



**COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS ANTILEUCÉMICOS *IN VITRO* DEL  
NUEVO COMPLEJO *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] CON LOS DE LAS  
COMBINACIONES DEL CLOTRIMAZOL CON TRANSPLATINO Y  
CISPLATINO**

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIA  
POSTGRADO EN MEDICINA VETERINARIA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS MORFOLÓGICAS



**COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS ANTILEUCÉMICOS *IN VITRO* DEL  
NUEVO COMPLEJO *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] CON LOS DE LAS  
COMBINACIONES DEL CLOTRIMAZOL CON TRANSPLATINO Y  
CISPLATINO**

Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al título de Magister  
Scientiarum en Ciencias Morfológicas

LCDA. LINMAR E. J. RODRÍGUEZ G.  
TUTORA: MSc. MAÍT X. VELÁSQUEZ M.

MARACAY, SEPTIEMBRE DE 2013



*A mi pequeña Valeria Marina, tu  
sonrisa me inspira a seguir  
creciendo cada día más.*

## AGRADECIMIENTOS

Desde estas líneas quiero expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que me han apoyado y ayudado en mi trayectoria profesional.

Quiero expresar mi agradecimiento a la Sección de Bioquímica- Farmacológica del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo, en especial a mi mentor y mi maestro, el Profesor Germán Fraile, por su confianza y su estímulo a seguir creciendo intelectualmente.

A mi Tutora Mait y al grupo de asesores de mí trabajo de grado, las profesoras: Irma Agrela, Gisela García y Elizabeth Marcano, por su predisposición permanente e incondicional en aclarar mis dudas y por sus substanciales sugerencias durante la redacción de la Tesis. Gracias su amistad.

A mis padres Nelly y Argenis, que con amor han infundido en mí valores, dándome ejemplos dignos de entrega y superación; siempre apoyándome para lograr cada unas de mis metas.

A mi esposo Alexander y a mi hija Valeria por su comprensión durante los años que le dediqué a este trabajo de Tesis.

A mi abuelita Juana, y a mis hermanos Liny y Argenis, siempre a mi lado en cada momento de mi vida.

A Sara, Nico y Pedro Miguel, por apoyo brindado durante estos últimos años. A mi amiga Elymar, mi compañera en este reto que emprendimos hace 3 años.

Finalmente, les doy infinitamente gracias a Dios y la Virgen del Valle por guiar mi camino, y haberme permitido lograr mis objetivos.

# COMPARACIÓN DE LOS EFECTOS ANTILEUCÉMICOS *IN VITRO* DEL NUEVO COMPLEJO *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] CON LOS DE LAS COMBINACIONES DEL CLOTRIMAZOL CON TRANSPLATINO Y CISPLATINO.

E.G. Lcda. Linmar E.J. Rodríguez G. Tutora: MSc. Mait X. Velásquez M.

Maracay, septiembre 2013

## RESUMEN

En un trabajo recientemente publicado, se demostró que el nuevo complejo *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] interactúa con el ADN e inhibe el crecimiento *in vitro* de algunas líneas de células tumorales. Sin embargo, tanto el ligando clotrimazol como el cisplatino mostraron mayores efectos citotóxicos que los de ese complejo. En el presente trabajo se compararon los efectos *in vitro* del *trans*-Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] con los de las combinaciones del clotrimazol con transplatino y con cisplatino sobre la línea de células T leucémicas Jurkat, debido a que: (a) el clotrimazol induce apoptosis en varias líneas de células de leucemia linfoblástica aguda sin afectar los linfocitos T maduros; (b) la unión del clotrimazol con un átomo de un metal de transición podría incrementar esos efectos y (c) los efectos antileucémicos del cisplatino y del transplatino podrían ser potenciados por sus combinaciones con el clotrimazol. Para ello se realizaron ensayos *in vitro* que permitieron determinar: la proliferación (conteo en hemocitómetro) y la viabilidad mediante técnicas de microscopía óptica y de fluorescencia (necrosis y apoptosis), espectrofotométricas (reacción del MTT) y de citometría de flujo (apoptosis). Las combinaciones se analizaron empleando un programa diseñado para determinar si los efectos observados son antagónicos, aditivos o sinérgicos y finalmente se compararon los IC<sub>50</sub> de cada compuesto y de sus combinaciones. Resultados: (a) El *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] exhibió efectos citotóxicos y citostáticos más pronunciados que los compuestos individuales; (b) la combinación cisplatino/clotrimazol indujo efectos aditivos y sinérgicos tanto para la pérdida de viabilidad como para la inhibición de la proliferación; (c) estos últimos efectos fueron mayores que los observados con el *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]; (d) la combinación cisplatino/clotrimazol induce efectos proapoptóticos mayores que los del *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]. En conclusión, el hallazgo más importante de este estudio es la posibilidad de alcanzar efectos antitumorales sinérgicos mediante combinaciones racionales del cisplatino con drogas de uso permitido tales como el clotrimazol.

**Palabras claves:** Jurkat, Clotrimazol, Cisplatino, Transplatino, Citostáticos, Citotóxico.

**COMPARISON OF *IN VITRO* ANTILEUKEMIC EFFECTS OF THE NEW COMPLEX *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] WITH THOSE OF THE CLOTRIMAZOLE COMBINATIONS WITH CISPLATIN OR TRANSPLATIN**

**ABSTRACT**

A recent study showed that the new platinum complex *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] binds DNA and inhibits the *in vitro* growth of different cancer cell lines. However, the related drug cisplatin as well as the clotrimazole ligand were more cytotoxic than the complex. In this work, clotrimazole and cisplatin (or transplatin) were evaluated alone or in combination against the growth and viability of the Jurkat leukemic T-cell line and these effects were compared with those of *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]. The main reasons for this proposal are: (a) clotrimazole exhibits apoptotic activities against leukemic T-cells without affecting mature T lymphocytes; (b) the binding of the clotrimazole ligand with a transition metal atom could increase its cytotoxic effects and (c) The antileukemic effects of both cisplatin and transplatin could be potentiated by combining it with clotrimazole. With this purpose, a number of *in vitro* assays were carried out for the assessment of: the cell proliferation (by counting in a hemocytometer) and the cell viability by different methods including fluorescence and optical microscopy (necrosis and apoptosis) as well as by spectrophotometric (MTT assay) and flow cytometric techniques. The combinations were analyzed by using a program designed to determine if their effects are antagonistic, additive or synergistic and finally, the IC<sub>50</sub> values correspondent to each compound alone or in combination, were compared. Results: (a) *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] exhibited a more potent cytotoxic or cytostatic effect than that of individual compounds; (b) the cisplatin/clotrimazole combination led to additive or synergistic decreases in cell viability and growth; (c) These effects were more pronounced than those observed with *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]; (d) The apoptotic effects induced by the cisplatin/clotrimazole combination were significantly higher than of *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]. Taken together, the most important finding to emerge from this study is that is possible to increase the antitumoral effects of cisplatin by designing rational combinations with well-known “old drugs” such as clotrimazole.

Keywords: Jurkat, clotrimazole, cisplatin, transplatin, cytostatic drugs, cytotoxic drugs

## ÍNDICE DE CONTENIDO

	<b>Pp</b>
DEDICATORIA .....	iv
AGRADECIMIENTO .....	v
RESUMEN .....	vi
ABSTRACT .....	vii
ÍNDICE DE TABLAS .....	xi
ÍNDICE DE FIGURAS.....	xii
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>1</b>
1.Objetivos .....	4
1.1. Objetivo General.....	4
1.2. Objetivos Específicos .....	4
<b>I. REVISIÓN BIBLOGRÁFICA</b> .....	<b>6</b>
1. Antecedentes .....	6
2. Bases Teóricas .....	10
2.1. Compuestos de Platino.....	10
2.2. El CDDP como base para el estudio de los mecanismos de acción de los compuestos de platino .....	12
2.3. Mecanismo de resistencia al CDDP .....	15
2.3.1. Mecanismos que afectan la acumulación intracelular de CDDP .....	16
2.3.2. Mecanismos que bloquean la muerte celular .....	17
2.4. Muerte celular inducida por CDDP .....	19
2.5. CTZ y su interés en la terapia antileucémica .....	23
3. Sistema Hipótesis, Variables e Indicadores .....	25

3.1. Hipótesis .....	25
3.2. Variables e Indicadores .....	25
<b>II. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>26</b>
1. Tipo y Diseño de Investigación.....	26
2. Unidades Experimentales .....	26
3. Procedimiento .....	27
3.1. Cultivo celular .....	27
3.2. Determinación los efectos de CTZ-Pt, sobre la proliferación de las células Jurkat.....	27
3.3. Determinación los efectos de CTZ-Pt, sobre la viabilidad de las células Jurkat.....	28
3.3.1. Método de exclusión de Azul Tripano .....	29
3.3.2. Microscopía de Fluorescencia .....	30
3.3.3. Reacción del MTT .....	31
3.3.4. Tinción y citometría de flujo con Ioduro de propidio (IP) .....	31
3.4. Determinación de los efectos de las combinaciones de clotrimazol más transplatino y clotrimazol más cisplatino sobre la viabilidad y proliferación de las células Jurkat .....	32
3.5. Análisis Estadístico de los Datos .....	37
<b>III. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
1. Efectos de CTZ-Pt, sobre la proliferación de las células Jurkat .....	39
2. Efectos de CTZ-Pt, sobre la viabilidad de las células Jurkat .....	41
2.1. Efectos sobre la necrosis y apoptosis evaluadas mediante microscopía óptica y de fluorescencia .....	41
2.2. Efectos sobre la viabilidad medida mediante la reacción del MTT .....	43

3. Efectos de las combinaciones de clotrimazol más transplatino y clotrimazol más cisplatino sobre la viabilidad y proliferación de las células Jurkat .....	44
3.1. Efecto de la combinación TDDP/CTZ sobre la viabilidad y proliferación .....	45
3.2. Efecto de la combinación CDDP/CTZ sobre la viabilidad y proliferación .....	47
4. Comparación de los efectos del CTZ-Pt con las combinaciones binarias TDDP/CTZ y CDDP/CTZ sobre la viabilidad y proliferación .....	53
5. Comparación de los efectos del CTZ-Pt con la combinación CDDP/CTZ sobre la apoptosis .....	55
<b>IV. DISCUSIÓN .....</b>	<b>60</b>
1. Efectos del Pt .....	61
2. Efectos del CTZ.....	62
<b>V. CONCLUSIONES.....</b>	<b>66</b>
<b>VI. RECOMENDACIONES.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>68</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Nº</b>	<b>Pp</b>
1. Combinación CDDP/CTZ proporción 1:1 y 1:2.....	48

## ÍNDICE DE FIGURAS

Nº	Pp
1. Complejo CTZ-Pt ( <i>trans</i> -[Pt(CTZ) <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> ]) .....	3
2. CDDP .....	7
3. TDDP .....	8
4. Drogas anticáncer con base de platino .....	10
5. Administración y biotransformación <i>in vivo</i> del CDDP .....	11
6. Transporte del CDDP en la célula .....	12
7. Formación de los aductos de CDDP con el ADN .....	13
8. Representación esquemática de la formación de aductos .....	14
9. Respuesta celular inducida por el CDDP .....	15
10. Representación esquemática de los mecanismos que afectan a la acumulación celular del CDDP .....	17
11. Reparación por Escisión de Nucleótidos .....	18
12. Muerte Celular .....	19
13. Mecanismo molecular de la apoptosis .....	20
14. Mecanismo de inducción de necrosis por CDDP .....	21
15. Apoptosis inducida por CDDP .....	22
16. CTZ .....	24
17. Clones de células Jurkat en cultivo .....	27
18. Micrografía de células Jurkat teñidas con azul tripano .....	29
19. Micrografía de células Jurkat teñidas con la mezcla fluorescente naranja de acridina y bromuro de etidio .....	31
20. Histograma representativo de citometría de flujo .....	32
21. Gráfica del efecto de la mediana (A), gráfico del índice de combinación con la fracción afectada (B) y gráfico de los índices de reducción de la dosis con la fracción afectada (C) .....	37

22. Efectos de los compuestos individuales sobre la proliferación .....	40
23. Efectos de los compuestos individuales sobre la necrosis y la apoptosis .....	42
24. Efectos de los compuestos individuales sobre la viabilidad .....	44
25. Comparación de los efectos individuales y combinados de TDDP y CTZ sobre la viabilidad .....	46
26. Comparación de los efectos individuales y combinados de TDDP y CTZ sobre la proliferación .....	47
27. Análisis de los efectos de las combinaciones CDDP/CTZ sobre la viabilidad. ...	50
28. Índice de reducción de la dosis .....	51
29. Análisis de los efectos de la combinación de CDDP/CTZ en la proporción 1:2 sobre la proliferación .....	52
30. Índice de reducción de la dosis .....	53
31. Comparación de los IC <sub>50</sub> de CTZ-Pt y CDDP/CTZ para la inhibición de la proliferación (A) y la pérdida de viabilidad (B). .....	55
32. Histogramas representativos de los efectos de los compuestos individuales y de la combinación (CDDP 5 μM)/(CTZ 10 μM) sobre la apoptosis .....	57
33. Comparación de los efectos de los compuestos individuales y de la combinación (CDDP 5 μM)/(CTZ 10 μM) sobre la apoptosis .....	58
34. Comparación de los efectos de los compuestos individuales y de la combinación CDDP 5 μM / CTZ 10 μM sobre la apoptosis y la necrosis .....	59
35. Secuencia de eventos propuesta por para explicar la sinergia entre el CTZ y el CDDP .....	64

## INTRODUCCIÓN

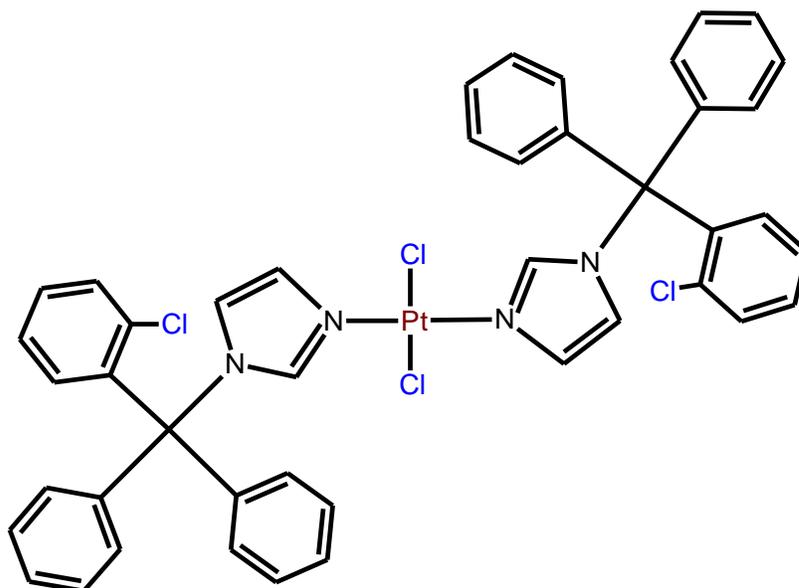
Los compuestos de platino han sido ampliamente usados en la quimioterapia contra el cáncer, demostrando gran actividad frente a tumores de células germinales, cáncer de ovario, cáncer de pulmón, cáncer de útero, cáncer colon-rectal y cáncer de vejiga (Lebwohl y Canetta, 1998). Un ejemplo de este tipo de compuestos es el cisplatino (*cis*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] o CDDP), el cual actúa uniéndose al ADN formando aductos que causan cambios en la doble hélice (Rabik y Dolan, 2007). A pesar de su amplio uso, su efectividad se ve limitada debido a sus efectos nefrotóxicos y neurotóxicos (Wang y Lippard, 2005), además de la resistencia mostrada en algunas neoplasias humanas y líneas celulares tumorales (Borst *et al.*, 2008).

Debido a sus efectos adversos y la resistencia observada en algunas células tumorales contra el CDDP, se han intentado diversas estrategias para mejorar sus bondades terapéuticas entre ellas destacan: (a) encapsulamiento dentro de liposomas para contrarrestar la resistencia debida a la disminución de la captación de CDDP por las células tumorales (Carvalho *et al.*, 2007); (b) combinación con otras drogas quimioterapéuticas (Ray y Kindler, 2009; Paton *et al.*, 2010) y (c) síntesis de nuevos complejos de platino (Kostova, 2006; Liu *et al.*, 2008).

Aunque la síntesis de nuevos complejos de platino ha rendido sus frutos debido a la aceptación a nivel mundial del carboplatino y del oxaliplatino, los severos efectos adversos que incluyen la nefrotoxicidad, la mielosupresión y las neuropatías; así como también el desarrollo de resistencia adquiridas frente a esas drogas, han hecho que continúe la búsqueda de nuevos complejos con alta potencia antitumoral, baja

toxicidad y exentas de resistencias cruzadas. En tal sentido, existen numerosos estudios sobre complejos de platino (II) y platino (IV) que se encuentran en fases experimentales (Jakupec *et al.*, 2008; Van Rijt y Sadler, 2009). Dentro de ese nuevo grupo de drogas se encuentran los denominados complejos de platino no-clásicos, que incluyen complejos con isomería geométrica *trans* y cuyo prototipo es el transplatino (*trans*-[Pt(NH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] o TDDP). Aunque TDDP carece de actividad anticáncer, se ha demostrado que diversos análogos pueden alcanzar actividades terapéuticas iguales o superiores a las de los “clásicos” CDDP, carboplatino y oxaliplatino (Jakupec *et al.*, 2008).

Otro grupo interesante de nuevos complejos de platino lo constituyen los sintetizados mediante coordinación con ligandos biológicamente activos, los cuales pueden ejercer su propio efecto antitumoral. Además, la inserción de átomos metálicos en esos ligandos, puede favorecer: (a) la estabilización de ciertas geometrías no usuales en esos ligandos; (b) actividad redox adquirida; (c) solubilidad incrementada; (d) captación celular aumentada y (e) efectos sinérgicos entre el metal y los ligandos (Jakupec *et al.*, 2008). Dentro de ese esquema, un grupo de investigadores del Laboratorio de Química Bioinorgánica del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), ha sintetizado nuevos complejos formados por la inserción de átomos de oro, cobre, rutenio, platino entre otros, dentro de la estructura de drogas de conocida actividad biológica. Empleando esa estrategia, dicho grupo sintetizó un nuevo complejo, el *trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] (CTZ-Pt) (Figura 1), que combina en su estructura química al agente antifúngico clotrimazol (CTZ) y el platino(II) (Navarro *et al.*, 2009).



**Figura 1. Complejo CTZ-Pt (*trans*-[Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>]): Estructura Química. Fuente:** Navarro *et al.*, 2009.

El CTZ-Pt exhibió capacidad de interactuar con el ADN en un sistema libre de células y además mostró propiedades antiproliferativas en un grupo variado de líneas tumorales *in vitro*. Sin embargo, sus actividades citotóxicas contra esas líneas tumorales fueron mayores que las del TDDP, menores que las del CDDP e iguales que el CTZ. Aunque estos efectos no fueron de mayor importancia en las líneas de tumores sólidos ensayados; la meta del presente trabajo fue estudiar los efectos del CTZ-Pt en la línea celular leucémica Jurkat debido a los siguientes factores:

1. Existen indicios que sugieren que las células leucémicas pueden ser más sensibles al CTZ, concentraciones bajas (2-10  $\mu\text{M}$ ) del CTZ indujeron apoptosis en células extraídas de pacientes con leucemia linfoblástica aguda (LLA), sin afectar a los linfocitos T maduros, y resultados similares se obtuvieron al tratar diferentes líneas leucémica usando concentraciones de 10  $\mu\text{M}$  CTZ (una concentración alcanzable *in vivo*) (Ito *et al.*, 2002). Estos efectos del CTZ fueron claramente mayores que los reportados en las líneas de tumores sólidos.

2. Los efectos relativamente bajos del CDDP sobre las células leucémicas pueden ser potenciados por otras drogas. Por ejemplo, el pre-tratamiento de células CD34(+) (provenientes de pacientes con leucemia mieloide crónica) con el imatinib mesilato (quimioterapéutico inhibidor de la tirosina quinasa), potenció los efectos pro-apoptóticos del CDDP (Skorta *et al.*, 2009). Por otra parte, se ha demostrado que el propio CDDP incrementa los efectos terapéuticos *in vivo* del temozolomide (agente alquilante empleado para tratar tumores cerebrales) en pacientes con LLA (Seiter *et al.*, 2009)

3. Los derivados con geometría *trans* del Pt(II) pueden tener actividades antitumorales tan potentes o mayores que los complejos con geometría *cis* tal como fue demostrado por Aris y Farell (2009)

Finalmente, debido a lo antes expuesto en este estudio se relacionó las actividades citostáticas y citotóxicas del complejo CTZ-Pt en las células Jurkat, fueron complementados con ensayos de combinaciones del CTZ con el CDDP y con el CDDP para determinar si la eficacia terapéutica del ligando CTZ coordinadamente unido a un átomo de Pt(II) (como en el CTZ-Pt) es diferente a la del CTZ libre combinado con un complejo de Pt(II) con actividades conocidas (como en los casos del CDDP y TDDP).

## 1. Objetivos

### 1.1. Objetivo General.

Comparar los efectos antileucémicos *in vitro* del nuevo complejo *trans*-Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] con los de las combinaciones del clotrimazol con transplatino y cisplatino.

### 1.2. Objetivos Específicos.

1. Determinar los efectos de CTZ-Pt, sobre la proliferación de las células Jurkat.

2. Determinar los efectos de CTZ-Pt, sobre la viabilidad de las células Jurkat.
3. Determinar los efectos de las combinaciones de CTZ más TDDP y CTZ más CDDP sobre la viabilidad y proliferación de las células Jurkat.

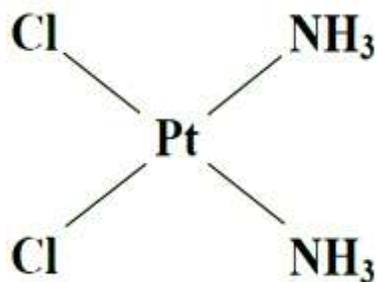
## I. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.

### 1. Antecedentes.

Los compuestos de platino han sido ampliamente usados en la terapia antineoplásica. En la literatura, existe un gran número de estudios que reportan efectos significativos de compuestos de platino (en su configuración *cis* o *trans*) en líneas celulares leucémicas. En este trabajo se presentan algunos ejemplos que ilustran la relevancia de los compuestos de platino.

El interés por el estudio de los complejos de platino como drogas antitumorales parte desde el descubrimiento de la inhibición de la división celular de *Escherichia coli* por parte de los mismos, el cual da origen al CDDP (Figura 2) uno de los principales agentes antitumorales (Rosemberg *et al.*, 1965). Estudios posteriores demostraron que el CDDP tenía efectos antitumorales en modelos murinos de sarcoma 180, cuando se le aplicaba una inyección intraperitoneal a una dosis de 8 mg/Kg (Rosemberg y Van Camp., 1970).

Su *et al.* (2000), demostraron mediante el ensayo del 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbromurodetetrazolio (MTT) que el carboplatino requiere de concentraciones 10 veces más altas que la del CDDP para inducir un grado similar de inhibición del crecimiento de las células leucémicas. Sin embargo, las células progenitoras hematopoyéticas respondieron igualmente tanto al CDDP como al carboplatino. Los resultados sugieren que la actividad mielosupresora de carboplatino es mayor que su efecto antileucémico.



**Figura 2. CDDP:** Estructura química cisdiaminocloroplatino (II). **Fuente:** Galea y Murray, 2008.

Troyano *et al.* (2001), comprobaron que el tratamiento con inhibidores de algunas ADN topoisomerasas y agentes alquilantes como el CDDP causaban acumulación de peróxido de hidrógeno y apoptosis en células U937. Por otra parte, el tratamiento con agentes antioxidantes posterior a la adición del CDDP atenúa la necrosis en estas células por una disminución del potencial de membrana mitocondrial, lo que indica que alteraciones en la función mitocondrial regulan la selección entre necrosis y apoptosis en dichas células.

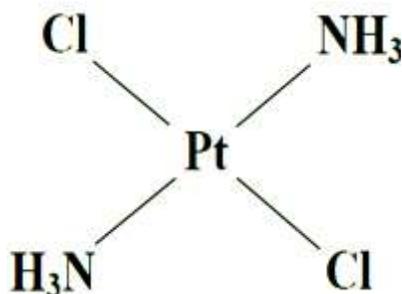
En otro estudio, Troyano *et al.* (2003), determinaron mediante técnicas de citometría de flujo que 0,5 mM de CDDP causa la activación de la caspasas 3 y 9; por ende muerte por apoptosis en células U937. El tratamiento previo con butionina sufoximina (supresor del Glutation) o peróxido de hidrógeno, suprime la activación de las caspasas, y la muerte celular se da por necrosis.

El primer estudio que examinó la expresión de genes BCL2L12 y BCL2 sobre la inducción de apoptosis por el CDDP fue realizado por Floros *et al.* (2003), quienes demostraron que el CDDP induce apoptosis de las células pertenecientes a la línea celular leucémica HL-60, debido a un aumento en la expresión de los genes proapoptóticos (BCL2L12) y una disminución en los genes antiapoptóticos (BCL2).

Ramos *et al.* (2006), demostraron que las actividades antitumorales incrementan tanto en líneas celulares sensibles como en líneas celulares resistentes al CDDP al sustituir los grupos NH<sub>3</sub> del TDDP por un grupo alifático y por un ligando amino

heterocíclico (trans-[PtCl<sub>2</sub>(isopropilamina)(3-(hidroximetil)-piridina)],1, y trans-[PtCl<sub>2</sub>(isopropilamina)(4-(hidroximetil)-piridina)].

Un compuesto análogo del CDDP, pero inactivo denominado TDDP (Figura 3) puede presentar actividad antitumoral tanto *in vivo* como *in vitro* si se sustituyen sus grupos funcionales NH<sub>3</sub> por aminas planares como las piridinas, quinolonas, isoquinolonas y tiazoles (Aris y Farell, 2009).



**Figura 3. TDDP:** Estructura química transdiaminocloroplatino (II). **Fuente:** Galea y Murray, 2008.

Navarro *et al.* (2009), prepararon y caracterizaron dos nuevos complejos de *trans*-CTZ platino ([Pt(CTZ)<sub>2</sub>I<sub>2</sub>] y CTZ-Pt). Con base en estudios de espectrometría, fluorimetría, desnaturalización térmica y viscosidad se determinó que ambos complejos se intercalan en el surco menor del ADN ocasionando inhibición del crecimiento de siete líneas celulares tumorales en un rango de concentraciones de 5 a 25 μM.

Por otra parte, existen estudios que revelan el potencial antineoplásico de agentes antifúngicos como el CTZ. Un estudio realizado por Aktas *et al.* (1998) demostró que el CTZ causa el agotamiento sostenido del calcio intracelular lo que conlleva a la activación de la Protein quinasa R (PKR) y fosforilación del Factor de iniciación 2α (eIF2α) y por lo tanto a la inhibición de la síntesis de proteínas a nivel de la iniciación de la traducción. Además el CTZ inhibe la expresión de ciertas ciclinas,

dando como resultado la inhibición de las quinasas dependientes de ciclinas y el bloqueo del ciclo celular en G1.

Khalid *et al.* (1999), estudiaron los efectos del CTZ sobre el crecimiento, morfología y sensibilidad al CDDP en líneas celulares de glioblastoma humano. Los autores analizaron dos líneas celulares, por una parte, la proliferación se determinó mediante el ensayo colorimétrico del MTT, este reveló una inhibición de la proliferación dosis dependiente. Por otra parte, el análisis de citometría de flujo reveló que las células tratadas con CTZ se acumulan en la fase G0/G1 con una marcada disminución celular en la fase S del ciclo celular, observándose también cambios morfológicos en dichas células.

Otro estudio demostró que el CTZ es citotóxico en células leucémicas humanas aisladas de pacientes con leucemia linfocítica aguda, este efecto es inducido por el agotamiento del calcio intracelular, lo que conlleva a la apoptosis y a la fragmentación del ADN (Ito *et al.*, 2002). En este estudio la apoptosis fue evaluada mediante Anexina V conjugada a FITC y la medida de flujo de calcio se detectó mediante la fluorescencia del fluorocromo Indo I el cual se encuentra conjugado al calcio.

En un estudio realizado por Penso y Beitner (2002) se observan datos que indican la reducción en la glucólisis y los niveles de ATP, de manera dosis y tiempo dependiente en líneas celulares de carcinoma de pulmón y en células de adenocarcinoma de colon (células CT-26) tratadas con CTZ.

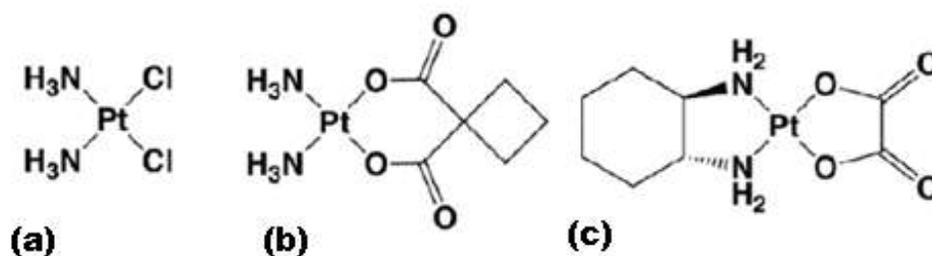
Dummer *et al.* (2005), realizaron un estudio en células de cáncer de mamas para determinar las alteraciones en el citoesqueleto asociadas a enzimas glicolíticas. Para ello se midió la citotoxicidad mediante el método del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbromurodetetrazolio), los cambios morfológico fueron observados por microscopia óptica de células teñidas con May–Grunwald–Giemsa y microscopia electrónica, la actividad enzimática fue medida por un método espectrofotométrico

de la reducción de  $\text{NAD}^+$  y el consumo de glucosa. Por último, para medir producción de lactato se emplearon: (a) un kit enzimático colorimétrico donde se determinaba el remanente de glucosa. (b) Un kit donde se determinaban los niveles de lactato utilizando la formación de NADH y piruvato. En este estudio se observó una disminución de la viabilidad inducida por el CTZ en líneas celulares de carcinoma mamario (MCF-7), por un mecanismo de alteración en el citoesqueleto asociados a enzimas glicolíticas.

## 2. Bases Teóricas.

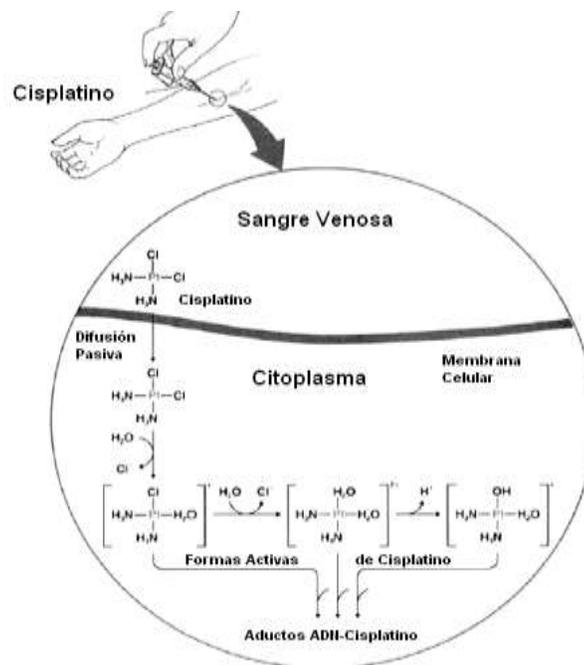
### 2.1. Compuestos de platino.

Existen una gran variedad de compuestos de platino empleados en la terapia contra el cáncer incluyendo CDDP (cis-diaminodicloroplatino II), carboplatino (cis-diamina(ciclobutano-1,1-dicarbóxilato)-platino II) y oxaliplatino (1,2-diaminociclohexanooxalato platino II) (Figura 4). Estas drogas han sido ampliamente usadas debido a la propiedad del platino para formar aductos con el ADN (Wang y Lippard, 2005).



**Figura 4. Drogas anticáncer con base de platino:** (a) CDDP (cis-diaminodicloroplatino II), (b) Carboplatino (cis-diamina(ciclobutano-1,1-dicarbóxilato)-platino II) y (c) Oxaliplatino (1,2-diaminociclohexanooxalato platino II). **Fuente:** Todd y Lippard, 2009.

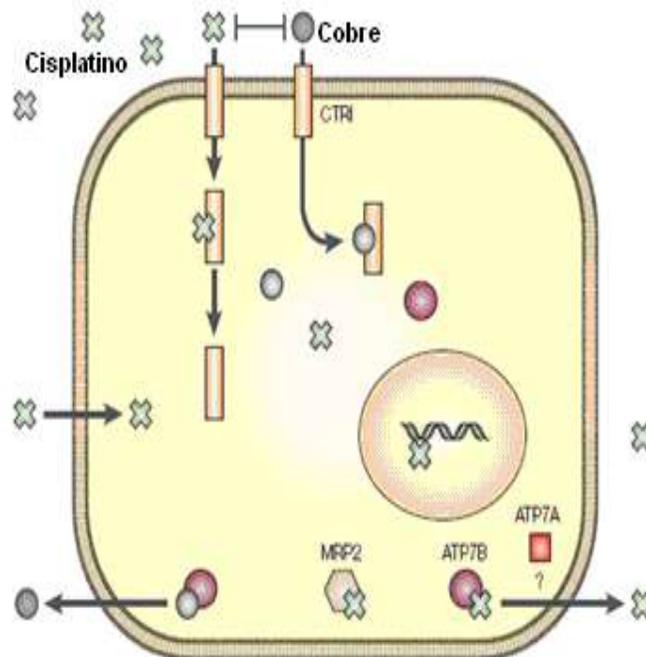
Su administración es intravenosa y una vez en el torrente sanguíneo se difunde a través de las membranas celulares al citoplasma (Figura 5). El CDDP es usado para cáncer de cabeza y cuello (incluye cánceres de boca, nariz, senos paranasales, glándulas salivales, garganta y ganglios linfáticos en el cuello), y tumores en células germinales; mientras que el carboplatino ha remplazado al CDDP en la quimioterapia de carcinoma de ovario y carcinoma de pulmón de células pequeñas. Por su parte, el oxaliplatino es usado en cáncer colon-rectal pero ha demostrado actividad antitumoral en cáncer endometrial, melanoma, linfoma no Hodgkin, carcinoma de pulmón, carcinoma de ovario y carcinoma de próstata (la actividad antitumoral contra estas neoplasias aún se encuentran en primera y segunda fase de estudio) (Rabik y Dolan, 2007).



**Figura 5. Administración y biotransformación *in vivo* del CDDP:** la administración es intravenosa y en el torrente sanguíneo se difunde al citoplasma. Una vez en el citoplasma, la baja concentración de iones cloruro facilita la hidrólisis de CDDP liberándose sus grupos cloruros. Se cree que el producto de esta hidrólisis es el que se une al ADN y forma los aductos. **Fuente:** Arnesano y Natile, 2009.

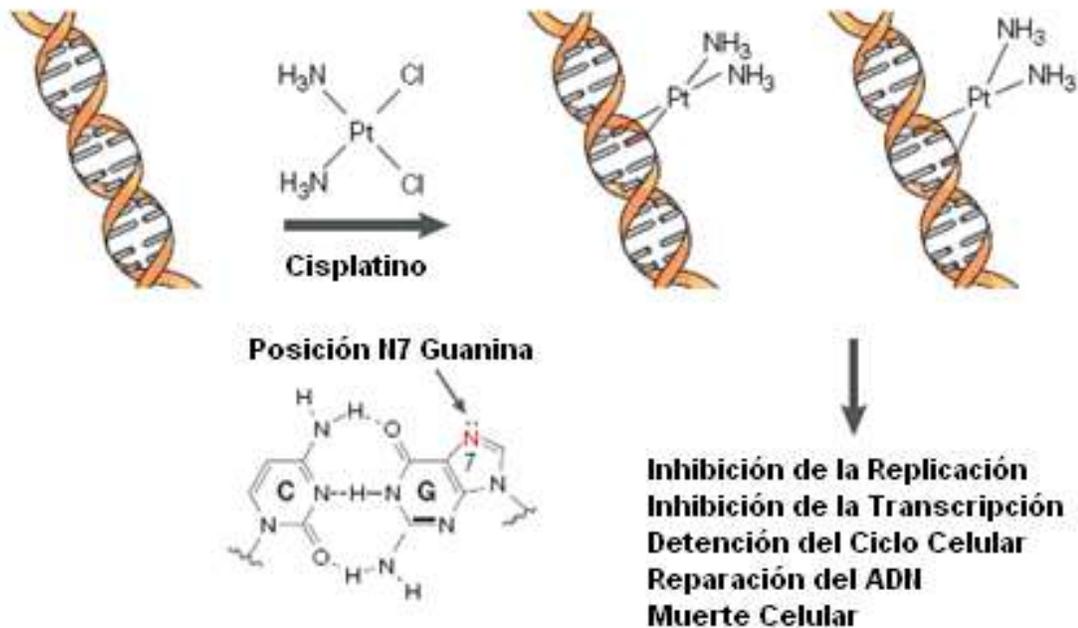
## 2.2. El CDDP como base para el estudio de los mecanismos de acción de los compuestos de platino.

El CDDP es un fármaco antineoplásico, cuyo mecanismo de acción no está completamente dilucidado. Este compuesto penetra a la célula por difusión pasiva. Esta entrada puede ser mediada por un transportador activo de cobre, el Ctr1p, tanto en levaduras como en células de mamíferos. Estudios han revelado que la mutación o delección del gen Ctr1p tanto en ratas como en levaduras aumentan la resistencia al CDDP (Figura 6) (Wang y Lippard, 2005). Dentro de la célula el CDDP se hidroliza perdiendo sus grupos cloruros (Figura 5) (la baja concentración de iones de cloruro facilita este proceso). Después de perder sus dos iones el CDDP hidrolizado reacciona con el ADN (Kostova, 2006).



**Figura 6. Transporte del CDDP en la célula:** El CDDP puede penetrar a la célula por difusión pasiva o mediante el transportador CTR1p. La salida del CDDP de la célula está asociada con otro transportador de cobre ATP7B. **Fuente:** Wang y Lippard, 2005.

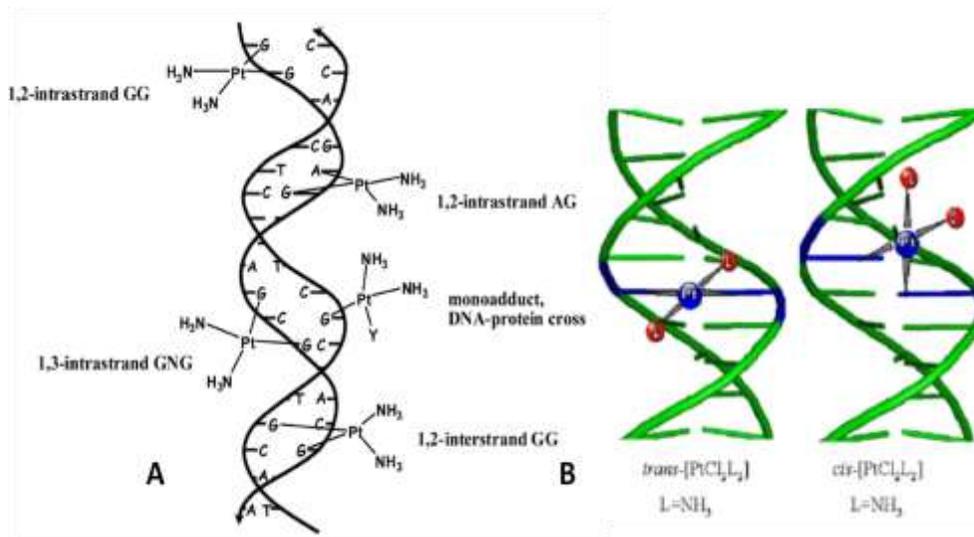
La citotoxicidad deriva de su unión al ADN y la formación de enlaces cruzados covalentes (aductos) intracatenarios en la posición N7 de las bases púricas (Figura 7). Aunque existen diversas teorías sobre el tipo de uniones que establece el CDDP con el ADN, se cree que las uniones 1,2-intracatenarias son las responsables de la citotoxicidad, debido a que el estereoisómero inactivo TDDP es incapaz de formar este tipo de uniones, formado solo enlaces 1,3-intercadenarios o intracatenarios (Rabik y Dolan, 2007) (Figura 8).



**Figura 7. Formación de los aductos de CDDP con el ADN:** El CDDP se une al ADN, formando aductos, en los que predominan los enlaces intracatenarios 1,2-guanina-guanina, la formación de estos enlaces cruzados distorsiona la hélice lo que puede desencadenar inhibición en la replicación y la transcripción, detención del ciclo celular, reparación del ADN y muerte celular. **Fuente:** Wang y Lippard, 2005.

Aunque existen diversas teorías sobre el tipo de uniones que establece el CDDP con el ADN, se cree que las uniones 1,2-intracatenarias son las responsables de la citotoxicidad,

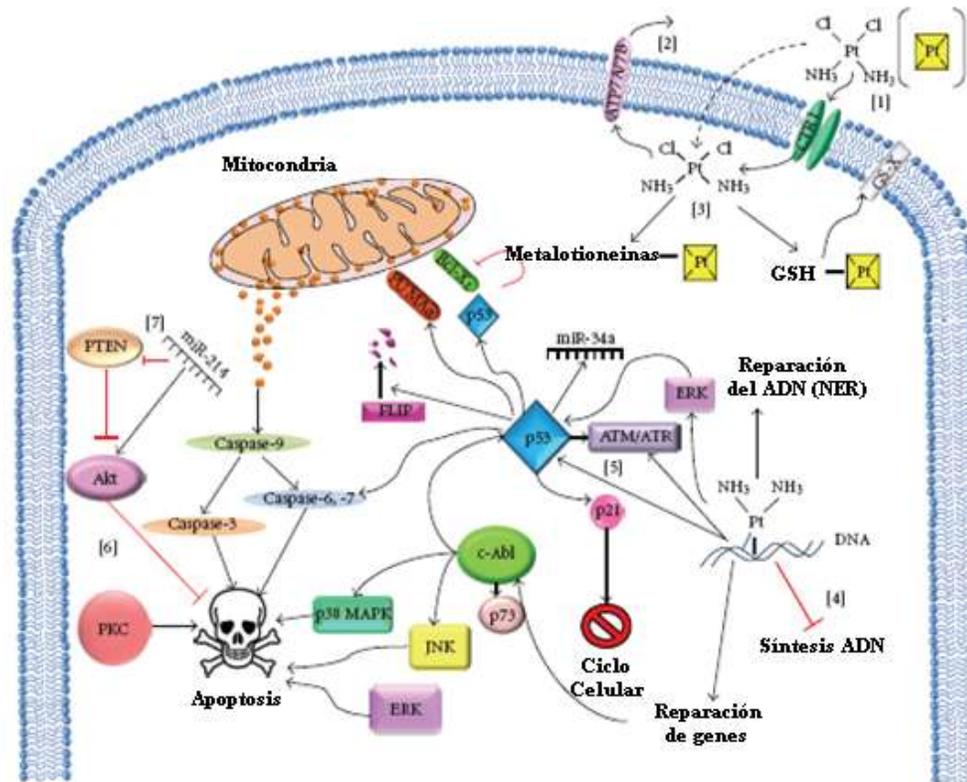
debido a que el estereoisómero inactivo TDDP es incapaz de formar este tipo de uniones, formado solo enlaces 1,3-intercatenarios o intracatenarios (Rabik y Dolan, 2007) (Figura 8).



**Figura 8. Representación esquemática de la formación de aductos:** (A) Diferentes tipos de aductos formado entre el CDDP y el ADN. (B) Debido a sus características geométricas, los enlaces intracatenarios formados por el TDDP son predominantemente 1,3-Guanina-Citocina y ocurren entre el mismo par de bases. **Fuente:** Aris y Farrell, 2009; Pizarro y Sadler, 2009.

La p53 puede regular la muerte celular inducida por CDDP mediante varios mecanismos. Su activación conduce a la inducción de p21, GADD45, PUMA $\alpha$ , proteínas proapoptóticas como las caspasa-6, caspasa-7, y microRNAs como miR-34<sup>a</sup>, además de unirse e inhibir la proteína antiapoptótica Bcl-xL. También puede inducir apoptosis por la degradación de la FLIP (Figura 9) (Basu y Krishnamurthy, 2010).

Por otra parte, la salida del CDDP está asociada a otro transportador de cobre, el ATP7B (trifosfato de adenosina de tipo P). La expresión de ATP7B en células de carcinoma humano modula la sensibilidad frente a CDDP y el cobre, aumentando el flujo de salida de ambos componentes. (Figura 9) (Wang y Lippard, 2005).



**Figura 9. Respuesta celular inducida por el CDDP:** (1) El CDDP entra a la célula por difusión pasiva o mediada por transportadores CTR1. (2) Salida del CDDP de la célula por los transportadores dependientes de ATP (ATP7A y ATP7B). (3) Unión del CDDP con tioles celulares, los cuales son expulsados de la célula por bombas dependientes de ATP (GS-X). (4) Formación de aductos al unirse el CDDP con el ADN. (5) El daño celular induce diferentes respuestas, como la detención de la síntesis del ADN, la reparación del mismo por el NER y la activación de p53. (6) Quinasas, tales como la PKC, ERK y Akt también están involucrados en la regulación de CDDP a la muerte celular inducida. (7) miR-214 promueve la resistencia a CDDP disminuyendo la activación de PTEN y Akt. **Fuente:** Basu y Krishnamurthy, 2010.

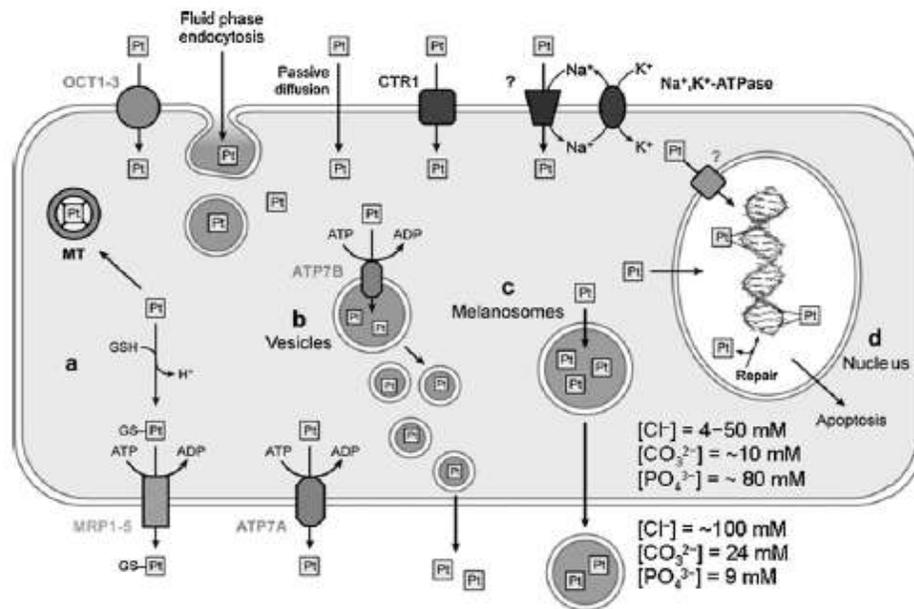
### 2.3. Mecanismo de resistencia al CDDP.

Los mecanismos de resistencia al CDDP suelen dividirse en dos grupos: a) los que afectan la acumulación intracelular y b) los que bloquean la inducción de muerte celular.

### **2.3.1. Mecanismos que afectan la acumulación intracelular de CDDP:**

**2.3.1.1. Absorción Reducida:** La disminución en la acumulación de esta droga está asociado tanto a la captación como a la salida del mismo de la célula donde los transportadores de cobre CTR1, ATP7A y ATP7B vinculados a este proceso juegan un papel fundamental (Figura 10). La deficiencia del CTR1 o su homólogo en mamíferos, el SLC31A1, se asocian con una disminución en la captación del CDDP por parte de la célula (Borst *et al.*, 2008), así mismo una sobreexpresión de ATP7A y ATP7B en las células está asociada de resistencia del CDDP producto del aumento en la acumulación del CDDP, esto ocasiona que la droga se acumule en vesículas impidiendo que esta llegue al ADN, posteriormente estas vesículas son expulsadas (Komatsu *et al.* citado por Borst *et al.*, 2008).

**2.3.1.2. Captura Intracelular del CDDP:** El incremento del glutatión (GSH) intracelular y la sobreexpresión de las isoenzimas glutatión-s-transferasa, así como la formación del complejo GSH-CDDP y el aumento en la extracción de este complejo por transportadores aniónicos de moléculas orgánicas pueden estar asociados a los mecanismos de resistencia (Figura 10) (Hamaguchi *et al.* citado por Borst *et al.*, 2008). Una vez en el citoplasma, la droga puede ser inactivada por oxidación o por conjugación con el GSH, el cual intercepta el complejo de platino evitando su unión al ADN, además de estar involucrado con la activación de ADN polimerasas encargadas de la reparación del ADN (Chu, 1994). El GSH no es el único tiol involucrado en las reacciones redox en las células. Cambios en el sistema antioxidante tiorredoxina reductasa, pueden inducir resistencia (Stordal y Davey, 2007).

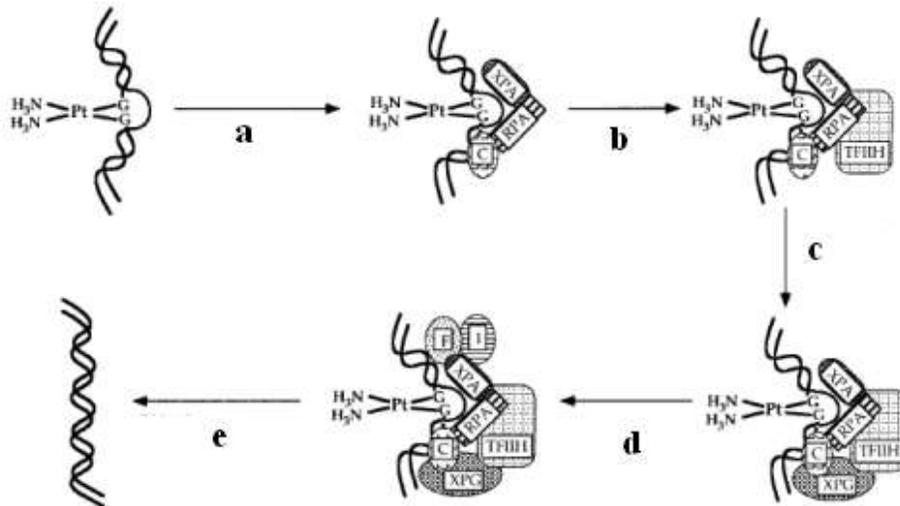


**Figura 10. Representación esquemática de los mecanismos que afectan a la acumulación celular del CDDP.** El CDDP puede entrar en la célula por difusión pasiva a través de la bicapa lipídica o por proteínas mediadoras tales como los transportadores de cationes orgánicos (OCT) o el transportador de cobre-1 (CTR1). Dentro de la célula, los fármacos de platino se pueden desactivar mediante la unión a metalotioneínas ricas en tioles (MT) o quelado por el glutatión (GSH), expulsándolo de la célula a través de las bombas de la SG-X (Mrp1-5)(a). También, pueden ser atrapados en vesículas y salen de la célula a través de ATP7B (b), o melanosomas, estos últimos expulsan al platino de la célula por exocitosis (c). **Fuente:** Arnesano y Natile, 2009.

### 2.3.2. Mecanismos que bloquean la muerte celular.

**2.3.2.1. Reparación del ADN:** Como se mencionó anteriormente la citotoxicidad del CDDP deriva de su unión al ADN, formando aductos lo que induce a cambios conformacionales. Por ende un incremento en la reparación del ADN es un mecanismo de resistencia potencial. La reparación de los aductos de CDDP ocurre principalmente por escisión de nucleótidos. La reparación por escisión de nucleótidos (NER) se inicia cuando se forma el aducto lo que origina un cambio conformacional en la doble hélice del ADN. El factor de unión al ADN dañado se une al complejo de

preincisión, siendo este complejo proteico el que localiza la zona dañada del ADN, la hélice se desenrolla en la zona dañada para posteriormente ser escindida por la enzimas ERCC1/XPF, las ADN polimerasas sintetizan el segmento ausente, cuando NER es completado el ADN se repara y vuelve a su forma helicoidal (Figura 11) (Cepeda *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2008).

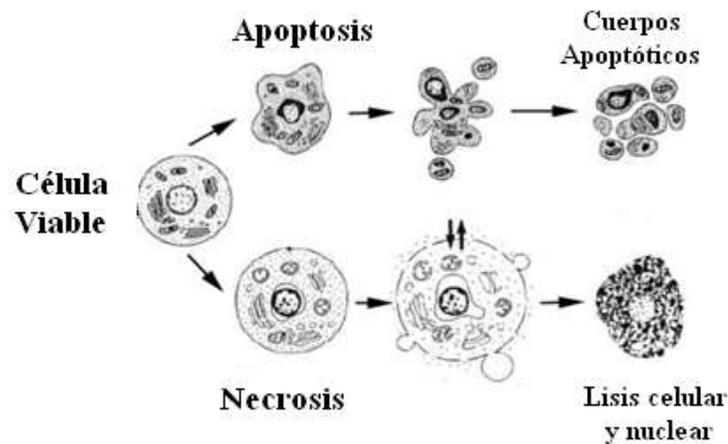


**Figura 11. Reparación por Escisión de Nucleótidos.** (a) El ADN dañado es reconocido por XPA, RPA y XPC-HR23. (b) Se une a TFIIH y forma el complejo de preincisión. (c) La hélice se desenrolla en la zona dañada para posteriormente ser escindida por la enzimas ERCC1/XPF. (d) Finalmente la ADN polimerasa sintetiza el fragmento ausente. (e) Cuando el NER está completado el ADN se repara y vuelve a su forma helicoidal. **Fuente:** Jamieson y Lippard, 1999.

**2.3.2.2. Vía Reparación de Genes:** Es un sistema de reparación post-replicación que corrige los nucleótidos no apareados, están involucrados al menos cinco proteínas (MLH1, MSH2, MSH3, MSH6 y PMS2) y requiere de la presencia de ATP. Las proteínas reconocen los nucleótidos no apareados y forman un complejo que se localiza en la zona afectada del ADN y escinde el segmento dañado. Posteriormente una ADN polimerasa sintetiza la porción faltante de la hebra (Cepeda *et al.*, 2007; Martin *et al.*, 2008).

#### 2.4. Muerte celular inducida por CDDP.

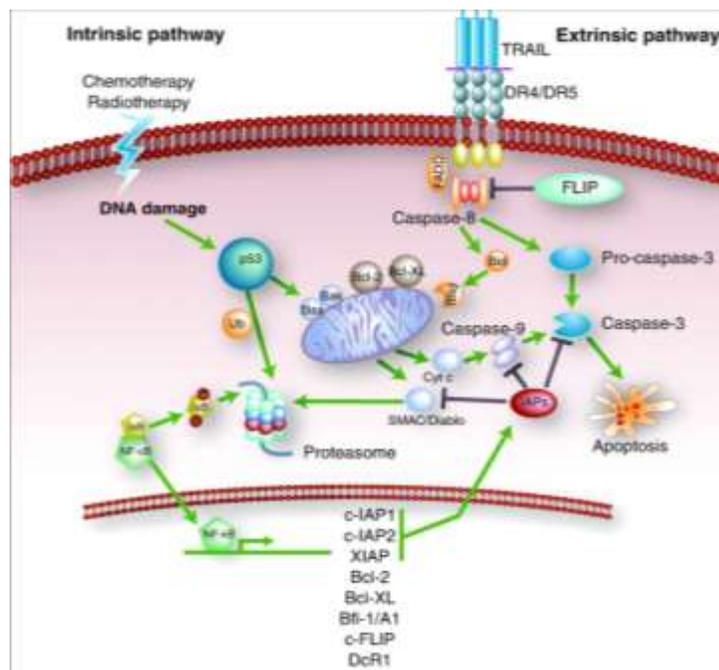
Los organismos multicelulares presentan dos mecanismos de eliminación de células: la apoptosis y la necrosis. Los procesos de necrosis y apoptosis difieren en varios aspectos. La necrosis involucra la ruptura de la membrana plasmática, liberación del contenido intercelular lo cual conducen a inflamación y finalmente a la desintegración celular. En contraste, la apoptosis se caracterizan por: la pérdida de la asimetría de los fosfolípidos de la membrana, condensación de la cromatina, reducción en el tamaño nuclear, ruptura del ADN internucleosomal, encogimiento celular, formación de protuberancias en las membranas y ruptura de la célula formándose los pequeños cuerpos apoptóticos (Figura. 12). Finalmente, los cuerpos apoptóticos son fagocitados por otras células. La apoptosis es una respuesta fisiológica programada y altamente regulada en la cual la muerte celular ocurre sin daños colaterales a los tejidos circundantes (Pittrak *et al.*, 1996).



**Figura 12: Muerte Celular:** Apoptosis y Necrosis. **Fuente:** Van Cruchten y Van Den Broeck, 2002.

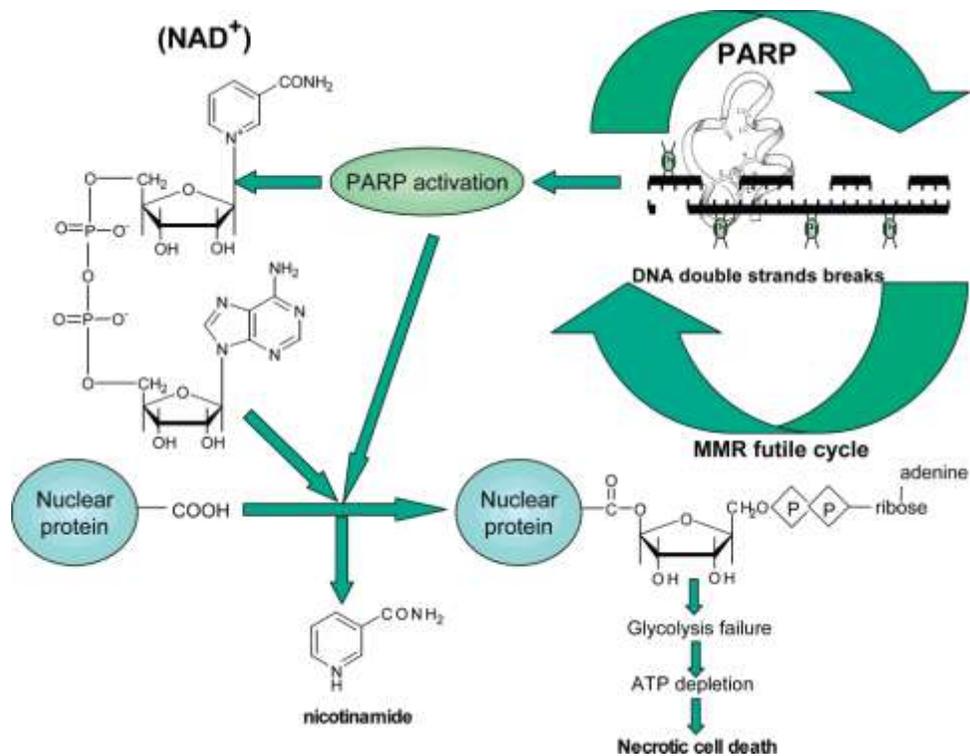
La apoptosis puede ser iniciada por tres vías diferentes: (a) la vía extrínseca, que se inicia con la unión a receptores de muerte y posterior activación de la caspasa 8; (b)

la vía intrínseca desencadenada por el estrés celular, seguida de la activación de la caspasa 9; y (c) la vía de la granzima B, en la cual la proteasa granzima B penetra a la célula diana. Cada una de estas vías converge a una fase de ejecución común de la apoptosis que requiere la activación proteolítica de las caspasas 3 o 7 de sus zimógenos inactivos. En resumen, las principales características bioquímicas de la apoptosis incluyen la activación de la cascada de las caspasas y la fragmentación del ADN, donde las mitocondrias juegan un papel muy importante debido a que liberan proteínas proapoptóticas, y la entrada de estas proteínas al citoplasma están reguladas por otras de la familia Bcl2 (Figura 13) (Ghavami *et al.*, 2009).



**Figura 13. Mecanismo molecular de la apoptosis:** La apoptosis celular puede iniciarse a través de la unión de receptores de muerte celular con su ligando (lo cual inicia la vía extrínseca), activando a la caspasa 8. La apoptosis se inicia por activación directa de las caspasas efectoras (caspasa 3). Por otra parte, daños en el ADN o ROS (Especies reactivas de oxígeno) inducen la expresión de Bax y Bak, las cuales causan cambios en la permeabilidad e la membrana mitocondrial, liberándose citocromo c. Este ultimo una vez en el citoplasma se une a Apaf 1 y a la pro-caspasa 9 en presencia de ATP, activando a la caspasa 9 que a su vez activa a la caspasa 3 (vía intrínseca). **Fuente:** Vries *et al.*, 2006; Ghavami *et al.*, 2009.

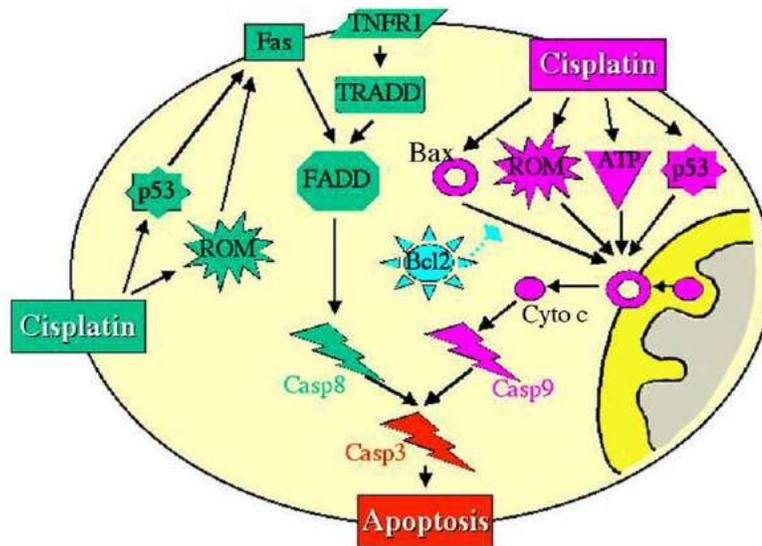
El CDDP puede inducir tanto necrosis como apoptosis. La muerte celular por necrosis es producto de la hiperactivación de la poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP), la cual es inducida por el excesivo daño al ADN. El PARP escinde el  $\text{NAD}^+$ , transfiriendo los restos de ADP-ribosa a los grupos carboxilos de las proteínas nucleares, causando la depleción de la  $\text{NAD}^+/\text{ATP}$  y como resultado, la necrosis (Figura 14) (Fuerte *et al.*, 2003; Wang y Lippard, 2005).



**Figura 14. Mecanismo de inducción de necrosis por CDDP:** La ruptura de la hebra del ADN inducida por CDDP activa PARP-1, que escinde  $\text{NAD}^+$  en poli (ADP-ribose) y restos de nicotinamida. El resultado es una disminución de  $\text{NAD}^+$  con una caída concomitante de los niveles de ATP. Si los niveles de ATP en la célula tumoral son bajos, entonces, se muere por necrosis. **Fuente:** Fuerte *et al.*, 2003

Las mayorías de las rutas de señalización apoptóticas inducidas por las drogas antineoplásicas culminan con la activación de la cascada de las caspasas. Los

mecanismos específicos por los cuales se activa la apoptosis inducida por el CDDP aún no están bien definidos, existen estudios que indican que la misma puede implicar la activación de sistemas de receptores de muerte como el CD95 (APO-1/Fas), de hecho esta comprobado que el CDDP a concentraciones terapéuticas conduce a la inducción de CD95-ligando, el cual puede mediar la muerte celular de forma autocrina o paracrina mediante la interacción de CD95-ligando/receptor. La interacción de CD95-ligando/receptor conlleva a la activación de la caspasa 8 y posteriormente la caspasa 3 induciendo a la apoptosis celular (figura 15) (Friesen *et al.*, 1999).



**Figura 15. Apoptosis inducida por CDDP:** El CDDP induce apoptosis producto del daño en la doble hélice del ADN creando cambios conformacionales que conducen a la expresión de p53, el cual puede activar diferentes mecanismos de iniciación. Por una parte, la apoptosis puede iniciarse por activación de receptores de muerte celular y por la otra, se induce la liberación del citocromo c desde la mitocondria. Ambos mecanismos culminan con la activación de la cascada de las caspasas. **Fuente:** Hanigan y Devarajan, 2003.

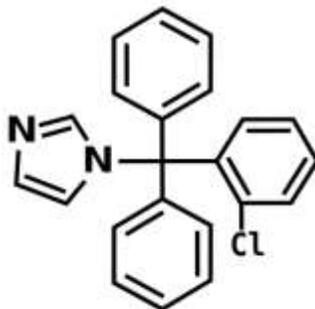
Otros estudios revelan que la activación de las caspasas puede darse por vía mitocondrial, debido a que algunas células tratadas con la droga presentan niveles

elevados de citocromo C en su citoplasma. Ante el daño en el ADN producido por el CDDP, se produce la expresión de p53, y si este daño es irreparable la p53 activa la expresión de Bax, la cual permeabiliza la membrana mitocondrial externa y permite la liberación de citocromo c; este se une a APAF1 y a la procaspasa 9 en presencia de ATP, dando lugar a forma la activa la caspasa 9, siendo esta responsable de activar a la caspasa 3 e inducir a apoptosis (Figura 15) (Wang y Lippard, 2005).

Lo expuesto revela que la apoptosis inducida por CDDP es dependiente de la p53. A pesar de ello, existen estudios que involucran vías apoptóticas inducida por CDDP independiente de la expresión de p53. Estudios en tumores de células germinales testiculares revelaron que el CDDP puede inducir a apoptosis a través de la activación de la vía de señalización de MEK-ERK, que culmina con la activación de la caspasa 3 y por lo tanto la muerte celular programada (Schweyer *et al.*, 2004).

## **2.5. CTZ y su interés en la terapia antileucémica.**

El CTZ (CTZ) es un antimicótico derivado del imidazol (Figura 16) que actúa inhibiendo la biosíntesis del ergosterol en la pared celular. Como la mayoría de los antifúngicos azólicos inhiben el citocromo P450-dependiente de la 14  $\alpha$ -desmetilasa, una enzima clave en la síntesis de ergosterol (Henry y Sisler citado por Turan *et al.*, 2001 y Chou *et al.*, 2008). Además modula la vía de señalización de los canales iónicos en las células, las cuales son importantes para la supervivencia y crecimiento celular.



**Figura 16. CTZ:** Clotrimazol. **Fuente:** Turan *et al.*, 2001.

Los canales de potasio dependientes de calcio se expresan ampliamente en las células de los diferentes tejidos, siendo activados por las concentraciones de iones calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) en el interior celular, un incremento en las concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  en el citoplasma induce a la activación de estos canales, provocando la salida de potasio restaurando de esta forma el potencial de membrana (Berkefeld *et al.*, 2010). En la célula la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  por el retículo endoplasmático puede ser el resultado de la producción de inositol-1,4,5-trifosfato, el cual es activado por la transducción de señales externas a través de receptores de superficie, en condiciones fisiológicas, el aumento de calcio intracelular induce a la apertura de los canales de calcio en la membrana citoplasmática y activa los canales de potasio dependiente de calcio; CTZ interrumpe la homeostasis mediante la liberación del calcio intracelular y el bloqueo de los canales de potasio (Ito *et al.*, 2002).

El interés de este compuesto en la terapia antileucémica se basa en:

1. La inhibición de la proliferación de células malignas *in vitro* e *in vivo*, sin evidencia de toxicidad sistémica (Benzaquen *et al.* citado por Ito *et al.*, 2002).
2. Inhibe la proliferación de linfocitos normales mediante el bloqueo de canales iónico (Jensen *et al.* citado por Ito *et al.*, 2002).

3. Las concentraciones de CTZ y sus metabolitos que interfieren el bloqueo de los canales iónico son alcanzables *in vivo* (Brugnara *et al.*, citado por Ito *et al.*, 2002).

### 3. Sistema de Hipótesis, Variables e Indicadores.

#### 3.1. Hipótesis.

Los efectos antileucémicos *in vitro* del complejo CTZ-Pt, son mayores que los de las combinaciones de CTZ con CDDP y CTZ con TDDP.

#### 3.2. Variables e Indicadores.

Variable	Dimensión	Indicador	Método
Dependiente: Células Jurkat	Proliferación Celular.	Cuantificación del número de células.	Contaje en Hemocitómetro
	Viabilidad Celular.	-La pérdida en la integridad de la membrana ocasiona cambios en la tinción observados por microscopia óptica. -Cambio en la absorbancia por la acción de enzimas detectados por un espectrofotómetro. -Cambios morfológicos observados por microscopia de fluorescencia. -Cambios en el marcaje detectados por citometría de flujo.	-Azul tripano. -MTT. -Microscopia de fluorescencia Naranja de Acridina/Bromuros de Etidio. -Citometría de Flujo tinción con Ioduro de propidio.
Independiente	CTZ-Pt y las combinaciones de CTZ con CDDP y CTZ con TDDP.		
Intervinientes	Tiempo de incubación y concentraciones de los complejos.		

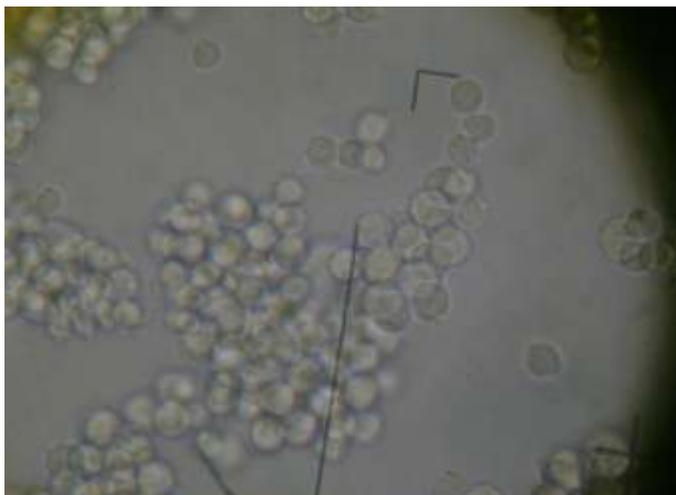
### **III. MATERIALES Y MÉTODOS.**

#### **1. Tipo y Diseño de Investigación.**

La investigación ejecutada, atendiendo a su nivel es de tipo descriptiva y de acuerdo a su diseño es experimental, ya que se determinó si CTZ-Pt causa efectos sobre las funciones biológicas de la línea celular leucémica Jurkat; y si dichos efectos difieren de los observados con las combinaciones de CTZ con CDDP y CTZ con TDDP. Esto permitió establecer una relación causa efecto sustentada en la introducción de un factor causal (droga) para la determinación de los efectos producidos sobre las células, manipulando en consecuencia, las variables objeto de la investigación (Arias, 2004).

#### **2. Unidades Experimentales.**

Se realizaron una serie de ensayos *in vitro* utilizando como unidad de investigación la población celular de linfocitos T tumorales células Jurkat (Figura 17) (Abraham y Weiss, 2004), donadas por el Centro de Medicina Experimental del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), las cuales fueron cultivadas y mantenidas *in vitro* en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Carabobo (BIOMED-UC).



**Figura 17. Clones de células Jurkat en cultivo.**

### **3. Procedimientos**

#### **3.1. Cultivo Celular.**

Las células Jurkat se cultivaron en un medio RPMI 1640 suplementado con suero fetal bovino al 10% L-glutamina 2 mM y 1 % de estreptomicina penicilina 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Para todos los protocolos experimentales se colocaron en una placa de 96 pozos fondo en U controles celulares de tiempo cero que contenían 100  $\mu\text{L}$  de suspensión de células Jurkat ( $0,2 \times 10^6$  células/mL) y 100  $\mu\text{L}$  de medio RPMI suplementado con el fin de verificar la integridad de las células antes de adicionar los compuestos. Asimismo controles sin los compuestos a los tiempos de incubación estudiados, estos contenían 100  $\mu\text{L}$  de suspensión de células Jurkat ( $0,2 \times 10^6$  células/mL), 99  $\mu\text{L}$  de medio RPMI suplementado y 1  $\mu\text{L}$  de DMSO (dimetilsulfoxido solvente en el cual se disuelven los compuestos).

#### **3.2. Determinación de los efectos de CTZ-Pt, sobre la proliferación de células Jurkat.**

La proliferación celular fue evidenciada a través del crecimiento de la población celular, lo cual se cuantifica mediante el uso de un hemocitómetro, para ello, en una

microplaca de 96 pozos de fondo U se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de suspensión de células Jurkat ( $0,2 \times 10^6$  células/mL) y 99  $\mu\text{L}$  de medio RPMI suplementado de la forma antes señalada. La placa fue preincubada a  $37^\circ\text{C}$  y atmósfera de  $5\% \text{CO}_2$  durante 24 h.

Transcurrido el periodo de preincubación se contaron los controles de 0h y se añadieron en cada pozo de la misma microplaca 1  $\mu\text{L}$  de CTZ-Pt, CDDP, TDDP o CTZ en un rango de 2,5 a 40  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{L}$  de DMSO a los pozos controles. Se incubó en atmósfera húmeda de 5 % de  $\text{CO}_2$  por 24 h adicionales. Por último, culminado el periodo de incubación se evidenció el crecimiento celular empleando el hemocitómetro, el cual permitió cuantificar el número de células por mL empleando la siguiente ecuación:

La proliferación celular fue calculada determinando el índice de crecimiento o de proliferación. Éste fue estimado dividiendo el número de células a las 24 h de incubación entre el número de células al momento de añadir los compuestos. Los resultados fueron expresados como porcentaje del control.

De igual manera se procedió para determinar los efectos de las combinaciones de TDDP/CTZ y CDDP/CTZ.

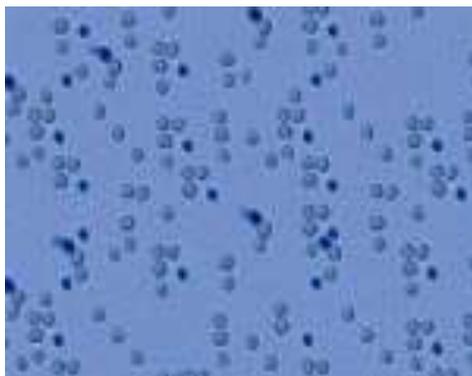
### **3.3. Determinación de los efectos CTZ-Pt, sobre la viabilidad de células Jurkat.**

Las células Jurkat ( $0,2 \times 10^6$  células/mL) se colocaron en una microplaca de 96 pozos y fueron preincubadas en las condiciones descritas anteriormente. Transcurrido el periodo de preincubación se realizó la lectura de los controles de 0 h mediante el

método de azul tripano. Se añadieron en cada pozo de la misma microplaca 1  $\mu\text{L}$  de CTZ-Pt, CDDP, TDDP o CTZ, en un rango de 2,5 a 40  $\mu\text{M}$  y 1  $\mu\text{L}$  de DMSO a los pozos controles, se incubó en atmósfera húmeda de 5 % de  $\text{CO}_2$  por 24 h. Finalizado el periodo de incubación se procedió a determinar la pérdida de viabilidad en términos de necrosis y apoptosis, empleando el método de exclusión azul tripano, microscopía de fluorescencia, reacción del MTT y citometría de flujo tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio.

### 3.3.1. Método de exclusión de azul tripano.

Este método está basado en la difusión pasiva del pigmento de alto peso molecular azul tripano a través de las membranas celulares. Las células sanas excluyen el pigmento, mientras que las células dañadas (necróticas) adquieren una coloración azul cuando se observan al microscopio (Figura 18) y de esta manera pueden contarse con la ayuda de un hemocitómetro o un simple portaobjeto (Patterson, 1979).



**Figura 18. Microfotografía de células Jurkat teñidas con azul tripano**

Para ello, se tomaron 20  $\mu\text{L}$  de suspensión celular y se mezclaron con 20  $\mu\text{L}$  de colorante azul tripano al 0,4 %. Luego se observaron al microscopio óptico con objetivo de 40X contando las células que han perdido viabilidad (color azul) con respecto a un total de 100 células.

### 3.3.2. Microscopía de Fluorescencia.

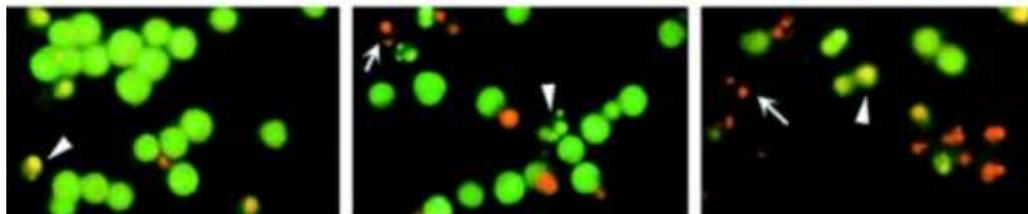
La microscopía de fluorescencia permitió observar organizaciones aberrantes de la cromatina, principal rasgo característico de los procesos apoptóticos. Para ello se empleó el colorante fluorescente naranja de acridina (NA), el cual permitió determinar cuántas células han sufrido apoptosis. En vista de que este colorante no permite hacer una diferenciación entre células viables y no viables, se empleó una mezcla de NA y bromuro de etidio (BE) (en una relación 1:1, a una concentración de 10 mg/mL), ya que la captación diferencial de estos dos pigmentos permite hacer la distinción de la viabilidad (Sweeney *et al.*, 1997).

Se colocó 1  $\mu\text{L}$  de la mezcla apropiada de pigmentos en el fondo de tubos de ensayo y se añadió 25  $\mu\text{L}$  de la suspensión celular con suave agitación manual. Posteriormente se colocó 10  $\mu\text{L}$  de esta mezcla en una lámina portaobjetos limpia y se cubrió con una laminilla de 22  $\text{mm}^2$ . La preparación resultante se examinó con un objetivo seco de 40x ó 60x usando epi-iluminación (Microscopio de fluorescencia Lieder) y una combinación de filtros apropiada para observar la fluorescencia.

Se contaron un mínimo de 200 células, registrando el número de cada uno de los siguientes estados celulares: (i) células viables con núcleos normales (VN; cromatina verde brillante con estructura organizada); (ii) células con núcleos apoptóticos (VA; cromatina verde brillante la cual está altamente condensada o fragmentada); (iii) células no viables (NVN; cromatina naranja brillante con estructura organizada).

Tanto las células vivas como las muertas incorporan NA el cual se intercala en el ADN haciéndolo aparecer verde y enlaza al ARN, tiñéndolo de rojo. Así, una célula viable tiene cromatina verde brillante en su núcleo y el citoplasma rojo. BE es capturado solamente por células no viables, se intercala en el ADN haciéndolo aparecer naranja, pero enlaza débilmente al ARN el cual puede verse ligeramente rojo. Así, una célula muerta tiene cromatina naranja brillante (BE se impone sobre NA) y su citoplasma, aparecerá rojo. Usando este método, los núcleos tanto

apoptóticos como normales en las células vivas fluorescen verde brillante. En contraste, los núcleos normales o apoptóticos en las células muertas fluorescen naranja brillante (Figura 19).



**Figura 19. Micrografía de células Jurkat teñidas con la mezcla fluorescente naranja de acridina y bromuro de etidio. Fuente: Mukhopadhyay *et al.*, 2001.**

### 3.3.3. Reacción del MTT.

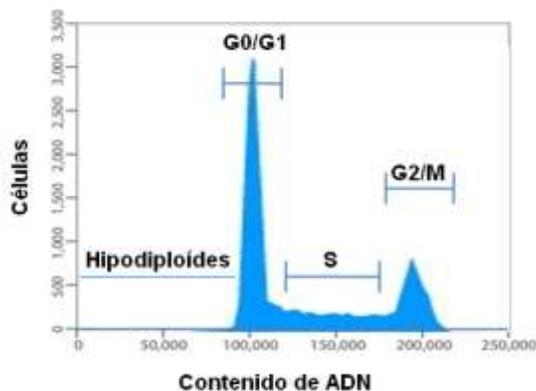
La técnica se fundamenta en la reducción del MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenilbromurodetetrazolio), a púrpura formazán por acción de reductasas presentes en las células vivas (Mosmann, 1983; Riss y Moravec, 1992).

Para ello se trasvasó 100  $\mu\text{L}$  de la suspensión tratada con los compuestos a una microplaca fondo de plano y en cada pozo se agregó 10  $\mu\text{L}$  del colorante MTT (5 mg/mL) y se re-incubó en las condiciones antes descritas por 4 h para obtener los cristales del colorante formazán, los cuales se disolvieron con una solución detergente (Triton X-100 al 10% v/v y HCl 0,1 M en isopropanol). Finalmente, se midió la absorbancia en un fotómetro de microplaca (Multiskan Ascent, Labsystems) con filtro de 550 nm. Los resultados fueron expresados como el porcentaje del control.

### 3.3.4. Tinción y citometría de flujo con Ioduro de propidio (IP).

Se basa en el principio de que las células apoptóticas, se caracterizan por la fragmentación del ADN y, por consiguiente, la pérdida de contenido de ADN nuclear. El uso de un fluorocromo, como PI, que es capaz de unirse y marcar al ADN hace posible la evaluación rápida y precisa del contenido de ADN celular por citometría de

flujo, y posterior identificación de las células hipodiploides (Figura 20) (Riccardi y Nicoletti, 2006).



**Figura 20. Histograma representativo de citometría de flujo. Fuente:** Riccardi y Nicoletti, 2006

Una vez transcurrido el tiempo de incubación con los compuestos en estudio las células son lavadas con PBS 1X, posteriormente, la suspensión celular fue resuspendida en 500  $\mu$ l de Solución de fluorocromo; dicha solución contiene 5 mg/L de IP disuelto en agua destilada al 0.1 % de citrato de sodio y 0.1 % de Triton 100X). Finalmente, se incubó durante una hora a 4°C y se analizó por citometría de flujo.

#### **3.4. Determinación de los efectos de las combinaciones de CTZ más TDDP y CTZ más CDDP sobre la viabilidad y proliferación de las células Jurkat**

Para evaluar los efectos de las combinaciones se siguieron las siguientes pautas:

**3.4.1. Evaluación efectos individuales de cada compuesto:** Se evaluaron los efectos individuales de cada compuesto sobre la proliferación y la viabilidad de las células Jurkat, para ello se empleó la metodología descritas en los apartados 3.2 y 3.3

**3.4.2. Selección de las concentraciones para las combinaciones:** Las concentraciones y el cociente de concentraciones adecuado para el estudio de las combinaciones fueron seleccionados en función a los resultados obtenidos al evaluar diferentes funciones celulares.

**3.4.3. Evaluación de los efectos de las combinaciones:** Se evaluaron los efectos individuales y combinados sobre la proliferación, la viabilidad y la apoptosis utilizando para ello las técnicas de conteo en hemocitometro, reacción del MTT y tinción y citometría de flujo con yoduro de propidio.

**3.4.3.1. Incubación con los compuestos:** En una microplaca de 96 pozos de fondo U se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de suspensión de células Jurkat ( $0,2 \times 10^6$  /mL) y 99  $\mu\text{L}$  de medio RPMI suplementado. La placa fue incubada a 37 °C y atmosfera de 5 %  $\text{CO}_2$  durante 24 h.

Transcurrido el periodo de preincubación se procedió a determinar los valores de absorbancias de los controles de 0h y se añadieron simultáneamente en cada pozo de la misma microplaca 0,5  $\mu\text{L}$  de los compuestos platino en un rango de 1 a 16  $\mu\text{M}$  y 0,5  $\mu\text{L}$  de CTZ en un rango de concentraciones 2 a 32  $\mu\text{M}$ ; adicionalmente con la finalidad de evaluar los compuestos individuales se añadió 0,5  $\mu\text{L}$  de los compuesto, en el rango de concentraciones anteriormente mencionado y 0,5  $\mu\text{L}$  de DMSO y 1  $\mu\text{L}$  de DMSO a los pozos controles. Se incubó en atmósfera húmeda de 5 % de  $\text{CO}_2$  por 24 h. Al finalizar la incubación se resuspendieron los pozos de forma homogénea y se procedió a la lectura.

#### **3.4.3.2. Análisis de las combinaciones:**

Para determinar el tipo de efecto producido por las combinaciones de CDDP/CTZ y de TDDP/CTZ, se empleó el método propuesto por Chou y Talalay (1984). El

método tiene como base la denominada ecuación del efecto de la mediana (del inglés “the median-effect equation”), la cual está diseñada para correlacionar las dosis de las drogas con sus efectos citotóxicos o citostáticos de la forma más sencilla posible.

**Ecuación del efecto de la mediana:** Esta ecuación constituye una especie de teoría unificada deducida a partir de las cuatro ecuaciones básicas de las ciencias biomédicas: Henderson-Hasselbalch, Michaelis-Menten, Hill y Scatchard.

$$\frac{f_a}{f_u} = \left( \frac{D}{D_m} \right)^m$$

Donde:

**D** es la dosis de la droga

**D<sub>m</sub>** es la dosis que determina la potencia de la droga

**f<sub>a</sub>** es la fracción afectada por la dosis

**f<sub>u</sub>** es la fracción no afectada ( $f_u = 1 - f_a$ )

**m** es un exponente que describe la sigmoidicidad de la curva dosis-respuesta

Una forma alternativa de la ecuación  $\frac{f_a}{f_u} = \left( \frac{D}{D_m} \right)^m$

es la siguiente:  $D = D_m \left( \frac{f_a}{1 - f_a} \right)^{1/m}$

La ecuación del efecto de la mediana se empleó para calcular el valor de  $D_x$ , el cual representa la dosis de una droga que inhibe (o destruye) al “x” % de las células (este valor puede representarse como el  $IC_{50}$ ,  $IC_{30}$ ,  $IC_{75}$ , etc., que inhibe el crecimiento o la supervivencia celular, o alternativamente, que estimula la apoptosis o necrosis). Esos valores permitieron determinar si los efectos de las combinaciones

de dos o más drogas eran aditivos, antagónicos o sinérgicos, mediante el empleo del denominado índice de combinación que se define a continuación:

**Determinación del Índice de Combinación (CI):** El índice de combinación es una medida cuantitativa del grado de interacción entre las drogas en términos de efecto aditivo (CI = 1); efecto sinérgico (CI < 1) y efecto antagónico (CI > 1). Para la combinación de dos drogas, el CI se calcula así:

$$CI = \frac{(D)_1}{(D_x)_1} + \frac{(D)_2}{(D_x)_2} + \frac{(D)_1(D)_2}{(D_x)_1(D_x)_2}$$

Donde (D)<sub>1</sub> y (D)<sub>2</sub> son las dosis de las drogas 1 y 2 que tienen un x% de efecto cuando se usan en combinación, mientras que (D<sub>x</sub>)<sub>1</sub> y (D<sub>x</sub>)<sub>2</sub> representan las dosis de las drogas 1 y 2 que tienen el mismo x% de efecto cuando se emplean solas.

El programa Calculusyn® fue empleado para analizar los datos provenientes de experimentos en los cuales las concentraciones de las drogas bajo estudio tuvo relaciones o cocientes fijos cuando se añadan juntas. Por ejemplo, si durante experimentos preliminares de inhibición de la proliferación celular se determinó que el IC<sub>50</sub> de la droga A fue 4 mM y el IC<sub>50</sub> de la droga B fue 10 mM, la combinación de ambas drogas puede hacerse según el siguiente esquema:

$$0,25 \times IC_{50}(A) / 0,25 \times IC_{50}(B) \rightarrow 1 \text{ mM} / 2,5 \text{ mM}$$

$$0,50 \times IC_{50}(A) / 0,50 \times IC_{50}(B) \rightarrow 2 \text{ mM} / 5 \text{ mM}$$

$$1 \times IC_{50}(A) / 1 \times IC_{50}(B) \rightarrow 4 \text{ mM} / 10 \text{ mM}$$

$$2 \times IC_{50}(A) / 2 \times IC_{50}(B) \rightarrow 8 \text{ mM} / 20 \text{ mM}$$

$$4 \times IC_{50}(A) / 4 \times IC_{50}(B) \rightarrow 16 \text{ mM} / 40 \text{ mM}$$

**D<sub>m</sub>**: Empleando la ecuación del efecto de la mediana bajo la forma:

$$D = D_m \left( \frac{f_a}{1 - f_a} \right)^{1/m}$$

Aplicando logaritmos a ambos miembros se obtiene:

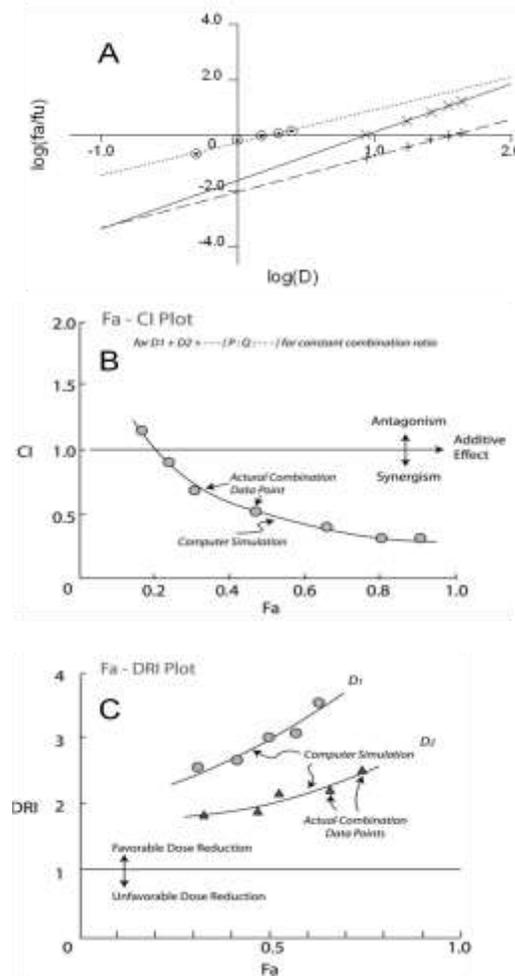
$$\log D = \log D_m + 1/m \log (f_a/1-f_a).$$

Por lo tanto si se grafica  $\log [f_a/(1-f_a)]$  vs.  $\log D$ , se obtiene una recta cuyo intercepto con el eje de las x es el  $\log D_m$ . (En el caso hipotético presentado aquí,  $D_m$  sería el  $IC_{50}$  de la combinación).

**m**: es una medida de la sigmoidicidad de la curva dosis-efecto. Este valor se determina por la pendiente del gráfico del efecto de la mediana.

**r**: El valor de r corresponde al coeficiente de correlación lineal del gráfico del efecto de la mediana. Es considerado como la primera línea estadística para medir la conformidad de los datos con el principio de la ley de acción de masas. Un valor de r igual a 1 indicaría conformidad perfecta.

**CI**: El índice de combinación CI es una medida cuantitativa del grado de interacción en los términos de efectos aditivos, sinérgicos o antagónicos tal como se definieron arriba. La figura 21 ilustra una representación de los gráficos suministrados por el programa CalcuSyn ® para el ejemplo aquí citado.



**Figura 21.** Gráfica del efecto de la mediana (A), gráfico del índice de combinación con la fracción afectada (B) y gráfico de los índices de reducción de la dosis con la fracción afectada (C).

#### 4. Análisis Estadístico de los Datos.

Una vez obtenidos los datos de esta investigación se realizó el análisis estadístico correspondiente a través de la utilización de la estadística descriptiva, con el fin de determinar medidas de tendencia central y dispersión, así mismo se realizó también un análisis de varianza (ANAVAR) y las correspondientes pruebas de medias

(Dunnett y Bonferroni pair test) a fin de verificar diferencias entre los distintos tratamientos.

Todos los valores obtenidos relacionados con los efectos del compuesto y de las combinaciones sobre la proliferación y viabilidad de las células Jurkat, fueron expresados como el promedio  $\pm$  S.E.M (error estándar medio) de al menos cuatro ensayos diferentes. Para determinar si los valores de los índices de combinación (C.I.) promediados son el resultado de eventos antagónicos, aditivos o sinérgicos, se empleó una prueba t de Student de dos colas. Esta prueba comparó el promedio de los C.I. obtenidos en al menos cuatro ensayos independientes con el valor hipotético de 1, el cual constituyó el límite que define la naturaleza de los eventos mencionados anteriormente. En todos los casos estudiar, las diferencias fueron consideradas significativas si el valor de p fue menor o igual que 0,05. Para los análisis estadísticos se empleó el programa InStat versión 3.0 (GraphPad Software).

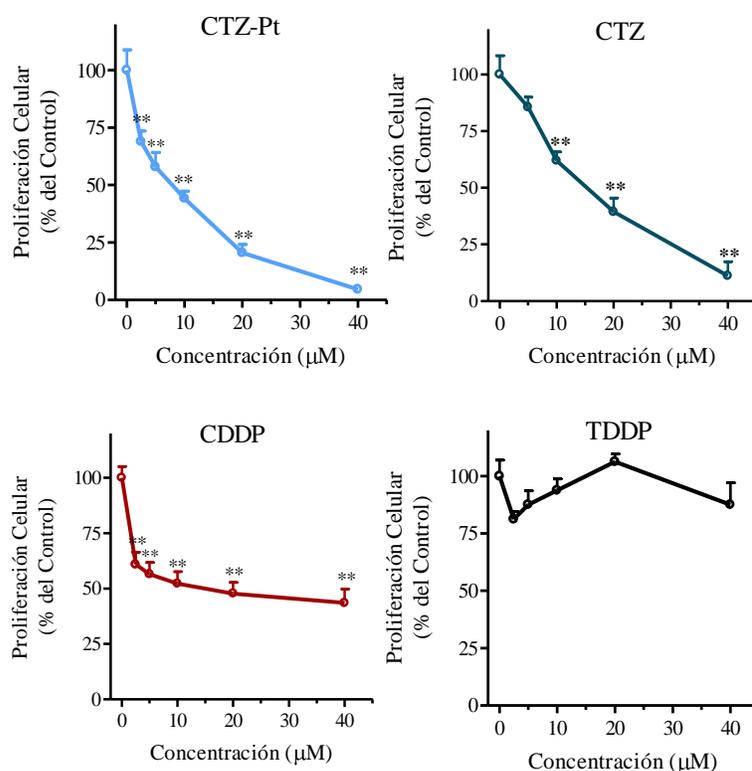
### III. RESULTADOS

Con el propósito de comparar los efectos antileucémicos *in vitro* del complejo CTZ-Pt con el de las combinaciones CDDP/CTZ y TDDP/CTZ, se evaluaron en primer lugar los efectos de los compuestos individuales: CTZ-Pt, CDDP, TDDP y CTZ. Para tales fines se seleccionó el intervalo de concentraciones comprendido entre 2,5  $\mu\text{M}$  y 40  $\mu\text{M}$  debido a que dentro de esos valores se encuentran las máximas concentraciones séricas tolerables para el antifúngico CTZ y el anticancerígeno CDDP, los cuales son los únicos utilizados en la investigación, cuyo uso está autorizado para el consumo humano (Seo *et al.*, 1977; Reece *et al.*, 1987). Por otra parte, todas las lecturas en los diferentes ensayos se hicieron a las 24 h posteriores a las adiciones de las drogas. No se hicieron evaluaciones en ensayos de mayor duración debido a que tanto para el CTZ como para el CDDP se han reportado rápidas declinaciones (dentro de las primeras 10 h después de su administración) de sus concentraciones sangre (Seo *et al.*, 1977; Reece *et al.*, 1987).

#### **1. Efectos de CTZ-Pt sobre la proliferación de las células Jurkat.**

La figura 22 muestra la proliferación de las células Jurkat en presencia de varias concentraciones de los compuestos bajo estudio. Con la excepción del TDDP, todos los compuestos inhibieron la proliferación de modo dependiente de sus concentraciones con valores aproximados de los  $\text{IC}_{50}$  iguales a 7  $\mu\text{M}$  para el CTZ-Pt, 15  $\mu\text{M}$  para el CTZ y 14  $\mu\text{M}$  para el CDDP. No se observó inhibición de la proliferación en las células tratadas con el TDDP por lo que no pudo determinarse su

IC<sub>50</sub>. Este resultado confirma las conocidas diferencias antitumorales entre el clínicamente activo CDDP y su isómero inactivo TDDP y concuerda con los resultados obtenidos en un trabajo recientemente publicado en el cual las células Jurkat fueron tratadas con ambos complejos (Tao *et al.*, 2010). Por otra parte, aunque no hay trabajos publicados acerca de los efectos de CTZ sobre células Jurkat, se ha demostrado que a la concentración de 10  $\mu$ M, CTZ induce apoptosis en otras líneas celulares de leucemia linfocítica aguda (Ito *et al.*, 2002).



**Figura 22. Efectos de los compuestos individuales sobre la proliferación.** Las células fueron ajustadas a  $2 \cdot 10^5$  células/mL e incubadas durante 24 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos. Los controles estuvieron representados por células tratadas en iguales condiciones pero en ausencia de los compuestos. Se determinó la proliferación empleando un hemocitómetro y los resultados fueron expresados como el porcentaje del control. Se aplicó la prueba de Dunnett comparando los efectos de cada concentración de los compuestos con el control correspondiente sin droga.  $p < 0,05$  fue considerado significativo (N=4).

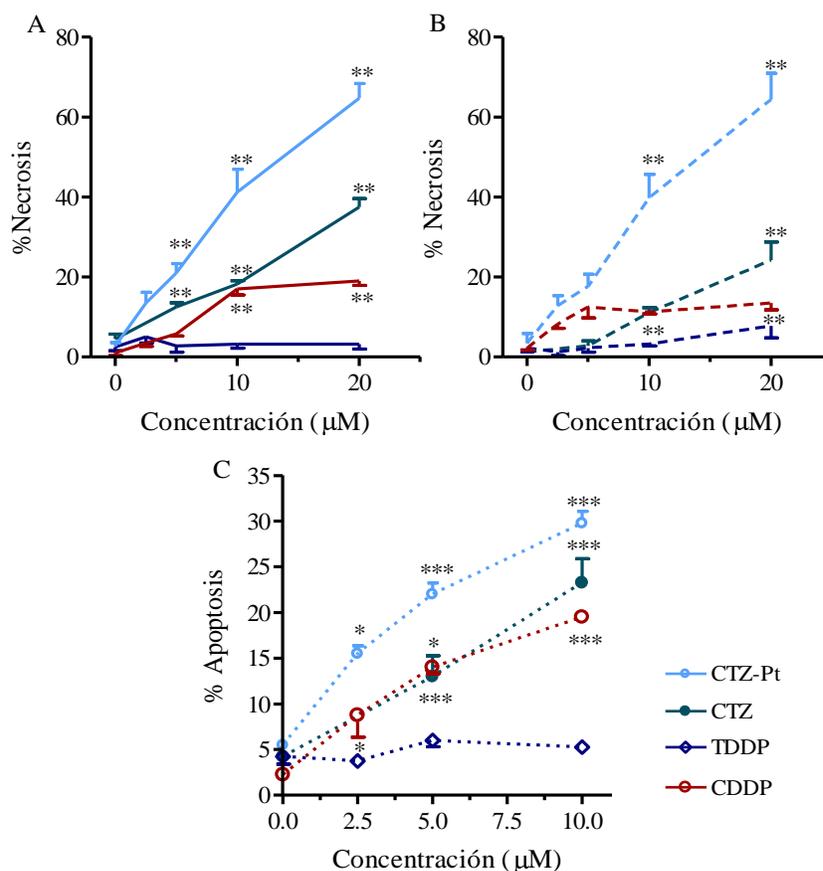
## **2. Efectos CTZ-Pt sobre la viabilidad de las células Jurkat.**

En la investigación se hicieron experimentos cuyos resultados se expresan mediante gráficos que demuestran la presencia (o la ausencia) de los efectos dependientes de las concentraciones de cada una de las drogas ensayadas sobre la “viabilidad” de las células Jurkat. En realidad, en cada uno de los ensayos se evaluó la “pérdida de viabilidad” de esas células bajo los términos de (a) incrementos en la necrosis, o pérdidas en la integridad de la membrana plasmática, observados por la incapacidad de excluir tanto al colorante azul tripano como al fluorocromo bromuro de etidio; (b) incrementos en la apoptosis, o pérdidas en la integridad de la cromatina, observados con la ayuda de la fluorescencia generada por naranja de acridina, un agente que se intercala en el ADN y (c) disminución en la capacidad de reducir al colorante MTT, un indicador que sufre cambios en sus propiedades fisicoquímicas como consecuencia de la pérdida de eventos bioquímicos que ocurren en las células vivas, pero que se detienen después de la muerte celular.

### **2.1. Efectos sobre la necrosis y apoptosis evaluadas mediante microscopía óptica y de fluorescencia.**

La figura 23 corresponde a los efectos del tratamiento durante 24 h con los compuestos individuales sobre la viabilidad de las células Jurkat en los términos de necrosis (A y B) y apoptosis (C). Los resultados dosis-dependientes observados mediante la captación del azul tripano (Figura 23A) y de la fluorescencia del bromuro de etidio (Figura 23B) fueron esencialmente idénticos para cada uno de los cuatro compuestos. En todos los gráficos se muestra que el complejo CTZ-Pt induce efectos necróticos y apoptóticos más potentes que el resto de los compuestos. Por otra parte, los efectos citotóxicos del CDDP y del CTZ fueron muy similares mientras que los

correspondientes al TDDP no fueron diferentes a los del control sin droga dentro del intervalo de concentraciones ensayado.

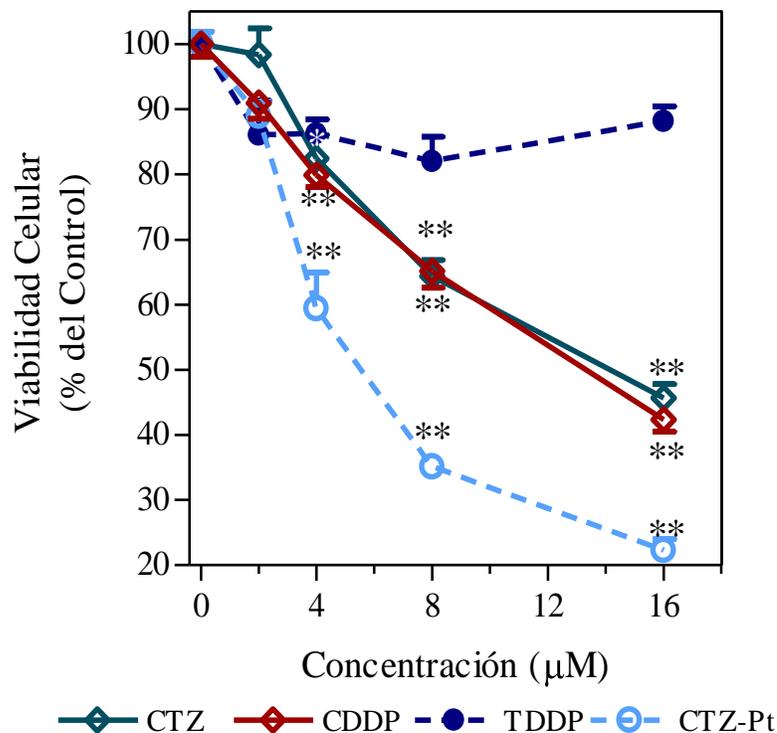


**Figura 23. Efectos de los compuestos individuales sobre la necrosis y la apoptosis.** Las células fueron ajustadas a  $2 \cdot 10^5$  células/mL e incubadas durante 24 h a  $37^\circ\text{C}$  y 5%  $\text{CO}_2$  en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos. Los controles estuvieron representados por células tratadas en iguales condiciones pero en ausencia de los compuestos. Se determinó la viabilidad empleando los métodos de exclusión del azul tripano (A) y microscopia de fluorescencia mediante tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio (B y C). Se aplicó la prueba de Dunnett comparando los efectos de las concentraciones de los compuestos con el control sin droga.  $p < 0,05$  fue considerado significativo ( $N=4$ ).

Con la finalidad de hacer los estudios comparativos de los efectos apoptóticos generados por las drogas individuales con los correspondientes al complejo CTZ-Pt, la figura 23C muestra solamente los efectos producidos hasta una concentración máxima de 10  $\mu\text{M}$ , debido a que dentro del intervalo 0-10  $\mu\text{M}$ , los efectos proapoptóticos del CTZ-Pt crecen de un modo dependiente de la dosis. Por encima de esa concentración, el CTZ-Pt genera eventos necróticos importantes (figuras 23A y 23B) en algunas células que probablemente estaban destinadas a morir por apoptosis. En tales casos, la fragmentación de la cromatina observable por la fluorescencia de la naranja de acridina sería enmascarada por la fluorescencia del bromuro de etidio en las células que perdieron la integridad de su membrana plasmática. El resultado final es un descenso ficticio en el porcentaje apoptosis como consecuencia del incremento en el porcentaje de necrosis.

## **2.2. Efectos sobre la viabilidad medida mediante la reacción del MTT.**

Los resultados de la figura 24 representados como las caídas de los porcentajes del control en función de las concentraciones, corresponden a estudios de viabilidad determinados mediante la reacción del MTT. Esta reacción permite evaluar la actividad metabólica celular y los resultados obtenidos se normalizaron y expresaron como el porcentaje de las células viables. Con la excepción del TDDP, se observó que los efectos de todos los compuestos tienen un comportamiento dependiente de la concentración. De nuevo, el CTZ-Pt exhibió los mayores efectos citotóxicos. Por otra parte, al comparar los valores de los  $\text{IC}_{50}$  para la inhibición de la proliferación (Figura 22) con los correspondientes a las pérdidas de viabilidad determinadas mediante la reacción del MTT (Figura 24) se observó cómo los valores aproximados de 7  $\mu\text{M}$  para el CTZ-Pt, 14  $\mu\text{M}$  para el CDDP y 15  $\mu\text{M}$  para el CTZ se repiten en ambos casos, sugiriendo que sus efectos citostáticos surgieron como consecuencia de eventos citotóxicos.



**Figura 24. Figura 22. Efectos de los compuestos individuales sobre la viabilidad.** Las células fueron ajustadas a  $2 \cdot 10^5$  células/mL e incubadas durante 24 h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> en presencia de diferentes concentraciones de los compuestos. Los controles estuvieron representados por células tratadas en iguales condiciones pero en ausencia de los compuestos. Se determinó la viabilidad empleando el método reacción del MTT y los resultados fueron expresados como porcentajes del control. El 100% corresponde a un valor de absorbancia de  $0,776 \pm 0,015$ . Se aplicó la prueba de Dunnett comparando los efectos de cada concentración contra el control correspondiente sin droga.  $p < 0,05$  fue considerado significativo (N = 4).

### 3. Efectos de las combinaciones de CTZ más TDDP y CTZ más CDDP sobre la viabilidad y proliferación.

Para evaluar los efectos de las combinaciones, las drogas TDDP y CTZ se combinaron en una proporción constante  $[TDDP]/[CTZ] = 1/2$  con la finalidad de mantener la misma relación estequiométrica entre el metal (Pt) y el CTZ presentes en

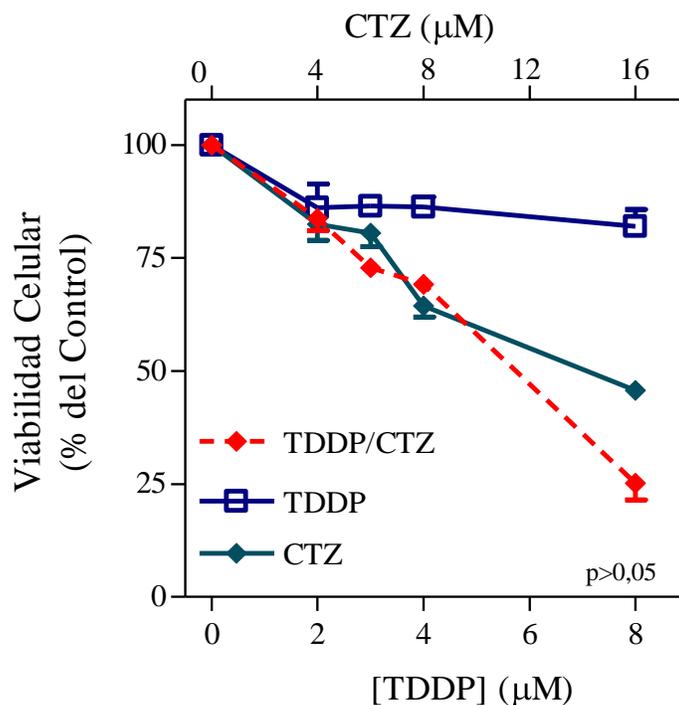
el complejo CTZ-Pt. En el caso de las combinaciones entre el CDDP y el CTZ, además de la proporción de 1/2, también se analizaron los efectos de la combinación en la proporción 1/1 debido a que, en contraste con el TDDP, el CDDP genera efectos dependientes de las concentraciones.

Para determinar si las interacciones entre las drogas combinadas con las células Jurkat generan efectos antagónicos, aditivos o sinérgicos se empleó el programa CalcuSyn® en aquellos casos en los que se cumplan dos requisitos: (1) que los efectos sean dependientes de las concentraciones de ambas drogas utilizadas en la combinación y (2) que los datos generados (inhibición de la proliferación o pérdida de la viabilidad) se ajusten a la ecuación de Chou-Talalay (Chou, 2010). Dicho análisis permite: (a) la determinación de los índices de combinación (C.I.); (b) la determinación de los índices de reducción de la dosis (IDR); (c) la determinación cuantitativa del ajuste de los datos a la ecuación del efecto de la mediana (valor de  $r$ ) y (d) las mediciones de los valores de los  $IC_{50}$  correspondientes a los compuestos individuales y a sus combinaciones. La información de mayor relevancia es aquella suministrada por los índices de combinación debido a que esos números reflejan si las combinaciones ensayadas son antagónicas, aditivas o sinérgicas.

### **3.1. Efectos de la combinación TDDP/CTZ sobre la viabilidad y proliferación.**

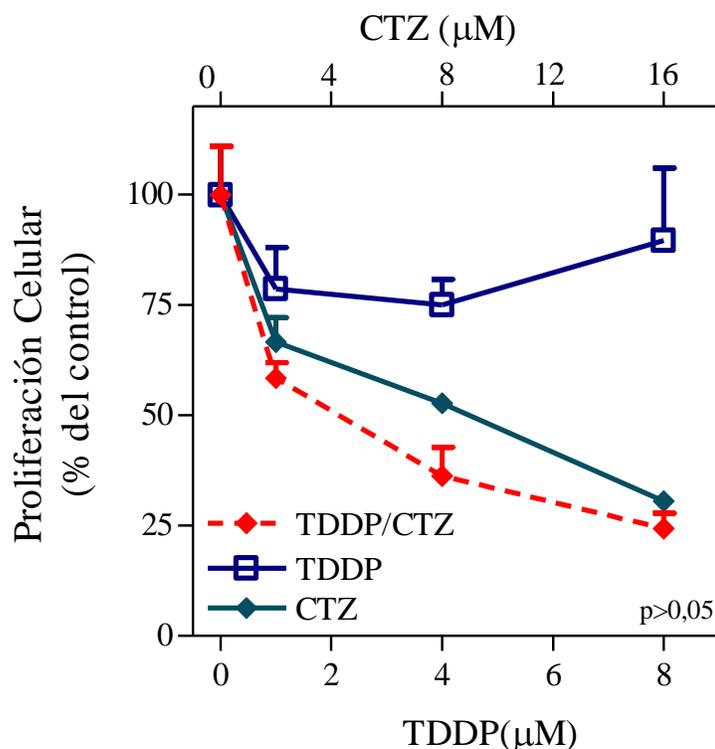
Los efectos de combinación TDDP/CTZ sobre la viabilidad fueron determinados mediante la reacción del MTT, empleando la proporción 1/2 dentro de los intervalos de concentraciones de 2 a 8  $\mu$ M para TDDP y de 4 a 16  $\mu$ M para CTZ. En la figura 25 se representan los porcentajes de viabilidad de los compuestos solos y combinados. En la figura puede observarse que los efectos de la combinación TDDP/CTZ son muy similares a los exhibidos por el CTZ solo, sugiriendo que, al

menos dentro de esos intervalos, el CTZ y el TDDP no interactúan de tal modo que se incrementen los efectos citotóxicos contra las células Jurkat.



**Figura 25. Comparación de los efectos individuales y combinados de TDDP y CTZ sobre la viabilidad.** Las células fueron ajustadas a  $2 \cdot 10^5$  células/mL e incubadas durante 24 h en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de los compuestos  $37^\circ\text{C}$  y  $5\% \text{CO}_2$ . La viabilidad se determinó empleando la reacción del MTT. Los resultados fueron expresados como porcentaje del control, donde el 100% corresponde a un valor de absorbancia de  $0,776 \pm 0,015$ . Se aplicó la prueba de Bonferroni comparando pares de columnas  $p < 0,05$  fue considerado significativo ( $N = 4$ ).

La proliferación de las células Jurkat también se evaluó en ensayos de 24 h y empleando la proporción 1/2 dentro del mismo intervalo de concentraciones mostrado en la figura 25. De nuevo, las curvas graficadas en la figura 26 indican que los efectos del CTZ y de la combinación TDDP/CTZ no son diferentes indicando que bajo esas condiciones, tampoco hay efectos citostáticos incrementados por la combinación.



**Figura 26. Comparación de los efectos individuales y combinados de TDDP y CTZ sobre la proliferación** Las células fueron ajustadas a  $2.10^5$  células/mL e incubadas durante 24 h en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de los compuestos  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  y  $5\%\text{CO}_2$ . La proliferación de las células viables se determinó mediante el conteo en hemocitómetro. Los resultados fueron expresados como porcentaje del control, donde el 100% corresponde a  $720.000 \pm 80.000$  cel/mL. Se aplicó la prueba de Bonferroni comparando pares de columnas  $p < 0,05$  fue considerado significativo ( $N = 4$ ).

### 3.2. Efecto de la combinación CDDP/CTZ sobre la viabilidad y proliferación.

Tomando en cuenta la información suministrada en la figura 24, las concentraciones individuales de CDDP y CTZ fueron combinadas en las proporciones 1:1 y 1:2, tal como se muestra en la tabla 1.

**Tabla 1.** Combinación CDDP/CTZ proporción 1:1 y 1:2.

<b>Combinación 1:1 CDDP/CTZ <math>\mu</math>M)</b>	<b>Combinación 1:2 CDDP/CTZ <math>\mu</math>M)</b>
1/1	1/2
2/2	2/4
4/4	4/8
8/8	8/16
16/16	16/32

Para determinar si los efectos citotóxicos observados al combinar estos compuestos en las proporciones indicadas fueron sinérgicos, aditivos o antagónicos, se empleó el programa CalcuSyn. Para ello se realizaron cuatro ensayos independientes para cada una de las combinaciones y se determinó la viabilidad de las células previamente incubadas durante 24 h con los compuestos. La viabilidad fue determinada mediante la reacción del MTT y los valores fueron expresados como % del control. Los gráficos de las figuras 23 son el resultado de promediar los datos obtenidos en los cuatro ensayos individuales.

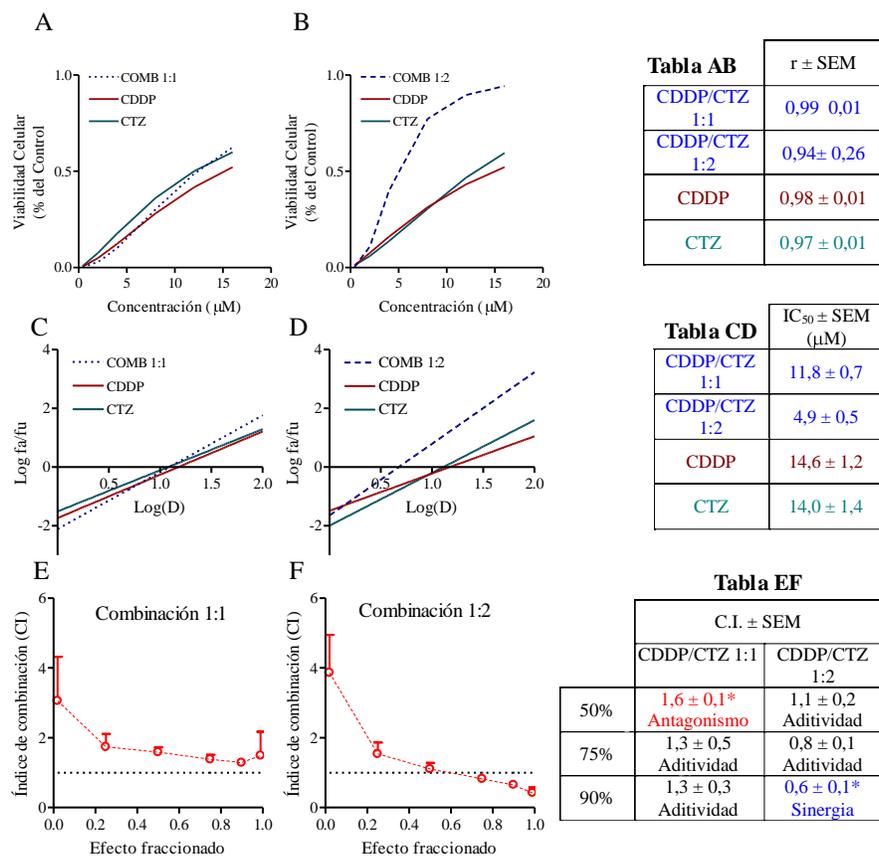
La figura 27 muestra que la combinación CDDP/CTZ 1:1 generó efectos similares a los de los compuestos individuales, mientras que la combinación CDDP/CTZ 1:2 produce efectos mayores a los inducidos por los compuestos individuales. La tabla AB anexa indica el correcto ajuste de los datos a la ecuación del efecto de la mediana, tal como lo sugieren los valores de  $r \geq 0,94$ .

Los gráficos de la figura 27C y 27D, son obtenidos a partir del empleo de la ecuación del efecto de la mediana ( $\log(f_a/f_u) = m \log(D) - m \log(D_m)$ ); donde  $f_a$  y  $f_u$  representan las fracciones afectadas y no afectadas, respectivamente. La tabla CD revela que la combinación CDDP/CTZ 1:2 es significativamente más potente que los

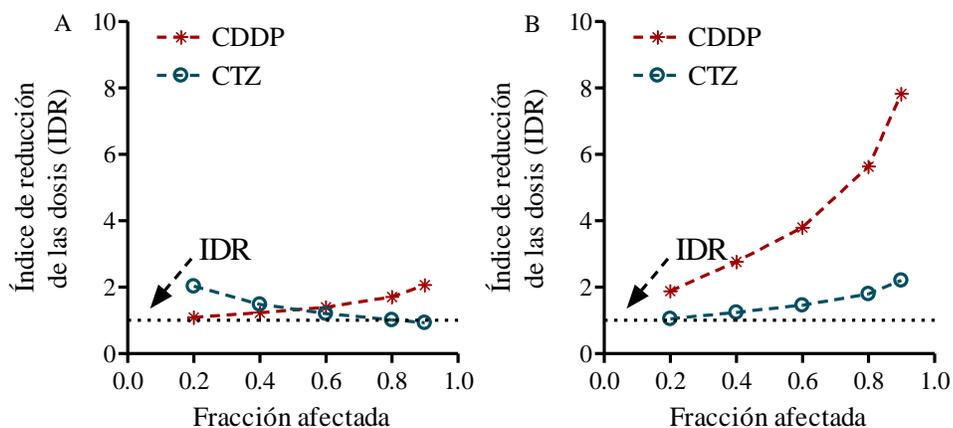
compuestos individuales para inhibir la viabilidad. Así lo indica la disminución notable en el  $IC_{50}$  del CDDP (desde 14,6 hasta 4,9  $\mu M$ ).

Las determinaciones de los índices de combinación revelan que en la combinación CDDP/CTZ 1:1 (Tabla EF) solamente se generan efectos aditivos a partir de los niveles que superen el 75% de la pérdida de viabilidad. Por debajo de ese valor, la combinación induce efectos antagónicos. En efecto, el índice de combinación obtenido para inhibir el 50% de la viabilidad resultó igual a  $1,6 \pm 0,1$  el cual es significativamente mayor que la unidad, de acuerdo con la prueba t de Student de dos colas. Un análisis similar para los efectos mayores, indicó que los índices de combinación no son diferentes de la unidad, por lo que se le atribuyen efectos aditivos a esa combinación. En contraste, en la combinación CDDP/CTZ 1:2 (Figura 27F y Tabla EF) los valores del índice de combinación declinaron a medida que aumentaban las concentraciones de los componentes de la combinación, encontrándose efectos sinérgicos a partir del 90% de la fracción afectada.

Otra información importante suministrada por el programa CalcuSyn es el IDR (índice de reducción de la dosis), una medida que indica cuánto se puede disminuir la concentración de un compuesto en una combinación sinérgica a un nivel de efecto dado en comparación con la dosis de cada compuesto solo. En este sentido, observamos que la combinación CDDP/CTZ= 1/1 (Figura 28A) genera incrementos muy modestos de los IDR para ambos compuestos. Por otra parte, en la combinación CDDP/CTZ= 1:2 (Figura 28B), el IDR del CDDP alcanza valores cercanos a 8 ( $7,82 \pm 2,23$ ) cuando la fracción afectada es 0,9 mientras que para este mismo nivel de efecto, el CTZ tiene un IDR cercano a 2 ( $2,20 \pm 0,39$ ). Estos resultados indican que los efectos sinérgicos tales como el exhibido por la combinación CDDP/CTZ= 1:2 para las fracciones afectadas cercanas al 90%, están acompañados de reducciones en las concentraciones efectivas. La figura 28B muestra claramente que la reducción fue más notable para el CDDP, lo cual es muy positivo debido a los conocidos efectos adversos del CDDP.



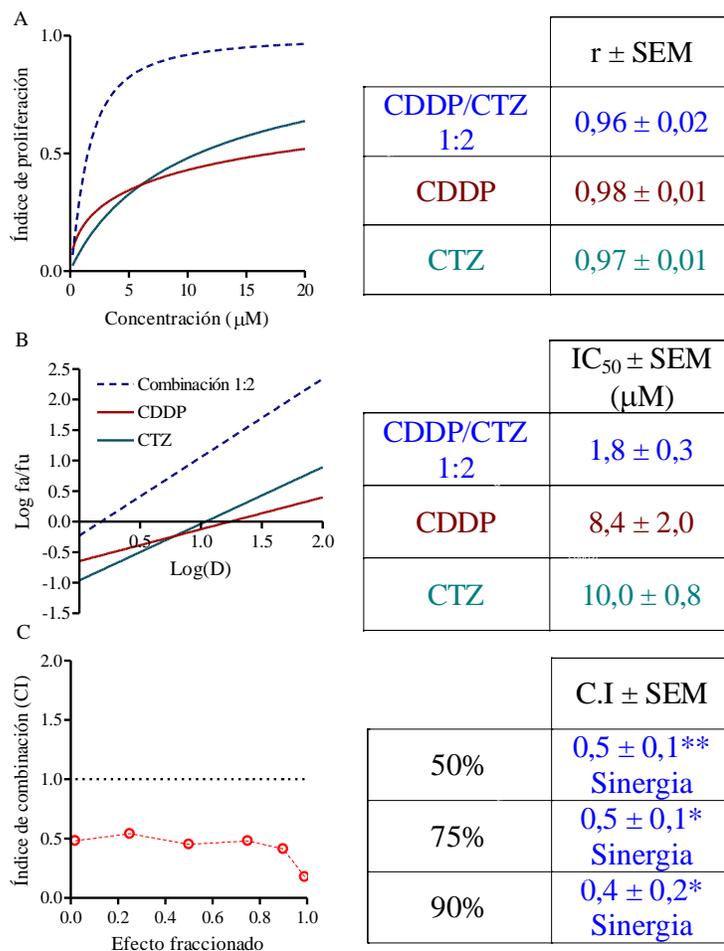
**Figura 27. Análisis de los efectos de las combinaciones CDDP/CTZ sobre la viabilidad.** Las células fueron ajustadas a  $2 \cdot 10^5$  células/mL e incubadas durante 24 h en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de los compuestos a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub> y la viabilidad fue determinada mediante la reacción del MTT. Las gráficas (A y B) corresponden a las curvas dosis-efecto y en la tabla adjunta (Tabla AB) se muestran los coeficientes de correlación lineal (r). Las gráficas C y D representan las expresiones logarítmicas de la ecuación del efecto de la mediana y en la Tabla CD se observan los valores de los IC<sub>50</sub> para los compuestos individuales y la combinación estudiada. En E y F se representan las variaciones del índice de combinación contra la fracción afectada y en la tabla adjunta (Tabla EF) los valores promediados de los índices de combinación (INDC) para la inducción del 50%, 75% y 90% de la pérdida de viabilidad INDC < 1, INDC = 1 e INDC > 1 indican sinergia, aditividad y antagonismo respectivamente. Los valores de p fueron considerados significativos cuando p < 0,05.



**Figura 28. Índice de reducción de la dosis.** Variación de los índices de reducción de la dosis para las combinaciones: A) CDDP/CTZ 1:1 y B) CDDP/CTZ 1:2 en los ensayos de viabilidad de las células Jurkat. Las condiciones de los ensayos fueron idénticas a las mostradas en la leyenda de la figura 27.

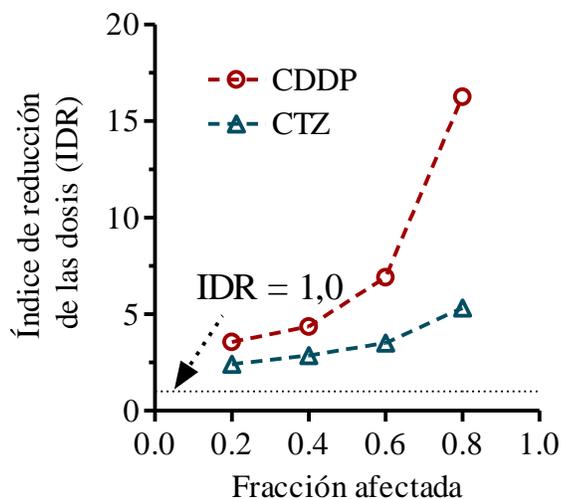
Posteriormente se estudiaron los efectos de la combinación CDDP/CTZ para la inhibición de la proliferación de las células Jurkat. Se escogió la combinación CDDP/CTZ en la proporción 1:2, ya que en el ensayo previo, fue dicha proporción la que indujo sinergia. Las concentraciones seleccionadas para los componentes CDDP/CTZ fueron ( $\mu\text{M}$ ): 1/2; 2/4; 4/8 y 8/16. Los efectos sobre la proliferación fueron evaluados mediante conteo en un hemocitómetro.

Las curvas hiperbólicas de la figura 29A indican claramente que la combinación seleccionada induce efectos más potentes que los correspondientes a los compuestos individuales. Los valores de los  $\text{IC}_{50}$  mostrados en la tabla adjunta de la figura 29B reflejan esta potenciación de un modo cuantitativo. Adicionalmente, la figura 29C muestra que todos los índices de combinación calculados desde los efectos fraccionados más bajos hasta el máximo valor posible, están por debajo de la línea límite de la unidad. La tabla adjunta de la figura 29C demuestra además que para las fracciones correspondientes al 50%, 75% y 90% de inhibición de la proliferación, los índices de combinación son significativamente menores que la unidad, indicando efectos sinérgicos importantes.



**Figura 29. Análisis de los efectos de la combinación de CDDP/CTZ en la proporción 1:2 sobre la proliferación.** Las células fueron ajustadas a  $2 \cdot 10^5$  células/mL e incubadas durante 24 h en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de los compuestos a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. La proliferación fue determinada mediante conteo en hemocitómetro. La figura A muestra las curvas dosis-efecto y en la tabla adjunta se representan los coeficientes de correlación lineal (r) correspondientes. Las rectas de la figura B representan las expresiones logarítmicas de la ecuación del efecto de la mediana, y en la tabla adjunta se incluyen los valores de los IC<sub>50</sub> para los compuestos individuales y la combinación estudiada. La figura C muestra las variaciones de los índices de combinación con la fracción afectada y en la tabla adjunta los valores promedios de los índice de combinación (INDC) para la inducción del 50%, 75% y 90% de la inhibición de la proliferación. INDC<1, INCD=1 e INDC>1 indican sinergia, aditividad y antagonismo respectivamente. Los valores de p fueron considerados significativos cuando p<0,05 para N=4 ensayos independientes.

La figura 30 muestra que para obtener, por ejemplo, un 80% de inhibición de la proliferación de las células Jurkat, esta combinación permite reducir la dosis de CDDP hasta aproximadamente quince veces y de CTZ hasta aproximadamente cinco veces en comparación con las que habría que emplear de modo individual para obtener ese mismo efecto. En ese sentido, se ha sugerido que para los agentes antivirales o anticáncer, la sinergia obtenida para las mayores fracciones afectadas, es de mayor relevancia para las terapias que para las fracciones bajas (Chou, 2010).



**Figura 30. Índice de reducción de la dosis:** Variación de los índices de reducción de la dosis para la combinación CDDP/CTZ 1:2 en los ensayos de proliferación de las células Jurkat. Las condiciones de los ensayos fueron idénticas a las mostradas en la leyenda de la figura 29.

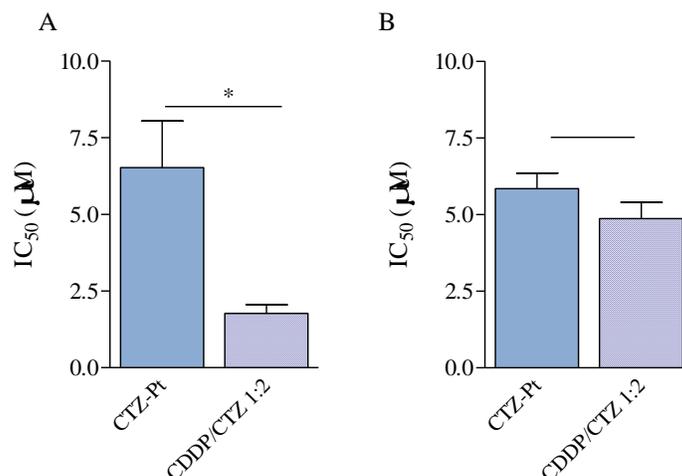
#### 4. Comparación de los efectos del CTZ-Pt con las combinaciones binarias TDDP/CTZ y CDDP/CTZ sobre la viabilidad y proliferación

Uno de los objetivos más importantes en este estudio es la comparación de los efectos citostáticos y citotóxicos de las combinaciones TDDP/CTZ y CDDP/CTZ con los generados por el complejo CTZ-Pt. En tal sentido, debido a que los efectos

observados para la combinación TDDP/CTZ fueron esencialmente iguales a los del CTZ solo (figuras 25 y 26), solamente se hicieron las comparaciones de los efectos del complejo CTZ-Pt con la combinación CDDP/CTZ 1:2, tanto para la inhibición de la proliferación como para la pérdida de la viabilidad.

Una manera apropiada para comparar las sensibilidades de las células en cultivo frente a dos o más tratamientos diferentes, hace uso de las mediciones de los  $IC_{50}$  los cuales reflejan las potencias de esos tratamientos sobre la supervivencia o proliferación celulares. Los gráficos A y B de la figura 31 corresponden a la comparación de los  $IC_{50}$  del CTZ-Pt y de la combinación CDDP/CTZ 1:2 calculados mediante el empleo del programa CalcuSyn®, para la inhibición de la proliferación y para la pérdida de viabilidad, respectivamente. La combinación CDDP/CTZ 1:2 inhibió el 50% de la proliferación a la concentración de 1,8  $\mu$ M, mientras que el CTZ-Pt necesitó una concentración de 6,5  $\mu$ M (figura 31A), lo cual demuestra que la combinación es más efectiva que el complejo en lo referente a la inhibición de la proliferación. Los  $IC_{50}$  para la pérdida de la viabilidad fueron de 5,8  $\mu$ M para CTZ-Pt y 4,9  $\mu$ M para CDDP/CTZ 1:2 (figura 31B).

El valor de  $IC_{50}$  1,8  $\mu$ M para la inhibición de proliferación y de 4,9  $\mu$ M para la pérdida de viabilidad nos indicó que los efectos citostáticos de la combinación CDDP/CTZ 1:2 son más importantes que sus efectos citotóxicos. Por lo contrario, en el CTZ-Pt, esos valores de  $IC_{50}$  de 6,5  $\mu$ M y 5,8  $\mu$ M revelan que la mayor parte de sus efectos son citotóxicos. En otras palabras, la inhibición de la proliferación por el CTZ-Pt probablemente se deba a la pérdida de viabilidad que este complejo indujo en las células Jurkat.



**Figura 31. Comparación de los IC<sub>50</sub> de CTZ-Pt y CDDP/CTZ para la inhibición de la proliferación (A) y la pérdida de viabilidad (B).** Las células Jurkat ( $2 \cdot 10^5$  células/mL) incubadas durante 24 h a 37 °C y 5 % CO<sub>2</sub>. Los datos graficados corresponde a cuatro ensayos independientes donde en A la proliferación fue determinada mediante el conteo en hemocitómetro y en B la viabilidad fue determinada mediante la reacción del MTT. Los resultados obtenidos fueron expresados como porcentaje del control para ambos casos, y posteriormente se realizaron los cálculos mediante el empleo del programa CalcuSyn para cada ensayo independiente, se promediaron los resultados y se aplicó una t de student donde  $p < 0,05$  se considero significativo.

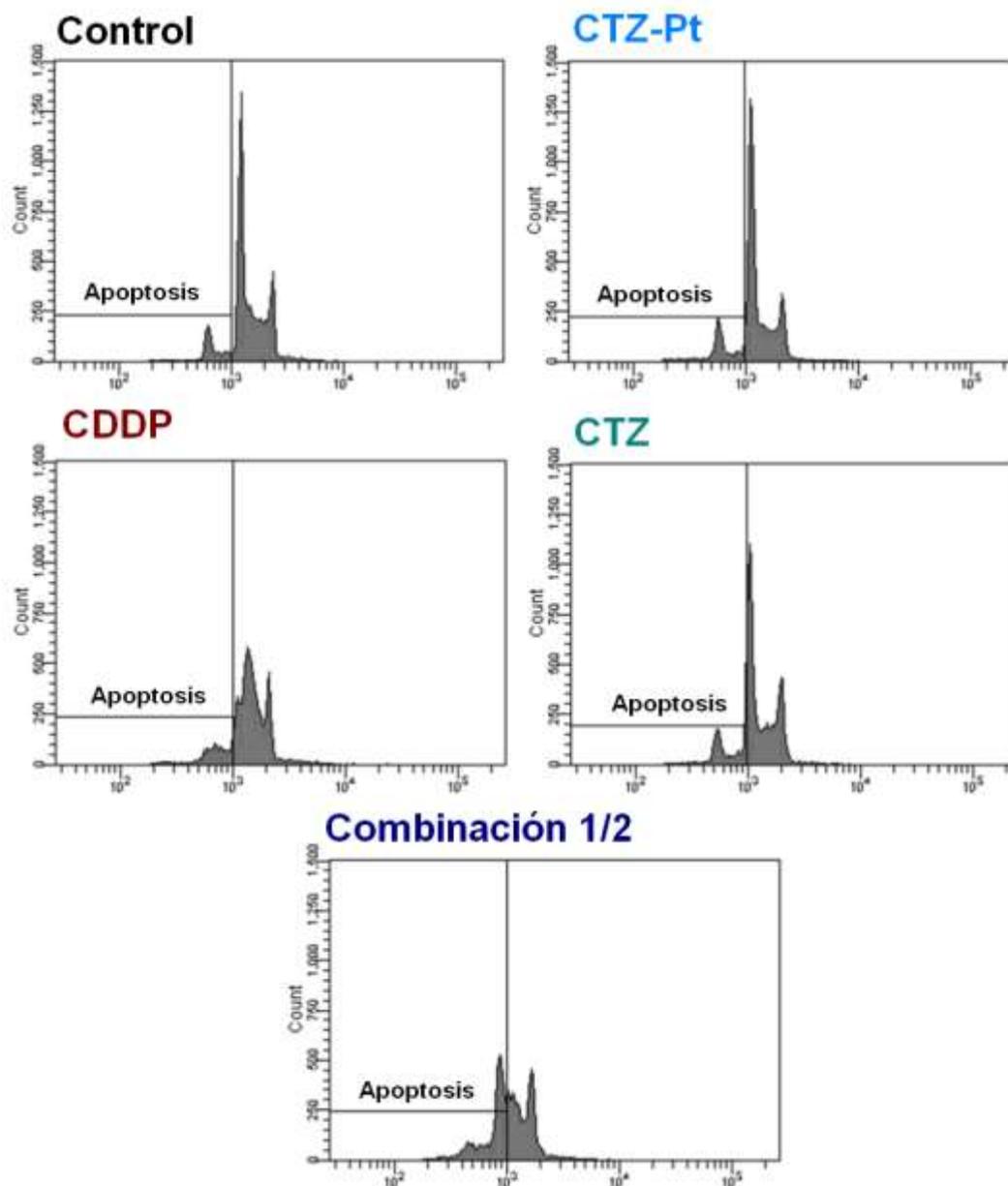
## 5. Comparación de los efectos del CTZ-Pt con la combinación CDDP/CTZ sobre la apoptosis

Los efectos de los compuestos individuales y combinados sobre la apoptosis fueron determinados mediante el empleo de las técnicas de citometría de flujo y de microscopia de fluorescencia. La primera permite analizar el contenido de ADN empleando el fluorocromo yoduro de propidio (IP). Las células apoptóticas sufren pérdidas parciales del ADN debido a la activación de endonucleasas. Si las células son previamente permeabilizadas, la consiguiente difusión de los fragmentos de ADN de bajo peso molecular fuera de las células, conduce a que las células que hayan perdido esos fragmentos, generen una fluorescencia del IP menor que la observada en

las células control. La consecuencia final es la observación de células con un contenido menor que las células viables diploides en los histogramas obtenidos con el citómetro. Por otra parte, en la microscopía de fluorescencia se cuantifica el porcentaje de células apoptóticas caracterizadas por la presencia de la cromatina fragmentada observable a través de la fluorescencia del agente intercalador naranja de acridina. En ambas técnicas, los eventos observados son característicos de la apoptosis tardía.

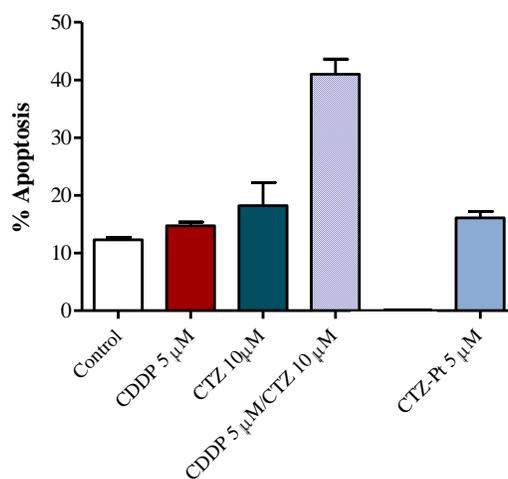
Para los mencionados ensayos se emplearon las concentraciones de 5  $\mu\text{M}$  para CDDP y CTZ-Pt, y de 10  $\mu\text{M}$  para el CTZ, ya que en los ensayos previos se demostró que a estas concentraciones, el CDDP y el CTZ generan efectos proapoptóticos aproximados de 15 y 20%, respectivamente (Figura 23C). Estos porcentajes son adecuados, ya que si se obtienen resultados que indiquen potenciación de la apoptosis, tal efecto sería fácilmente observable.

En la figura 32 se muestran histogramas representativos de cuatro ensayos independientes en los que se puede observar la presencia de células apoptóticas hipodiploides. Debe destacarse que los histogramas de las células control y las tratadas con el CTZ y el CTZ-Pt son de apariencias normales en el sentido de (a) la presencia de un pico diploide (células en la fase  $G_1/S$  del ciclo celular); (b) la presencia de un pico tetraploide (células en la fase  $G_2/M$  del ciclo celular) y (c) células en la fase S de síntesis cuyo contenido es intermedio entre las  $G_1$  y las  $G_2$ . En contraste, en las células tratadas con el CDDP solo o combinado, se observa disminución del pico  $G_1$  y aumentos tanto en el pico  $G_2$  como en la fase S. Estos eventos son característicos tanto del retraso en la fase S como del arresto o detención del ciclo celular en la fase  $G_2/M$ , lo cual ha sido ampliamente reportado para las células tratadas con el CDDP y otros complejos de platino con la geometría *cis*, mientras que los complejos con la geometría *trans* tal como el CTZ-Pt, no alteran la distribución del ciclo celular (Murphy *et al.*, 2012).



**Figura 32. Histogramas representativos de los efectos de los compuestos individuales y de la combinación (CDDP 5  $\mu$ M)/(CTZ 10  $\mu$ M) sobre la apoptosis.** Las células fueron ajustadas a  $2 \cdot 10^5$  células/mL e incubadas durante 24 h en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de los compuestos a 37 °C y 5 %  $\text{CO}_2$ . La apoptosis se determinó mediante citometría de flujo empleando como fluorocromo yoduro de propidio contando 10.000 eventos. Los histogramas corresponden al: Control, 5  $\mu$ M CTZ-Pt, 5  $\mu$ M CDDP, 10  $\mu$ M CTZ y la combinación 1/2 de CDDP/CTZ.

Al comparar las barras correspondientes a CDDP 5  $\mu$ M y CTZ 10  $\mu$ M con la de CDDP 5  $\mu$ M/CTZ 10  $\mu$ M en la figura 33, observamos que la combinación incrementa la apoptosis de manera significativa. Este incremento puede considerarse aditivo, ya que el valor aproximado de 40 % apoptosis inducido por la combinación es similar a la suma de los efectos proapoptóticos de los compuestos individuales, cuyo valor aproximado es de 35 % de apoptosis.

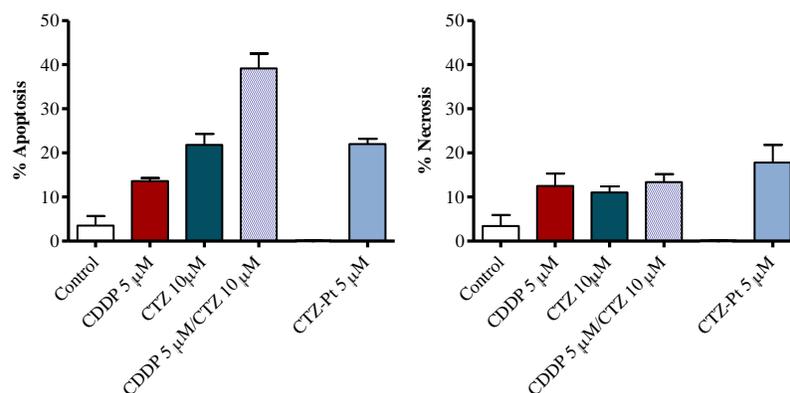


**Figura 33. Comparación de los efectos de los compuestos individuales y de la combinación (CDDP 5  $\mu$ M)/(CTZ 10  $\mu$ M) sobre la apoptosis.** Las células fueron ajustadas a  $2 \cdot 10^5$  células/mL e incubadas durante 24 h en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de los compuestos a 37  $^{\circ}$ C y 5 %  $\text{CO}_2$ . La apoptosis se determinó mediante citometría de flujo empleando como fluorocromo yoduro de propidio contando 10.000 eventos. Los valores representan la media  $\pm$  SEM de cuatro ensayos individuales.

Aunque ha sido establecido que la presencia de células subdiploides es un marcador característico de las células apoptóticas, es posible que algunas células necróticas muestren este tipo de pérdidas en su contenido de ADN. Para investigar esta posibilidad, deben hacerse ensayos paralelos que permitan cuantificar la necrosis. Con este propósito, se hicieron evaluaciones simultáneas de necrosis y de apoptosis mediante microscopía de fluorescencia con la combinación de los

fluorocromos naranja de acridina y bromuro de etidio bajo las mismas condiciones de los ensayos de citometría de flujo. Los resultados se muestran en la figura 34, los cuales sugieren que la subdiploidia fue producto solo de la apoptosis. En efecto, los resultados coinciden con los de citometría de flujo mostrando valores aproximados de 15, 20 y 40 % para el CDDP 5  $\mu\text{M}$ , para el CTZ 10  $\mu\text{M}$  y para la combinación (CDDP 5  $\mu\text{M}$ )/(CTZ 10  $\mu\text{M}$ ), respectivamente. De nuevo, se hace evidente que con la combinación se alcanzan efectos aditivos, ya que valores aproximados de 35-40 % de apoptosis se repiten tanto para la combinación como para la sumatoria de los efectos individuales de cada compuesto.

Por otra parte, las comparaciones de los resultados obtenidos con la combinación con los correspondientes al complejo CTZ-Pt indican que: (a) la combinación induce apoptosis en mayor proporción que el complejo CTZ-Pt (figuras 29 y 30) y (b) que solo CTZ-Pt induce efectos necróticos significativos a la concentración estudiada (figura 34).



**Figura 34. Comparación de los efectos de los compuestos individuales y de la combinación CDDP 5  $\mu\text{M}$  / CTZ 10  $\mu\text{M}$  sobre la apoptosis y la necrosis.** Las células fueron ajustadas a  $2 \cdot 10^5$  células/mL e incubadas durante 24 h en presencia y ausencia de diferentes concentraciones de los compuestos a 37 °C y 5 %  $\text{CO}_2$ . La apoptosis y la necrosis se determinaron mediante microscopía de fluorescencia y tinción con naranja de acridina y bromuro de etidio: Los valores representan la media  $\pm$  SEM de cuatro ensayos independientes.

## IV. DISCUSIÓN

Esencialmente, los resultados mostrados en el presente trabajo revelan que en las células Jurkat, (1°) el complejo CTZ-Pt es un agente citotóxico y citostático más potente que el CDDP y (2°) las combinaciones con concentraciones apropiadas del CDDP con el CTZ pueden generar efectos citotóxicos y citostáticos más pronunciados que los del complejo CTZ-Pt.

La primera observación sugiere que la síntesis de nuevos complejos de platino con geometría *trans* puede conducir a actividades anticáncer de importancia, lo cual ha sido reportado para varios complejos de platino en los cuales se ha sustituido al ligando NH<sub>3</sub> por aminas con estructuras planas (Aris y Farrell, 2009).

La segunda observación sugiere que los efectos *in vitro* que esos nuevos complejos exhiban, deberían ser comparados con los producidos por las combinaciones del CDDP con los ligandos de esos complejos. Ambas observaciones son discutidas en los siguientes párrafos.

En el trabajo publicado por el grupo de investigadores que sintetizó al CTZ-Pt, se reportó que, en un sistema libre de células, ese complejo puede interactuar de un modo no covalente con el surco menor del ADN (Navarro *et al.*, 2009). Además, al estudiar sus efectos sobre un total de seis líneas de tumores sólidos de diferentes orígenes, el CTZ-Pt pudo inhibir el crecimiento de cuatro de esas líneas dentro del intervalo de concentraciones 5-25 µM. Dentro de ese mismo intervalo, sin embargo, no observaron los indicios de citotoxicidad que sí mostraron el CTZ y el CDDP, empleados como las drogas controles. Esos resultados sugieren que la débil

interacción del CTZ-Pt con el ADN, la cual es característica de los complejos de platino con la geometría *trans* (por ejemplo, el TDDP), no es suficiente para generar daños al ADN que desencadenen los efectos citotóxicos característicos de los complejos de platino con la geometría *cis*, tales como el CDDP, el carboplatino y el oxaliplatino, cuyas interacciones con el ADN son del tipo covalente (Kostova, 2006).

En contraste, las figuras 23, 24 y 25 del presente trabajo indican que los eventos citostáticos del CTZ-Pt (Figura 22), están acompañados de efectos citotóxicos importantes (figuras 23, 24 y 25) en las células leucémicas Jurkat, sugiriendo que en este caso, los eventos citotóxicos también podrían provenir de interacciones con blancos moleculares distintos al ADN.

Los histogramas de la figura 32 indican que las interacciones del CTZ-Pt con el ADN son diferentes a las del CDDP. En efecto, esos histogramas muestran la acumulación característica de células en el pico G<sub>2</sub> del ciclo celular (Shen *et al.*, 2013) solamente cuando el CDDP, solo o combinado, estuvo presente. En contraste, los histogramas correspondientes a las células tratadas con el complejo CTZ-Pt o con el CTZ, muestran los picos normales correspondientes a las células apoptóticas (pico sub-G<sub>1</sub>), y a las células en las fases G<sub>1</sub>/S y G<sub>2</sub>/M del ciclo celular. Es probable entonces, que los efectos citotóxicos del CTZ-Pt pueden provenir tanto de sus interacciones con el ADN como de sus efectos sobre otros blancos moleculares en el interior de las células Jurkat. En tal sentido, en los siguientes párrafos se discuten algunas de las posibles interacciones tanto del metal (Pt) como del ligando (CTZ) con blancos celulares diferentes al ADN.

### **1. Efectos del Pt:**

Las figuras 22, 23 y 24 muestran que el TDDP, en contraste con el CDDP y el CTZ-Pt, no genera efectos citostáticos o citotóxicos contra las células Jurkat dentro del intervalo 2-40  $\mu$ M. Aunque estos resultados confirman numerosos hallazgos previos acerca de la falta de actividad del TDDP tanto *in vitro* como *in vivo* (Kostova,

2006), no dejan de ser sorprendentes si se considera que el TDDP es un inhibidor más potente de la enzima tioredoxina reductasa (TrxR) que el propio CDDP (Arnér *et al.*, 2001). Este tema puede ser relevante debido a que se ha demostrado que la inhibición de la TrxR por diversos fármacos suele conducir a importantes efectos citotóxicos (Arnér, 2009). Una posible explicación puede extraerse de las diferencias de reactividad entre los complejos de platino de geometría *trans* con los de geometría *cis* cuando son tratados con el glutatión (GSH), un antioxidante cuya alta concentración intracelular le permite neutralizar los efectos de muchas sustancias electrofílicas tales como los complejos de platino(II). En efecto, en un sistema libre de células se demostró que dos complejos del tipo *trans*-Pt(II) (incluyendo al TDDP) son inactivados por el GSH de un modo considerablemente más eficiente que dos complejos isómeros del tipo *cis*-Pt(II) (incluyendo al CDDP) (Suchánková *et al.*, 2009). Además, se ha reportado un resultado similar durante las interacciones del TDDP y el CDDP con una de las isoformas de la metalotioneína, una importante proteína antioxidante que contiene un elevado número de residuos de cisteína (Kerotki y Vasák, 2009). En resumen, las interacciones del TDDP con el GSH o con las metalotioneínas, son consistentes con el modelo de resistencia generado por los niveles inadecuados del platino alcanzando su objetivo esencial: el ADN (Kelland, 2007). En el caso de ser correcta esa explicación y tomando en cuenta que el CTZ-Pt también tiene la configuración *trans*, es razonable suponer que los efectos citostáticos y citotóxicos del CTZ-Pt observados en las células Jurkat, dependen en buena medida de las propiedades del ligando orgánico CTZ.

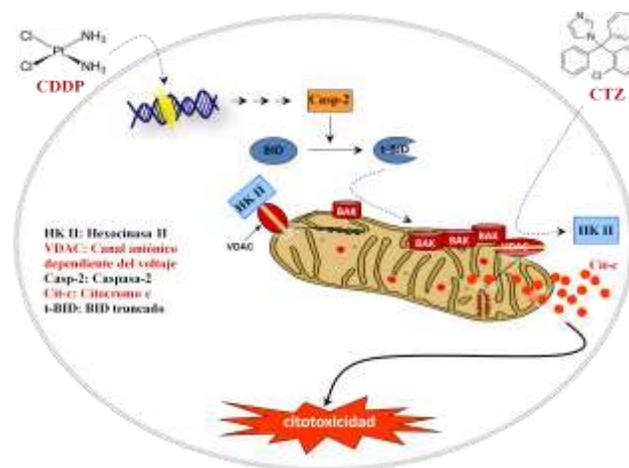
## **2. Efectos del CTZ:**

Aunque la mayoría de las propiedades terapéuticas y tóxicas del CTZ han sido atribuidas a la inhibición de los canales de potasio activados por el calcio así como de las enzimas de la familia del citocromo P450 (Chou *et al.*, 2008), en un estudio reciente se demostró que, en dos líneas celulares de cáncer de mama humano, el CTZ puede inducir la disminución del contenido intracelular del ATP así como de las

actividades de las enzimas glucolíticas hexocinasa, fosfofructocinasa-1 y piruvato cinasa (Furtado *et al.*, 2012). Este hallazgo es interesante debido a que tales efectos sobre el metabolismo fueron relacionados con inhibiciones del crecimiento y migración de las células tumorales, mientras que una línea de células epiteliales mamarias no tumorales, no fue afectada por el CTZ. Este ejemplo encaja muy bien dentro de la noción del conocido “efecto Warburg” que sostiene que los tumores malignos agresivos de rápido crecimiento, tienen actividades glucolíticas mucho mayores que aquellas provenientes de sus tejidos originarios normales (Vander Heiden *et al.*, 2009). Es posible entonces, que la inhibición de la glucólisis por el CTZ sea una explicación de los resultados mostrados en las figuras 25, 26, 27 y 29 del presente trabajo, los cuales indican que los efectos del CDDP y del TDDP pueden incrementarse si se combinan con CTZ. Cabe destacar que este tipo de incrementos ha sido reportado en trabajos donde combinaron el CDDP con un conocido inhibidor de la glucólisis, la 2-desoxiglucosa (2-DG) en células de cáncer de cuello y cabeza (Simons *et al.*, 2007) y de neuroblastoma (Chuang *et al.*, 2013).

Los resultados relacionados con los efectos pro-apoptóticos generados por la combinación de CTZ con CDDP en células Jurkat no han sido reportados previamente. En otras líneas tumorales se ha observado que el CTZ puede generar incrementos modestos en la citotoxicidad del CDDP (Khalid *et al.*, 1999) o en contraste, puede disminuir la citotoxicidad del CDDP (Lee *et al.*, 2008). Sin embargo, en un estudio llevado a cabo en células de carcinoma de colon tratadas durante 16 h con 20  $\mu\text{M}$  CTZ o con 30  $\mu\text{M}$  CDDP, se observó la inducción de 11% y 25% de necrosis (medida por el método de exclusión del azul tripano) respectivamente, mientras que la combinación de ambas drogas con idénticas concentraciones indujo 72% de necrosis (Shulga *et al.*, 2009). Las figuras 33 y 34 del presente trabajo muestran que el tratamiento de las células Jurkat durante 24 h con la combinación de 5  $\mu\text{M}$  CDDP con 10  $\mu\text{M}$  CTZ generó incrementos en la apoptosis que fueron aditivos mientras que la necrosis no fue afectada por esa combinación.

En el estudio publicado por Shulga *et al.*, 2009, se sugirió que los efectos citotóxicos observados en las células de carcinoma de colon se debieron a que el CTZ induce la separación de la enzima hexocinasa 2 (HXK 2) de su sitio de unión a las mitocondrias. La hexocinasa (HXK) inicia todas las rutas de utilización de la glucosa y la isoforma HXK 2, cuya actividad es altamente incrementada en los tumores agresivos, acopla la glucólisis con la fosforilación oxidativa debido a su unión a las mitocondrias, actuando de esa forma como un sensor metabólico (Chiara *et al.*, 2008). La secuencia de eventos propuesta por Shulga *et al.*, 2009 para explicar la sinergia entre el CTZ y el CDDP fue la siguiente: (a) El CDDP induce daño al ADN; (b) El daño al ADN activa la caspasa-2; (c) la caspasa-2 cataliza la ruptura de la proteína pro-apoptótica Bid generando su forma truncada t-Bid; (d) La formación de t-Bid induce la oligodimerización de Bak, otra proteína pro-apoptótica; (e) La oligomerización de Bak es potenciada por la acción del CTZ sobre la unión de la HXK 2 a la mitocondria, conduciendo a la permeabilización de las mitocondrias y finalmente, a la eventual citotoxicidad (Figura 35). Debe destacarse que en las células Jurkat se ha reportado una secuencia similar de eventos citotóxicos, incluyendo la activación de la caspasa-2, cuando son tratadas con otras drogas genotóxicas (Inoue *et al.*, 2009).



**Figura 35. Secuencia de eventos propuesta para explicar la sinergia entre el CTZ y el CDDP. Fuente: Shulga *et al.*, 2009**

Tomados estos hallazgos en su conjunto, puede sugerirse que la inhibición de la glucólisis por el CTZ, ya sea por su acción sobre las enzimas glucolíticas o sobre la separación de la HXK 2 de las mitocondrias, podría formar la base de protocolos de combinación con otras drogas quimioterapéuticas incluyendo las sales de platino, para incrementar sus efectos anticáncer.

## V.CONCLUSIONES

Al comparar los efectos antileucémicos in vitro del nuevo complejo *trans*-Pt(CTZ)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>] con los de las combinaciones del clotrimazol con transplatino y cisplatino, se encontró que:

- En contraste con los efectos reportados sobre otras líneas de tumores sólidos, el complejo CTZ-Pt es un agente citotóxico y citostático más potente que el CDDP en la línea de células leucémicas Jurkat.
- Las combinaciones con concentraciones apropiadas del CDDP con el CTZ pueden generar efectos citotóxicos y citostáticos más pronunciados que los del complejo CTZ-Pt. Estos efectos no fueron observados cuando las combinaciones se hicieron con el TDDP.
- La combinación de CDDP con CTZ empleando concentraciones tolerables para los seres humanos, generó incrementos en la apoptosis que fueron aditivos mientras que la necrosis no fue afectada por esa combinación.

## **VI. RECOMENDACIONES**

Debido a que el hallazgo más importante de este estudio es la posibilidad de alcanzar efectos antitumorales sinérgicos mediante combinaciones racionales del CDDP con drogas de uso permitido tales como el CTZ, se recomienda hacer estudios similares combinando sales de platino (CDDP, carboplatino, oxaliplatino) con otros azoles de uso clínico permitido (ketoconazol, itraconazol, posaconazol) así como con otros inhibidores de la glucólisis (2-desoxiglucosa, 3-bromopiruvato, dicloroacetato).

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

Abraham R. and A. Weiss. 2004. Jurkat T cells and development of the T-cell receptor signalling paradigm. *Nat. Rev. Immunol.* 4(4):301

Aktas, H., R. Flückiger, J. Acosta, J. Savage S. Palakurthi and J. Halperin, J. 1998. Depletion of Ca<sup>2+</sup> stores, phosphorylation of eIF2 $\alpha$ , and sustained inhibition of translation initiation mediate the anticancer effects of CTZe. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95:8280.

Arias, F. 2004. El proyecto de Investigación. Introducción a la metodología científica (4ta Ed.). Episteme, Caracas, Venezuela.

Aris, S., and N. Farrell. 2009 Towards Antitumor Active trans-Platinum Compounds. *Eur. J. Inorg. Chem.* 1(10):1293.

Arnér, E., H. Nakamura, T. Sasada, J. Yodoi, A. Holmgren, G. Spyrou. 2001. Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cisdiamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex. *Free Radic Biol Med.* 31(10):1170.

Arnér E. 2009. Focus on mammalian thioredoxin reductases--important selenoproteins with versatile functions. *Biochim Biophys Acta.* 1790(6):495.

Arnesano, F., and G. Natile. 2009. Mechanistic insight into the cellular uptake and processing of cisplatin 30 years after its approval by FDA. *Coord. Chem. Rev.* 253:2070–2081.

Basu, A., and S. Krishnamurthy. 2010. Cellular Responses to Cisplatin-Induced DNA Damage. *J. Nucleic. Acids.* 2010:1.

Berkefeld H., B. Fakler and U. Schulte. 2010. Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels: from protein complexes to function. *Physiol. Rev.* 90(4):1437-1459.

Borts, P., S. Rottenberg, and J. Jonkers. 2008. How do real tumors become resistant to cisplatin?. *Cell Cycle.* 7(10): 1353.

- Carvalho, A., F. Vieira, V. Melo, M. Lopes, J. Silveira, G. Ramaldes, A. Garnier-Suillerot, E. Pereira-Maia and M. Oliveira. 2007. Preparation and cytotoxicity of cisplatin-containing liposomes. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 40(8):1149.
- Cepeda V., M. Fuertes, J. Castilla, C. Alonso, C. Quevedo and J. Pérez. 2007. Biochemical mechanisms of cisplatin cytotoxicity. *Anticancer Agents Med .Chem.* 7(1):3.
- Chiara F, D. Castellaro, O. Marin, V. Petronilli, W. Brusilow, M. Juhaszova, S. Sollott, M. Forte, P. Bernardi, A. Rasola. 2008. Hexokinase II detachment from mitochondria triggers apoptosis through the permeability transition pore independent of voltage-dependent anion channels. *PLoS One.*(3):e1852
- Chou, C., C. Lunn and L. Murgolo. 2008. KCa3.1:Target and marker for cancer, autoimmune disorder and vascular inflammation. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 8(2):179.
- Chou, T. and P. Talalay. 1984. Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drug or enzyme inhibitions. *Adv. Enz. Regul.* 22: 27.
- Chou, T. 2010. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method. *Cancer Res.* 70:440.
- Chuang J., M. Chou, M. Tai, T. Lin, C. Liou, T. Chen, W. Hsu, P. Wang. 2013. 2-Deoxyglucose treatment complements the cisplatin- or BH3-only mimetic-induced suppression of neuroblastoma cell growth. *Int J Biochem Cell Biol.*45(5):944.
- Chu, G. 1994. Cellular Responses to Cisplatin. *J. Of Biol. Chem.* 269(2): 787.
- Dummer, D., M. Marinho-Carvalho, C. Teixeira, V. Veigad, A. Da Poianb, C. Holandino, M. De Freitas, and M. Sola-Penna. 2005. CTZe decreases human breast cancer cells viability through alterations in cytoskeleton associated glycolytic enzymes. *Mol. Genet. Metab.* 84:354.
- Floros, K., H. Thomadaki, G. Lallas, N. Katsaros, M. Talieri and A. Scorilas. 2003. Cisplatin-Induced Apoptosis in HL-60 human promyelocytic cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1010:153.
- Friesen, C., S. Fulda and K. Debatin. 1999. Cytotoxic drugs and the CD95 pathway. *Leukemia.* 13:1854.
- Fuertes M., C. Alonso and J. Pérez. 2003. Biochemical modulation of Cisplatin mechanisms of action: enhancement of antitumor activity and circumvention of drug resistance. *Chem. Rev.* 103(3):645.

- Furtado C., M. Marcondes, M. Sola-Penna, M. de Souza, P. Zancan. 2012. Clotrimazole preferentially inhibits human breast cancer cell proliferation, viability and glycolysis. *PLoS One*.7(2):e30462.
- Galea, A. and V. Murray. 2008. The anti-tumour agent, cisplatin, and its clinically ineffective isomer, transplatin, produce unique gene expression profiles in human cells. *Cancer Inform.* 6:315.
- Ghavami, S., M. Hashemi, S. Ande, B. Yeganeh, W. Xiao, M. Eshraghi, C. Bus, K. Kadkhoda, E. Wiechec, A. Halayko and M. Los. 2009. Apoptosis and cancer: mutations within caspase genes. *J. Med. Genet.* 46: 497.
- Hanigan, M. and P. Devarajan. 2003. Cisplatin nephrotoxicity: molecular mechanisms. *Cancer Ther.* 1: 47.
- Inoue S., G. Browne, G. Melino, G. Cohen. 2009. Ordering of caspases in cells undergoing apoptosis by the intrinsic pathway. *Cell Death Differ.* 16(7):1053.
- Ito, C., C. Tecchio, E. Coustan-Smith, T. Suzuki, F. Behm, S. Raimondi, C. Pui and D. Campana. 2002. The antifungal antibiotic CTZe alters calcium homeostasis of leukemic lymphoblasts and induces apoptosis. *Leukemia* 16(7): 1344.
- Jakupec, M., M. Galanski, VB. Arion, C. Hartinger and B. Keppler. 2008. Antitumour metal compounds: more than theme and variations. *Dalton Trans.* 14(2):183.
- Jamieson, E., and S. Lippard. 1999. Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts. *Chem. Rev.* 99:2467.
- Karotki A. and M. Vasák. 2009. Reaction of human metallothionein-3 with cisplatin and transplatin. *J Biol Inorg Chem.* 14(7):1129.
- Kelland L. 2007. The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy. *Nat Rev Cancer.*7(8):573.
- Khalid, M., S. Shibata and T. Hiura. 1999. Effects of CTZe on the growth, morphological characteristics, and cisplatin sensitivity of human glioblastoma cells in vitro. *J. Neurosurg.* 90(5):918.
- Kostova, I. 2006. Platinum Complexes as Anticancer Agents. *Recent. Pat. Anticancer Drug. Discov.* 1(1):1.

Lebwohl, D., and R. Canetta. 1998. Clinical development of platinum complexes in cancer therapy: an historical perspective and an update. *Eur. J. Cancer.* 34(10): 1522.

Lee E., Y. Hasegawa, T. Shimizu, Y. Okada. 2008. IK1 channel activity contributes to cisplatin sensitivity of human epidermoid cancer cells. *Am J Physiol Cell Physiol.*294(6):C1398.

Liu, W., C. Qing, X. Chen, Q. Ye, Y. Yu and S. Hou. 2008. Preparation, characterization and in vitro anticancer activity of platinum(II) complexes with N-Cyclohexyl-1,3-propanediamine as the carrier. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo).* 56(5):659.

Martin, L., T. Hamilton and S. Schilder. 2008. Platinum Resistance: The role of DNA repair pathways. *Clin. Cancer Res.* 2008:14(5).

Mosmann, T. 1983 Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Methods.* 65: 55.

Mukhopadhyay D., S. Sundereshan, C. Rao, A. Karande. 2001. Placental protein 14 induces apoptosis in T cells but not in monocytes. *J Biol Chem.* 27:276(30).

Murphy, R., E. Komlodi-Pasztor, R. Robey, F. Balis, N. Farrell, and T. Fojo. 2012. Retained platinum uptake and indifference to p53 status make novel transplatinum agents active in platinum-resistant cells compared to cisplatin and oxaliplatin. *Cell Cycle.* 11(5):963.

Navarro, M., A. Higuera, M. Arsenak and P. Taylor. 2009. Synthesis, characterization, DNA interaction Studies and anticancer activity of platinum-CTZe complexes. *Transition Met. Chem.* 34:869.

Paton, F., M. Paulden, P. Saramago, A. Manca, K. Misso, S. Palmer and A. Eastwood. 2010. Topotecan for the treatment of recurrent and stage IVB carcinoma of the cervix. *Health Technol. Assess.* 1(14 Suppl):55.

Patterson, M. 1979. Measurement of growth and viability of cells in culture. *Methods Enzymol.* LVII: 141.

Penso, J. and R. Beitner. 2002. CTZe decreases glycolysis and the viability of lung carcinoma and colon adenocarcinoma cells. *Eur. J. Pharmacol.* 451: 227.

Pitrak, D., H. Tsai, K. Mullane, S. Sutton and P. Stevens. 1996. Accelerated neutrophil apoptosis in the acquired immunodeficiency syndrome (Artículo en línea). *J. Clin. Invest.* 98(12): 2714.

Pizarro, A. and P. Sadler. 2009. Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes. *Biochimie.* 91(10): 1198.

Rabik, C. and M. Dolan. 2007. Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents. *Cancer Treat. Rev.* 33(1):9.

Ramos, F., O. Vrána, A. Quiroga, C. Navarro, A. Halámiková, H. Rybnícková, L. Hejmalová and V. Brabec. 2006. Structural characterization, DNA interactions, and cytotoxicity of new transplatin analogues containing one aliphatic and one planar heterocyclic amine ligand. *J. Med. Chem.* 49(8):2640.

Ray, M. and H. Kindler. 2009. Malignant pleural mesothelioma: an update on biomarkers and treatment. *Chest.* 136(3):888.

Reece, P., I. Stafford, M. Davy and S. Freeman. 1987. Disposition of unchanged cisplatin in patients with ovarian cancer. *Clin Pharmacol Ther.* 42(3):320.

Riccardi, C. and I. Nicoletti. 2006. Analysis of apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *Nat. Protoc.* 1(3): 1458.

Riss, T.L. and R.A. Moravec. 1992. Comparison of MTT, XTT, and a novel tetrazolium compound for MTS for in vitro proliferation and chemosensitivity assays. *Mol. Biol. Cell. (Suppl.)* 3, 184a.

Rosemberg, B., L. Van Camp and T. Krigas. 1965. Inhibition of cell division in *Escherichia coli* by electrolysis products from platinum electrode. *Nature.* 205:698.

Rosenberg, B., and L. Van Camp. 1970. The Successful Regression of Large Solid Sarcoma 180 Tumors by Platinum Compounds. *Cancer Res.* 30:1799.

Schweyer, S., A. Soruri, O Meschter, A. Heintze, F. Zschunke, N. Miosge, P. Thelen, T. Schlott, H. Radzun and A. Fayyazi. 2004. Cisplatin- induced apoptosis in human malignant testicular germ cell lines depends on MEK/ERK activation. *Br. J. Cancer.* 91: 589.

Seo, M., H. Iida, and Y. Miura. 1977. Basic experiments with clotrimazole administered orally. *Curr Med Res Opin.* 5(2):169.

Seiter, K., S. Katragadda, D. Ponce, M. Rasul and N. Ahmed. 2009. Temozolomide and cisplatin in relapsed/refractory acute leukemia. *J. Hematol. Oncol.* 22(2):21.

Shen H., R. Perez, B. Davaadelger, C. Maki. 2013. Two 4N cell-cycle arrests contribute to cisplatin-resistance. *PLoS One.*8(4):e59848.

Shulga N., R. Wilson-Smith, J. Pastorino. 2009. Hexokinase II detachment from the mitochondria potentiates cisplatin induced cytotoxicity through a caspase-2 dependent mechanism. *Cell Cycle.* 8(20):3355-64

Simons A., I. Ahmad, D. Mattson, K. Dornfeld, D. Spitz. 2007. 2-Deoxy-D-glucose combined with cisplatin enhances cytotoxicity via metabolic oxidative stress in human head and neck cancer cells. *Cancer Res.* 67(7):3364.

Skorta, I., M. Oren, C. Markwardt, M. Gutekunst, W. Aulitzky and H. Van der Kuip. 2009. Imatinib mesylate induces cisplatin hypersensitivity in Bcr-Abl+ cells by differential modulation of p53 transcriptional and proapoptotic activity. *Cancer Res.* 69(24):9337.

Stordal, B. and M. Davey. 2007. Understanding Cisplatin resistance using cellular models. *IUBMB Life* 59(11): 696.

Suchánková T., M. Vojtísková, J. Reedijk, V. Brabec, J. Kaspárková. 2009. DNA and glutathione interactions in cell-free media of asymmetric platinum(II) complexes cis- and trans-[PtCl<sub>2</sub>(isopropylamine)(1-methylimidazole)]: relations to their different antitumor effects. *J Biol Inorg Chem.* 14(1):75.

Su, W., S. Chang, T. Chen, J. Chen and C. Tsao. 2000. Comparison of in vitro growth-inhibitory activity of carboplatin and cisplatin on leukemic cells and hematopoietic progenitors: the myelosuppressive activity of carboplatin may be greater than its antileukemic effect. *Jpn. J. Clin. Oncol.* 30(12):562.

Sweeney, J., P. Nguyen, G. Omman and D. Hinshaw. 1997. Ultraviolet irradiation accelerate apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes: protection by LPS and GM-CSF. *J. Leukoc. Biol.* 62(4):517.

Tao, Z., B. Toms, J. Goodisman and T. Asefa. 2010. Mesoporous silica microparticles enhance the cytotoxicity of anticancer platinum drugs. *ACS Nano.* 4(2):789.

Todd, R. and S. Lippard. 2009. Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds. *Metallomics.* 1(4): 280.

Troyano, A., P. Sancho, C. Fernández, E. De Blas, P. Bernardi and P. Aller. 2001. Effect of Glutathione depletion on antitumor drug toxicity (Apoptosis and Necrosis) in U937 human promonocytic cells. *J. Biol. Chem.* 276(50):47107.

Troyano, A., P. Sancho, C. Fernández, E. De Blas, P. Bernardi and P. Aller. 2003. The selection between apoptosis and necrosis is differentially regulated in hydrogen peroxide-treated and glutathione-depleted human promonocytic cells. *Cell Death Differ.* 10: 889.

Turan V., V. Mishin and P. Thomas. 2001. CTZe is a selective and potent inhibitor of rat cytochrome P450 3A subfamily-related testosterone metabolism. *Drug Metab. Dispos.* 29(6):837.

Van Cruchten, S. and W. Van Den Broeck. 2002. Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat. Histol. Embryol.* 31(4): 214.

Vander Heiden M., L. Cantley, C. Thompson. 2009. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science.* 324(5930):1029.

Van Rijt, S. and P. Sadler. 2009. Current applications and future potential for bioinorganic chemistry in the development of anticancer drugs. *Drug Discov. Today.* 14(23-24):1089.

Vries E., J. Gietema and S. Jong. 2006. Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand pathway and its therapeutic implications. *Clin. Cancer Res.* 12(8):2390.

Wang, D. and S. Lippard. 2005. Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4(4):307.