



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS



**“INTERACCIÓN ANTIPROLIFERATIVA Y APOPTÓTICA
ENTRE AZATIOPRINA Y N-ACETILCISTEÍNA EN CÉLULAS
JURKAT DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA T”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS

PRESENTA

EDGARDO BECERRA BECERRA

DIRIGIDA POR

Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

QUERÉTARO

CENTRO UNIVERSITARIO

SEPTIEMBRE DE 2016

MÉXICO



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Química

Maestría en Ciencias Químico Biológicas

**"INTERACCIÓN ANTIPROLIFERATIVA Y APOPTÓTICA ENTRE AZATIOPRINA Y
N-ACETILCISTEÍNA EN CÉLULAS JURKAT DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA
AGUDA T"**

TESIS

Que como parte de los requisitos para obtener el grado de
Maestro en Ciencias Químico Biológicas

Presenta:

Edgardo Becerra Becerra

Dirigido por:

Dra. María Guadalupe García Alcocer

SINODALES

Dra. María Guadalupe García Alcocer
Presidente

Dra. Laura Cristina Berumen Segura
Secretario

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca
Vocal

Dr. Mamadou Moustapha Bah
Suplente

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera
Suplente

M. en S.P Sergio Pacheco Hernández

Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña

Director Facultad de Química

Directora Investigación y Posgrado

Centro Universitario
Querétaro, Qro
Septiembre, 2016

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	
SUMMARY	
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Leucemias	4
2.1.1 Leucemia linfoblástica aguda	5
2.1.2 Fisiopatología básica de la leucemia linfoblástica aguda	6
2.1.3 Epidemiología	7
2.1.4 Datos clínicos	8
2.1.5 Diagnóstico	10
2.1.6 Tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda	11
2.1.6.1 Quimioterapia	13
2.1.6.2 Azatioprina	15
2.2 Radicales libres en cáncer	21
2.3 N-acetilcisteína	23
3. JUSTIFICACIÓN	27
4. HIPÓTESIS	29
4.1 Pregunta de investigación	29
4.2 Hipótesis	29
5. OBJETIVOS	30
5.1 General	30

5.2 Específicos	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS	31
7. RESULTADOS	36
8. DISCUSIÓN	45
9. CONCLUSIÓN	49
10. BIBLIOGRAFÍA	50

ÍNDICE DE CUADROS

TABLA		Página
1	Clasificación de las leucemias.	5
2	Fármacos usados en la terapia de Leucemia linfoblástica aguda.	12
3	Diseño experimental para evaluar el efecto de Azatioprina + NAC sobre el ciclo celular, apoptosis, actividad de caspasas y ROS	32

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Porcentaje de supervivencia a cinco años de pacientes con LLA en países desarrollados	8
2	Porcentaje de supervivencia a cinco años de pacientes con LLA en países en vías de desarrollo	9
3	Frotis sanguíneo teñido mediante el método de Wright, de un paciente con leucemia linfoblástica aguda	11
4	Reacción del glutatión con azatioprina	16
5	Sitios de acción de la Aza en un linfocito T interactuando con una célula presentadora de antígeno	17
6	Vía metabólica de azatioprina	18
7	Oxidación de bases tiopúricas por ROS Vía metabólica de azatioprina.	21
8	Efecto antiproliferativo de NAC	36
9	Efecto antiproliferativo de Aza	37
10	Efecto de la IC ₂₅ de NAC + IC ₂₅ de Aza sobre la proliferación celular	38
11	Efecto apoptótico de Aza y NAC, de manera individual y en conjunto	39
12	Porcentaje de la actividad de multicaspasas (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), inducida por los diferentes tratamientos	39
13	Porcentaje de inducción de apoptosis temprana, tardía y necrosis inducida por Aza y NAC	40
14	Gráficos de apoptosis en citometría de flujo	41
15	Análisis del efecto de los diferentes tratamientos sobre las fases G ₀ /G ₁ y G ₂ /M del ciclo celular	42
16	Histogramas de distribución de las fases del ciclo celular	43

RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda T (LLA-T) es un tipo de cáncer derivado del linaje linfoide, y presenta un mal pronóstico al ser quimiorresistente. El tratamiento de elección es la quimioterapia y los fármacos que presentan mayor eficacia son las tiopurinas. La Azatioprina (Aza) es la tiopurina más tóxica, debido a que se utiliza mayor dosis ya que necesita ser biotransformada por grupos sulfhidrilo (SH) presentes en el glutatión o la cisteína cuya biodisponibilidad, en células cancerosas, está disminuida al contener niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) elevadas. Por otro lado, las ROS provocan la oxidación de las tiopurinas y de sus metabolitos activos, disminuyendo así, su efecto quimioterapéutico. La N-acetilcisteína (NAC) es un antioxidante aprobado por la FDA, que podría incrementar la biotransformación de Aza al aportar grupos SH, favorecer la resíntesis de glutatión y disminuir ROS. En este trabajo se utilizó a la par, Aza y NAC en células Jurkat de LLA-T, para favorecer un incremento del efecto antiproliferativo y apoptótico sin incrementar los niveles de ROS. De manera individual, tanto Aza 1.0 y 2.0 μ M como NAC 3.0mM indujeron apoptosis y arresto en el ciclo celular. Al utilizar Aza 1.0 μ M+ NAC 3.0mM de manera conjunta se obtuvo un efecto antiproliferativo significativamente mayor ($p < 0.05$), en relación al obtenido con Aza 2.0 μ M, mientras que el efecto apoptótico fue estadísticamente igual ($p > 0.05$). La combinación de Aza 1.0 μ M + NAC 3.0mM incrementaron el arresto del ciclo celular en la fase G2/M; evento favorable para que las células entren en proceso de apoptosis. Aza 1.0 y 2.0 μ M indujo un incremento significativamente mayor ($p < 0.05$) con respecto al control, mientras que NAC 3.0mM y NAC 3.0mM + Aza 1.0 μ M mantuvieron niveles de ROS estadísticamente iguales a los del control; evento favorable en pro de disminuir el estrés oxidativo. En conclusión, Aza y NAC ejercieron una interacción antiproliferativa y apoptótica aditiva, sin incrementar los niveles de ROS.

Palabras clave: **NAC, Aza, ROS, Glutatión, LLA-T**

SUMMARY

T cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a type of cancer derived from lymphoid lineage, and has a poor prognosis due to its chemoresistance. The treatment of choice is chemotherapy and the drugs that have greater efficacy are thiopurines. Azathioprine (Aza) is the most toxic thiopurine, because higher doses are used in order to be biotransformed by sulfhydryl groups (SH) present in glutathione or cysteine, whose bioavailability in cancer cells, decreases by the elevated levels of reactive oxygen species (ROS). Furthermore, ROS induce the thiopurines oxidation and its active metabolites, and then decreases their chemotherapeutic effect. N-acetylcysteine (NAC) is an antioxidant approved by the FDA, which could increase the biotransformation of Aza for providing SH groups, encourage the resynthesis of glutathione and decrease ROS. In this work it was used Aza and NAC in Jurkat T-ALL cells in order to increase the antiproliferative and apoptotic effect without increasing ROS levels. Individually, both Aza 1.0 and 2.0 μ M as NAC 3.0mM induced apoptosis and cell cycle arrest. Together, using Aza 1.0 μ M + NAC 3.0mM significantly induced an anti-proliferative effect ($p < 0.05$) compared to those obtained with Aza 2.0 μ M, while the apoptotic effect was statistically equal ($p > 0.05$). The combination of NAC 3.0mM + 1.0 μ M Aza increased cell cycle arrest at the G2/M phase; favorable to enter cells undergoing apoptosis event. Aza 1.0 and 2.0 μ M induced a significantly greater increase ($p < 0.05$) compared to control, while NAC 3.0mM and NAC 3.0mM + Aza 1.0 μ M remained ROS levels statistically equal to the control; favorable event to reducing oxidative stress. In conclusion, NAC Aza and exerted an additive anti-proliferative and apoptotic interaction without increasing ROS levels.

Key words: **NAC, Aza, ROS, ALL-T**

1. INTRODUCCIÓN

Las leucemias son un tipo de cáncer derivado de las células blancas sanguíneas conocidas como leucocitos, el cual impide el funcionamiento normal de éstas células y el control sobre su proliferación. Las leucemias pueden clasificarse en crónicas o agudas dependiendo de la rapidez con la que la enfermedad avanza y empeora. La leucemia crónica avanza lentamente y, al principio de esta enfermedad, las células leucémicas pueden todavía realizar algunas de las funciones de los leucocitos normales. Es posible que al principio las personas no tengan ningún síntoma. Los médicos suelen descubrir la leucemia crónica durante los exámenes de rutina; antes de la aparición de cualquier síntoma. La leucemia aguda avanza rápidamente y, las células leucémicas no pueden realizar ninguna de las funciones de los leucocitos normales. Por esta razón, la leucemia aguda es la más grave y presenta un mal pronóstico de supervivencia. Las leucemias se clasifican, también, de acuerdo al linaje de la célula hematopoyética involucrada, mieloide o linfoide, las cuales también se conocen como leucemia mieloblástica y leucemia linfoblástica respectivamente de acuerdo al linaje.

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) se presenta principalmente en niños, y puede dividirse en LLA-T y LLA-B, siendo esta última la más común con un 80 % de prevalencia, mientras que la LLA-T tiene una prevalencia del 20 %. La LLA-B es menos agresiva y generalmente presenta un buen pronóstico, mientras que la LLA-T tiene un pobre pronóstico de supervivencia. Cuando la LLA es diagnosticada en su inicio, la probabilidad de remisión total es de hasta un 90 %, sin embargo, cuando el diagnóstico se realiza en una etapa avanzada, prácticamente no hay posibilidades de cura.

El tratamiento quimioterapéutico que se utiliza generalmente es multiagente (varios medicamentos), para atacar a distintos mecanismos mediante los cuales la célula leucémica sobrevive, crece y prolifera. Un solo medicamento quimioterapéutico es capaz de generar graves efectos adversos mediante diferentes mecanismos. Uno de los mecanismos tóxicos de los agentes quimioterapéuticos es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), cuyos niveles aumentan en células leucémicas. El aumento de ROS puede matar las células leucémicas, pero también células normales provocando patologías degenerativas en el paciente.

Las células leucémicas pueden desarrollar tolerancia a los medicamentos, por lo que la efectividad del tratamiento disminuye y es necesario aumentar la dosis. El aumento en la dosis del medicamento puede repercutir en mayores efectos adversos al paciente, por lo que es importante utilizar diferentes fármacos que potencien el efecto sobre un mecanismo anticancerígeno para así disminuir la toxicidad.

La azatioprina es un pro-fármaco que se utiliza en enfermedades autoinmunes y en la prevención del rechazo de trasplantes. Es un inmunomodulador que favorece el arresto del ciclo celular. Para ejercer su efecto inmunomodulador es necesaria su biotransformación no enzimática a mercaptopurina y mediante reacciones enzimáticas, la mercaptopurina es biotransformada a nucleótidos de desoxitiguanosina (metabolitos activos). La biotransformación no enzimática de azatioprina se lleva a cabo al reaccionar con grupos sulfhidrilo (SH), así que su biodisponibilidad dependerá de la cantidad de SH en el medio. Debido que las células leucémicas tienen mayores niveles de ROS, hay una disminución de glutatión y la biotransformación de Aza disminuye considerablemente.

La N-acetilcisteína es un fármaco aprobado por la FDA con capacidad antioxidante debido a su grupo SH, por lo que su disponibilidad en el medio favorecerá la transformación de azatioprina a mercaptopurina, y también

eliminará especies reactivas de oxígeno, que son responsables de oxidar e inactivar los metabolitos de azatioprina y de activar vías de señalización mitogénicas y antiapoptóticas. Utilizar estos dos fármacos al mismo tiempo, podría potenciar el efecto en el arresto del ciclo celular y apoptosis, así como disminuir ROS.

2. ANTECEDENTES

2.1 Leucemias

La leucemia es una enfermedad neoplásica progresiva del sistema hematopoyético, caracterizada por la proliferación no controlada de células progenitoras no asignadas o parcialmente asignadas a desarrollarse como leucocitos. Las leucemias incluyen un grupo heterogéneo de neoplasias que difieren respecto a su agresividad, célula de origen, características clínicas y respuestas al tratamiento. La leucemia se clasifica en dos grandes grupos con base en la agresividad de la enfermedad: 1) aguda, la cual si no se trata provoca rápidamente la muerte en unos meses, 2) crónica, una variante menos agresiva, que si no se trata causa la muerte en meses o años. Estos dos grandes grupos se pueden clasificar en mieloides o linfoides, de acuerdo al origen de la clona de la célula progenitora leucémica. Generalmente coexisten ambos linajes, mieloides y linfoides, pero en diferente proporción, y la clasificación se hará de acuerdo al linaje que predomine (McKenzie, 2009).

Los sistemas de clasificación permiten vincular la agresividad de la enfermedad y el origen de la célula, lo cual permite clasificar las leucemias en cuatro tipos: leucemia mieloblástica aguda (LMA), leucemia mielocítica crónica (LMC), leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia linfocítica crónica (LLC) (INC, 2014) (cuadro 1) a LMA afecta a células mieloides y es de crecimiento rápido. Hay más de 13 000 casos nuevos de leucemia cada año afecta tanto a adultos como a niños. La LMC se presenta en células mieloides y por lo general es de crecimiento lento al principio. Hay aproximadamente 5 000 casos nuevos cada año y predomina en adultos. La LLC se presenta en células linfoides y es por lo general de crecimiento lento. Hay más de 15 000 casos nuevos de esta leucemia cada año. A menudo, las personas que son diagnosticadas con esta

enfermedad son mayores de 55 años, y casi nunca afecta a niños. La LLA se desarrolla a partir de células linfoides y es de crecimiento rápido. Hay más de 5 000 casos nuevos de esta leucemia cada año. La LLA es el tipo de leucemia más común entre niños pequeños, representando un tercio de los cánceres que se diagnostican en niños. Aunque también afecta a adultos con una prevalencia del 20% (ACS, 2010).

Cuadro 1. Clasificación de las leucemias (INC, 2011)

	Mieloide	Linfoide	Otras
Leucemia aguda	mieloblastica promieloblastica monocitica mielomonocitica eritrocitaria magacarioblastica	Linfocítica T Linfocítica B De células nulas (indiferenciada)	Indiferenciada de línea Célula mixta de células asesinas mieloide/natural
Leucemia crónica	Mielocitica mielomonocitica	Linfocítica plasmocítica (mieloma múltiple) Células peludas Prolinfocítica Linfocitos de células grandes granulares	

2.1.1 Leucemia linfoblástica aguda

La LLA afecta en su mayoría a niños pequeños, con máxima incidencia entre los 2 y 5 años de edad. Se caracteriza por una elevada tasa de proliferación de células progenitoras linfoides. La célula linfoide predominante en la médula ósea y en la sangre periférica es el linfoblasto. Los linfoblastos son precursores de los linfocitos (Hunger y col., 2012). Los linfoblastos leucémicos reemplazan al tejido hematopoyético normal en la médula ósea e infiltran los ganglios linfáticos, el bazo, el hígado, y otros órganos. La LLA se caracteriza por ser un trastorno heterogéneo, con una variedad de subtipos morfológicos e inmunitarios. Sin tratamiento la supervivencia es corta, pero con regímenes terapéuticos desarrollados

recientemente, la mayoría de los niños pasan a un período de remisión prolongada (McKenzie, 2009).

2.1.2 Fisiopatología básica de la leucemia linfoblástica aguda

La anormalidad básica en LLA parece ser la mutación de una sola célula progenitora linfoide, la cual da origen a una clona de linfocitos malignos. Estas células linfoides tienen la capacidad de proliferar de manera no regulada y están detenidas en su secuencia de maduración. Se desconoce el factor desencadenante de la mutación genética leucémica original, pero puede ser una combinación de factores leucemogénicos, los cuales favorecen el desarrollo de células leucémicas y da origen a este tipo de leucemia (Zuckerman y Rowe, 2014). La LLA representa un grupo de precursores B y T linfoides malignos que bloquean la diferenciación linfoide y conducen a la célula a un estado aberrante de proliferación y supervivencia. Los factores genéticos implicados en LLA son principalmente hiperdiploidía (>50 cromosomas), hipodiploidía (<44 cromosomas), translocaciones cromosómicas y rearrreglos de genes. La mayoría de los genes relacionados con LLA codifican proteínas relacionadas con el desarrollo linfoide, lo que favorece el arresto en el desarrollo celular linfoide, y un evento secundario en la regulación del ciclo celular, supresión de tumores y remodelación de la cromatina, lo que dará lugar al establecimiento de la clona leucémica (Ma y col., 2014).

Las técnicas de Biología Molecular actuales han permitido identificar aquellos genes que están implicados en el desarrollo normal linfoide y que se relacionan con la LLA. Los genes son: reguladores transcripcionales del desarrollo linfoide (PAX5, IKZF1, EBF1, LEF1), supresores de tumores (CDKN2A, CDKN2B, RB1, TP53), genes de señalización linfoide (BTLA, CD200 TOX), reguladores de la cromatina y reguladores epigenéticos (CTCF, CREBBP) (Mulligan, 2012). La secuenciación de

amplio espectro de los subtipos de LLA, muestran alteraciones en varias vías celulares que influyen en el pronóstico de vida, incluyendo receptores de citocinas, señalización del oncogen Ras, factor similar al receptor de citoquina 2, cromosoma Filadelfia (BCR-ABL), proteína similar a BCR-ABL, sobreexpresión y mutación de la cinasa Janus (Asselin y col., 2013).

2.1.3 Epidemiología

El registro epidemiológico de neoplasias hemato-oncológicas indica que del 2007 al 2012 se registró un promedio de 10,200 casos por año, siendo la LLA el 9.6 % del total. La LLA tiene una incidencia de 4 a 5 por cada 100,000 habitantes de 2 a 4 años de edad. Dicha incidencia disminuye durante la infancia tardía, la adolescencia, edad adulta y alcanza una incidencia de 1/100_000 habitantes en los adultos de 50 años o más. Sin embargo, en México esta incidencia es en niños y adultos en conjunto (INC, 2014). La LLA es más común en hombres; en México se reporta una tasa de mortalidad del 6.1, y después de los 35 años de edad, se duplica tanto en hombres como en mujeres, y alcanza su nivel máximo en grupos de 65 años (GPC, 2009). La LLA representa el 80 % de las leucemias en niños y el 20 % en adultos y un tercio del total de los cánceres diagnosticados en niños de 0 a 14 años es LLA. En Estados Unidos la incidencia es de 8 por cada 100,000 habitantes (ACS, 2014).

La LLA de células B se presenta en el 80 % de los casos de LLA y tiene, por lo general, un buen pronóstico. Sin embargo, la LLA de células T (LLA-T) se presenta de un 15 a 20 % de los casos de LLA y tiene un pobre pronóstico, ya que presenta resistencia a la quimioterapia sola y combinada (INC, 2014).

En las figuras 1 y 2 se indican los porcentajes de supervivencia de LLA a cinco años en pacientes de países desarrollados y en vías de desarrollo. A la fecha, en países desarrollados, se han alcanzado porcentajes de supervivencia de más del 90 %, con lo cual se propone que las estrategias de tratamiento han sido eficaces, a diferencia de las adoptadas en los países en vías de desarrollo (HIM, 2012). México, al igual que el resto de los países de desarrollo mostrados en la figura 2, no alcanza porcentajes de supervivencia del 80 %. Esto es un indicativo de la urgencia de nuevas estrategias terapéuticas.

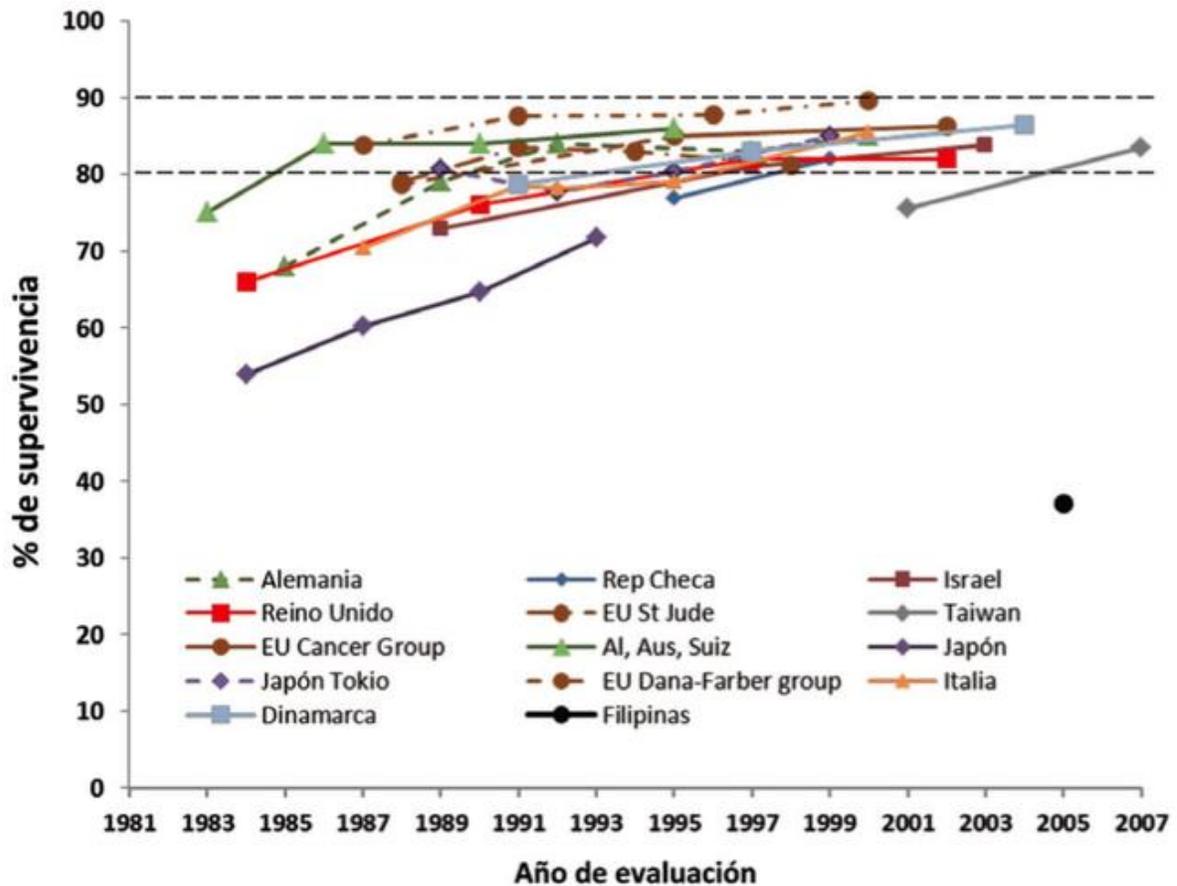


Figura 1. Porcentaje de supervivencia a cinco años de pacientes con LLA en países desarrollados (Rendón-Macías y col., 2012).

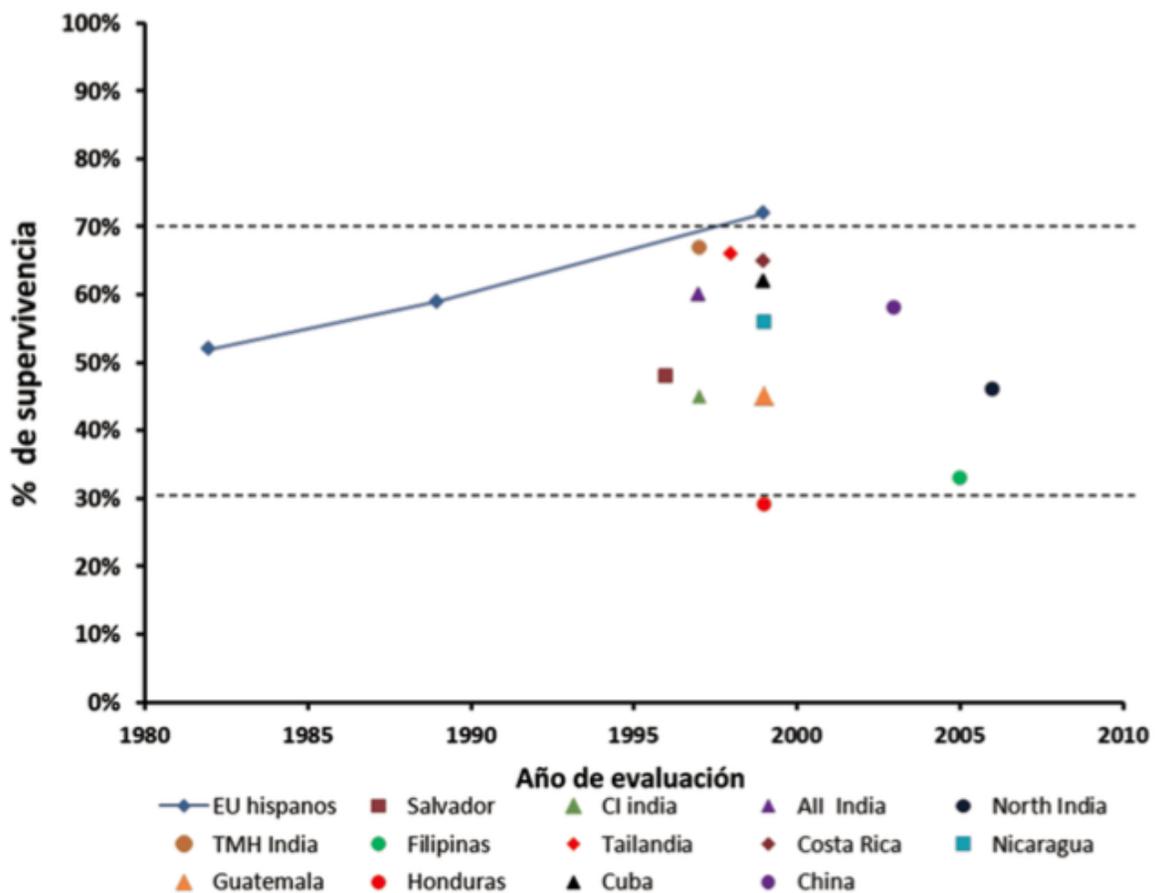


Figura 2. Porcentaje de supervivencia a cinco años de pacientes con LLA en países en vías de desarrollo (Rendón-Macías y col., 2012).

2.1.4 Datos clínicos

El inicio de la enfermedad suele ser abrupto y continúa de manera progresiva. Los síntomas están vinculados con anemia, trombocitopenia y neutropenia. Las quejas comunes incluyen fatiga, palidez, fiebre, pérdida de peso, irritabilidad y anorexia. La fiebre se vincula frecuentemente con una infección concomitante. Hay petequias y equimosis en más de la mitad de los pacientes, la hemorragia es menos común. Existe dolor óseo en cerca del 80% de los pacientes que manifiestan hipersensibilidad, especialmente sobre los huesos largos. Los niños rehúsan, con

frecuencia, caminar o estar de pie, además tienen síntomas relacionados con afección del sistema nervioso central, los cuales incluyen cefalea y vómito. La esplenomegalia, hepatomegalia y linfadenopatía son hallazgos comunes en LLA (Mulligan, 2012).

2.1.5 Diagnóstico

El diagnóstico comprende los exámenes físicos, pruebas de laboratorio y moleculares. El examen físico puede revelar hematomas, hepatomegalia, esplenomegalia e inflamación de los ganglios linfáticos y signos de sangrado como petequias. Los exámenes de sangre abarcan el conteo de los leucocitos y linfocitos específicamente, conteo de plaquetas, biopsia y aspirado medular. También se realiza punción lumbar para buscar células leucémicas en el líquido cefalorraquídeo (Williams, 2009).

El análisis molecular se realiza para buscar cambios cromosómicos en el ADN en los linfocitos. Ciertos cambios en el ADN pueden determinar la evolución del paciente (pronóstico) y el tratamiento más adecuado (Mulligan, 2012).

En la figura 3 se observan linfoblastos sanguíneos de un paciente masculino de 9 años, el cual fue diagnosticado con LLA-T (ACS, 2013). Se realizó la tinción de Wright para observar los linfoblastos de sangre periférica. Se observa que abundan y predominan los linfoblastos, así como bajos niveles de glóbulos rojos.

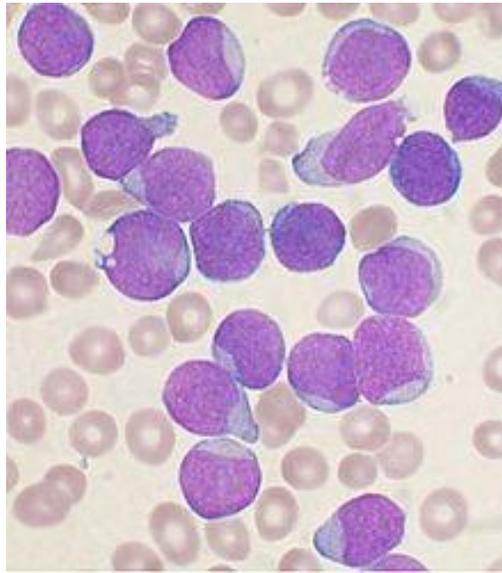


Figura 3. Frotis sanguíneo teñido mediante el método de Wright, de un paciente con leucemia linfoblástica aguda (ACS, 2013)

2.1.6 Tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda

La LLA, en adultos, es tratada principalmente con quimioterapia a largo plazo y con regímenes más intensivos cada vez. Esto ha favorecido el aumento en la tasa de supervivencia, pero también la probabilidad de causar efectos secundarios. En la LLA infantil, el tratamiento es de acuerdo al estatus de riesgo. El Instituto Nacional del Cáncer (INC) clasifica a los pacientes en dos grupos:

*Riesgo estándar: recuento de glóbulos blancos menor de 50,000/ μ L y entre 1 y menos de 10 años de edad.

*Riesgo alto: recuento de glóbulos rojos de 50,000/ μ L o más, y más de 10 años de edad.

El tratamiento de la LLA infantil incluye radioterapia craneal, debido al riesgo de leucemia en el SNC (INC, 2014). Actualmente se utilizan diversas estrategias de tratamiento como lo es el trasplante de médula ósea y factores de crecimiento, con la finalidad de suplantar tejido hematopoyético leucémico por sano y modificar la

cinética de proliferación respectivamente (cuadro 2).

Cuadro_2. Fármacos usados en la terapia de Leucemia linfoblástica aguda (McKenzie, 2009)

Fármaco	Clase	Acción
Arabinósido de citosina	Antimetabolito pirimidina	Inhibe síntesis del ADN
Daimpribocina	Antibiótico antraciclina	Inhibe síntesis del ADN y del ARN
Doxorrubicina	Antibiótico antraciclina	Inhibe síntesis del ADN y del ARN
5-Azacitidina	Antimetabolito pirimidina	Inhibe síntesis del ADN y del ARN
6-Tioguanina	Antimetabolito purina	Inhibe síntesis de purinas
Metilgloxal Bis	Desconocida	Desconocida
AMSA	Desconocida	Se fija al ADN
Prednisona	Glucocorticoide	Lisa linfoblastos
Vincristina	Alcaloide	Inhibe síntesis de ADN y formación de husos mitóticos
Asparaginasa	Enzima	Degrada la asparagina endógena
Daunorrubicina	Antibiótico antraciclina	Inhibe síntesis del ADN y del ARN
Metotrexato	Antimetabolito del ácido fólico	Inhibe síntesis de pirimidinas
6-Mercaptopurina	Antimetabolito de la purina	Inhibe síntesis de pirimidinas
Ciclofosfamida	Agente alquilante	Se entrecruza con hebras del ADN

2.1.6.1 Quimioterapia

La quimioterapia es el tratamiento de elección para el tratamiento de LLA. El objetivo de este tipo de terapéutica consiste en erradicar todas las células malignas dentro de la médula ósea, para permitir la repoblación con precursores hematopoyéticos normales. El problema con este tipo de tratamiento es que los

fármacos usados no son específicos para las células leucémicas. Los agentes quimioterapéuticos también actúan sobre células normales. La mayor parte de los fármacos usados para tratar la LLA se clasifican en tres grupos: antimetabolitos, agentes alquilantes y antibióticos (McKenzie, 2009).

Los antimetabolitos, los más utilizados en la LLA, son antagonistas de las purinas o de las pirimidinas los cuales inhiben la síntesis del ADN. Estos fármacos matan a las células en el ciclo celular y afectan a cualquier célula en rápida división. Los antimetabolitos también matan a las células que recubren el intestino, el epitelio germinal de los folículos pilosos y las células hematopoyéticas normales, esto causa complicaciones de perturbación gastrointestinal, pérdida de pelo y citopenias que pueden poner en riesgo la vida del paciente (Rosenberg y Krontiris., 2000).

La terapéutica de LLA se divide en tres fases. La fase de inducción está diseñada para lograr la remisión clínica de la enfermedad (erradicación de la población de los blastos leucémicos) y tiene una duración de 28 días. Esta fase se continúa por la etapa profiláctica del sistema nervioso central (SNC). La segunda fase es la de consolidación que tiene como objetivo reducir aún más las células leucémicas debajo de los niveles detectables, tiene una duración de 30 días. Incluye la intensificación de la terapia dirigida al SNC. La leucemia del SNC es la variedad más común de recidiva en niños pequeños, quienes no han sido sujetos de tratamiento específico del encéfalo y la médula espinal tempranamente en la remisión (Hunger y col., 2012). Las dos modalidades de tratamiento en la fase profiláctica del SNC, son la irradiación craneal y la quimioterapéutica intratecal. La tercera fase es la quimioterapéutica de mantenimiento, llamada también citorreductora o consolidación de la remisión, y está diseñada para evitar esta recidiva y prolongar la remisión, erradicando las células leucémicas restantes. Esta fase puede durar hasta 3 años. La tasa de recidivas después de la suspensión de todo tipo de tratamiento es cercana a 25 % (ACS, 2012).

La fase de mantenimiento es muy importante ya que evita las recaídas, porque la mayoría de los pacientes que cesan la quimioterapia tienen recaídas. Sin embargo, el tratamiento es tóxico para el paciente, es por eso que la duración de la fase de mantenimiento está en continuo debate. Se ha observado que si se continúa por seis meses adicionales de quimioterapia, después de la remisión completa el número de recaídas disminuye significativamente. Por otro lado, además de un aumento en la tasa de supervivencia se han identificado aumentos en las tasas de muerte no leucémicas, es decir, muertes asociadas a la toxicidad del tratamiento (Hunger y col., 2012). Esto da pauta a priorizar la identificación de pacientes que no requieren un tratamiento tan intenso ó en el mejor de los casos, implementar tratamientos menos tóxicos pero efectivos.

Las tiopurinas son los fármacos más utilizados en todas las fases de la quimioterapia, en especial en la etapa de mantenimiento. Se ha reportado que los pacientes que cesan el tratamiento con tiopurinas tienden a tener recaídas e incluso sucumbir a la enfermedad (ACS, 2012). Es por eso que se consideran los fármacos más importantes junto con el metotrexato en la LLA.

2.2 Tiopurinas

La familia de las tiopurinas incluye a 6-mercaptopurina (6-MP), 6-tioguanina (6-TG) y azatioprina (Aza), las cuales son antimetabolitos que se usan también para el tratamiento de desordenes en la piel (psoriasis), artritis reumatoide, prevención de rechazo de trasplante y desordenes inmunológicos gastrointestinales. Al ser antimetabolitos, ejercen su efecto al mimetizar la estructura de los metabolitos endógenos, para así generar una disrupción de los procesos bioquímicos celulares normales (Elion y col., 1989). La 6-MP es un análogo de la hipoxantina, mientras que la azatioprina es el profármaco de 6-MP, es decir, requiere de una previa biotransformación. Por otro lado, la 6-TG es un análogo de la guanina. La única diferencia entre estos metabolitos y los metabolitos endógenos, es el átomo de azufre en lugar del oxígeno. La 6-TG y 6-MP son las tiopurinas más utilizadas en el

tratamiento de la LLA, a diferencia de la Aza, de la cual se requiere una mayor dosis debido que requiere más pasos de biotransformación; además de considerarse la tiopurina que causa mayores efectos secundarios (Oncolox, 2014)

2.1.6.2 Azatioprina

La Aza, al igual que las demás tiopurinas, interfiere con la síntesis de ADN y por tanto tiene su mayor efecto en tejidos en división, inhibiendo la proliferación linfocitaria. La Aza es una pro-droga que es convertida *in vivo* a 6-MP por medio de un ataque no enzimático llevado a cabo por compuestos que contienen grupos sulfhidrilos (SH) como el glutatión o la cisteína que están presentes en cada célula (Figura 4) . La 6-MP puede ser convertida a ácido 6-tioúrico por la xantina oxidasa, a 6-metil-MP por la tiopurina S-metiltransferasa (TPMT) o a 6-TG por la hipoxantina fosforribosil transferasa (HPRT) (Tiede y col., 2003). La 6-TG, posteriormente es transformada por reacciones enzimáticas a nucleótidos de tioguanina o nucleótidos de desoxitioguanosina (dTG), los cuales son los metabolitos activos que median las propiedades inmunosupresoras. Los nucleótidos de desoxitioguanosina son sustratos para la incorporación a los ácidos nucleicos, desde los primeros estadios del metabolismo de las purinas, enlenteciendo todo el proceso de síntesis de ADN y deteniendo la proliferación celular (Karran, 2007). Por otro lado, se han encontrado discrepancias en cuanto al mecanismo de acción en todas las tiopurinas en general, en especial en cuanto a qué fase del ciclo celular logran ejercer arresto, ya que se ha observado que actúan tanto en la fase G1/S como en la fase G2/M. Xiao y colaboradores, en 2014, determinaron que el metabolito dTG inhibe preferentemente a las ciclinas A y E y a la cinasa dependiente de ciclina CDK4, las cuales promueven el progreso de la fase G1 a S sin embargo, también pueden inhibir a CDK1 y la ciclina D, las cuales promueven el progreso de la fase G2 a M. Además, estudiaron el proteoma de células Jurkat de leucemia linfoblástica aguda T, y determinaron que las tiopurinas eran capaces de inhibir principalmente proteínas G y pequeñas proteínas G que los linfocitos utilizan para vías de supervivencia y proliferación (Xiao y col., 2014).

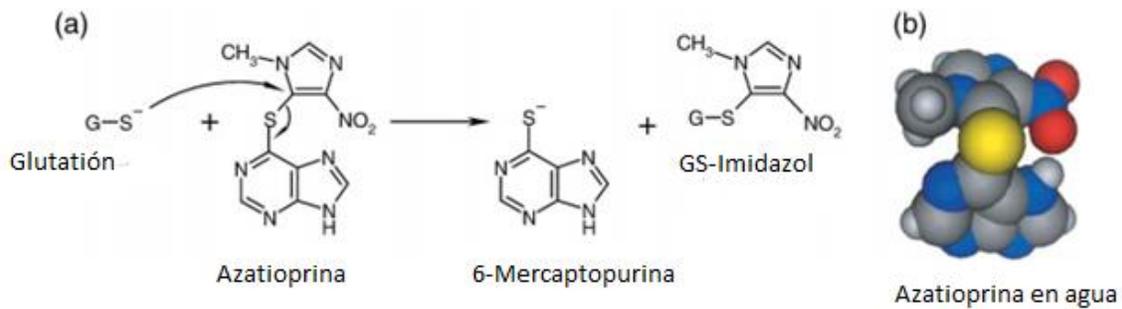


Figura 4. Reacción del glutatión con azatioprina. En (a) se observa la reacción del átomo de azufre del glutatión con el carbono 5 del grupo imidazol de azatioprina, para liberar a 6-Mercaptopurina y un derivado imidazólico. En (b) se observa la estructura de azatioprina en solución acuosa (kurtovic y col., 2008).

La Aza también tiene la capacidad de ejercer un efecto apoptótico al activar el mecanismo de reparación de errores de mal emparejamiento de bases (MMR). El sistema de reparación MMR normalmente sólo detiene la replicación para reparar el error, pero el constante error de emparejamiento causado por Aza induce apoptosis mediado por MMR (Karran y col., 2003). Poppe y colaboradores, en 2006, evaluaron el efecto apoptótico de Aza en linfocitos T, y determinaron que el metabolito tioguanosina trifosfato, ejercía apoptosis al inhibir la proteína G Rac-1, que media señales de supervivencia desencadenadas por acción del CD28. Otro mecanismo mediante el cual Aza ejerce apoptosis es por daño mitocondrial, al incrementar los niveles de especies reactivas de oxígeno (ROS) y disminuir la expresión de enzimas mitocondriales implicadas en el transporte de electrones, lo que conduce a la pérdida de la viabilidad mitocondrial y celular (Zhang y col., 2013).

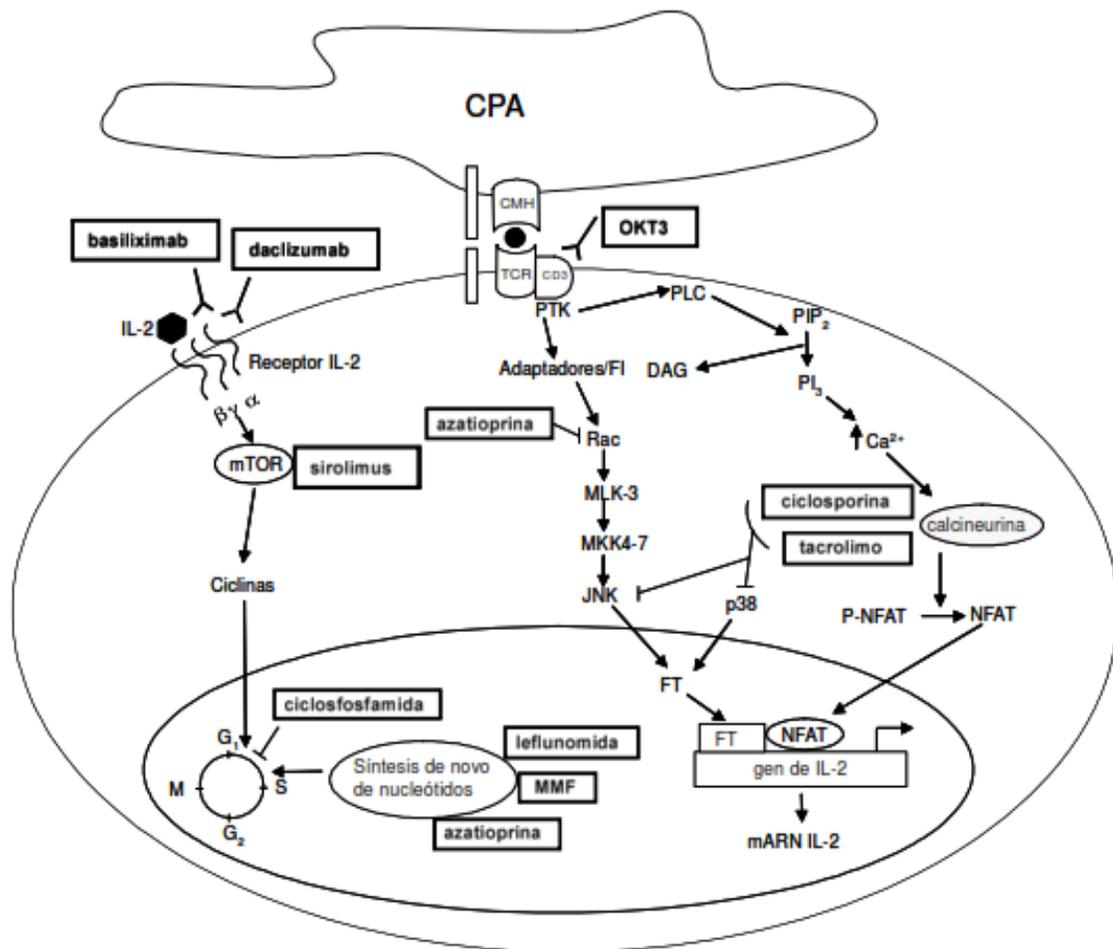


Figura 5. Sitios de acción de la Aza en un linfocito T interactuando con una célula presentadora de antígeno (CPA) (Tiede y col., 2003).

En la figura 5 se muestra el mecanismo de acción general de Aza y otros fármacos en el linfocito T. La Aza ejerce arresto en el ciclo celular en la fase G₀/G₁, al inhibir la síntesis *de novo* de purinas, así como la inhibición de la proteína Rac-1, lo cual interfiere con la vía de señalización antiapoptótica.

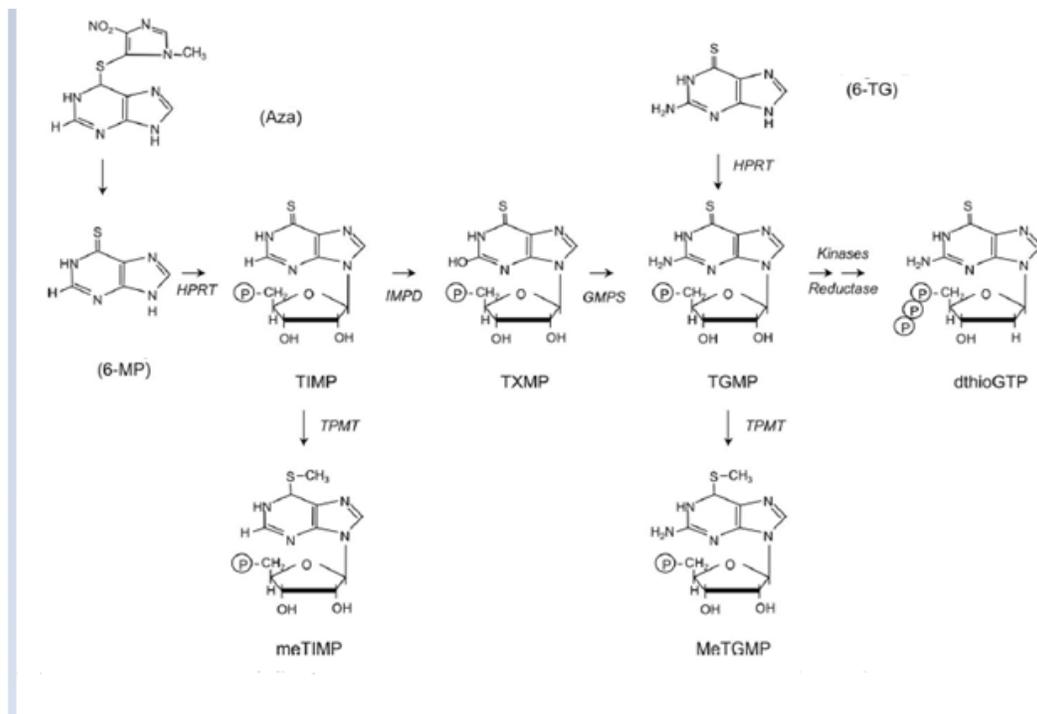


Figura 6. Vía metabólica de azatioprina. TPMT: tiopurina metiltransferasa; HGPRT: hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa; Aza: azatioprina; TIMP: tioinositol monofosfato; GMPS: guanósina monofosfato; TGMP: tioguanina monofosfato; dthioGTP: desoxitioguanosina trifosfato; MeTGMP: metiltioguanina monofosfato; MeTIMP: metiltioinosina monofosfato; 6-MP: 6-mercaptopurina; 6-TG: 6-tioguanina. (Tiede y col., 2003).

La Aza tiene gran actividad antineoplásica, sin embargo, provoca efectos tóxicos en el organismo, los cuales se relacionan con su mecanismo de acción y con la mayor dosis, en comparación con las otras tiopurinas. Esto se debe a que la Aza requiere de más reacciones enzimáticas para la formación de metabolitos activos, tal como se muestra en la figura 6. Aza puede provocar variaciones en el volumen corpuscular medio de los eritrocitos, así como inmunosupresión. Estos parámetros han sido utilizados para la monitorización del tratamiento con Aza. La inmunosupresión provoca leucopenias, principalmente en pacientes con la enfermedad de Crohn. Lennard y colaboradores reportaron que los niveles de dTG pueden determinarse en el interior de los eritrocitos mediante técnicas de

cromatografía de alta resolución y se ha demostrado que la concentración intraeritrocitaria refleja su existencia en los tejidos. De este modo, se ha evidenciado que las concentraciones intracelulares de dTG están relacionadas con la toxicidad y con el efecto terapéutico de la Aza y que los efectos mielosupresores y linfo-supresores, parecen depender de la cuantía de este metabolito. Por tanto, su determinación se ha propuesto como un marcador útil para la monitorización del tratamiento con Aza (Lennard y col., 1997). La monitorización del tratamiento con Aza está en base a su biotransformación, ya que se puede inferir la biodisponibilidad de sus metabolitos en base a la actividad de las enzimas encargadas del metabolismo de Aza (Lennard y Lilleyman., 2009).

La enzima TPMT es responsable de la conversión de la Aza en sus metabolitos inactivos, la 6-metilmercaptapurina, la cual es responsable de la hepatotoxicidad (Escousse y col., 1998). Por lo tanto, la actividad de la enzima TPMT parece ser un factor importante en la regulación de las concentraciones de los metabolitos activos y tóxicos de Aza. Así, en los pacientes con baja actividad de la TPMT se observan elevadas concentraciones de dTG, mientras que en aquellos con alta actividad enzimática las concentraciones de dTG son bajas. Mediante la determinación de la actividad enzimática de la TPMT no sólo podría estimarse el riesgo de sufrir efectos adversos, sino también la probabilidad de que la dosis administrada de Aza esté produciendo la inmunodepresión adecuada y el consiguiente efecto terapéutico. Los pacientes con una actividad reducida de TPMT tienen un mayor riesgo de experimentar toxicidad debido a la acumulación excesiva de 6-MP. En estos pacientes debe tenerse en cuenta la necesidad de utilizar una dosis menor a la estándar descrita (Lowry y col., 2001). La dosis de AZA y 6-MP se ajustan habitualmente en función del peso del paciente, con lo que se pretende alcanzar la mayor eficacia terapéutica y al mismo tiempo reducir la incidencia de efectos adversos, aunque esto no siempre se consigue. Stocco y colaboradores, en 2014, determinaron que el efecto terapéutico y la dosis de Aza están determinados por la concentración y actividad de la enzima TPMT, por consiguiente la dosis de Aza debe ser individualizada (Coulthard y col., 2001).

Los efectos adversos más comunes del tratamiento con Aza incluyen la mielotoxicidad (2-4% de los pacientes tratados) es dosis-dependiente y reversible, y se expresa habitualmente como leucopenia, aunque también es posible su aparición en forma de anemia o trombocitopenia. A nivel gastrointestinal, son frecuentes las náuseas y vómitos. Es menos recurrente la reacción de hipersensibilidad idiosincrásica, que puede cursar con fiebre, exantema, artralgias, malestar general, incrementos de fosfatasa alcalina, bilirrubina y transaminasas. La pancreatitis y colestasis, deterioro de la función hepática también son poco frecuentes (Drugs.com, 2014). La hepatotoxicidad es un tema de controversia en el tratamiento con Aza. Al y colaboradores, en 2014, evaluaron la hepatotoxicidad de Aza en hepatocitos de rata en un modelo *in vitro*. Determinaron que Aza induce citotoxicidad dosis dependiente, con una dosis letal media de 400 μM .

Los mecanismos subyacentes a la citotoxicidad se deben a la sobreproducción de ROS y a la depleción de glutatión, por lo cual disminuye la oxidación de metabolitos activos y disminuye la biotransformación de Aza. En el estudio realizado por Al y colaboradores determinaron también, que la N-acetilcisteína reduce la citotoxicidad mediada por Aza al disminuir la concentración de especies reactivas de oxígeno y favorecer la formación de glutatión (Al y col., 2014). Las ROS tienen la capacidad de oxidar a las tiopurinas y a sus metabolitos, tal como se muestra en la figura 7 (Karran, 2007). Las bases tiopúricas de Aza en su forma oxidada, después de reaccionar con ROS, cambian su espectro de absorción. Las bases normales de adenina y guanina tienen un espectro máximo de absorción de 260 nm, en la región UV. Mientras que las bases tiopúricas tienen un espectro máximo de absorción de 340 nm. Una disminución en el espectro de absorción de las bases tiopúricas es indicativo de oxidación de las mismas (O'Donovan y col., 2005). Las tiopurinas, como la Aza, al reaccionar con especies reactivas de oxígeno (ROS), son convertidas a radicales libres y derivados oxidados. Éstos son más reactivos y mutagénicos, pudiendo desencadenar otro tipo de cáncer y disminuyendo su efecto antineoplásico (Warren y col., 1995). Las células cancerosas generan mayores

niveles de ROS, por lo que al administrar tiopurinas, éstas serán oxidadas, aumentando su efecto mutagénico y disminuyendo el efecto antineoplásico. Por lo anterior, es importante mantener niveles bajos de ROS, manteniendo el estado redox para aumentar la biodisponibilidad de metabolitos tiopúricos activos y disminuir la citotoxicidad de las tiopurinas (Karran, 2007).

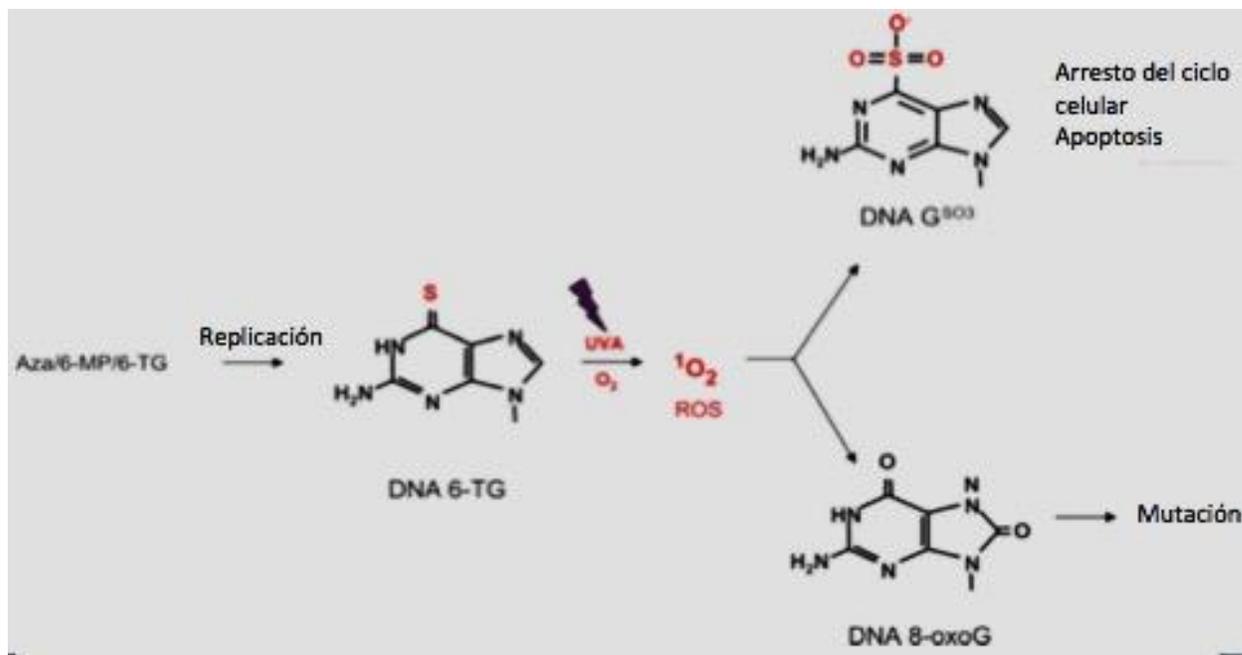


Figura 7. Oxidación de bases tiopúricas por ROS. Las especies reactivas de oxígeno generadas por metabolismo celular o por inducción de agentes externos atacan a las bases tiopúricas, generando metabolitos oxidados que pueden ejercer arresto del ciclo celular, apoptosis y mutaciones (Karran, 2007)

2.2 Radicales libres en cáncer

Los radicales libres pueden producirse como resultado de la oxidación celular. Las principales especies oxidantes incluyen a las ROS como el radical superóxido, hidroxilo y peróxido de hidrógeno. Un número limitado y controlado de estos radicales libres resulta benéfico para el organismo, porque la acción que ejercen dentro del sistema inmunológico, dado que son capaces de eliminar

microorganismos patógenos (Storz, 2007). Cuando el número de radicales libres aumenta causan inestabilidad induciendo resultados negativos como el inicio del cáncer. Esto se debe por que los radicales libres alteran el ADN, afectando así la integridad genómica. Cuando las células pierden su integridad genómica no son capaces de regular su proliferación, además de que los radicales libres activan vías de señalización implicadas en la supervivencia y proliferación celular (Stor). Las vías de señalización sensibles a radicales libres y a ROS se elevan de manera persistente en muchos tipos de cáncer. Estas vías de señalización participan en proliferación y crecimiento, diferenciación, síntesis proteica, metabolismo de glucosa, supervivencia celular e inflamación (Storz, 2005). El mecanismo mediante el cual los radicales libres y ROS pueden activar estas vías de señalización es mediante la oxidación reversible de proteínas como tirosin fosfatasa, tirosin cinasa, receptores tirosin cinasa y factores de transcripción (Chiarugui y Fiaschi, 2007). Se ha reportado que oxidación de regiones protéicas específicas, principalmente en residuos de cisteína, da lugar a la activación de vías de señalización tales como MAPK/Erk1/2, PI3K/Akt y NF- κ B. La activación de dichas vías da lugar la progresión del ciclo celular, proliferación, supervivencia celular-apoptosis, metabolismo energético, angiogénesis, entre otros procesos celulares (Liou y Storz, 2010).

El estudio realizado por Schumacker, en 2006, reportó que las células cancerígenas pueden producir más radicales libres que las células normales, lo que da lugar a un mayor número de mutaciones y resistencia a fármacos (Schumacker, 2006). Cuando hay un incremento de radicales libres se genera un ambiente de hipoxia, la cual es una característica prominente de tumores avanzados. Los radicales libres, también determinan la activación de varios factores de transcripción, entre ellos el NF- κ B, que es un factor transcripcional redox que da lugar a la activación de genes proinflamatorios y antiapoptóticos. Además del metabolismo celular, los fármacos quimioterapéuticos por sí mismos son capaces de producir radicales libres como un mecanismo adicional para eliminar las células cancerígenas. Por lo tanto, en estados de cáncer en tratamiento quimioterapéutico

se observan niveles incrementados de radicales libres, esto favorece la muerte celular por daño oxidativo, pero también puede favorecer la propagación de mutaciones y la progresión del cáncer (Bertout y col., 2008).

El incremento en los niveles de radicales libres provoca la disminución de antioxidantes, favoreciendo así efectos adversos como la aparición de enfermedades degenerativas como alteraciones del aparato circulatorio, del sistema nervioso, entre otras. Es importante mantener un equilibrio entre los niveles de antioxidantes y radicales libres, de tal manera que los antioxidantes no interfieran con el tratamiento quimioterapéutico y que los radicales libres no favorezcan la progresión del cáncer y de otras enfermedades.

2.3 N-acetilcisteína

La N-acetilcisteína (NAC) es un precursor de la L-cisteína, así como un dador de grupos sulfhidrilo. Este fármaco favorece la formación de glutatión, al aportar la cisteína necesaria para su síntesis y la reducción de las especies reactivas de oxígeno. El efecto mucolítico de NAC se ha comprobado desde hace décadas, se utiliza en el tratamiento de las afecciones bronquiales agudas y crónicas. Asimismo, ha sido evaluada para el tratamiento de la enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), las enfermedades del intersticio pulmonar, la intoxicación por paracetamol y la enfermedad cardíaca isquémica, renal, hepática, entre otras (Tse y Tseng, 2014).

La NAC ejerce un efecto antioxidante al promover la síntesis de glutatión y por sí mismo mediante la reacción de intercambio tiol-disulfuro y donación de electrones para reducir proteínas y radicales libres respectivamente (Kim y col., 2001). El efecto antioxidante de NAC se ha demostrado *in vivo*, como en el estudio realizado por Mata y colaboradores, en 2003, donde se demostró que la NAC administrada vía oral puede reducir la producción de especies reactivas de oxígeno y la pérdida de glutatión pulmonar inducida por cigarrillo (Mata y col., 2011).

Debido al efecto antioxidante y al grupo SH de NAC, ésta podría favorecer la biotransformación de Aza y el incremento de sus metabolitos activos al disminuir especies oxidantes en la célula. Esto supondría el uso de un antioxidante y un fármaco quimioterapéutico al mismo tiempo. Aunque el uso de antioxidantes en la quimioterapia es común, se realiza únicamente como desintoxicante de estrés oxidativo y no como un potenciador de la quimioterapia (ACS, 2012). Se estima que aproximadamente 13 a 87% de los pacientes bajo quimioterapia son prescritos con antioxidantes. Este amplio rango se debe a que no se ha llegado a un consenso final sobre el efecto de un antioxidante en el cáncer. Algunos autores afirman que los antioxidantes pueden favorecer la supervivencia y proliferación celular al disminuir ROS, los cuales aumentan por efecto de la quimioterapia y por el metabolismo celular; de esta manera la célula cancerosa no moriría por daño oxidativo. Sin embargo, otros autores reportan que los antioxidantes pueden modificar el estado redox y por lo tanto la actividad de proteínas que participan en vías de señalización y supervivencia, lo cual favorecería el efecto antineoplásico (Ferraro, 2006).

La NAC se utiliza en pacientes con cáncer para desintoxicar el organismo de ROS, de esta manera se logra un efecto protector, pero se podría sacrificar el efecto antineoplásico y perder el control que se hubiera logrado sobre el cáncer (Neuwelt y col., 2004). En 2004, Neuwelt y colaboradores determinaron que NAC ejerce un efecto quimioprotector sin disminuir el efecto antitumoral de cisplatino en un modelo *in vivo* en ratas. Así mismo, Chen y colaboradores, en 2011 determinaron el mismo efecto de NAC al utilizar isofosfamida (Chen y col., 2011). Sin embargo, NAC también puede bloquear el efecto apoptótico por daño oxidativo de fármacos que favorecen el incremento de ROS (Wu, 2006), de tal manera que no se puede llegar a un consenso del efecto definitivo de un antioxidante como NAC y un fármaco antineoplásico.

Las tiopurinas, en especial Aza, provocan hepatotoxicidad como uno de los principales efectos adversos, por lo que atenuar dicha hepatotoxicidad con antioxidantes es un enfoque que se busca en la quimioterapia. Akbulut y colaboradores, evaluaron el efecto hepatoprotector de NAC frente a metotrexato, el cual es conocido por su hepatotoxicidad. Se inyectaron vía peritoneal dosis de metotrexato, metotrexato y NAC a ratas Spargue Dawley y se observó que la NAC redujo la producción de radicales libres y aumentó la actividad de enzimas antioxidantes, lo que se tradujo en una reducción de la hepatotoxicidad causada por metotrexato (Akbulut y col., 2014).

El efecto antioxidante de la NAC se ha evaluado también en humanos expuestos a plomo, el cual induce la producción de radicales libres. Kasperczyk y colaboradores evaluaron la capacidad antioxidante de NAC al administrarla vía oral una dosis de 400-800 mg, a trabajadores expuestos a plomo. Se midieron previamente niveles de albúmina y bilirrubina para evaluar que no causara hepatotoxicidad. Como marcador de daño oxidativo se midieron niveles de hidroperóxidos lipídicos. Después de la administración de NAC se observó una disminución de los niveles de hidroperóxidos lipídicos y no hubo cambio significativo en los niveles de bilirrubina y albúmina. Con esto se concluyó que la NAC ejerce un efecto antioxidante y es inocua (Kasperczyk y col., 2014).

Wu y colaboradores evaluaron el efecto de NAC sobre el estrés oxidativo, apoptosis y la actividad de NF- κ β en conejos con falla cardiaca. Los conejos fueron inyectados vía intravenosa con NAC y otro grupo no recibió tratamiento. Aquellos conejos que recibieron el tratamiento con NAC mostraron una disminución de agentes oxidantes, aumento de los niveles de glutatión, así como una disminución de las actividades de NF- κ β y caspasa 9. Esto indica que la NAC ejerce un doble efecto antioxidante mediante la interacción directa con especies oxidantes y por favorecer la formación de glutatión. El efecto antiapoptótico se debió a la protección mitocondrial al disminuir los niveles de especies oxidantes (Wu y col., 2008).

La curcumina, metabolito de la cúrcuma, induce un aumento de especies reactivas de oxígeno e induce autofagia en células cancerosas. Lee y colaboradores trataron células humanas HCT116 de cáncer de colón con curcumina y con NAC para evaluar el efecto antiautofágico de NAC. Las células tratadas sólo con curcumina presentaron niveles elevados de especies reactivas de oxígeno, lo que indujo autofagia, mientras que las células tratadas con curcumina y posteriormente con NAC mostraron una disminución significativa de los niveles de especies reactivas de oxígeno y de actividad autofágica. Se observó también, que la NAC inhibió la activación de la vía ERK y MAPK, relacionadas con supervivencia y proliferación, lo cual se relaciona con la disminución de especies reactivas de oxígeno (Lee y col., 2011).

Wu y colaboradores reportaron que el gen promotor de tumor, TPA, induce la activación de las vías de PKC, ERK y disminución de la expresión de integrinas y cadherinas, siendo estos factores responsables del crecimiento y migración celular. La activación de estas vías está relacionada con un aumento en los niveles de especies reactivas de oxígeno. Las líneas celulares HepG2 y Huh7 que presentan las características mencionadas fueron tratadas con NAC y se observó disminución del crecimiento y migración celular, lo cual se relacionó con la disminución de especies reactivas de oxígeno. La NAC es un eficaz antioxidante, inocua, que puede utilizarse durante la quimioterapia para regular los niveles elevados de radicales libres y prevenir el progreso del cáncer, así como la aparición de otras patologías. O'Donovan y colaboradores, en 2005, demostraron que NAC es capaz de disminuir ROS y, a su vez, los metabolitos oxidados y mutagénicos de las tiopurinas, generados por su reacción con ROS (O'Donovan y col., 2005). Sin embargo, la dosis de NAC debe regularse de tal manera que no interfiera con el tratamiento quimioterapéutico.

JUSTIFICACIÓN

El cáncer es una enfermedad con una incidencia creciente, y debido a que en ocasiones el diagnóstico se realiza en una etapa avanzada, la enfermedad llega a ser mortal. La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es un tipo de cáncer derivado de células hematopoyéticas, específicamente de los linfocitos. La LLA es uno de los cánceres más comunes en niños, ya que representa un tercio del total que se diagnostican en edades de 0 a 14 años. La LLA puede ser de linfocitos B (LLA-B) o de linfocitos T (LLA-T), siendo ésta última la más agresiva, debido a que presenta mayor resistencia a fármacos.

En países desarrollados, la tasa de supervivencia desde los 80's a la fecha ha aumentado considerablemente, se incrementó de 50 % a 90 %. Sin embargo, en países en desarrollo, como México, la tasa de supervivencia es de apenas un 70 %, cuando el diagnóstico se realiza a tiempo. Una vez que se ha llevado a cabo el diagnóstico de LLA-T se procede con el tratamiento quimioterapéutico con fármacos antineoplásicos, que siempre es una terapia multi-agente (más de un fármaco), con el fin de combatir de mejor manera las células cancerosas. Un solo fármaco es capaz de ejercer efectos adversos severos, ya que atacan también a células normales. Los niños, por lo general, tienen una menor tolerancia al tratamiento, dada su toxicidad, y presentan otros síntomas que pueden comprometer su estado de salud.

En países desarrollados utilizan antioxidantes con el fin de proteger al organismo del estrés oxidativo adquirido durante el tratamiento farmacológico. Por otro lado, algunos investigadores proponen utilizar antioxidantes en etapas tempranas de la quimioterapia, con el objetivo de disminuir la toxicidad y coadyuvar al tratamiento. Sin embargo, otros investigadores sugieren que el uso de antioxidantes podría proteger a las células cancerígenas y favorecer su proliferación. Esta estrategia de tratamiento, antioxidante-quimioterapéutico, tiene que estudiarse en un enfoque individual, es decir, un antioxidante con un quimioterapéutico, en un tipo de cáncer

en específico. Así se podrá determinar puntualmente el efecto de esa combinación. Es por eso que en este trabajo se utilizó a la par, azatioprina y N-acetilcisteína en células Jurkat de leucemia linfoblástica aguda T, para favorecer una interacción antiproliferativa y apoptótica, y al mismo tiempo proveer de una defensa antioxidante (N-acetilcisteína) para no exacerbar el estrés oxidativo.

4 HIPÓTESIS

4.1 Pregunta de investigación

¿El uso del antioxidante NAC puede favorecer la eficacia antiproliferativa y apoptótica de Azatioprina en un modelo *in vitro* sobre células Jurkat de leucemia linfoblástica aguda T, y además prevenir el incremento de los niveles de ROS?

4.2 Hipótesis

La terapia combinada de Aza y NAC ejerce un efecto aditivo antiproliferativo y apoptótico en células Jurkat de leucemia linfoblástica aguda T, favoreciendo también la disminución de ROS.

5. OBJETIVOS

5.1 General

- Evaluar el efecto antiproliferativo y apoptótico de Aza + NAC, así como la eficacia de NAC en la prevención del incremento de ROS inducido por Aza, en células Jurkat de leucemia linfoblástica aguda T.

5.2 Específicos

- Determinar las concentraciones inhibitorias 25 y 50 de Aza y NAC en células Jurkat de leucemia linfoblástica aguda T.
- Evaluar, mediante citometría de flujo, el efecto de Aza + NAC en el arresto del ciclo celular, apoptosis y actividad de caspasas en células Jurkat-LLA-T.
- Evaluar, mediante citometría de flujo, la eficacia de NAC en la prevención del incremento de ROS mediado por Aza.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1 Material biológico

6.1.1 Línea celular

La línea celular Jurkat, de linfoblastos T, se obtuvo de la compañía ATCC. Las células son obtenidas de un paciente de 14 años con leucemia linfoblástica aguda y son preservadas en nitrógeno líquido. Los linfoblastos T Jurkat expresan el receptor de células T (TCR), CD3 y tienen un número modal de 46 cromosomas.

6.2 Fármacos y estándares

Se utilizaron los fármacos NAC y Aza, los cuales fueron adquiridos en *Sigma Aldrich*.

6.3 Métodos

6.3.1 Diseño experimental

Cuadro_3. Diseño experimental para evaluar el efecto de Azatioprina + NAC sobre el ciclo celular, apoptosis, actividad de caspasas y ROS.

Grupo	IC ₂₅ Aza	IC ₅₀ Aza	IC ₂₅ NAC
Control	---	---	---
1	+	---	---
2	---	+	---
3	---	---	+
4	+	---	+

Para evaluar el efecto de NAC y Aza sobre el ciclo celular, apoptosis, actividad de caspasas y ROS, las células fueron incubadas por 24 h con los fármacos; a excepción del ensayo de ROS en el cual las células fueron incubadas por 6 h.

6.3.2 Cultivo celular

Las células se sembraron en medio de cultivo RPMI 1640, con 10 % de suero fetal bovino. Las condiciones fueron 95 % aire, 5 % CO₂ y 37 °C. Los cultivos se mantuvieron por la adición de medio de cultivo fresco o reemplazo del mismo. Los lavados celulares se realizaron cada 2 ó 3 días, manteniendo una concentración de 1 x 10⁵ o 1x 10⁶ células viables/mL.

6.3.3 Determinación de la concentración inhibitoria 25 y 50 (IC₂₅,IC₅₀) de Aza y NAC

Para determinar la IC₂₅ se utilizaron cajas de cultivo de 12 pozos. Cada pozo contenía inicialmente 250,000 células llevadas a volumen final de 1 mL con medio RPMI-1640. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C en 95 % de aire y 5 % CO₂. Después de 24 horas se trataron con 50 µL de Aza a concentraciones de 0.008 a 100 µM o 50 µL de NAC a concentraciones de 0.039 a 40 mM y se incubaron por 24 h . Finalmente se contó el total de células mediante una cámara de Neubauer para determinar la concentración de fármaco que inhibe el 25 y 50 % de la proliferación celular.

- Fórmula para conteo celular # células= [(# células) (dilución)/# campos] (10000)/(volumen de solución madre)

6.6.4 Evaluación del efecto de Aza y NAC sobre el ciclo celular

Al finalizar el tratamiento farmacológico, la suspensión celular se centrifugó a 1_500 rpm durante 5 minutos a temperatura ambiente, para remover el medio con fármacos. El botón celular se resuspendió en 250 μ L de buffer de tripsina (solución A) y se incubó por 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 200 μ L de Solución B (inhibidor de tripsina y buffer RNasa) y se mezcló sin vortex, se dejó incubar 10 minutos a temperatura ambiente sin remover la solución A. A la suspensión celular resultante se agregaron 200 μ L de solución C (yoduro de propidio) y se mezcló e incubó por 10 minutos a 4 °C en oscuridad. Después del tiempo de incubación las muestras fueron analizadas en el citómetro BD FACSVersé.

6.6.5 Evaluación del efecto apoptótico de Aza y NAC

Las células Jurkat, después del tratamiento farmacológico, se lavaron en PBS 1X frío. Posteriormente, las células se recentrifugaron a 2200 rpm por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en el buffer de unión a anexina 1X hasta tener una concentración de 1×10^6 células/mL, y se utilizaron 100 μ L de la suspensión celular. Se adicionaron 5 μ L de annexin V y 5 μ L de yoduro de propidio 100 μ g/mL a 100 μ L de la suspensión celular y se incubaron a temperatura ambiente por 15 minutos. Después del tiempo de incubación se adicionaron 400 μ L de buffer de unión a anexina 1X y las muestras se analizaron por citometría de flujo antes de 1 h. El análisis por citometría de flujo se realizó a 530 nm.

6.6.6 Evaluación de la actividad de caspasas mediado por Aza y NAC

Las células en suspensión (3×10^5) fueron tratadas como se indica en el cuadro 3. Posteriormente, se tomaron 50 μ L de la suspensión celular de cada muestra, se transfirieron a un tubo cónico y se agregaron 5 μ L del reactivo *Muse MultiCaspase*;

se mezclaron por pipeteo suave. Las muestras se incubaron por 30 minutos a 37° C. Después de la incubación se agregaron 150 μ L del reactivo *Muse Caspase 7-ADD*, se mezclaron por pipeteo suave y se incubaron por 5 minutos protegiendo las muestras de la luz. Al finalizar el tiempo de incubación, las muestras fueron analizadas inmediatamente en el citómetro de flujo *Muse Cell Analyzer*. Los resultados fueron presentados como el porcentaje de actividad multicaspasas.

6.6.7 Medición de ROS

Las células fueron incubadas con 3 μ M NAC y 1 o 2 μ M de Aza por 24 h, como se indica en el cuadro 3. Al término del tiempo de incubación las células fueron lavadas una vez con PBS 1X y resuspendidas en DCDFDA 20 μ M (diluido con buffer 1X) a una concentración de 1×10^6 células/mL e incubadas 30 minutos a 37° C en oscuridad. Posteriormente, las células se lavaron con buffer 1X y se resuspendieron con el mismo buffer a una concentración de 1×10^6 células/mL y se analizaron en el citómetro BD FACSVerse a una longitud de onda de: excitación 484nm y emisión 535nm.

6.6.8 Estadística

Los datos fueron presentados como la media +/- desviación estándar. Para evaluar diferencia significativa entre al menos uno de los grupos se utilizó ANOVA de una vía y para evaluar diferencias significativas entre grupos y respecto al control se utilizaron las pruebas *post hoc* de *Tukey* y *Dunnet*, respectivamente (De Veaux y col., 2009).

7 Resultados

Las figuras 8 y 9 representan el efecto de NAC y Aza, respectivamente, sobre la proliferación de células Jurkat. Los resultados indicaron diferencia significativa, $p < 0.05$, comparados con el control desde la concentración 0.156 mM de NAC hasta la concentración 40 mM. Con base en la curva dosis-respuesta, las concentraciones inhibitorias 25 y 50 (IC_{25} , IC_{50}) son 3 mM y 6 mM, respectivamente. La Aza ejerce inhibición de la proliferación significativamente diferente al control, a partir de la concentración 0.08 μM y continúa de manera progresiva al aumentar la dosis. De acuerdo a la curva dosis-respuesta, las IC_{25} e IC_{50} fueron 1.0 μM y 2.0 μM .

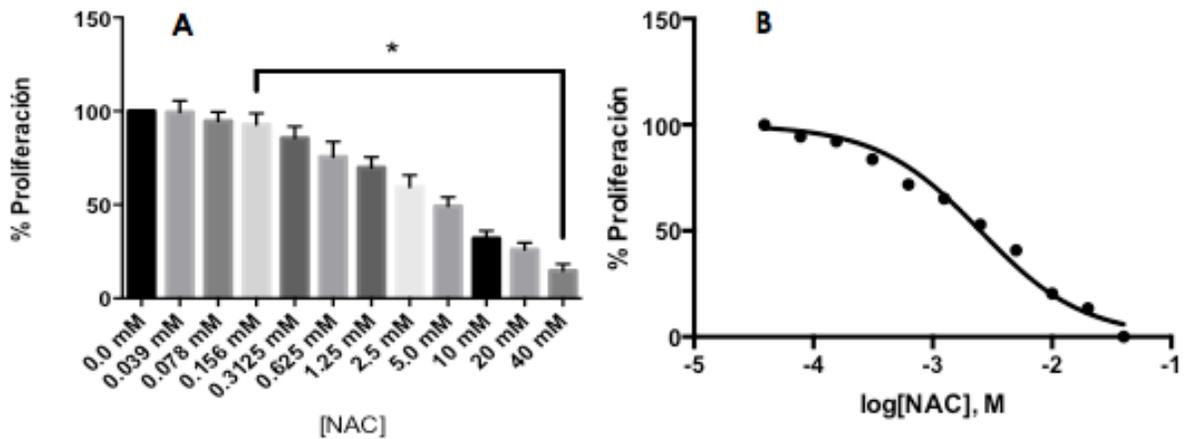


Figura 8. Efecto antiproliferativo de NAC. A. Gráfico de barras donde se muestra la disminución de la proliferación celular respecto a la dosis de NAC. B. Curva dosis-respuesta de NAC. * Diferencia significativa respecto al control, ANOVA y *post hoc* de *Dunnet*, $p < 0.05$.

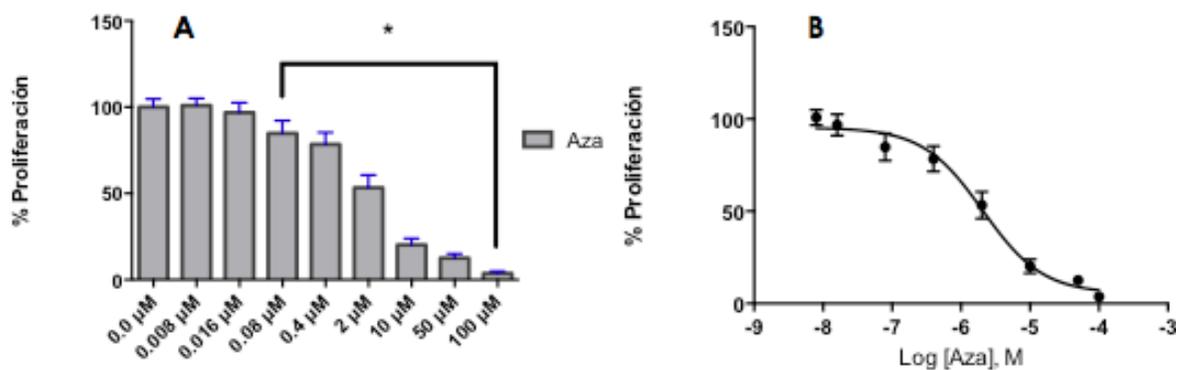


Figura 9. Efecto antiproliferativo de Aza. A. Disminución de la proliferación celular respecto a la dosis de Aza. B. Curva dosis respuesta de Aza. * Diferencia significativa respecto al control, ANOVA y *post hoc* de *Dunnet*, $p < 0.05$.

En la figura 10 se observa el efecto de los diferentes tratamientos sobre la proliferación celular. Todos los tratamientos ejercieron un efecto antiproliferativo significativamente mayor con respecto al control, y entre todos los grupos existe diferencia significativa. El uso a la par de 3 mM de NAC + 1.0 µM de Aza ejerce un efecto antiproliferativo significativamente mayor al que ejerce 2.0 µM de Aza, de acuerdo al análisis estadístico de ANOVA y *post hoc* de Tukey, $p < 0.05$, siendo un punto a favor en pro de disminuir la dosis de Aza, usando como coadyuvante dosis terapéutica tolerable del antioxidante NAC, lo cual podría favorecer la disminución de los efectos adversos.

Las figuras 11 a 13 muestran el efecto apoptótico de los diferentes tratamientos. Los resultados de apoptosis basados en yoduro de propidio y Anexina-V (figura 11) indican, de manera parcial, que la célula sigue mecanismos de muerte celular programada, lo cual fue confirmado mediante la medición de la actividad de multicaspasas (figura 12), en la que se representa el porcentaje total de dicha actividad proteolítica. En cada gráfica se indican las diferencias significativas entre cada grupo. El control difiere significativamente de todos los tratamientos, teniendo porcentajes de apoptosis por debajo del 4%, lo cual determina la validez de tales

ensayos, ya que se debe trabajar con células con aproximadamente el 95% de viabilidad.

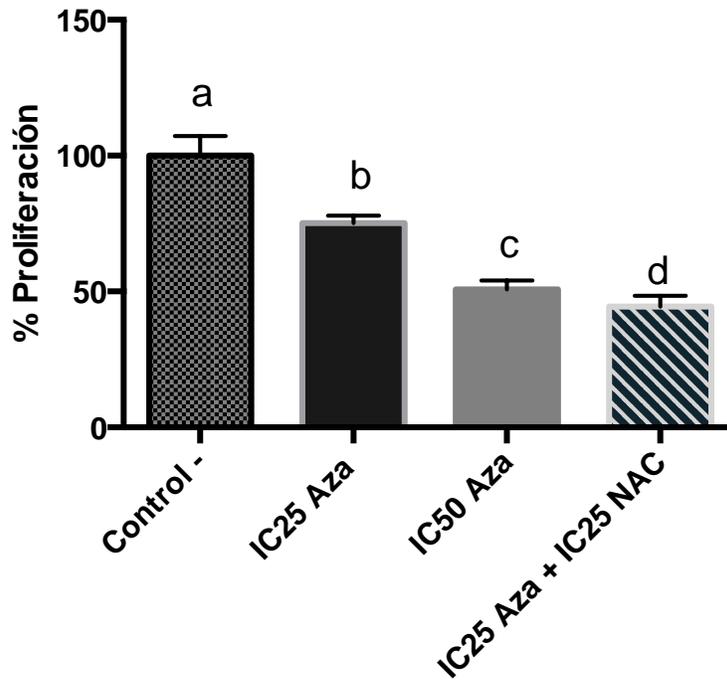


Figura 10. Efecto de la IC₂₅ de NAC + IC₂₅ de Aza sobre la proliferación celular. Todos los grupos presentan diferencia significativa entre sí, de acuerdo al análisis de ANOVA y *post hoc* de Tukey, $p < 0.05$.

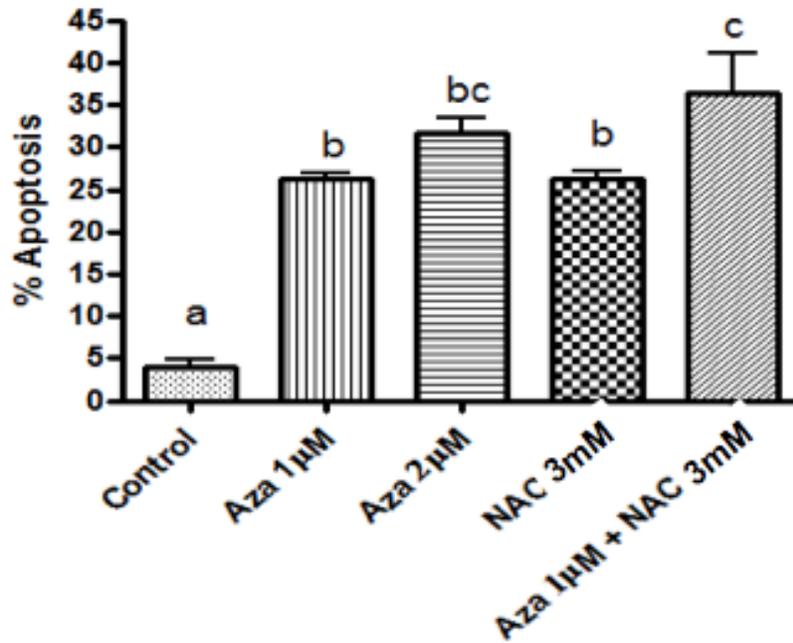


Figura 11. Efecto apoptótico de Aza y NAC de manera individual y en conjunto. Se presenta el porcentaje de inducción a apoptosis. Las letras diferentes indican diferencia significativa entre grupos, ANOVA y *post hoc* de Tukey, $p < 0.05$.

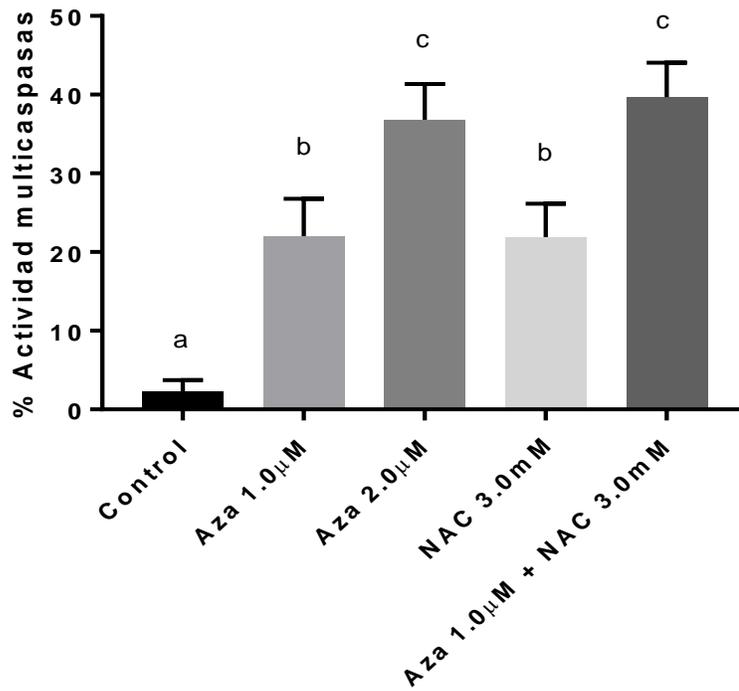


Figura 12. Porcentaje de la actividad de multicaspasas (1, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9), inducida por los diferentes tratamientos. Las diferencias significativas se representan como letras diferentes, ANOVA y *post hoc* de Tukey, $p < 0.05$.

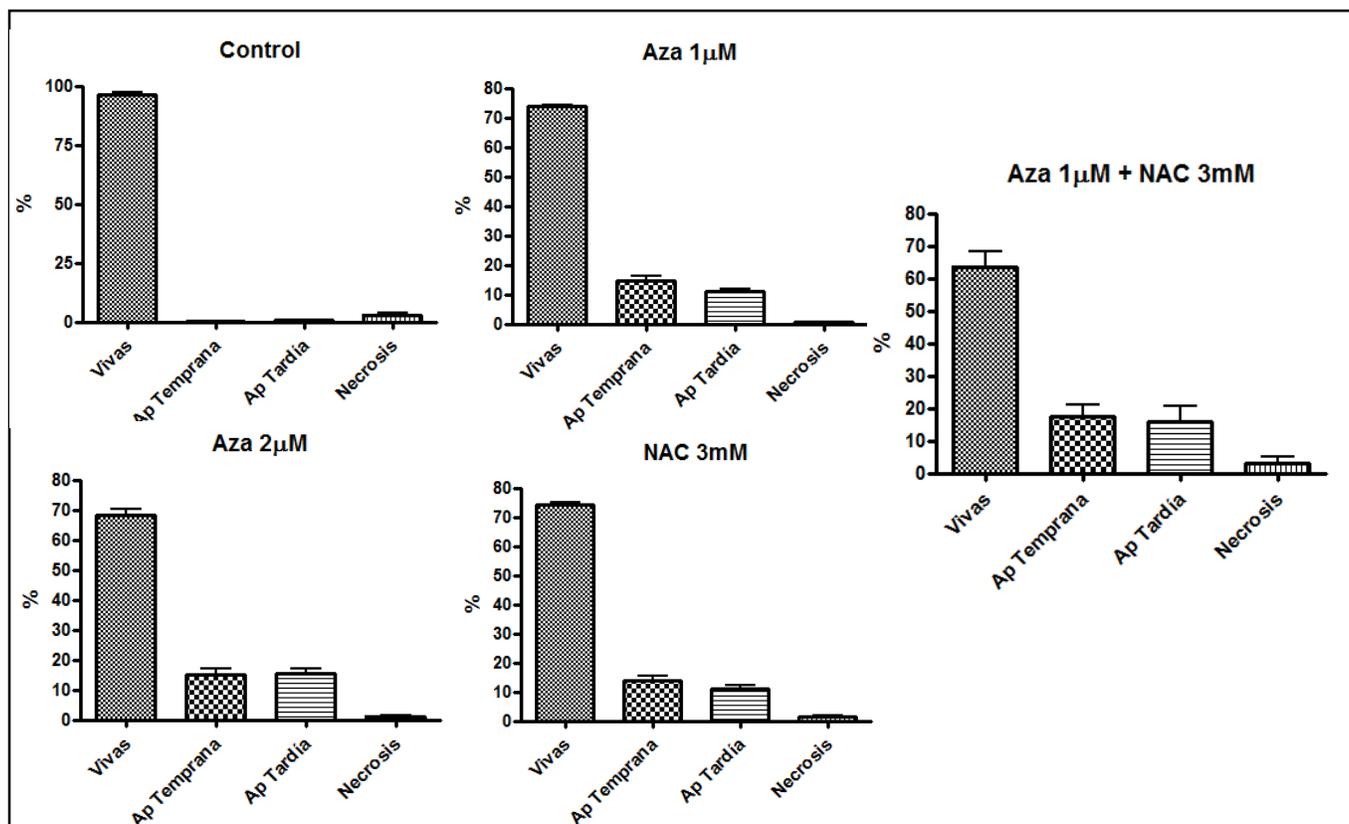


Figura 13. Porcentaje de inducción de apoptosis temprana, tardía y necrosis inducida por Aza y NAC. En las gráficas se observa que el porcentaje de necrosis en todos los casos es prácticamente nulo, indicando que Aza y NAC están induciendo sólo apoptosis; evento benéfico para la quimioterapia.

Los gráficos de apoptosis obtenidos mediante citometría de flujo se presentan en la figura 14. En cada gráfico hay cuatro cuadrantes y en cada uno se indica el tipo de apoptosis que se está llevando a cabo en la célula, así como aquellas células que están en necrosis. Además, se señala el porcentaje de células en cada cuadrante, cada punto naranja representa una célula de manera individual. En todos los casos

predomina la apoptosis sobre la necrosis; y la apoptosis temprana sobre la tardía. El proceso apoptótico se confirmó mediante la evaluación de la actividad de multicaspasas.

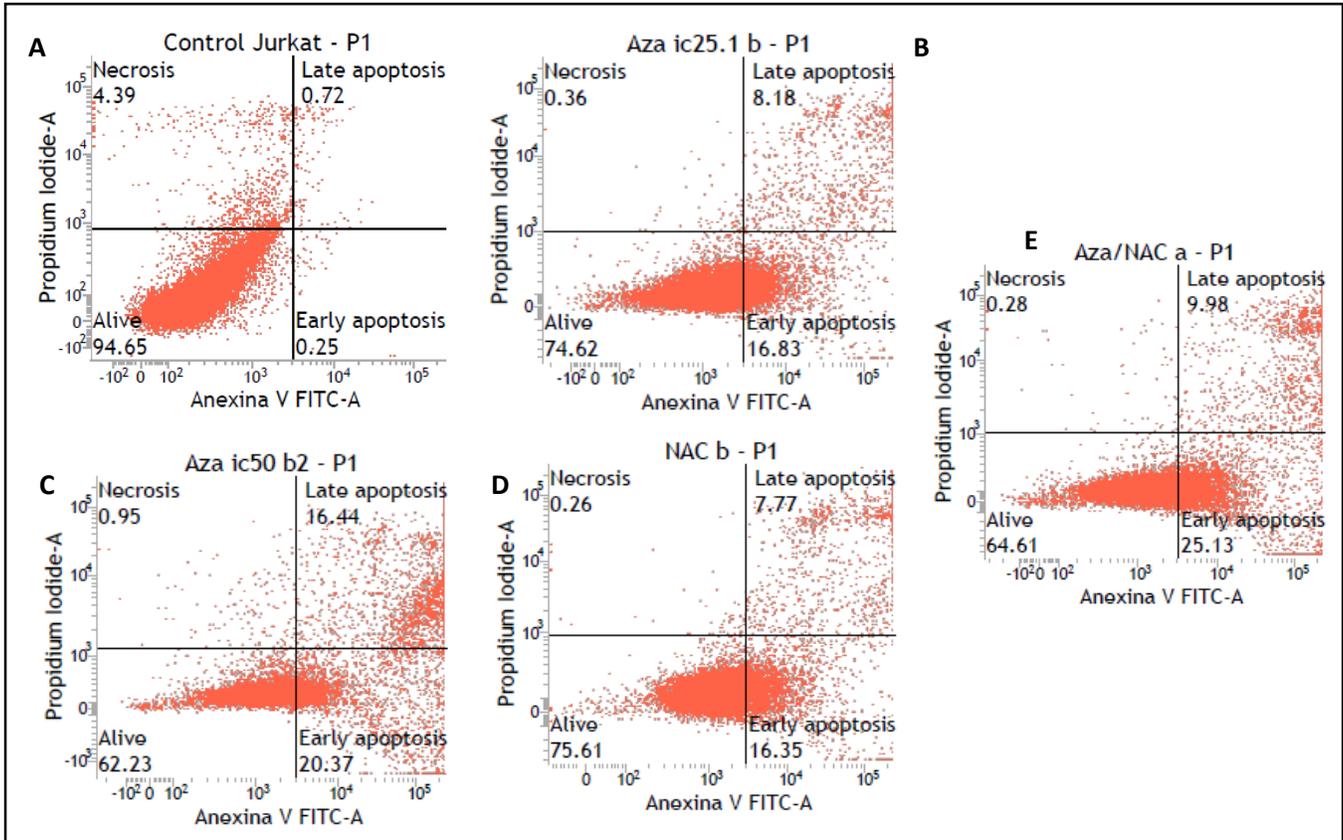


Figura 14. Gráficos de apoptosis en citometría de flujo. En cada cuadrante del gráfico se señala el tipo de apoptosis que se está llevando a cabo, así como necrosis. A; control, B; Aza 1.0 μM, C; 2.0 μM, D; NAC 3mM, E; Aza 1.0 μM + NAC 3mM.

El efecto de los tratamientos sobre el ciclo celular fue evaluado mediante citometría de flujo, a partir de la incorporación estequiométrica del yoduro de propidio en el ADN celular (figura 15). Se presenta el análisis de las fases G0/G1 y G2/M, debido a que en estas fases es donde se ha reportado que Aza ejerce arresto. En la fase G0/G1 no hubo diferencia significativa entre tratamientos, $p < 0.05$, sin embargo, fue

en esta fase donde se observó el mayor porcentaje de arresto celular en todos los tratamientos. Por otro lado, en la fase G2/M, la combinación de Aza 1.0 μ M + NAC 3.0mM favorecieron un incremento significativo del arresto del ciclo celular, $p < 0.05$, con respecto a todos los grupos (figura 15).

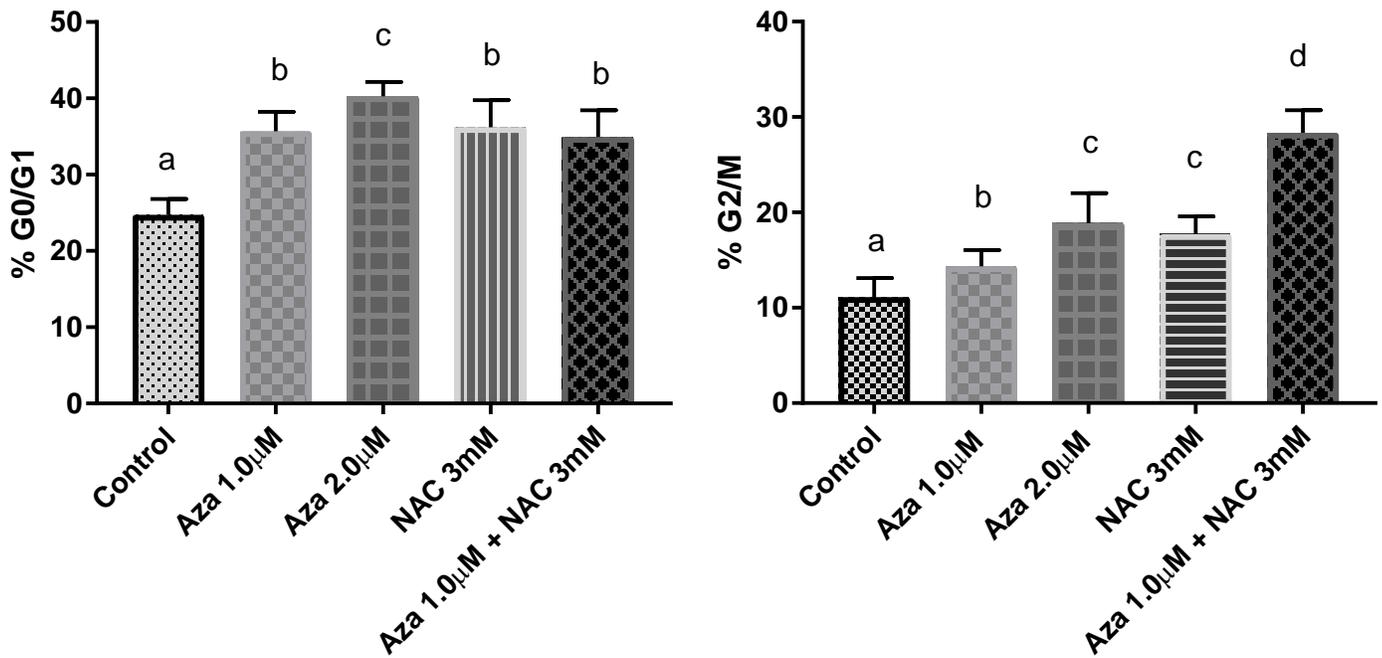


Figura 15. Análisis del efecto de los diferentes tratamientos sobre las fases G0/G1 y G2/M del ciclo celular. Se presentan los porcentajes de células que se encuentran en arresto en las fases del ciclo celular. Las diferencias significativas entre grupos, *Tukey*, $p < 0.05$, se representan como letras diferentes.

En la figura 16 se observa la distribución de las fases del ciclo celular, así como la cantidad de células en cada fase, en el eje de las ordenadas. Se observa que la combinación Aza 1.0 μ M + NAC 3.0mM favorece un incremento en el arresto en la fase G2/M con respecto a Aza 2.0 μ M. Este comportamiento se observó en todos los ensayos de ciclo celular, lo cual podría explicar, en parte, la interacción

antiproliferativa y apoptótica de Aza y NAC. En todos los casos el arresto del ciclo celular se observó en las fases G0/G1 y G2/M.

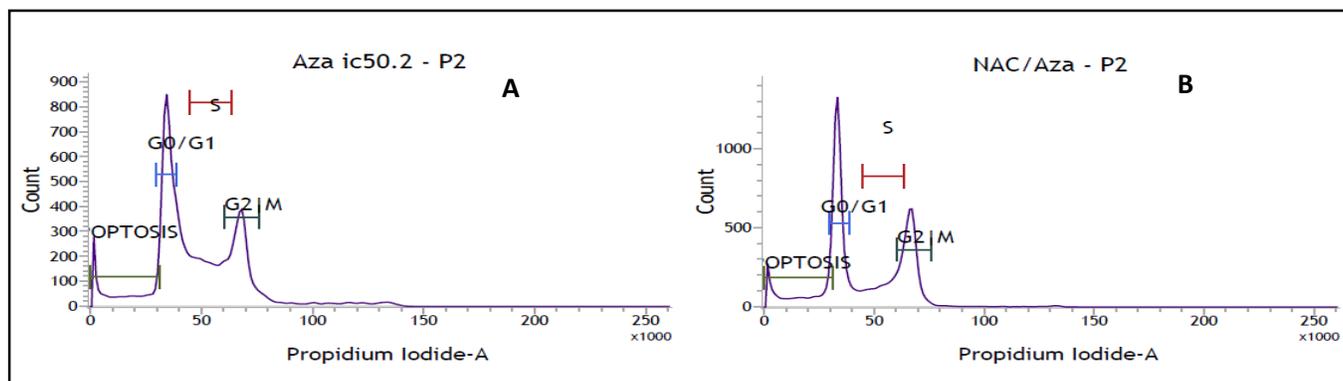


Figura 16. Histogramas de distribución de las fases del ciclo celular, obtenidas mediante citometría de flujo. En cada histograma se observa la distribución de las distintas fases del ciclo celular. En el eje de las abscisas se grafica la fluorescencia del yoduro de propidio, mientras que en el eje de las ordenadas se grafica el número de células. A; Aza 2.0 μ M, B; Aza 1.0 μ M + NAC 3.0mM.

En la figura 17 se muestran los niveles de ROS inducidos por cada tratamiento. Los resultados se presentan como las veces de cambio respecto al control (1.0) que induce cada tratamiento, basadas en la intensidad media de fluorescencia. Los grupos de Aza 1.0 y 2.0 μ M inducen significativamente más ROS que el control y que todos los demás tratamientos. La NAC 3.0 mM no favorece un incremento significativo de ROS respecto al control ni al usarse a la par con NAC. No se debe confundir la medición de los niveles de ROS con la capacidad antioxidante, ya que en la última se debe medir la actividad de enzimas antioxidantes.

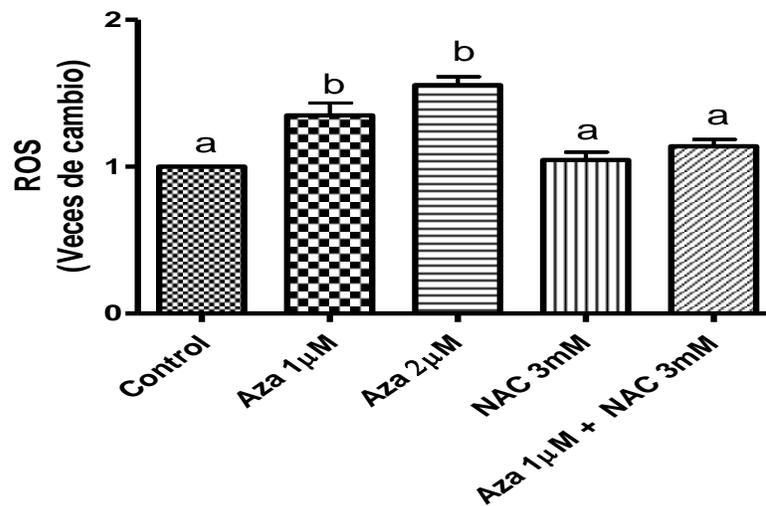


Figura 17. Niveles de ROS inducidos por Aza y NAC. Se presentan como las veces de cambio respecto al control. Las letras diferentes indican diferencia significativa, ANOVA y *post hoc* de Tukey, $p < 0.05$.

8 Discusión

La tiopurina Aza se utiliza en la clínica para el tratamiento de la LLA sin embargo, su uso es limitado debido a los efectos adversos que ocasiona. Una de las razones de la mayor toxicidad de Aza con respecto a las demás tiopurinas, es que se requiere mayor dosis, al ser ésta un pro-fármaco que requiere mayores reacciones de biotransformación a sus metabolitos activos, llamados nucleótidos de tioguanina (DrugBank, 2012). La biotransformación de Aza requiere la presencia de grupos SH presentes en el glutatión o la cisteína (Tiede y col., 2003), los cuales se ven disminuidos en células cancerosas debido al estrés oxidativo (Karran, 2007), ya que en estas células hay una mayor producción de radicales libres (Schumacker, 2006; Irwin y col., 2013). De esta manera, la biotransformación de Aza en células cancerosas se ve limitada. El uso de un antioxidante que contenga grupos SH, como la NAC, que además favorece la re síntesis de glutatión, es limitado debido a que pudiera disminuir el efecto quimioterapéutico al proteger a la células cancerosas.

En el presente estudio se determinó, en primera instancia, el efecto antiproliferativo de NAC sobre células Jurkat-T de LLA. Lo cual es consistente con lo reportado por Mansour y colaboradores en 2014 al determinar que NAC ejercía inhibición de la proliferación en la misma línea celular. Una vez determinado el efecto antiproliferativo de NAC se procedió a evaluar el efecto de Aza 1.03 μM + NAC 3 mM. La combinación de ambos fármacos ejerce un efecto antiproliferativo significativamente mayor al que ejerce Aza 2.06 μM ; por lo tanto, NAC no ejerce un efecto protector sobre las células cancerosas, sino que interactúa aditivamente con Aza. El mecanismo de esta interacción antiproliferativa puede tener dos vertientes. La primera se debe al efecto antiproliferativo de Aza ya comprobado inicialmente por Elion GB, en 1989, el cual se debe a la inhibición de las cinasas dependientes de ciclinas 1 y 4; lo cual favorece arresto en el ciclo celular en las fases G2/M y G1/S (Xiao y col., 2014), la incorporación de nucleótidos de tioguanina al ADN,

impidiendo su replicación y la inhibición de la síntesis de purinas (Karran, 2007). Por su parte, NAC tiene la capacidad de disminuir la expresión de ciclinas A, B y D (Amini y col., 2014), ejerciendo así un efecto antiproliferativo. Además, NAC aporta grupos SH, *per se*, y además favorece la re-síntesis de glutatión; lo cual es necesario para la biotransformación inicial de Aza a 6-MP. Por otro lado, las ROS pueden oxidar los metabolitos activos de Aza y de esta manera disminuir su efecto antineoplásico, pero al ser NAC un antioxidante capaz de disminuir ROS en células Jurkat-T (Gao y col., 2008) favorecería la protección de los metabolitos activos de Aza y se mantendría el efecto antiproliferativo; la disminución de ROS no afecta el mecanismo de acción de Aza, debido a que no ejerce apoptosis por daño oxidativo, como lo hacen la mayoría de los fármacos quimioterapéuticos (O`Donnovan, 2009).

La apoptosis es un evento de suprema importancia para la célula, ya que permite la eliminación de células disfuncionales o potencialmente peligrosas (Xu y col, 2012). Sin embargo, las células cancerosas cuentan con mecanismos de supervivencia que les permiten seguir proliferando y evadir la muerte. Los agentes quimioterapéuticos actúan por diferentes mecanismos para inducir apoptosis. En el presente estudio se observó que ambos fármacos, Aza y NAC, ejercen un efecto apoptótico, por separado y usados a la par. La Aza actúa mediante dos mecanismos ya elucidados. El primero es por la inducción del sistema de reparación de errores de mal apareamiento de bases (MMR), el cual induce el proceso de apoptosis cuando los errores de apareamiento son significativos. Los errores de apareamiento de bases causados por Aza son transiciones GC → AT (Warren y col., 1995). El metabolito de Aza, tGTP, inhibe a la pequeña GTPasa Rac-1, la cual participa en vías de señalización antiapoptóticas como Akt. Al ser inhibida esta vía, las células no son capaces de inhibir estímulos de apoptosis (Tiede y col., 2003). Por otro lado, los antioxidantes como NAC han sido poco estudiados en cuanto a su actividad antineoplásica, ya que en numerosos estudios se ha reportado que protegen a las células cancerosas y les permiten sobrevivir. El mecanismo del efecto apoptótico, de NAC observado en este estudio no fue

elucidado por completo, sin embargo, se propone que NAC, al acidificar el medio, favorece la actividad de la caspasa 3 ejecutora, desencadenando así la apoptosis . En el estudio realizado por Manz y colaboradores en 2002, se reportó que en células Jurkat depletadas de glutatión (GSH) se inhibía la apoptosis y el número de células vivas no difería significativamente del control. Sin embargo, el 80% de las células que tenían GSH entraron en proceso de apoptosis e incrementaron la actividad de caspasas iniciadoras y ejecutoras, determinando, así, la importancia de la presencia de glutatión para iniciar este proceso de muerte celular (Hentze y col., 2002). La NAC es un precursor de GSH, por lo tanto, al administrar NAC los niveles de GSH aumentarán (Amini y col., 2014) y la célula contará con los medios necesarios para iniciar el proceso de apoptosis cuando se le aplique un estímulo. Además, Aza + NAC favorecieron el incremento del arresto del ciclo celular en la fase G2/M, lo cual es un evento favorable para la inducción de apoptosis, debido a que la célula ya ha sintetizado su material genético y no tiene la posibilidad lesiones posteriores.

Ambos fármacos favorecieron la inducción de apoptosis, y mínimamente de necrosis. Esto se determinó al medir la actividad de multicaspasas (1,3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) mediante citometría de flujo. El porcentaje de apoptosis inducido por cada fármaco es similar al porcentaje de actividad de multicaspasas, confirmando, así, el tipo de muerte celular. Esto es importante, ya que un fármaco que favorezca la necrosis sería perjudicial, debido a que la célula liberaría su contenido, lo cual incluye citosinas inflamatorias, y esto propagaría los procesos inflamatorios.

Cuando se administran Aza y NAC al mismo tiempo actúan mediante mecanismos diferentes para inducir apoptosis, la manera en la que pueden interactuar es mediante el ataque nucleofílico de NAC a Aza para generar el metabolito activo, 6-MP y así favorecer la biodisponibilidad de los metabolitos activos. Aunado a esto, NAC neutralizaría las ROS protegiendo de la oxidación a los metabolitos de Aza.

Las ROS son importantes para el desarrollo del cáncer, así como también en la respuesta quimioterapéutica. Mantener la homeostasia redox es importante, especialmente en células leucémicas, las cuales tienen niveles de ROS significativamente mayores que las células normales, debido a alteraciones en las vías pro y antioxidantes. Estos elevados niveles de ROS provocan inestabilidad genómica, supervivencia, crecimiento y motilidad (Finkel, 2003). Una de las principales fuentes de ROS es la mitocondria, una vez que han ocurrido mutaciones en el ADN mitocondrial y han una disminución en la expresión de las proteínas de la cadena de transporte de electrones y de enzimas antioxidantes. Esto favorece un desacoplamiento del transporte de electrones y un incremento sostenido de ROS. Este mecanismo es mediante el cual Aza incrementa significativamente los niveles de ROS, favoreciendo su citotoxicidad característica, debido a la incorporación de nucleótidos de tioguanina al ADN mitocondrial.

La NAC generó niveles de ROS similares al control, por lo que no exagera la citotoxicidad, sino que favorece la homeostasia redox. Cuando se utiliza a la par con Aza, predomina el efecto antioxidante de NAC, al atenuar la generación de ROS mediada por Aza. Como se observó anteriormente, Aza y NAC actúan en conjunto para inhibir la proliferación celular e inducir apoptosis, lo cual indica que no están actuando por mecanismos oxidativos. Al disminuir ROS, la actividad de vías de señalización relacionadas con proliferación y supervivencia se vería disminuída, ya que las ROS actúan como segundos mensajeros y facilitan la señalización que involucra cinasas, fosfatasa y factores de transcripción (Finkel, 2011). De acuerdo a los resultados obtenidos, la administración de NAC permite disminuir la dosis de Aza, al actuar como coadyuvante, y así la citotoxicidad; incluida la citotoxicidad oxidativa.

9 Conclusión

El uso de antioxidantes es un tabú en el tratamiento contra el cáncer y no se ha concluido si su uso es benéfico para las células cancerosas o si favorece su muerte o arresto del ciclo celular. Este enfoque debe ser estudiado en cada tipo de cáncer y fármaco en particular. En el presente trabajo se determinó el efecto antiproliferativo de NAC en células Jurkat de LLA-T, siendo una pauta para probar su efecto coadyuvante con un quimioterapéutico. La combinación de NAC + Aza favoreció una disminución de la proliferación significativamente superior al doble de la dosis de Aza de manera individual. Por otro lado, se demostró que la combinación de Aza + NAC ejerce su efecto mediante el arresto del ciclo celular en la fase G0/G1 y en la fase G2/M, así como en la inducción de apoptosis, específicamente, y no necrosis. La combinación de ambos fármacos, además, favoreció la disminución de ROS a niveles iguales a los del control, siendo este un evento favorable en pro de la disminución del estrés oxidativo. NAC y Aza ejercen una interacción antiproliferativa mediante la inducción de apoptosis y arresto del ciclo celular, además de disminuir ROS, las cuales están implicadas en señalización proliferativa y antiapoptótica. Este trabajo da la pauta para continuar con el estudio de los mecanismos de interacción antioxidante-quimioterapéutico, como un nuevo enfoque en el tratamiento contra el cáncer, esto con el objetivo de disminuir la mortalidad por la toxicidad de la quimioterapia.

10 BIBLIOGRAFÍA

Akbulut S, Elbe H, Eris C, Dogan Z, Toprak G, Otan E, Erdenmli E, Turkoz Y. 2014. Cytoprotective effects of amifostine, ascorbic acid and N-acetylcysteine against methotrexate-induced hepatotoxicity in rats. *WJG*. 20 (29): 10158-10165.

Al A, Wan L, O'Brien P. 2014. Evaluation of azathioprine-induced cytotoxicity in an *in vivo* rat hepatocyte system. *Hindawi*. 37:7-14.

American Cancer Society. <http://www.cancer.org/cancer/leukemia-acutelymphocyticalinadults/index>. Consulta: 09/2014.

Amini A, Masoumi-Moghaddam S, Ehteda A, Lawson D. 2014. Bromelain and N-acetylcysteine inhibit proliferation and survival of gastrointestinal cancer cells in vitro: significance of combination therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 33:92.

Amini A, Masoumi-Moghaddam S, Ehteda A, Lawson Morris D. 2014. Bromelain and N-acetylcysteine inhibit proliferation and survival of gastrointestinal cancer cells in vitro: significance of combination therapy. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*. 33:92.

Asselin BL, Gaynon P, Whitlock JA. 2013. Recent advances in acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: an expert panel discussion. *Curr Opin Oncol*. 25(3):6-14.

Bertout JA, Patel SA, Simon MC. 2008. The impact of O₂ availability on human cancer. *Nat Rev Cancer*. 8(12):967–75.

Chen N, Hanly L, Rieder M, Yeger H, Koren G. 2011. The effect of N-acetylcysteine on the antitumor activity of ifosfamide. *Can J Physiol Pharmacol* 89:335–343.

Coulthard S, Hogarth L, Little M, Matheson E, Redferin C, Minto L, Hall A. 2001. The effect of thiopurine methyltransferase expression on sensitivity of thiopurine drugs. *Mol Pharmacol*. 62: 102-109.

De Veaux RD, Velleman PF, Bock DE. 2009. Intro stats. 3ra Ed. Editorial Pearson. Boston. 13:23-143.

DrugBank. 2012. Azathioprine. <http://www.drugbank.ca/drugs/DB00993>. Consulta 09/08/2014.

Drugs.com. 2014. Azathioprine side effects. <https://www.drugs.com/sfx/azathioprine-side-effects.html>. Consulta 08/08/2014.

Elion GB. 1989. The purine path to chemotherapy. *Science*, 244, 41–47.

Escousse A, Guedon F, Mounie J. 1998. 6- Mercaptopurine pharmacokinetics after use of azathioprine in renal transplant recipients with intermediate or high thiopurine methyl transferase activity phenotype. *J Pharm Pharmacol*. 50(11):1261-6.

Ferraro D. 2006 Pro-metastatic signaling by c-Met through RAC-1 and reactive oxygen species (ROS). *Oncogene*. 25(26):3689–98.

Finkel T. 2003. Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol* 15: 247–254.

Finkel T. 2011. Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol* 194: 7–15.

Gao M, Gao L, Tao Y, Hou J, Yang W, Wu X, Xu H, Tompkins V, Han Y, Wu H, Zhan F, Shi J. 2014. Proteasome inhibitor carfilzomib interacts synergistically with histone deacetylase inhibitor vorinostat in Jurkat T-leukemia cells. *Acta Biochim Biophys*. 46:484-491.

Guía de práctica clínica. GPC. Gobierno Federal. http://www.cenetec.salud.gob.mx/descargas/gpc/CatalogoMaestro/142_GPC_LEUCEMIA_LINFOBLASTICA/Imss_ER.pdf Consulta: 08/2014.

Henzte H, Schmitz I, Latta M, Krueger M, Krammer PH, Wendel A. 2002. Glutathione Dependency of Caspase-8 Activation at the Death-Inducing. *JBC Papers in Press*. 4:567-574.

Hospital Infantil de México. Boletín médico. http://www.himfg.edu.mx/descargas/documentos/BMHIM_2012/BMHIM_vol_69_Espanol/BMHIM_69-3-abr-mayo_2012_espanol.pdf Consulta 09/2014.

Hunger SP, Baruchel A, Biondi A, Evans WE, Jeha S, Loh M, Moericke A, Pieters R, Relling MV, Schmiegelow K, Schrappe M, Silverman LB, Stanulla M, Valsecchi MG, Vora A, Pui CH. 2012. *Pediatr Blood Cancer*. The thirteenth international childhood acute lymphoblastic leukemia workshop report: La Jolla, CA, USA, 7-9.

Hunger SP, Lu X, Devidas M. 2012. Improved survival for children and adolescents with acute lymphoblastic leukemia between 1990 and 2005: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 30 (14): 1663-9.

Instituto nacional del cáncer. 2014. Leucemia linfoblástica aguda infantil. <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/leucemia/pro/tratamiento-lla-infantil-pdq>. Consulta 10/09/2014.

Irwin ME, Rivera-Del Valle N, Chandra J. 2013. Redox Control of Leukemia: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox*

Signaling. 18(11) 4258-4265.

Karran P, Offman J, Bignami M. 2003. Human mismatch repair, drug-induced DNA damage, and secondary cancer. *Biochimie*, 85, 1149–1160.

Karran P. 2007. Thiopurines, DNA damage, DNA repair and therapy-related cancer. *Cancer research*. 79: 153-170.

Kasperczyk S, Dobrakowski M, Kasperczyk A, Zalejska-Fiolka J, Pawlas N, Kapka-Skrzypczak L, Brikner E. 2014. Effect of treatment with N-acetylcysteine on non-enzymatic antioxidant reserves and lipid peroxidation in workers exposed to lead. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine*. 21(2): 272-277.

Kim D, Peng XC, Sun XH. 2011. Massive apoptosis of thymocytes in T-cell-deficient Id1 transgenic mice. *Mol Cell Biol*. 19:8240–8253.

Lee Y, Kim N, Suh Y, Lee Ch. 2011. Involvement of ROS in curcumin-induced autophagic cell death. *Korean J Physiol Pharmacol*. 15: 1-7.

Lennard L, Lilleyman JS, Van Loon J, Weinshilboum RM. 2009. Genetic variation in response to 6-mercaptopurine for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet*. 336:225–9.

Lennard L, Welch JC, and Lilleyman JS. 1997. [Thiopurine drugs in the treatment of childhood leukaemia: the influence of inherited thiopurine methyltransferase activity on drug metabolism and cytotoxicity.](#) *Br J Clin Pharmacol*. 44(5):455-61

Liu GH, Storz P. 2010. Reactive oxygen species in cancer. *Free Radic Res*. 44(5).

Lowry PW, Franklin CL, Weaver AL, Pike MG, Mays DC, Tremaine WJ. 2001. Measurement of thiopurine methyltransferase activity and azathioprine metabolites in patients with inflammatory bowel disease. *Gut*. 49:665–70.

Ma Y, Dobbins S, Sherborne A, Chubb D, Galbiati M, Cazzaniga G, Micalizzi C, Tearle R, Lloyd A, Hain R, Greaves M, Houlston R. 2014. Developmental timing of mutations revealed by whole-genome sequencing of twins with acute lymphoblastic leukemia. *Proc Natl Acad Sci*. 110:7429-33.

Mata M, Morcillo E, Gimeno C, Cortijo J. 2011. N-acetyl-L-cysteine (NAC) inhibits mucin synthesis and pro-inflammatory mediators in alveolar type II epithelial cells infected with influenza virus A and B and with respiratory syncytial virus (RSV). *Biochem Pharmacol*. 82(5):548–55.

McKenzie S. 2009. Hematología clínica. 2ª edición. España: Editorial Manual Moderno. 2: 34-421.

Mullighan CG. 2012. Molecular genetics of B and T precursors acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 122:3407–3415.

Neuwelt EA, Pagel MA, Kraemer DF, Peterson DR, Muldoon LL. 2004. Bone marrow chemoprotection without compromise of chemotherapy efficacy in a rat brain tumor model. *J Pharmacol Exp Ther* 309:594–599.

O'Donovan P, Perrett C, Zhang X et al. 2005. Azathioprine and UVA light generate mutagenic oxidative DNA damage. *Science*, 309: 1871–1874.

O'Donovan P, Perrett C, Zhang X et al. 2005. Azathioprine and UVA light generate mutagenic oxidative DNA damage. *Science*, 309, 1871–1874.

Oncolox. Bernward Zeller MD. 2014. Drug therapy for acute lymphoblastic leukemia in children. oncolox.org/Prosedyrer/TREATMENT/.../Childhood_ALL. Consulta 09/10/2014.

Poppe D, Tiede I, Fritz G, Becker C, Bartsch B, Wirtz S. 2006. Azathioprine suppresses ezrin-radixin-moesin-dependent T cell-APC conjugation through inhibition of Vav Guanosine exchange activity on Rac proteins. *J Immunol.* 176: 640-51.

Rendón-Macías ME, Reyez-Zepeda NC, Villasís-Keever MA, Serrano J, Escamilla A. 2012. Global trend of survival in pediatric acute lymphoblastic leukemia: a review of the last four decades. *Bol Med Hosp Infant Mex.* 69 (3):153-163.

Rosenberg N, Krontiris T. 2000. The molecular basis of neoplasia. *Hematology basic.* 7 (5): 234-143.

Storz P. Mitochondrial ROS--radical detoxification, mediated by protein kinase D. *Trends Cell Biol.* 2007; 17(1):13–8.

Storz P. Reactive oxygen species in tumor progression. *Front Biosci.* 2005; 10:1881–96.

Tiede I, Fritz G, Strand S, Poppe D, Dvorsky R, Strand D. 2003. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest.* 111: 1133-45.

Tse H, Tseng C. 2014. Update on the pathological processes, molecular and clinical

utility of N-acetylcysteine in chronic obstructive pulmonary disease. *International Journal of COPD*. 9: 825-836.

Warren DJ, Andersen A, and Slordal L. 1995. Quantitation of 6-thioguanine residues in peripheral blood leukocyte DNA obtained from patients receiving 6-mercaptopurine-based maintenance therapy. *Cancer Res* 55:672-679.

Williams E. Hematología. 2009. 6ª. edición. NY: Editorial Marbán. 2:45-64.

Wu WS, Wu JR, and Hu CT. 2008. Signal cross talks for sustained MAPK activation and cell migration: the potential role of reactive oxygen species. *Cancer Metastasis Rev* 27: 303– 314.

Wu WS. 2006 The signaling mechanism of ROS in tumor progression. *Cancer Metastasis Rev*. 25(4):695–705.

Xiao Y, Ji D, Guo L, Wang Y. 2014. Comprehensive Characterization of ^SGTP-Binding Proteins by Orthogonal Quantitative ^SGTP-Affinity Profiling and ^SGTP/GTP Competition Assays. *Anal. Chem*, 86, 4550–4558.

Xu YC, et al. Involvement of TRAF4 in oxidative activation of c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem*. 2002; 277(31):28051–7.

Zuckerman T, Rowe J. 2014. Pathogenesis and prognostication in acute lymphoblastic leukemia. *F1000 Prime reports*. 6:59-65.