

No se conoce con precisión el mecanismo de muerte celular relacionado con la alquilación del DNA. Hay evidencias de que en células normales en médula ósea y epitelio intestinal, el DNA dañado, activa un *checkpoint* dependiente de p53 normal. Las células quedan bloqueadas en la interfase G1/S y pueden reparar el DNA alquilado o entrar en apoptosis. Células con el gen p53 mutado o ausente, no pueden suspender la progresión del ciclo celular y no entran en apoptosis.

Como ejemplo de agente alquilante, en este trabajo se utilizó ciclofosfamida. Es una droga metabolizada en hígado, donde es activada por el sistema de citocromo p450 (*in vitro* por el grupo CYP2B) y es convertida en 4-hidroxiciclofosfamida.

### Crotoxina

Es una fosfolipasa A2 secretoria (sPLA2) derivada del veneno de *Crotalus Durissus Terrificus*, es una proteína heterodimérica compuesta por una subunidad B con actividad enzimática y una subunidad A de unión a receptor, sin actividad enzimática. La función fisiológica de esta enzima es catalizar la hidrólisis de ácidos grasos presentes en la membrana de la célula. Además interviene en procesos esenciales como función vascular, desarrollo de mamíferos, respuesta inmunológica frente a infecciones, curación de heridas. Además de su conocida función enzimática, sPLA2 interacciona con receptores específicos de membrana que participan en sus actividades biológicas.

## Material y Métodos

### Células utilizadas

Los ensayos de citotoxicidad se realizaron con la línea celular U937 (Sundstrom, Nilsson 1976 y Ralph *et al* 1976) proveniente de un linfoma histiocítico generalizado (a partir de una semilla proveniente de ATCC inicialmente, Maryland, EEUU, y luego, de un repique proporcionado por la Lic. Carina Shayo del IBYME). La figura 2 ilustra el aspecto característico de estas células en cultivo de 24 hs.

Las células U937 fueron cultivadas en medio RPMI 1640 (Sigma, Saint-Louis, MO, EEUU), enriquecido con glutamina (concentración final: 2 mM) y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, BIOSER Argentina, inactivado a 56°C durante 30 minutos), a 37°C en estufa (Forma Scientific) con atmósfera controlada de CO<sub>2</sub> 5% y humedad en saturación. La densidad de la suspensión celular se ajustó a valores entre 400000 y 600000 células por botella en los repiques efectuados cada 48hs. El control de la viabilidad se realizó periódicamente mediante conteo con Trypan Blue.

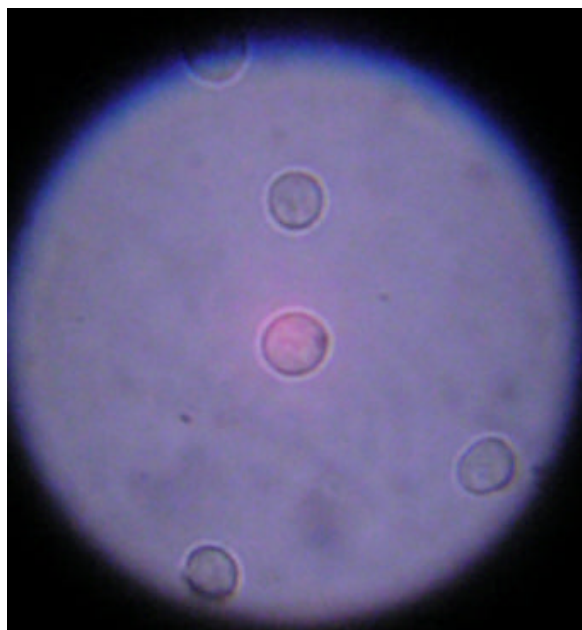


Fig 2. Microfotografía en microscopio de transmisión de células U937 en un preparado realizado entre portaobjeto y cubreobjeto, teñido con azul tripano, tras 24hs de cultivo en medio RPMI 1640 (aumento 400x)

Las células HEP-2 (Eagle, 1955) fueron cultivadas en estufa (Forma Scientific) con atmósfera controlada (5% de CO<sub>2</sub>) y humedad en saturación, en medio esencial mínimo de EARLE (MEM-EARLE, Sigma, Saint-Louis, MO, EEUU), enriquecido con glutamina (concentración final: 2 mM) y 10% de Suero Fetal Bovino (SFB, BIOSER Argentina) inactivado a 56°C durante 30 minutos. Las mismas fueron repicadas aproximadamente cada 48hs. descartando el medio de cultivo (con pipeta pasteur), lavando dos veces con solución fisiológica estéril (ROUX-OCEFA S. A., Buenos Aires, Argentina) y tratándolas con 0.5 ml de tripsina 1x en PBS (Flow Laboratories, Inc, McLean, Va, EEUU) durante aproximadamente 10 minutos, en estufa, para despegar la monocapa. El control de la acción de la tripsina sobre la monocapa se realizó mediante la observación del cultivo en microscopio invertido. Una vez despegadas las células, se les agregó nuevamente medio de cultivo y se descartaron 2/3 del cultivo reemplazándolo por medio fresco. La figura 3 muestra una imagen usual de un cultivo de estas células.

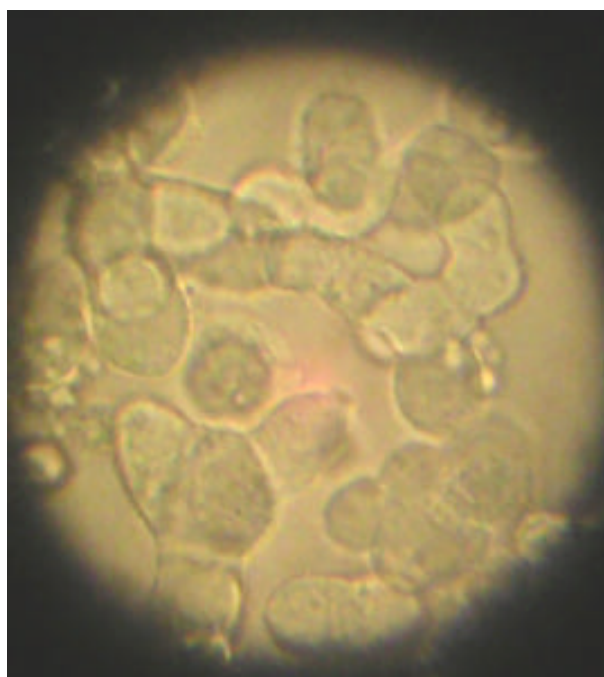


Figura 3: Microfotografía de células HEP-2 en microscopio invertido formando monocapa luego de 24hs. de cultivo (aumento 100x)

### Drogas:

En este trabajo fueron utilizadas diversas drogas. A continuación se mencionarán las drogas utilizadas y la procedencia de las mismas. Doxorubicina (Delta Farma, Buenos Aires, Argentina), Mitomicina (Sigma, St Louis, MO, EEUU), Ciclofosfamida (Labinca, Buenos Aires, Argentina) y Crotoxina (Onco-Venom Research, Inc., Panamá, Panamá).

Doxorubicina: la solución madre se preparó a partir de un vial de droga liofilizada, solubilizado con una ampolla de agua destilada estéril (por indicación del prospecto) obteniéndose una concentración de 2mg/ml. Fue almacenada en el congelador a -20°C, en alícuotas de 500il. Como solución de trabajo, se diluyó la solución madre con medio de cultivo hasta obtener una concentración de 128 ig/ml.

Mitomicina: la solución madre se preparó a partir de un vial de 2 mg de droga liofilizada, con una ampolla de 2 ml de agua destilada estéril (por indicación del prospecto). Fue alícuotada y almacenada en el congelador a -20° C. La solución de trabajo se preparó mediante dilución de la solución madre en medio de cultivo hasta llegar a una concentración de 45 ig/ml.

Ciclofosfamida: la solución madre se preparó a partir de un frasco ampolla de 2mg de droga liofilizada, que fue solubilizada con una ampolla de 10ml de agua destilada estéril. La solución madre fue alícuotada y almacenada en freezer a -20°C. La solución de trabajo se preparó con medio RPMI en una concentración de 200ig/ml.

Crotoxina: la solución madre proporcionada por el Dr. Vidal corresponde a ampollas de crotoxina y cardiotoxina en las siguientes concentraciones: CT = 0,3 mg/ml y CD = 0,4 mg/ml, que a su vez fueron

diluidos al 10% en medio de cultivo RPMI para ser utilizada. La droga CT + CD, se preparó mezclando en igual proporción ambos compuestos.

### Medición de citotoxicidad:

Se emplearon diversos enfoques:

1. Para seleccionar las condiciones de trabajo en los diversos experimentos, se realizaron curvas dosis-respuesta, determinando la concentración inhibitoria 50% ( $CI_{50}$ ) de cada droga sobre cultivos celulares.
2. Una vez seleccionadas las concentraciones óptimas de trabajo, se emplearon distintas técnicas para caracterizar la presencia de daño celular y la modalidad de producción del mismo:
  - 2.a. Microscopía óptica y de fluorescencia,
  - 2.b. Citometría de flujo,
  - 2.c. Ensayo MTT
  - 2.d. Electroforesis en gel de agarosa para evaluar degradación de ADN.

### Curvas dosis respuesta

Fueron realizadas en placas de 96 pocillos (Nunclon Delta, Nunc, Dinamarca) con 20000 células/pocillo, en un volumen final de 100  $\mu$ l, que fueron incubadas con drogas en diluciones seriadas al medio durante 24 hs. En las células HEP-2, el criterio fue la destrucción de la monocapa evaluada en microscopio invertido. En el caso de las células U-937 se evaluaba la densidad y morfología celulares. La  $CI_{50}$  fue determinada mediante conteo con fluorescencia, de un total de 200 células se separaron en viables, necróticas y apoptóticas.

### Viabilidad mediante NA y BE:

La viabilidad de las células para cada uno de los pocillos fue determinada mediante fluorescencia de naranja de acridina (NA, Anedra, San Fernando, Buenos Aires, Argentina) y bromuro de etidio (BE, Sigma, 5g.). Se preparó inicialmente una solución madre 100x (10 mg/ml de Naranja de Acridina y 10 mg/ml de bromuro de Etidio). Para realizar el ensayo de viabilidad se tomaron 25  $\mu$ l de la suspensión de células en medio de cultivo ( $5 \times 10^5$ /ml) y se agregó 1  $\mu$ l de una solución de Naranja de Acridina (100  $\mu$ g/ml en agua destilada) y 1  $\mu$ l de una solución de Bromuro de Etidio (100  $\mu$ g/ml de BrEt en agua destilada). La solución de trabajo se prepara en el momento diluyendo 1/10 con agua bidestilada la solución madre.

Nota: la solución madre debe estar protegida de la luz en un recipiente color caramelo.

Las células fueron contabilizadas como apoptóticas, viables y necróticas según la coloración adquirida y la morfología observada.

### Marcación para citometría de flujo

Fueron realizados en tubos de cultivo colocando 500000 células/ml e incubadas con concentraciones de droga cercanas a la  $DL_{50}$  durante 24 hs. Se tomó la  $DL_{50}$  observada en la placa y una concentración superior y una inferior. El control se realizó con células sin tratar y un control con la dosis de droga más alta utilizada.

La marcación se realizó con anexina V e yoduro de propidio según el protocolo indicado en el equipo comercial de Sigma que se detalla a continuación:

#### Protocolo de marcación con AnexinaV y Yoduro de Propidio

- Bajar las células a 3000 rpm durante 1 minuto, descartar el sobrenadante.
- Lavar las células en PBS helado pH 7.4. Resuspender generosamente el pellet.
- Bajar las células a 3000 rpm durante 1 minuto, descartar el sobrenadante, remover el exceso de PBS con una pipeta.
- Resuspender las células en 1x binding buffer (10mM HEPES/NaOH, pH 7.4, 140 mM Na Cl, 2.5mM  $CaCl_2$ , filtrado con poro de 0.2 $\mu$ m). Ajustar la densidad celular a  $2-5 \times 10^5$  células/ml.
- Agregar 5  $\mu$ l de Anexina V-FITC a 95  $\mu$ l de la suspensión celular. Mezclar.
- Incubar 10 min a temperatura ambiente.
- Lavar las células con 1x buffer de unión. Bajar las células a 3000rpm durante 1 minuto, descartar el sobrenadante y resuspender en 95  $\mu$ l de buffer de unión.
- Agregar 5  $\mu$ l de yoduro de propidio 20  $\mu$ g/ml.
- Analizar las células por citometría de flujo.

Cabe destacar que las células analizadas con este método fueron las células U937 dado que crecen en suspensión.

### Ensayo de viabilidad MTT

Otro método utilizado para estimar la supervivencia celular, fue el ensayo de reducción del (3-[4,5-dimethyl thiazol-2-y1]-2,5 diphenil tetrazolium bromide) (MTT, Sigma). Este compuesto es una sal de tetrazolio

soluble, de color amarillo, que se transforma en un formazan insoluble, de color azul por acción de la actividad deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas, que se disuelve con isopropanol para medir su absorbancia en el espectrofotómetro (Kuhn et.al. 2003).

Se considera que la cantidad de formazan que se produce en un cultivo es directamente proporcional a la cantidad de células vivas.

El protocolo realizado para esta determinación es ligeramente diferente para las células U937 (que crecen en suspensión) y para las HEP-2 (que crecen adheridas a una superficie). A continuación se detalla el mismo para ambos tipos celulares.

**Protocolo para células U937:** para la realización de este ensayo, se partió de un cultivo celular en fase de crecimiento exponencial. Las células fueron centrifugadas a baja velocidad en una centrífuga de mesa (DCS-16-RV, Presvac, Argentina). El sobrenadante fue descartado y fueron lavadas dos veces con solución fisiológica estéril. Finalmente se resuspendieron en medio de cultivo RPMI adicionado con glutamina y 0,1% de sero albúmina bovina (SAB, CellPro Incorporated, Bothell, WA, EEUU) y se siguieron los siguientes pasos:

- preparar las placas con 20000 células por pocillo y las distintas dosis de la droga ensayada en un volumen final de 50  $\mu$ l
- disponer las placas en la incubadora a 37°C durante 20hs.
- colocar 10  $\mu$ l de solución MTT (0,5 mg/ml, en PBS pH 7,2 e incubar nuevamente a 37°C durante 4 horas).
- agregar 100  $\mu$ l de isopropanol para solubilizar el formazan
- determinar la absorbancia de la solución resultante a 540 nm en un lector de policubeta (BIO-RAD Modelo 3550).

**Protocolo para células HEP-2:** se descarta el medio con suero, se lava dos veces con solución fisiológica y se tripsinizan las células. Luego se resuspenden en medio EARLE con 10% SFB ( BIOSER Argentina) y se realiza el siguiente protocolo.

- sembrar placas de 96 pocillos con una concentración de 8000 células por pocillo en un volumen de 100  $\mu$ l. Esta concentración celular se determina mediante conteo en cámara de Neubauer y tinción con azul tripan
- incubar toda la noche en la estufa a 37°C, dejando que las células se adhieran y formen monocapa
- descartar el medio de cultivo, lavar y agregar MEM EARLE 0,1% SAB con las diluciones al medio de la droga en un volumen final de 50  $\mu$ l
- incubar en estufa a 37°C durante 20hs.
- agregar 10  $\mu$ l de solución MTT (0,5 mg/ml disuelto en PBS pH 7,2 e incubar nuevamente a 37°C durante 4 horas.
- agregar 100  $\mu$ l de isopropanol para solubilizar el formazan
- determinar la absorbancia de la solución resultante a 540 nm en un lector de policubeta (BIO-RAD Modelo 3550).

Los controles realizados para cada experimento tuvieron como objetivo determinar el blanco correspondiente para cada experimento y fueron los siguientes:

- medio de cultivo + MTT / medio de cultivo sin MTT
- células en medio de cultivo + MTT / células en medio de cultivo sin MTT
- droga + MTT / droga sin MTT

#### «Escalera» (*Ladder*) de DNA

Extracción de DNA para determinar apoptosis por electroforesis en gel de agarosa (*ladder*)

Centrifugar una suspensión de  $1 \times 10^6$  células en medio de cultivo. Descartar el sobrenadante. El pellet se resuspende con 20  $\mu$ l de 10mM de EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 8, conteniendo SDS 0.5% y 0.5% de proteínaasa K. Incubar a 50°C una hora. Agregar 10  $\mu$ l de 0,5 mg/ml RNAsa A e incubar por una hora mas a 50°C. Luego calentar las muestras a 70°C. Tomar 3  $\mu$ l y llevar a 10-12  $\mu$ l con buffer de carga (Nature vol 337, january 1989)

Sembrar en gel de agarosa al 2% ( 2 g de agarosa cada 100 ml de buffer TAE) conteniendo 0,1  $\mu$ g/ml de Bromuro de Etidio. La electroforesis se realiza con buffer TAE hasta que el frente de corrida (identificado por el colorante indicador) se encuentre cerca del extremo del gel (el final de la corrida).

#### Estadística

Los datos obtenidos por los diferentes métodos fueron analizados en el programa Microsoft Excel 2000,



calculando el promedio, la media armónica y la desviación estandar. Muchos de los ensayos fueron analizados cualitativamente.

## Resultados

A continuación se describirán los resultados obtenidos a partir de los diversos ensayos de citotoxicidad.

### Cultivos celulares

En primer lugar, se realizó un *screening* de dosis seriadas al medio de la droga a estudiar, para evaluar el comportamiento de las células ante las distintas drogas y determinar en que rango de concentraciones debían ser utilizadas durante los ensayos posteriores. Esto fue realizado en placas de 96 pocillos colocando 20000 células por pocillo. Luego de 24hs de incubación, una muestra de cada pocillo fue analizada con fluorescencia, entre portaobjeto y cubreobjeto y mediante tinción con violeta de cristal en cámara de Neubauer.

En la tabla 1 se muestran los resultados del conteo celular luego del tratamiento de 24hs. de células U937 con Doxorubicina. Según este ensayo preliminar, la  $IC_{50}$  para esta droga, se encontraría entre las siguientes concentraciones: 0.5  $\mu\text{g/ml}$  y 0.125  $\mu\text{g/ml}$ .

Placa U937 tratadas con DOR												
concentración $\mu\text{g/ml}$	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	control
conteo con violeta de cristal	1000										5000	9500
% viabilidad (fluorescencia)	0	0	0	0	0	7,5	6,5	17,5	45	56	65	69,5
desvío standard	0	0	0	0	0	3,536	0,707	3,536	7,071	1,414	7,071	7,778

Tabla 1. Resultado del conteo de las células U937 tratadas con Doxorubicina con un período de incubación de 24 hs. La  $IC_{50}$  fué estimada entre 0.5 y 0.125  $\mu\text{g/ml}$

En la tabla 2 se presentan los resultados del tratamiento de 24hs de células U937 con Mitomicina. En este caso se estimó la  $IC_{50}$  entre 0.4  $\mu\text{g/ml}$  y 0.05  $\mu\text{g/ml}$ . Estas concentraciones serán utilizadas luego en el análisis por citometría de flujo.

Placa U937 tratadas con MMC												
concentración $\mu\text{g/ml}$	25	12,5	6,25	3,2	1,6	0,8	0,4	0,2	0,1	0,05	0,025	control
Promedio de conteo con violeta de cristal	3250										14000	16000
desvío standard	3889										7071	4243
Promedio de % viabilidad (fluorescencia)	0	0	2	4,5	4,5	17,5	33	29,8	35	68,35	77	79
desvío standard	0	0	2,828	3,536	3,536	2,121	4,243	2,546	7,071	18,88	12,73	5,657

Tabla 2. Resultado del conteo de las células U937 tratadas con Mitomicina C con un período de incubación de 24 hs. La  $IC_{50}$  fué estimada entre 0.4 y 0.05  $\mu\text{g/ml}$ .

En la tabla 3, se presentan los resultados obtenidos del tratamiento de las células U937 con Crotoxina. Dado que esta droga es la combinación de dos compuestos distintos (el veneno de dos serpientes diferentes), primero se realizaron ensayos con cada uno de ellos por separado y luego con los dos juntos en partes iguales. En el panel **a** se observan los ensayos con CT, en el **b** con CD y en el **c** con la combinación de ambos compuestos (VRCTC-310).

Al igual que lo realizado con DOR y MMC, luego del tratamiento con esta droga, las células fueron observadas con el microscopio de fluorescencia y con microscopía óptica en cámara de Neubauer. Los números que se observan en las tablas surgen del conteo de las células luego de la incubación con la droga durante un período de 24hs.

En el caso de CT, no pudo estimarse claramente el rango de la concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) porque en todos los pocillos, aún en los que la concentración de droga era muy alta, se encontraron células viables. Por este motivo, los ensayos posteriores se realizaron con la dosis más alta de la droga. Con CD y CT+CD se utilizó también la concentración más alta para evaluar parámetros similares.

Placa U937 tratadas con CT												
concentración µg/ml	30	15	7,5	3,75	1,87	0,94	0,47	0,23	0,12	0,06	0,03	control
Promedio de conteo con violeta de cristal	13000						30000				27000	26500
Promedio de % viabilidad (fluorescencia)	3,8	3,5	6	5,5	15	30	33	45	60	55	80	85
desvío standard	1,273	2,475	2,828	0,354	2,121	3,536	1,414	17,68	14,14	14,85	5,657	3,536

a

Placa U937 tratadas con CD												
concentración µg/ml	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,31	0,16	0,078	0,04	control
Promedio de conteo con violeta de cristal	1500						10000			22000		25000
Promedio de % viabilidad (fluorescencia)	0	0	5	6	20	27	35	43	60	62	88	85
desvío standard	0	0	3,536	2,121	3,536	2,121	4,95	0,707	5,657	2,121	1,414	3,536

b

Placa U937 tratadas con CT+CD												
concentración µg/ml	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,31	0,16	0,078	0,04	control
Promedio de conteo con violeta de cristal	1000						15000			20000		28000
Promedio de % viabilidad (fluorescencia)	16	10	7	10	25	28	37	44	58	66	79	90
desvío standard	11,31	7,071	1,414	2,828	3,536	1,414	2,828	10,61	1,414	2,828	6,364	3,536

c

Tabla 3: panel a: resultados del tratamiento durante 24 hs de células U937 con CT. En el panel b se observan los resultados de dichas células con CD y en el c con una combinación de ambas drogas. En cada caso, se contó una alícuota de cada well tratado y control, con naranja de acridina y bromuro de etidio (entre portaobjeto y cubreobjeto) y con violeta de cristal (en cámara de Neubauer)

El valor de IC<sub>50</sub> para CD según este método, estaría entre 0,625 µg/ml y 0,16 µg/ml, al igual que para CT+CD. Esto induce a pensar que la acción de ambos CT+CD sería atribuible a CD y no a CT.

En la tabla 4, se observan los resultados del experimento realizado con células U937 incubadas durante 24hs con ciclofosfamida (CPM). Los resultados obtenidos son bastante erráticos y no hace posible estimar un rango de IC<sub>50</sub>, aunque en ensayos posteriores se usará las concentraciones: 0,4 µg/ml y 0,2 µg/ml

Placa U937 tratadas con CPM												
concentración ug/ml	100	50	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195	0,098	control
conteo con violeta de cristal	8500	11000	10750	19000	18500	26000	24000	26500	20000	18500	17000	28500
desvío estándar	707,1	1414	353,6	1414	707,1	1414	1414	707,1	2828	2121	2828	2121
% viabilidad (fluorescencia)	0	0,6	2,5	2,5	4	20,5	19	32	35	36,5	45	83
desvío estándar	0	0,849	0,707	3,536	1,414	24,75	1,414	24,04	7,071	2,121	7,071	4,243

Tabla 4: resultados del tratamiento de células U937 con CPM durante 24hs. Los resultados se obtuvieron del conteo en cámara de Neubauer (tinción con violeta de cristal) y en microscopio de fluorascencia (tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio)

Como puede observarse en el desvío estándar, la variabilidad de este método es muy grande y no sería adecuado calcular la IC<sub>50</sub> tomando en cuenta sólo estos datos. Esto puede explicarse en base a la subjetividad del operador que es quien debe determinar, más allá de la tinción de las células, la viabilidad o no de las mismas. De todos modos, estos resultados fueron utilizados para tener una idea aproximada de las concentraciones de droga que debían usarse en ensayos posteriores. Además fueron muy útiles para observar la morfología celular en estadios de apoptosis como se puede apreciar en las fotos que se presentan a continuación.

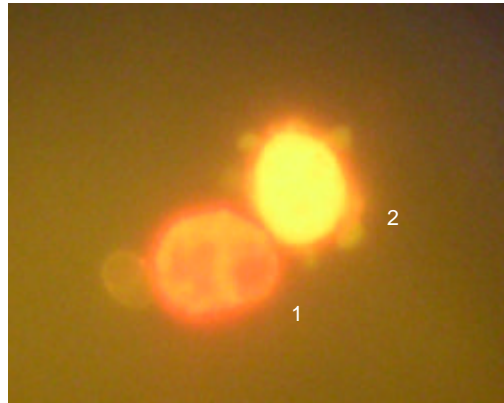


Figura 4.a: Microfotografía en microscopio de fluorescencia, de una célula U937 necrótica (1) y una apoptótica (2) (aumento 400x)

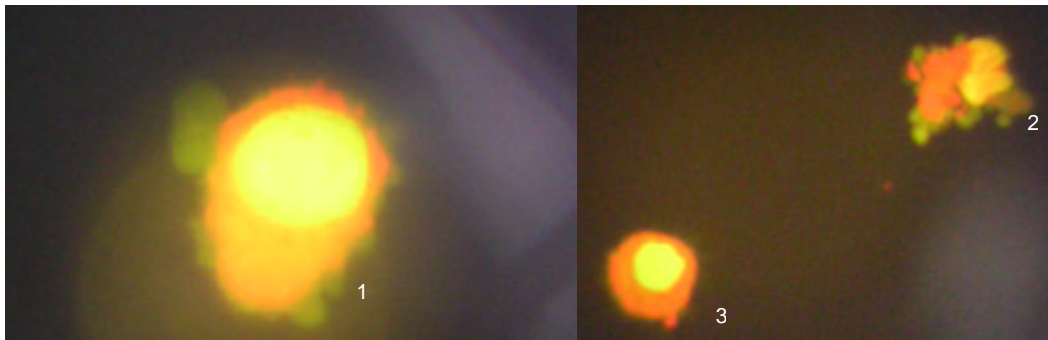


Figura 4.b: Microfotografía en microscopio de fluorescencia de células U937 en diferentes estadios. En la figura 1. célula en estadio de apoptosis temprana (obsérvese el *blebbing*), figura 2. célula en estadio de apoptosis tardía, figura 3. célula viable. Aumento al cual fueron fotografiadas, 400x.

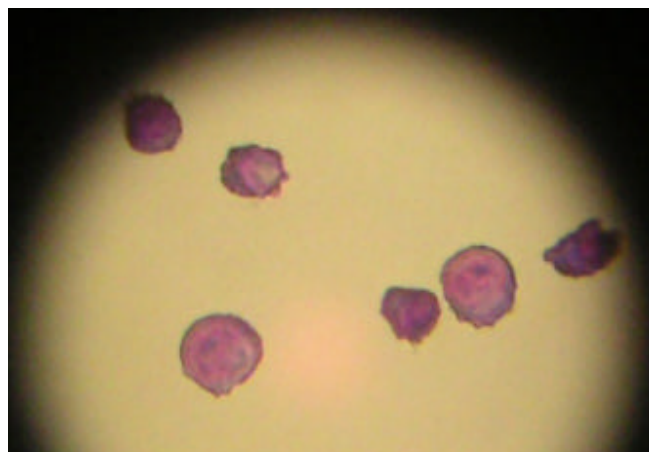


Figura 4.c: Microfotografía en microscopio de transferencia de células U937 teñidas con violeta de cristal (aumento 400x)

Las tablas presentadas a continuación, corresponden a los resultados de los tratamientos realizados en células HEP-2. Dado que estas células crecen adheridas a la superficie, lo que se realizó fue una observación de la integridad de la monocapa en el microscopio invertido y luego se tiñeron las células con Naranja de Acridina y Bromuro de Etidio para ser analizadas en el microscopio de fluorescencia. La observación de las mismas sólo pudo hacerse con un aumento de 100x porque la altura de la placa no permitió el enfoque

a mayor aumento. Por lo tanto, en lugar del conteo habitual de las células se realizó una estimación del porcentaje de viabilidad según la proporción de células verde o naranja observadas (en este aumento no es posible distinguir detalles suficientes como para determinar si son viables, apoptóticas o necróticas). Para estas células no se pudo estimar por este método la  $IC_{50}$  correspondiente a las drogas utilizadas. Se realizaron los mismos ensayos con el método de reducción de MTT.

La tabla 4, corresponde a los resultados obtenidos del tratamiento de células HEp-2 con Doxorubicina durante 24hs. La estimación del porcentaje de monocapa se realizó mediante observación en microscopio invertido, de los pocillos tratados con DOR y su comparación con el control (células sin tratar).

Placa Hep-2 tratadas con DOR												
concentración $\mu\text{g/ml}$	64	32	16	8	4	2	1	0,5	0,25	0,125	0,06	control
% viabilidad (fluorescencia)	0	0	0	0	0	4	46	55	70	77	85	92
desvio standard	0	0	0	16,97	14,14	26,87	9,899	14,14	11,31	8,485	3,536	1,414
% de monocapa	20	20	35	50	50	80	80	85	90	100	100	100

Tabla 4: resultados del tratamiento de células HEp-2 con Doxorubicina durante 24hs.

En la tabla 5 se observan los resultados de los tratamientos de células HEp-2 con MMC, al igual que con DOR, el «% de monocapa», corresponde al porcentaje de monocapa viable que se observa en cada pocillo, comparado con el control.

Placa Hep-2 tratadas con MMC												
concentración $\mu\text{g/ml}$	25	12,5	6,25	3,125	1,563	0,781	0,391	0,195	0,098	0,049	0,024	control
% viabilidad (fluorescencia)	0	0	10	30	50	50	65	70	70	80	85	90
desvio standard	0	0	3,536	4,243	3,536	3,536	3,536	2,121	7,071	3,536	3,536	3,536
% de monocapa	0	0	0	5	20	20	50	70	70	100	100	100

Tabla 5: resultados del tratamiento de células HEp-2 con Mitomicina C durante 24hs.

En la tabla 6 observamos los resultados de las células tratadas con Crotoxina. Como se realizó en la línea celular U937 estos ensayos se realizaron primero con los dos compuestos que forman la droga por separado y luego con la droga completa.

Placa Hep-2 tratadas con CT												
concentración $\mu\text{g/ml}$	30	15	7,5	3,75	1,875	0,938	0,469	0,234	0,117	0,059	0,029	control
% viabilidad (fluorescencia)	80	Todas las células se ven verdes en el microscopio de fluorescencia										
% de monocapa	La monocapa se observa igual al control											100

Placa Hep-2 tratadas con CD												
concentración $\mu\text{g/ml}$	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	control
% viabilidad (fluorescencia)	0	10	15	30	50	60	80	80	90	100	100	100
% de monocapa	5	5	20	60	80	80	90	100	100	100	100	100

Placa Hep-2 tratadas con CT+CD												
concentración $\mu\text{g/ml}$	40	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,313	0,156	0,078	0,039	control
% viabilidad (fluorescencia)	0	0	15	25	40	60	80	80	90	100	100	100
% de monocapa	0	0	20	50	80	80	90	90	100	100	100	100

Tabla 6: resultados de los ensayos de citotoxicidad en células HEp-2 luego de 24hs de incubación con: CT (panel a), CD (panel b) y CT+CD (panel c). El análisis fue realizado mediante microscopía óptica y de fluorescencia.

Como puede apreciarse, estos resultados tienen una variabilidad muy grande y sólo serán tomados en cuenta como aproximación cualitativa. En el caso de las drogas Doxorubicina y Mitomicina, se ve claramente que a altas concentraciones son letales para las células. En cambio no queda muy claro lo que ocurre con CT y CD. En principio podría decirse que la acción de la Crotoxina sobre las células HEP-2 se debe a la citotoxicidad de CD. Las mismas dosis serán utilizadas luego en los ensayos con MTT y se confeccionarán las curvas dosis-respuesta correspondientes.

A continuación se muestran algunas de las microfotografías obtenidas luego de la observación de células HEP-2 al microscopio.

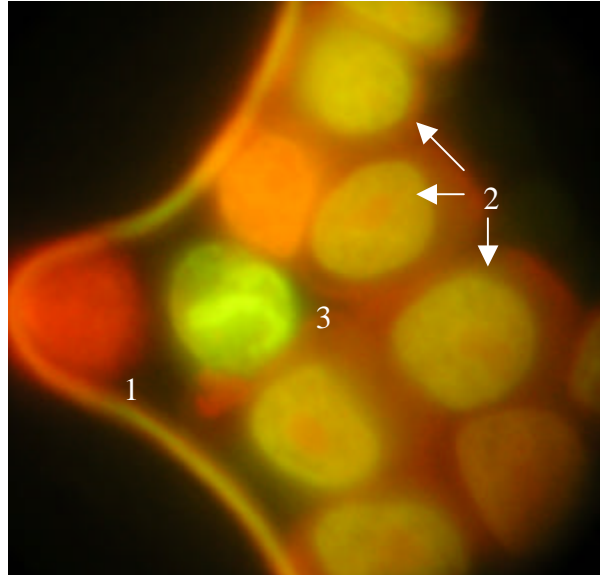


Figura 5.a: Microfotografía de células HEP-2. Dado que estas células crecen adheridas, para poder fotografiarlas, se las creció en un portaobjeto y luego fueron teñidas con fluorescencia. 1 célula necrótica, 2 células viables, 3 célula con morfología compatible con apoptosis (aumento 400x)

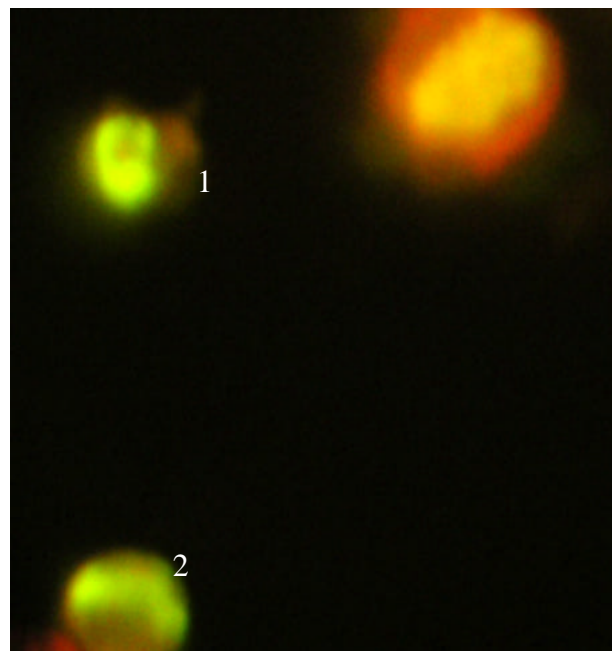


Figura 5.b: microfotografía de células HEP-2 en cultivo teñidas con fluorescencia. Las figuras 1 y 2 muestran morfologías típicas de apoptosis (aumento 400x)

### Citometría de flujo

El análisis de las muestras por citometría de flujo, requiere que las células sean pasadas en suspensión frente al láser de excitación del fluorocromo empleado. Por eso este método fue sólo utilizado con la línea celular U937, ya que éstas crecen en suspensión y por lo tanto no hay que utilizar para desprenderlas métodos (como el tratamiento con tripsina) que podría dañarlas y afectar así los resultados del ensayo.

En la figura 6 se observa un control de viabilidad correspondiente a células no tratadas. Como puede apreciarse, se trata de una población de células bastante homogénea, esto se puede determinar porque la nube de puntos que representa cada evento (es decir cada célula) se encuentra mayormente concentrada en el cuadrante inferior izquierdo del panel **b** (91,59% de viabilidad).

El panel **a** se muestra un *dot plot* que relaciona la complejidad interna (medida en el eje y) y el tamaño de cada célula (eje x). En cambio en el panel **b** se observa la relación entre las células marcadas (con yoduro de propidio y/o anexina) y las células cuya marcación no es tan significativa (cuadrante inferior izquierdo). Estas células serán consideradas viables, en los tratamientos realizados con drogas. En el cuadrante superior derecho se observan las células que dieron positivo a la marcación con anexina (células apoptóticas) y en el cuadrante superior izquierdo las que dieron positivo al yoduro de propidio (células necróticas).

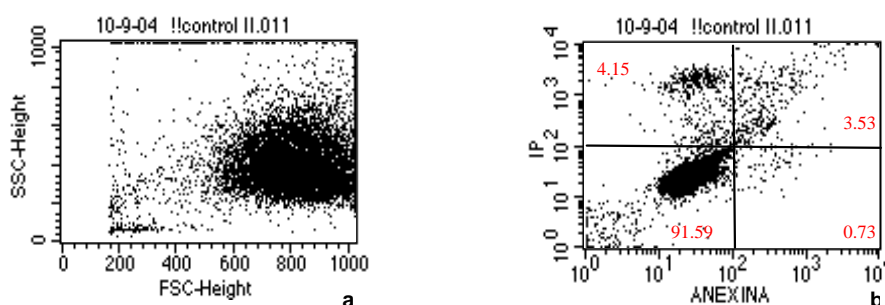


Figura 6: en el panel **a** se observa un *dot plot* de células U937 sin tratar (control) Aquí se mide en el eje y la complejidad interna y en el x el tamaño de cada evento. En el panel **b** se mide en absisas las células marcadas con yoduro de propidio y en ordenadas las marcadas con anexina. Los valores de cada cuadrante corresponde a la cantidad de eventos registrados en cada uno de ellos.

En base a este control se analizaron muestras de células de la línea U937 tratadas con Doxorubicina, Mitomicina, Crotoxina y Ciclofosfamida. Para cada droga, se probaron dos o tres concentraciones, las obtenidas como cercanas a la IC<sub>50</sub> en los ensayos con cultivos celulares.

A continuación se muestran en la figura 7 las curvas comparativas entre el control y el tratamiento con las siguientes dosis de MMC: MI [0.08µg/ml], MII [0.16mg/ml] y MIII [0.32mg/ml]. Los gráficos en color azul corresponden a las células marcadas con anexina y los rojos a las marcadas con yoduro de propidio. En todos los gráficos, las curvas azul y rojo oscuro corresponden al control y las celeste y rosa a los tratamientos.

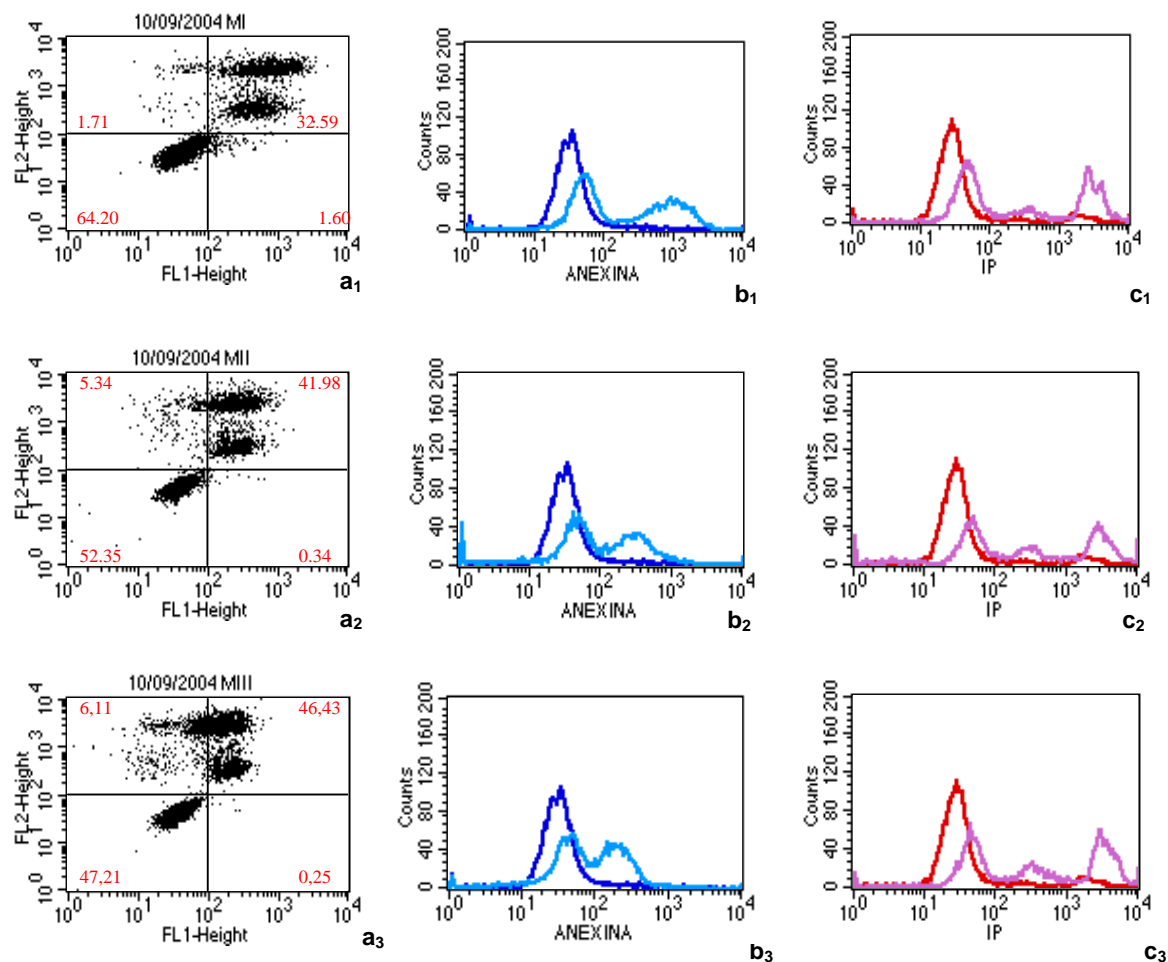


Figura 7: En los paneles **a**<sub>1</sub>, **a**<sub>2</sub>, **a**<sub>3</sub> se observan los dot plot de tratamientos realizados con MMC en tres diluciones sucesivas cercanas a la estimada IC<sub>50</sub> (MI [0.08 µg/ml], MII [0.16 µg/ml] y MIII [0.32 µg/ml]). En el cuadrante inferior izquierdo se encuentra escrito el porcentaje de viabilidad en cada caso. En los paneles **b**<sub>1,2,3</sub> se observa la comparación correspondiente a la marcación con anexina, entre el control (en color azul oscuro) y el tratamiento con MMC (color celeste) de las distintas dosis ensayadas. En los paneles **c**<sub>1,2,3</sub> se observan las comparaciones correspondientes a la marcación con yoduro de propidio del control (color rojo) y el tratamiento (color rosa)

En la curva correspondiente al tratamiento (celeste o rosa), debería verse un desplazamiento hacia la derecha (alejándose de la curva control) en relación con el aumento de la dosis de MMC. Si bien este corrimiento no es muy evidente, sí puede observarse el efecto de la misma en los porcentajes del cuadrante inferior izquierdo del *dot plot* (panel **a**). Los números relativos a la cantidad de células de dicho cuadrante, disminuyen al aumentar la dosis. El corrimiento de la curva hubiera sido más notorio si en lugar de utilizar tres dosis sucesivas al medio, de la droga estudiada, se hubiesen realizado diluciones mayores (por ejemplo 1/5).

En la figura 8, podemos observar por este método, el efecto de la doxorubicina sobre las células U937. Como se observa en las figuras **b** y **c**, la curva correspondiente al tratamiento, se corre levemente hacia la derecha (es decir, que se aleja de la curva control) en respuesta a un aumento de la dosis. En el panel **a** (1, 2 y 3), se observa que el porcentaje de viabilidad del cuadrante inferior izquierdo, es muy bajo. Esto se debe en parte, a que la estimación de la IC<sub>50</sub> por el método de observación y conteo con fluorescencia es poco precisa y al ser tan grande la variabilidad se cometen muchos errores en la estimación de dicho parámetro. Hubiera sido más efectivo realizar en primera instancia el método MTT y luego una vez determinada la Concentración Inhibitoria 50 con más exactitud, realizar la determinación por citometría de flujo. Por otro lado, las células U937 utilizadas para estos ensayos fueron provistas por dos fuentes distintas (semilla ATCC e IBYME como se indica en Materiales y Métodos), si bien se trata de la misma línea celular, se observó que el comportamiento en cultivo era diferente como así también su respuesta al tratamiento.

Las concentraciones de Doxorubicina utilizadas para estos ensayos fueron las siguientes: DIII [0.5 µg/ml], DII [0.25 µg/ml] y DI [0.125 µg/ml]

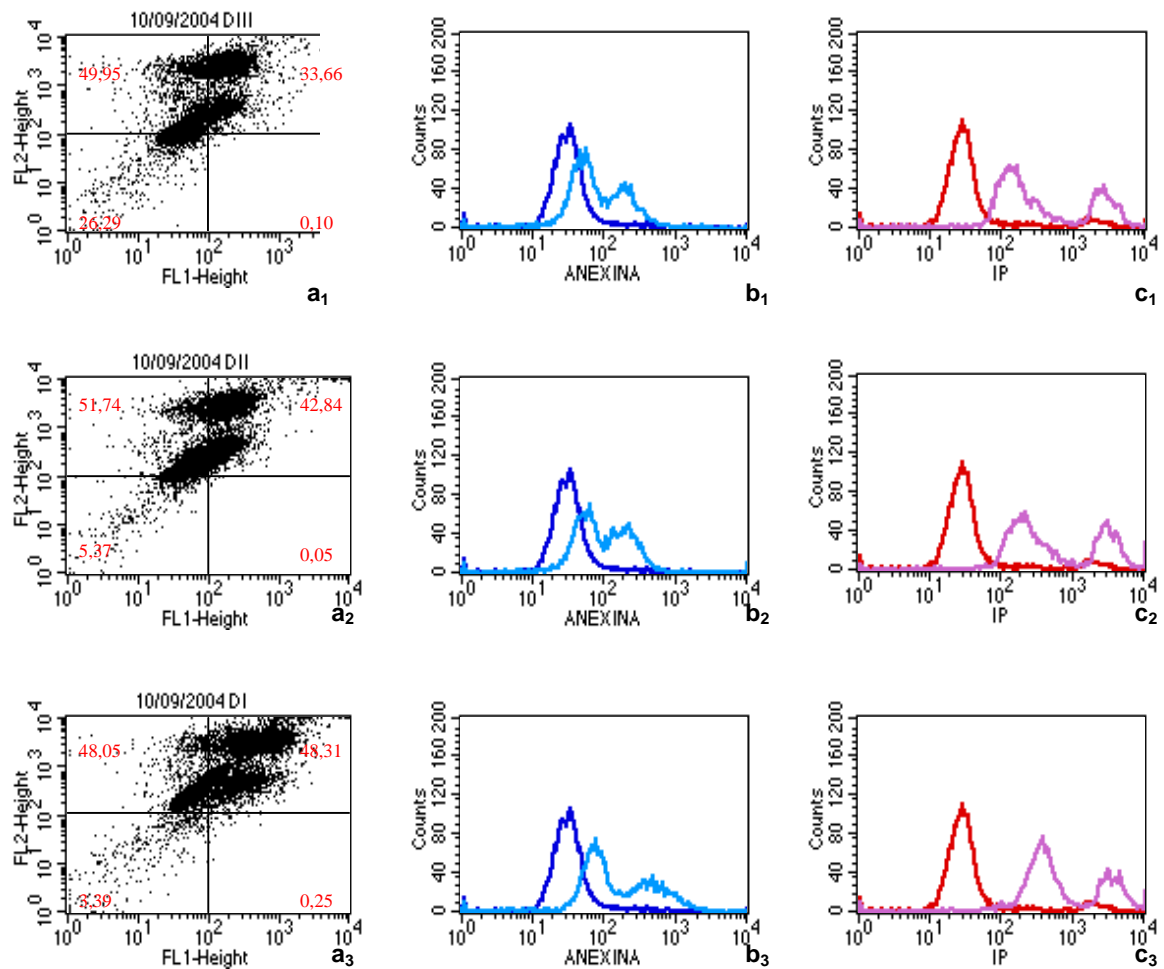


Figura 8: paneles **a**<sub>1, 2, 3</sub> *dot plot* correspondientes a células U937 tratadas con Doxorubicina, en los cuadrantes se puede observar el porcentaje de eventos que se registraron en cada uno. Paneles **b**<sub>1,2,3</sub> comparación de la curva control (azul) con el tratamiento (celeste) evaluada según la marcación de anexina. En los paneles **c**<sub>1, 2, 3</sub> se observa la comparación de la curva control (roja) con el tratamiento (rosa) según la marcación de propidio.

También fueron ensayadas con este método la Crotoxina y Ciclofosfamida. Con respecto a la primera, en la figura 9 podemos observar los resultados obtenidos luego del tratamiento con CT. La dosis utilizada en este caso fue de 30µg/ml y como podemos observar tanto en el *dot plot* como en la comparación entre control y tratado, no hay un efecto evidenciable de esta droga sobre la línea celular U937 en particular, en los tiempos de incubación ensayados. El porcentaje de eventos registrados en el cuadrante inferior izquierdo del panel **a** muestra claramente, que la cantidad de células viables en el tratamiento es prácticamente igual a la del control.



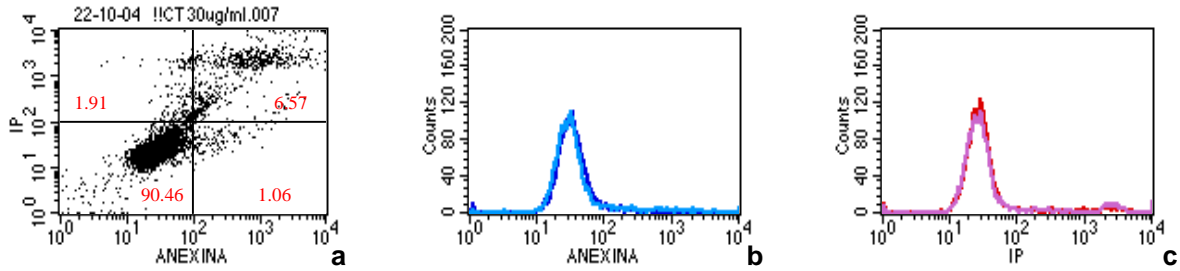


Figura 9: citometría de flujo de células U937 tratadas con CT y marcadas con yoduro de propidio y AnexinaV. El panel **a** corresponde al *dot plot*, el panel **b** a la comparación entre el control (curva azul) y el tratamiento (curva celeste) evaluadas según la marcación con Anexina V. En el panel **c** se presenta la comparación entre el control (curva roja) y las células tratadas (curva rosa) evaluadas según la marcación con yoduro de propidio.

Los resultados obtenidos al tratar las células con CD y con CD+CT durante 24hs, se muestran en las figuras 10 y 11. Como puede observarse, en ninguno de los dos *dot plot* pueden distinguirse poblaciones bien diferenciadas de células (como sí ocurre en los tratamientos anteriores), pero sí puede verse un efecto de CD y de CT+CD sobre las células, dado que los porcentajes de células registrados en cada cuadrante varían visiblemente con respecto al control. Además, si analizamos la comparación entre la curva control, representada en azul para anexina y en rojo para yoduro de propidio, y el tratamiento, se aprecia claramente un corrimiento hacia la derecha de la curva que representa el tratamiento con respecto al control. Esto indica que son poblaciones de células que difieren, en cuanto a su tamaño y complejidad interna, a las del control.

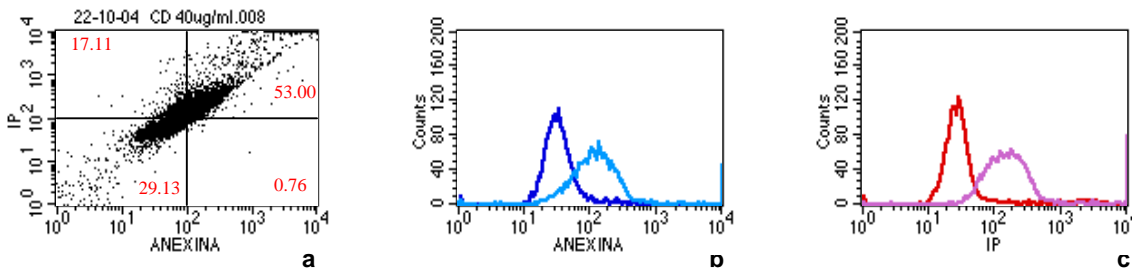


Figura 10: gráficos obtenido de la citometría de flujo realizada con células tratadas con CD. El panel **a** corresponde al *dot plot* obtenido, en donde se evidencia el efecto de la droga sobre las células tratadas (los valores de los cuadrante, son el porcentaje correspondiente al cuadrante respecto del total de eventos analizados). El panel **b**, corresponde a la comparación entre las curvas control (azul) y tratado (celeste) de las células que evidencian marcación con anexina v. El panel **c**, corresponde a la comparación entre control (curva roja) y tratamiento (curva rosa) de las células que evidenciaron marcación con yoduro de propidio.

En este caso también es oportuno señalar, que aparentemente el efecto de la Crotoxina sobre la línea celular U937 correspondería a la acción de CD y no a CT, dado que CD evidencia resultados similares a los de las dos drogas juntas.

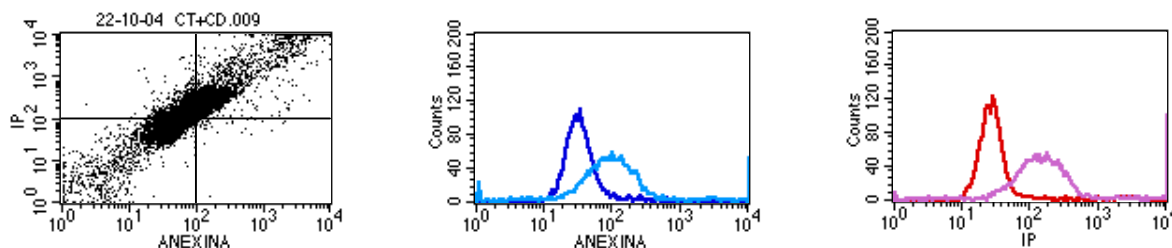


Figura 11: gráfico obtenido de la citometría de flujo realizada con células tratadas con CT+CD. El panel a corresponde al *dot plot* obtenido, en donde se evidencia el efecto de la droga sobre las células tratadas (los valores de los cuadrante, son el porcentaje correspondiente al cuadrante respecto del total de eventos analizados). El panel b, corresponde a la comparación entre las curvas control (azul) y tratado (celeste) de las células que evidencian marcación con anexina v. Los paneles c, corresponde a la comparación entre control (curva roja) y tratamiento (curva rosa) de las células que evidenciaron marcación con yoduro de propidio.

Con respecto a la Ciclofosfamida, para las dosis ensayadas, no se observó efecto alguno sobre esta línea celular. En la figura 12 se pueden observar los resultados luego de 24hs de tratamiento con la droga en células U937. Las concentraciones de droga ensayadas fueron: 0.2  $\mu\text{g/ml}$  y 0.4  $\mu\text{g/ml}$ . Estas concentraciones fueron elegidas sobre la base de los resultados de los ensayos en multiplaca analizados con fluorescencia.

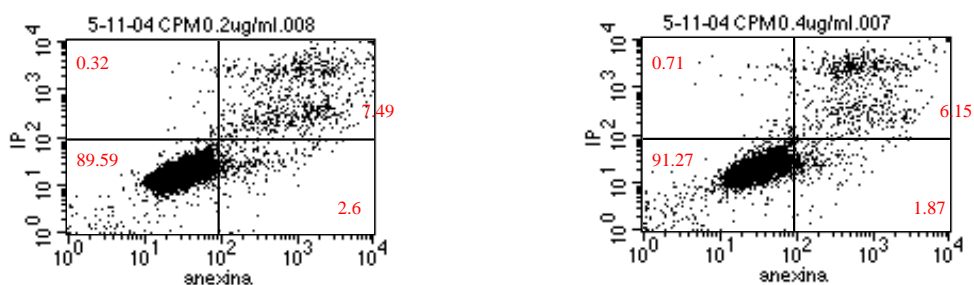


Figura 12: citometría de flujo de células tratadas con ciclofosfamida durante 24hs. En el panel a la concentración de CPM es de 0,2  $\mu\text{g/ml}$  y en el panel b es de 0,4  $\mu\text{g/ml}$ . Como puede observarse en el cuadrante inferior izquierdo de ambos *dot plot*, la viabilidad celular es muy similar al control.

### Curvas dosis-respuesta

Las curvas dosis-respuesta fueron realizadas con los datos obtenidos de los ensayos con MTT en células con 24 hs de tratamiento con la droga indicada. Los controles se realizaron para determinar el blanco que debía ser restado a cada medición.

La primera serie de gráficos, corresponde a los ensayos realizados con células U937. En la figura 13, se observa la curva dosis respuesta correspondiente a ensayos de citotoxicidad por Doxorubicina (DOR). La DOR indujo una caída dosis dependiente en la fracción de células viables, evidente tanto en la graficación lineal (panel a) como en la semilogarítmica (panel b). Llamativamente, a altas concentraciones de DOR, se observa un aumento de la viabilidad. Como se analizará en la discusión, se trata probablemente de un artefacto resultante de que la lectura que hace el espectrofotómetro a 540nm, incluye no sólo el MTT, sino también la droga (que presenta un color rojo intenso).

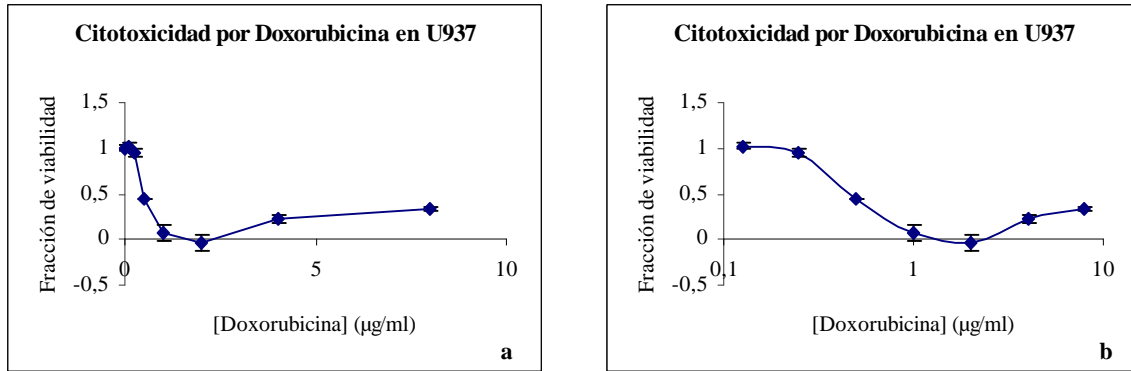


Figura 13: curvas dosis respuesta correspondiente al tratamiento de células U937 con DOR. Panel **a** gráfico con escala lineal y panel **b** gráfico con escala semilogarítmica.

En la figura 14, se puede ver la foto de una placa de células U937 tratadas con Doxorubicina, en donde se observa claramente que a altas concentraciones de droga la coloración del pocillo es muy intensa (interfiriendo así con la coloración propia del método).

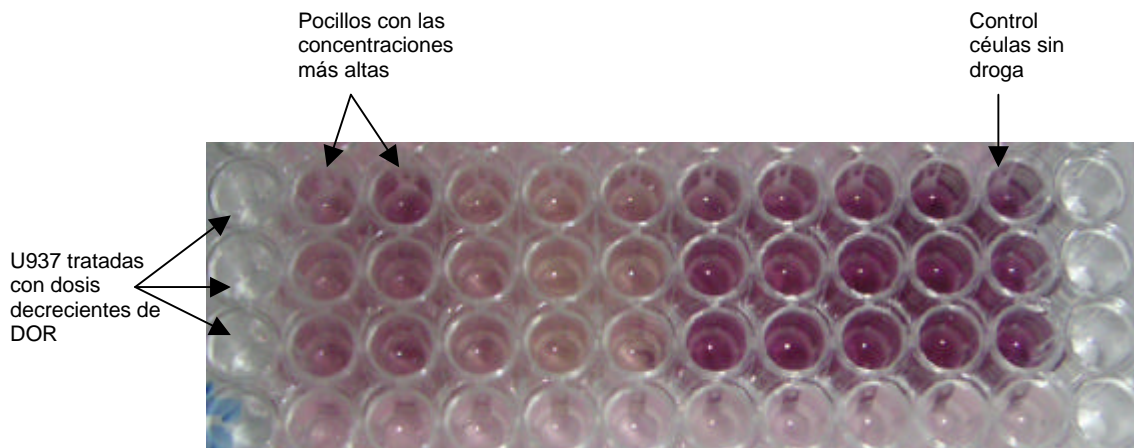


Figura 14: foto de una placa de 96 pocillos, con células U937, tratadas durante 24hs con Doxorubicina y analizadas con el método de reducción de MTT. En la foto se observa la intensa coloración de la droga en las dosis más altas (primeros 2 pocillos de la izquierda).

La dosis inhibitoria 50 para la doxorubicina, calculada por este método es de 0,5 mg/ml, que está dentro del rango de dosis estimadas por la observación con fluorescencia y que fueron ensayadas por citometría de flujo. Si bien no es exactamente coincidente con estas dos aproximaciones anteriores, puede prestarse a confusión el hecho de no saber hasta que punto una célula se considera viva o muerta. Una célula apoptótica mantiene hasta cierto punto ciertas características de células viables.

En la figura 15, se observan los efectos de Mitomicina (MMC). Se observa una disminución dosis-dependiente de la viabilidad celular, llegando en las concentraciones mayores, a menos del 15% de viabilidad.

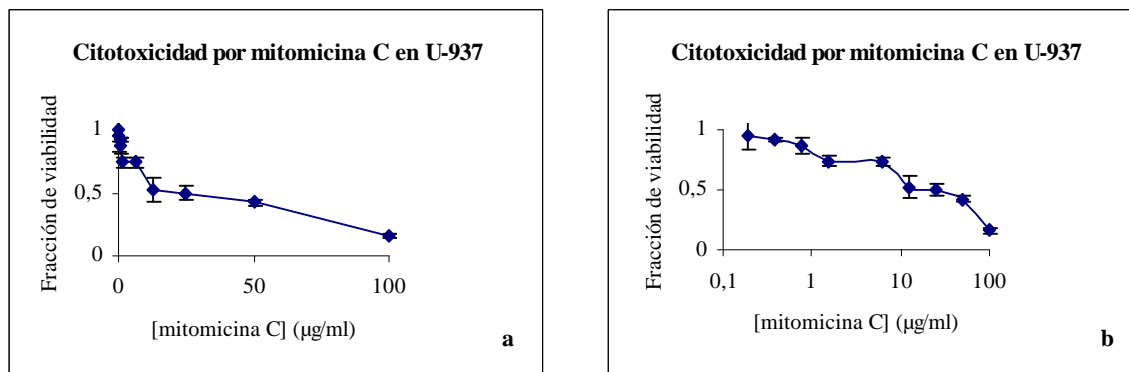


Figura 15. Los paneles **a** y **b** corresponden a las curvas dosis-respuesta en escala lineal y semilogarítmica respectivamente, de células U937 tratadas con MMC.

En este caso la  $IC_{50}$  estimada por este método para MMC está entre 12.5 mg/ml y 50 mg/ml, no se puede establecer un valor más preciso dado que la fracción de viabilidad se mantiene cercana al 50% entre estas dos concentraciones. Por otro lado cabe destacar que la dosis calculada por este método es visiblemente más alta que la calculada por el método de observación con fluorescencia.

En la figura 16 se observa la curva dosis-respuesta del efecto del tratamiento de células U937 con CT. Contrariamente a lo esperado, CT no muestra efecto citotóxico en esta línea celular en las condiciones utilizadas, observándose un aumento de la viabilidad celular aún en dosis altas de la droga. Esto mismo fue observado en los otros métodos realizados, no pudiéndose establecer una concentración inhibitoria para esta droga, por ninguno de ellos

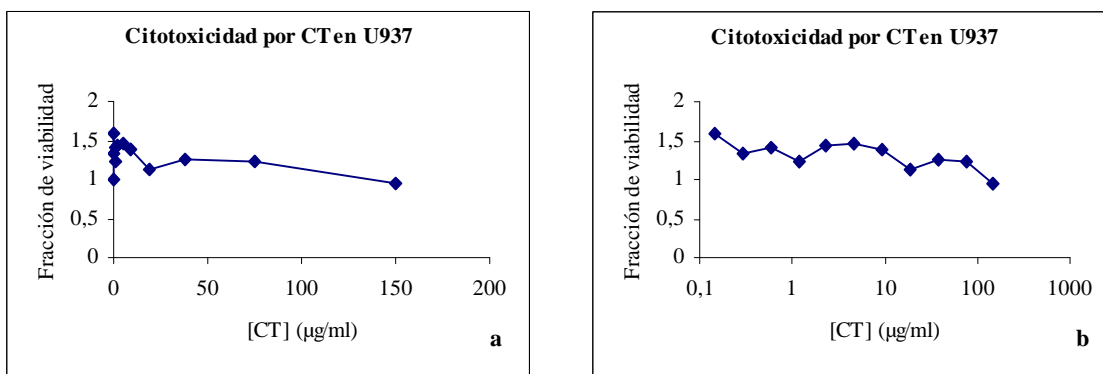


Figura 16: panel **a** y panel **b**, curvas dosis-respuesta en escala lineal y en escala semilogarítmica respectivamente, correspondientes al tratamiento de células U937 con CT.

Las figuras 17 y 18 muestran un experimento representativo del efecto de CD y CT+CD respectivamente, en la misma línea celular. En este caso, el efecto de las dos drogas juntas, no difiere del de CD sola por lo que en las condiciones utilizadas, debería atribuirse el mismo a la acción de CD.

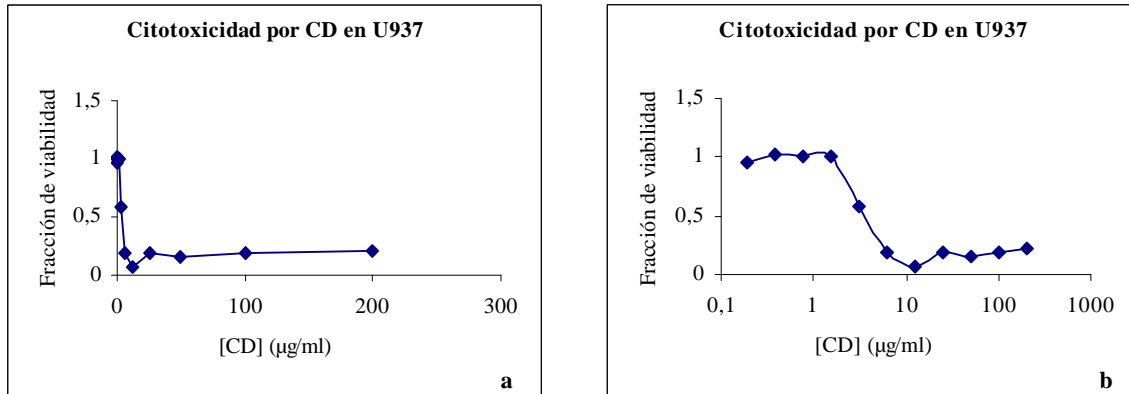


Figura 17: paneles **a** y **b** gráficos en escala lineal y semilogarítmica respectivamente, correspondientes al tratamiento de células U937 con CD (24hs de incubación).

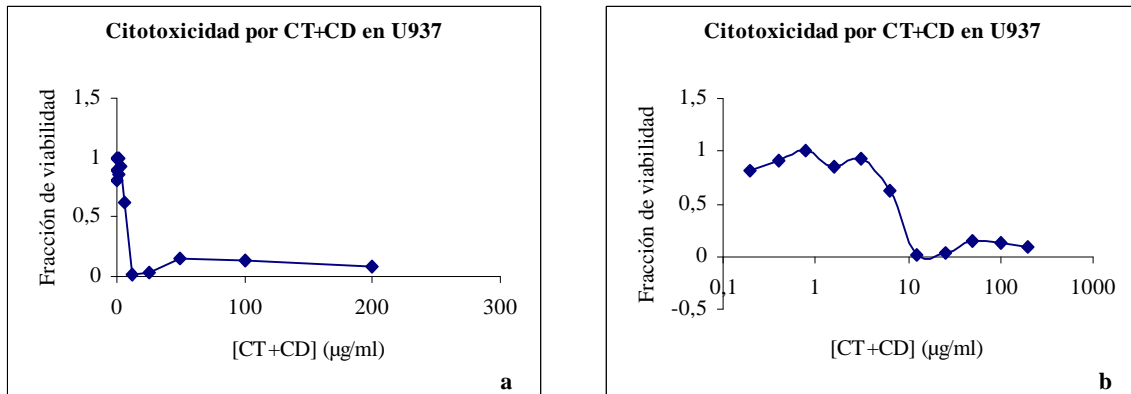


Figura 18: panel **a**, curva dosis-respuesta en escala lineal correspondiente al tratamiento con CT+CD. Panel **b**, gráfico en escala semilogarítmica del mismo tratamiento.

La  $IC_{50}$  estimada por este método para CT+CD en células U937, es de 6,25 µg/ml

La serie de gráficos que se muestran a continuación (Fig 19 a 22), corresponden a los ensayos de reducción de MTT con células HEP-2. La figura 19, muestra las curvas dosis-respuesta de Doxorubicina, en las que se observa una disminución dosis-dependiente de la viabilidad celular. A bajas dosis de la droga la viabilidad celular es alta, disminuyendo significativamente al aumentar la concentración de la droga. Esto puede observarse más claramente en el gráfico semilogarítmico del panel **b**.

Pero al igual que lo observado en células U937, en las dos últimas concentraciones (que son a su vez las más elevadas) se observa un aumento de la curva de viabilidad, correspondiente a la intensa coloración de la droga (color rojo intenso), que ha interferido en la medición del espectrofotómetro.

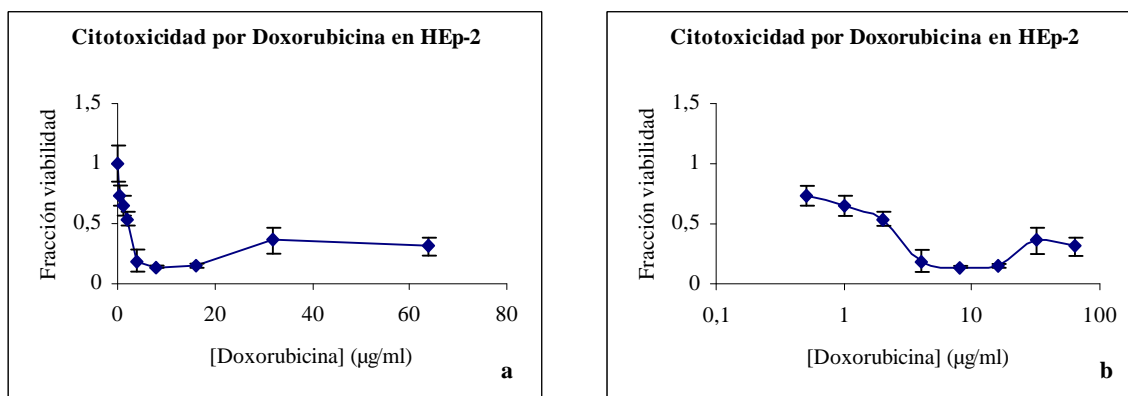


Figura 19: curva dosis respuesta del ensayo de citotoxicidad por Doxorubicina en células hep-2. En el panel **a** se observa el gráfico en escala lineal y en el panel **b** el gráfico en escala semilogarítmica correspondiente.

La concentración inhibitoria 50 ( $IC_{50}$ ) estimada por este método para la Doxorubicina está alrededor de  $2\mu\text{g/ml}$ , para células HEp-2.

En el gráfico de la figura 20, se observan los resultados obtenidos del ensayo de citotoxicidad por Mitomicina C sobre la línea celular HEp-2. Como se puede observar, a las concentraciones ensayadas, no se observan efectos significativos de la droga sobre esta línea celular, lo cual no coincide con los resultados observados en las placas analizadas con fluorescencia. Esto será comentado en la discusión pero en principio podría deberse a que el análisis con fluorescencia es mucho más subjetivo e inexacto. Con estos resultados no es posible determinar una concentración inhibitoria 50 y sería preciso ensayar otras concentraciones de la droga para probar su eficacia.

La elección de las concentraciones que fueron utilizadas en los ensayos, se realizó mediante la búsqueda bibliográfica de trabajos en los cuales se utilizaran estas drogas sobre las líneas celulares en estudio o en líneas celulares de características similares.

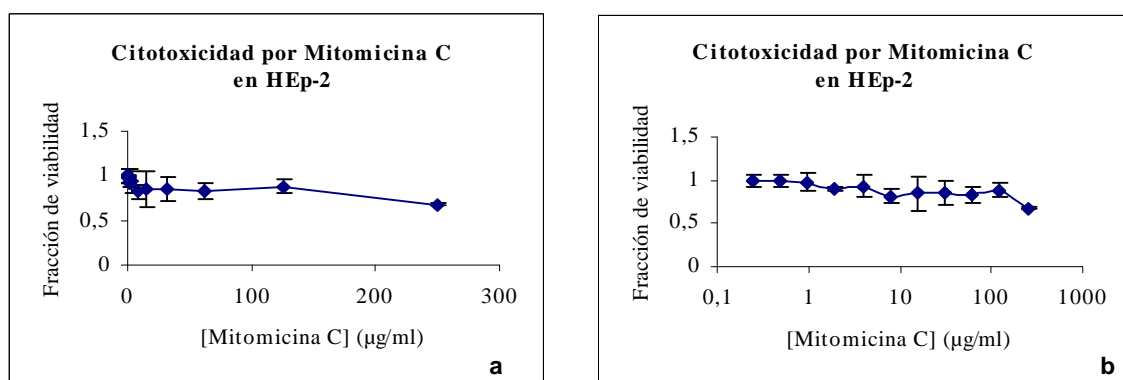


Figura 20: gráficos correspondientes a los ensayos de citotoxicidad por Mitomicina C en células hep-2 analizados por el método MTT. El panel **a** corresponde al gráfico en escala lineal y el **b** al gráfico en escala semilogarítmica del mismo experimento.

En las figuras 21 y 22 se muestran los ensayos de citotoxicidad causada por Crotoxina. Para este compuesto en particular, por estar formado por dos compuestos extraídos de diferentes especies de serpiente, se realizaron tres ensayos:

1. citotoxicidad causada por dosis crecientes de CT (Crotoxina)
2. citotoxicidad causada por dosis crecientes de CD (Cardiotoxina)
3. citotoxicidad causada por CT+CD

A continuación se muestran los resultados de estos ensayos. En la figura 21 se observa la curva dosis-respuesta obtenida luego de incubar células de la línea celular HEp-2 con dosis seriadas de CT. Al igual que en células U937, aun a altas concentraciones de droga no se observa un efecto citotóxico cercano del 100%, por lo tanto no es posible calcular la  $IC_{50}$ . Esto coincide con lo observado al microscopio óptico y de fluorescencia en donde los pocillos con altas dosis de CT mostraban células aún viables.

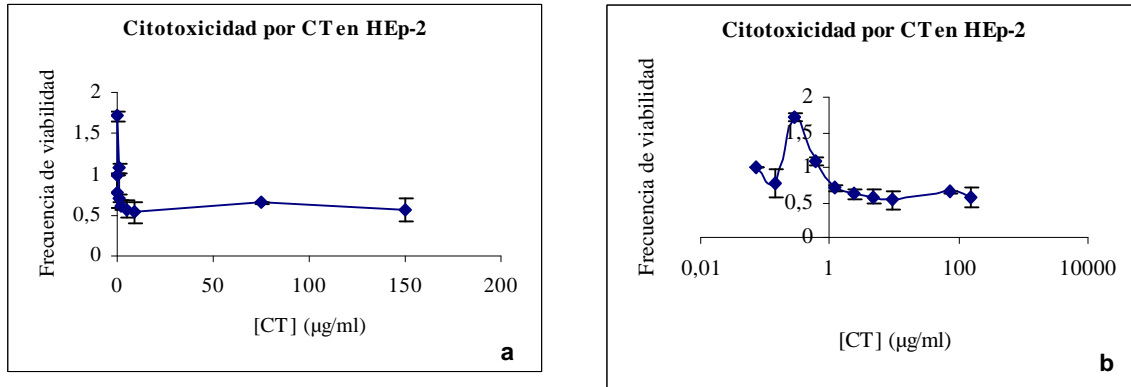


Figura 21: ensayo de citotoxicidad por CT en células hep-2. Panel a gráfico en escala lineal . Panel b gráfico en escala semilogarítmica.

En el gráfico de la figura 22 se muestra el efecto de células HEp-2 tratadas con CD. A diferencia de lo ocurrido con CT, en los ensayos realizados con dosis crecientes de CD y CD+CT, puede observarse un efecto citotóxico a concentraciones elevadas de la droga. Por lo tanto el efecto de CT+CD debería atribuirse en este caso a la acción de la Cardiotoxina y no al de la Crotoxina

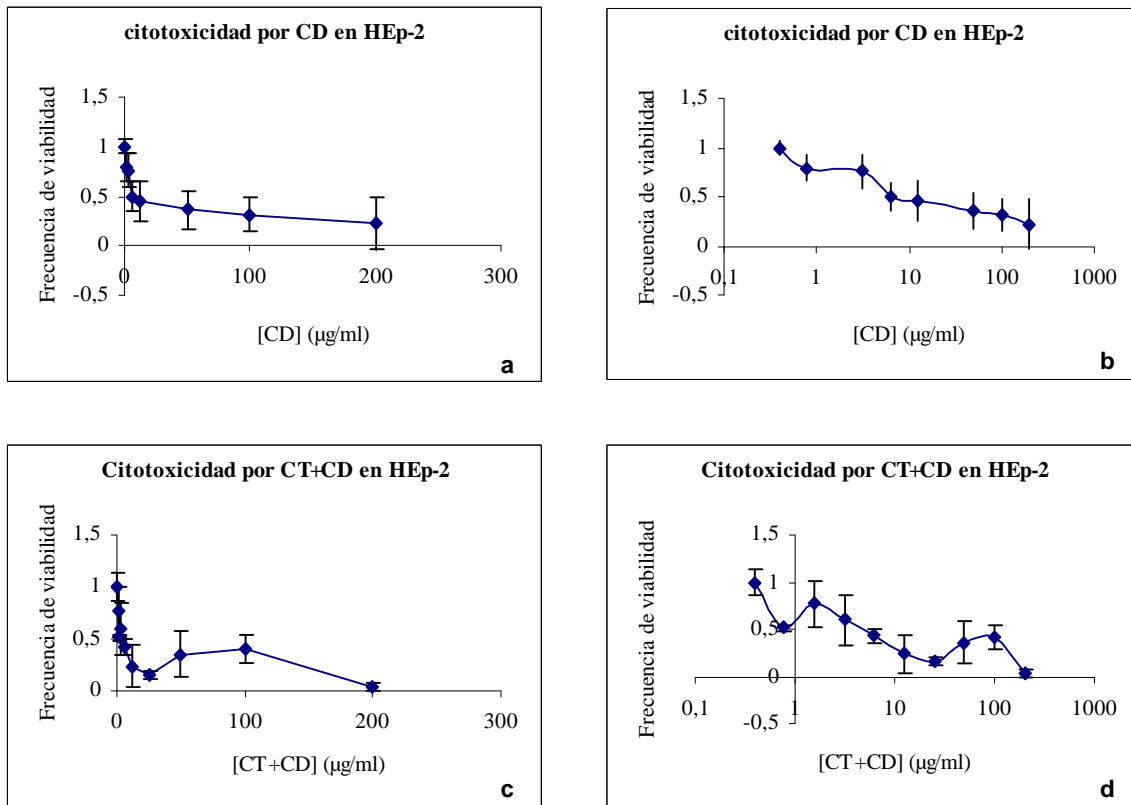


Figura 22: en el panel a se muestran los efectos de citotoxicidad causados por CD en un gráfico en escala lineal. El panel b corresponde a los mismos datos analizados en un gráfico con escala semilogarítmica. Panel c citotoxicidad por CT+CD en gráfico con escala lineal. Panel d datos analizados en gráfico con escala semilogarítmica.

La concentración inhibitoria 50 que se calcula a partir del gráfico para CD, es de 6.25 µg/ml, siendo que la de CT+CD está entre 3.125µg/ml y 6.25 µg/ml

En la Figura 23, se puede apreciar el efecto de distintas concentraciones de CT, CD y CT+CD, sobre las células HEp-2. La diferencia de coloración en la hilera de pocillos correspondientes a CT y las hileras correspondientes a CD y CD+CT



Fig. 23: placa de células hep-2 tratadas con CT, CD y CT+CD, donde se observa la coloración pareja de la hilera de pocillos con células tratadas con CT.

### Fragmentación de DNA

La fragmentación del DNA, es una de las características bioquímicas más relevantes en la determinación de apoptosis. Dado que este trabajo ha sido orientado a la determinación de citotoxicidad por diferentes métodos, la idea de hacer una corrida electroforética y ver cómo el DNA se veía afectado por estos tratamientos, pareció ser una alternativa importante de evaluar. Hasta ahora la droga que pareció mantener un patrón de comportamiento más parejo (en cuanto a rango de concentraciones se refiere) fue la doxorubicina. Por este motivo, se decidió realizar la corrida electroforética con células U937 tratadas con varias dosis de Doxorubicina.

Las concentraciones de doxorubicina con las que se incubaron las células fueron las siguientes:  $D_1=128 \mu\text{g/ml}$ ,  $D_2=2 \mu\text{g/ml}$ ,  $D_3=1 \mu\text{g/ml}$ ,  $D_4=0.5 \mu\text{g/ml}$ ,  $D_5=0,25 \mu\text{g/ml}$ , C=células sin tratar. Como puede observarse en la figura 24, a bajas concentraciones de droga, el DNA está prácticamente entero y no entra en el gel (queda en el pocillo). A medida que aumentan las dosis de DOR, comienza a verse la degradación del DNA y va aumentando la longitud de la banda de corrida.

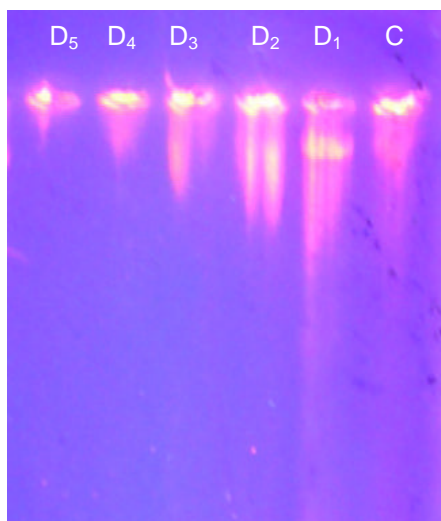


Figura 24: fotografía de una electroforesis de DNA de células tratadas con dosis variables de Doxorubicina. En la figura se observa el efecto de dosis crecientes de DOR ( $D_5$  a  $D_1$ ).



## Discusión

En el presente trabajo se estudiaron diversos métodos de evaluación de citotoxicidad celular causada por diferentes drogas, clásicamente caracterizadas por su efecto citotóxico (al punto de ser usadas en terapéutica) y una potencial droga antineoplásica, la crotoxina.

En referencia a los métodos utilizados en este trabajo, el método de reducción de MTT, fue el más confiable en cuanto a los resultados obtenidos. Además, no es un método excesivamente costoso, dado que sólo es necesario comprar el reactivo y prepararlo en el laboratorio. Requiere la utilización de multiplacas y lector de absorbancia, que son equipos de uso relativamente frecuente en el laboratorio. La confiabilidad de los resultados, está basada en la sencillez del método (no es requiere un entrenamiento técnico complejo para realizarlo) y se minimizan los errores de subjetividad del operador.

Uno de los inconvenientes presentados en la utilización de este método, fue al utilizar altas concentraciones de Doxorubicina (droga intensamente coloreada). Estas dosis eran leídas por el espectrofotómetro, dando valores de viabilidad inexistentes. Se hubiera podido reducir este efecto aspirando el medio de cultivo con la droga y lavando, esto fue realizado en las células HEp-2, pero no fue posible reducir completamente el efecto de coloración de la droga. En los tratamientos realizados con U937 no se realizó porque al crecer estas células en suspensión, habría que haber centrifugado la placa previamente.

El método de incubación en multiplaca y posterior análisis con fluorescencia y conteo con violeta de cristal, es menos preciso por varios motivos. En primer lugar, porque sólo se toma una alícuota (25  $\mu$ l) para ser observada en el microscopio, por lo tanto pueden cometerse errores de muestreo, involuntarios (aunque en todos los casos se homogeneizaba el pocillo con la micropipeta). Además, la observación al microscopio y la determinación de la viabilidad o no de las células, depende mucho del ojo del operador (que puede estar más o menos entrenado en este aspecto) y de la subjetividad del mismo. Como se mencionó anteriormente, no es sencillo definir y determinar qué está vivo y qué no. Las células que se observan en apoptosis, van en camino a la muerte celular, pero no están literalmente muertas y no pueden ser consideradas como tal. De todos modos, este es un método fácil de implementar y bastante económico y que sirve para determinar una dosis máxima de citotoxicidad y una mínima, rango necesario para la implementación de otros métodos.

La citometría de flujo, es un método preciso y confiable, que proporciona un detallado análisis célula a célula, pero los reactivos y el equipo necesario para realizarlo (se debe contar con un citómetro) hacen que este método sea más costoso y difícil de utilizar. Es necesario además, contar con un operador muy bien entrenado que pueda programar las condiciones de adquisición de la muestra, adquirir las muestras y analizar los resultados, dado que al ser un método de análisis complejo, hay numerosas variables en juego que requieren ser analizadas.

Con respecto a la electroforesis de DNA, es un método relativamente sencillo que lo único que requiere es poner a punto el protocolo de extracción y corrida. En este trabajo sólo fue realizada para una droga, Doxorubicina, que es la droga que dio resultados más parejos en todos los métodos realizados. Es un método confiable y económico que determina la apoptosis de manera indiscutible (obteniéndose bandas discretas en la corrida).

También es interesante comentar, las diferencias observadas en distintas sublíneas de la línea celular U937. En la línea utilizada inicialmente, que fue descongelada en el laboratorio y provenía de una semilla original de ATCC, se observó un crecimiento mucho más lento, aún después de varios repiques y no se logró que aumentara significativamente la concentración celular en cultivo. Estas células parecían también ser más susceptibles a las dosis de droga ensayadas en los experimentos. Fue diferente lo observado en el repique cedido por el IBYME. En este caso, las células alcanzaban altas concentraciones en cultivo y luego de ser repicadas, llegaban muy rápidamente a la concentración inicial. También se mostraron más resistentes a las dosis de droga ensayadas. Esto podría explicarse, porque las primeras estuvieron congeladas durante varios años y podrían haberse visto eventualmente dañadas. Por otra parte, las provenientes del IBYME, al ser un repique de un cultivo en activo crecimiento, estaban posiblemente en mejores condiciones.

Con las células HEp-2 no se presentó esa diferencia, éstas fueron provistas por el mismo laboratorio (Lab de Virología del Hospital de Niños Ricardo Gutiérrez). Luego de ser utilizadas fueron congeladas en nuestro laboratorio y posteriormente descongeladas para volver a ser utilizadas. Siempre tuvieron un crecimiento parejo, al igual que su respuesta ante los tratamientos.

En referencia a los resultados obtenidos, los valores de  $IC_{50}$  no pudieron ser establecidos con precisión en todos los casos. Esto pudo deberse a varias causas. En primer lugar, el *screening* inicialmente realizado para determinar un rango de concentración de droga que comprendiera la  $IC_{50}$ , resultó ser muy poco preciso en cuanto a los resultados obtenidos. Por este motivo, no se utilizaron las concentraciones adecuadas en los ensayos de citometría de flujo. Hubiera sido mejor, realizar primero el método MTT y luego la citometría.

Tal vez de este modo se hubiese podido obtener con mayor exactitud, resultados más satisfactorios y comparables.

En cuanto a la falta de eficacia de CT, hay varios puntos que deben tenerse en cuenta. En primer lugar, la Crotoxina es una fosfolipasa A2 secretoria que además de su actividad catalítica, presenta actividad biológica al unirse a receptores de membrana celular tales como el receptor de factor de crecimiento epidérmico (EGF-R). Se han realizado estudios que indican que la actividad antiproliferativa de CT estaría ligada a la expresión de altos niveles de EGF-R por parte de la célula blanco, mientras que en la acción de CD no habría ninguna correlación entre los niveles de EGF-R y su acción antiproliferativa (Donato NJ, 1996). Es posible que la falta de eficacia observada con CT sobre estas líneas celulares, sea debido a la carencia de niveles adecuados de EGF-R. Por otra parte, la acción de una droga sobre un tipo celular específico, depende de varios factores como por ejemplo la concentración, el tiempo de incubación del cultivo con la droga en estudio y el estadio del ciclo celular en el que se encuentre el cultivo. Quedará para futuros estudios la posibilidad de modificar estas variables y llegar a conclusiones más certeras.

Con respecto a la Ciclofosfamida, presenta valores muy erráticos en el ensayo de *screening*, debería haberse ensayado primero por el método MTT antes de realizar la citometría de flujo y contar así, con un rango de concentraciones más confiable. Pero dado que requiere ser activada por el citocromo P450 para lograr su actividad biológica, probablemente el cultivo celular no sea el mejor modelo para su estudio.

En la última década, se han develado estructuras tridimensionales formadas por complejos DNA-drogas citotóxicas, por medio de difracción de rayos X y análisis de Resonancia Magnética Nuclear. Estos estudios han proporcionado numerosos datos acerca de la conformación del DNA y del modo de interacción de las drogas, en particular, los sitios específicos (sitio blanco) en el cual actúan. La interacción de muchas drogas antineoplásicas importantes con el DNA juega un rol fundamental en su actividad biológica (Yang X, Wang A, 1999). De hecho el DNA podría ser considerado como un receptor macromolecular de esas drogas. Sería preciso evaluar cada una de estas interacciones para determinar con mayor precisión la acción o falta de eficacia de las drogas aquí estudiadas.

## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. Roberto A. Diez, por permitirme realizar este trabajo en su laboratorio, por todo lo que tan generosamente me ha enseñado y por ayudarme a que esta tesina se haga finalmente realidad.

A la Dra Inés Bignone que pensó en mi para hacer esta tesina y a quien le voy a estar siempre agradecida.

A la Dra. Teresa Guereño, que ha sido en las etapas iniciales que suelen ser las más difíciles, un apoyo incondicional y una ayuda invaluable.

A la Dra. Alicia Fuchs, de quien aprendí el rigor del trabajo en el laboratorio, que estuvo siempre cerca cuando necesité ayuda y me la ha brindado desinteresadamente.

A la Dra. Cecilia Fornari y a toda su gente por prestarme el citómetro y enseñarme a analizar los datos.

Al «casi» Bioquímico Adrián Mancini, compañero inseparable de trabajo sin el cual los días en el laboratorio se me hubieran hecho mucho más largos.

A Gustavo Vassen quien seguramente dentro de no mucho tiempo va a ser un distinguido Biólogo o Químico (o ambos) y que también estuvo aprendiendo conmigo durante el desarrollo de este trabajo.

A toda la gente de la II Cátedra de Farmacología, especialmente a Mario y Jorge que nos prepararon cada día ese cafecito rico de la mañana.

A Marilina y Patricio con cuyo buen humor y simpatía compartimos mañanas y tardes divertidas haciendo más ameno el trabajo.

A la Dra Mischenko (que me prestó el suero cuando no tenía), Marcela (que me facilitó las células HEP-2), Federico, Natalia, la Sra. Teresa y tantas otras personas que de modo conciente o no me han ayudado a concretar este trabajo.

Finalmente, pero no menos importante, debo agradecerle a mi familia. A mi mamá y papá, mis hermanos y hermanas, mis hijas y mi marido y a María Cristina Salerni. Todos ellos son muy importantes para mí y sin ellos, por distintas razones, nada de esto hubiera sido posible. ¡¡Muchas gracias por todo!! Bibliografía

## Bibliografía

- ATCC Catalogue of Cell Lines & Hybridomas Rockville, MD USA: ATCC. 1994
- Donato NJ, Martin CA, Perez M, Newman RA, Vidal JC y Etcheverry M. Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crotoxin, a snake venom phospholipase A<sub>2</sub> toxin. A novel growth inhibitory mechanism. *Biochemical Pharmacology* 1996 Jun. Vol 51, 1535-1543.
- Eagle, H. Propagation in a fluid medium of a human epidermoid carcinoma strain KB, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1955, 89: 362-364.
- Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A. Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics. Décima edición, Mc Graw Hill. New York, 2001. capítulo 52
- Hengartner, MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 2000, 407: 770-776
- Jäättelä M. Multiple cell death pathways as regulators of tumour initiation and progression. *Oncogene*, 2004, 23, 2746–2756
- Krammer, PH. CD95's deadly mission in the immune system. *Nature*, 2000, 407: 789-795.
- Kroemer G. Cell death and cancer: an introduction. *Oncogene*, 2004, 23: 2744–2745.
- Kuhn DM, Balkis M, Chandra J, Mukherjee PK, y Ghannoum MA. Uses and Limitations of the XTT Assay in Studies of *Candida* Growth and Metabolism *Journal of Clinical Microbiology*, Jan. 2003, p. 506–508
- Litter M. Compendio de Farmacología. Editorial El Ateneo, cuarta edición, 1988, capítulo 45
- Lockshin RA, Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature Reviews in Cell Biology*, 2001, 2: 545-556.
- Lockshin R, Zakeri Z. Caspase-independent cell death? *Oncogene*, 2004, 23:2766–2773.
- Majno G, Joris I. Apoptosis, Oncosis and Necrosis. An overview of cell Death. *American Journal of Pathology*, 1995, 146: 3-15.
- Nicotera P, Melino G. Regulation of the apoptosis–necrosis switch. *Oncogene*, 2004, 23:2757–2765.
- Ohta I, Goraia I, Miyamoto Y, Yanga J, Zhenga JH, Kawata N, Hirahara F, Shirotake S. Cyclophosphamide and 5-fluorouracil act synergistically in ovarian clear cell adenocarcinoma cells. *Cancer Letters* 162 (2001) 39-48
- Ralph, P., Moore, M.A.S., and Nilsson, K. Lysozyme synthesis by established human and murine histiocytic lymphoma cell lines. *J. Exp. Med.*, 143: 1528-1533, 1976.
- Rich T, Allen RL, Wyllie AH. Defying death after DNA damage. *Nature*, 2000, 407: 777-783.
- Richard A, Zakeri L y Zakeri Z. Programmed cell death and apoptosis: origins of the theory. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 2001 Jul. Vol 2, 545-556.
- Syu-ichi K *et al.* Diethyldithiocarbamate-Induced Cytotoxicity and Apoptosis in Leukemia Cell Lines. *Biol. Pharm. Bull.* 2003, 26:964–968.
- Sundstrom, C. and Nilsson, K. Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (U937). *Int. J. Cancer*, 17: 565-577, 1976. (Ref ID:2145).
- Wang, K., Shindoh, H., Inoue T. y Horii I. Advantages of in vitro cytotoxicity testing by using primary rat hepatocytes in comparison with established cell lines. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2002. Vol.27, No.3, 229-237.
- Xiang-Lei Yang, Andrew H.-J. Wang. Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacology & Therapeutics* 83 (1999) 181–215
- Yang XL, Wang AH. Structural studies of atom-specific anticancer drugs acting on DNA. *Pharmacol Ther.* 1999 Sep;83(3):181-21