



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO
FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE METOTREXATO Y
ÁCIDO GLUTÁMICO EN EL TRATAMIENTO DE CÉLULAS
(JURKAT) DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA TIPO T”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

CLAUDIA GUTIÉRREZ GARCÍA

DIRIGIDO POR

DRA. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2016.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EFECTO DE LA COMBINACIÓN DE METOTREXATO Y
ÁCIDO GLUTÁMICO EN EL TRATAMIENTO DE CÉLULAS
(JURKAT) DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA TIPO T”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

CLAUDIA GUTIÉRREZ GARCÍA

DIRIGIDO POR

DRA. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

SINODALES

Dra. María Guadalupe García Alcocer

Director

Dra. Laura Cristina Berumen Segura

Sinodal

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera

Sinodal

Q.F.B. Sabina Sánchez Vélez

Sinodal

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
RESUMEN	1
1. ANTECEDENTES.	1
1.1. Sistema Hematopoyético.	1
1.2. Leucemia.	3
1.3. Clasificación de Leucemia.	4
1.3.1. Leucemia linfoblástica aguda (LLA).	4
1.3.1.1. Características de la leucemia linfoblástica aguda.	4
1.3.1.2. Factores de riesgo.	5
1.3.1.3. Diagnóstico.	6
1.3.1.4. Tratamiento de LLA.	7
1.3.2. Leucemia mieloide aguda (LMA).	9
1.3.3. Leucemia linfoide crónica (LLC).	10
1.3.4. Leucemia mieloide crónica (LMC).	10
1.4. Folatos.	11
1.4.1. Transportadores de folatos/antifolatos.	12
1.4.1.1. Influjo.	12
1.4.1.2. Eflujo.	13
1.4.2. Poliglutamación.	13
1.5. Antifolatos.	13
1.5.1. Poliglutamables y no poliglutamables.	14
1.6. Metotrexato.	15
2. HIPÓTESIS.	17
3. OBJETIVOS.	18
3.1. General.	18
3.2. Específicos.	18

4. METODOLOGÍA.	19
4.1. Materiales.	19
4.2. Material biológico.	19
4.3. Reactivos.	19
4.4. Equipos.	20
4.5. Métodos.	20
4.5.1. Cultivo celular.	20
4.5.2. Curvas concentración-respuesta de MTX.	21
4.5.3. Evaluación del efecto de metotrexato y ácido glutámico en el tratamiento de células Jurkat.	21
4.5.4. Evaluación del efecto apoptótico de metotrexato y ácido glutámico en células Jurkatpor Anexina V – PI.	21
5. RESULTADOS.	22
5.1. Cl_{50} metotrexato.	22
5.2. Efecto de metotrexato y ácido glutámico.	23
5.3. Efecto apoptótico de metotrexato y ácido glutámico.	24
7. DISCUSIÓN.	26
8. CONCLUSIONES.	28
9. REFERENCIAS.	29

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Resumen de propiedades de algunos antifolatos.	15

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema del sistema hematopoyético.	3
2	Estructuras químicas de ácido fólico, dihidrofolato y tetrahidrofolato.	11
3	Reacciones folato-dependientes en la célula.	12
4	Gráfico concentración-respuesta de metotrexato para la línea celular Jurkat.	22
5	Efecto de metotrexato y ácido glutámico en la proliferación de la línea celular Jurkat.	23
6	Efecto apoptótico de metotrexato y ácido glutámico de la línea celular Jurkat.	24
7	Diagrama de puntos de células Jurkat en apoptosis.	25

RESUMEN

La Leucemia Linfoblástica Aguda es el tipo de cáncer más común en los niños, siendo el subtipo T una de las leucemias más resistentes. El tratamiento se divide en cuatro bloques y metotrexato (MTX) es uno de los pilares del mantenimiento y de la terapia directa al Sistema Nervioso Central. Sin embargo, debido a la necesidad de utilizar altas dosis, la toxicidad deteriora la salud y la calidad de vida de los niños con este padecimiento. En este trabajo se evaluó la combinación de metotrexato y ácido glutámico, amino ácido no esencial, en el tratamiento de células (Jurkat) de Leucemia Linfoblástica Aguda tipo T. Se estableció la CI_{50} de este fármaco resultado de $5.667 \mu M$. Con este trabajo se concluyó que CI_{50} de MTX más ácido glutámico 20 mM tiene un efecto mayor en la inhibición de la proliferación celular en comparación con la CI_{50} , lo cual coincide con el efecto apoptótico observado con el ensayo de Anexina V-Ioduro de propidio por citometría de flujo.

1. ANTECEDENTES.

1.1. Sistema Hematopoyético.

En el cuerpo humano adulto casi una cuarta parte de todas las células, son del tipo sanguíneo. La formación de células sanguíneas recibe el nombre de hematopoyesis, el sistema hematopoyético por tanto es masivo y requiere de regulación para mantenerse en condiciones homeostáticas. También debe ser capaz de responder cuando sea necesario, como durante una infección o después de una pérdida de sangre, para producir más células sanguíneas. Las células madre y los progenitores hematopoyéticos se generan en distintos lugares durante la embriogénesis de los mamíferos, estas células migran a diferentes sitios anatómicos hasta que finalmente se alojan en la médula ósea poco antes del nacimiento. En situaciones de estrés, la hematopoyesis extramedular puede llevarse a cabo en regiones que normalmente carecen de este tipo de actividad.

El sistema hematopoyético es responsable de la producción de una amplia gama de diferentes tipos de células, desde eritrocitos que transportan el oxígeno y plaquetas que se encargan de la coagulación de la sangre, hasta las numerosas formas de granulocitos, también es responsable de la producción de células provenientes de la rama linfoide como son los linfocitos T, los linfocitos B, las células NK y los linfocitos innatos. Las células dendríticas y los mastocitos también son generados por el sistema hematopoyético. Por consiguiente, el sistema hematopoyético es un conjunto complejo de diferentes tipos de células de la sangre, que realizan una amplia gama de tareas para mantener la homeostasis (Al-Drees y col., 2015).

Las células madre hematopoyéticas (CMH) son células multipotenciales que generan a las células progenitoras, las cuales se diferencian y dan lugar a los diferentes linajes de células sanguíneas. Las células madre pueden elegir autorrenovarse, comprometerse a la diferenciación, morir por apoptosis, permanecer en la médula ósea o migrar hacia la periferia. Estos procesos deben ser finamente sintonizados para mantener un nivel estacionario de células madre

funcionales en la médula ósea y de forma consistente proporcionar los progenitores para los diferentes linajes hematopoyéticos.

Las células madre tienen la capacidad de generar células hijas con las mismas propiedades que la célula madre. Este proceso puede ser simétrico, generando dos células madre, o asimétrico, resultando una célula madre y otro progenitor que poseerá una capacidad reducida para la autorrenovación, de ese modo, se establece una jerarquía para mantener la producción de sangre a través del tiempo sin agotamiento (Li y col., 2015).

Las CMH generan un grupo de CMH de largo plazo (CMH-LP) capaces de auto-renovarse indefinidamente, y un grupo de corto plazo (CMH-CP) que se auto-renuevan por un intervalo definido. CMH-CP se diferencian en progenitores multipotenciales que no se auto-renuevan (PMP) de donde se derivan los progenitores linfoides comunes (PLC) y los progenitores mieloides comunes (PMC), los cuales son dos progenitores oligopotenciales más restringidos, que en última instancia dan lugar a la progenie diferencial, a través de la maduración funcional irreversible. Los PLC están restringidos para dar lugar a linfocitos T, linfocitos B y células natural killer (NK), mientras que los PMC dan lugar al progenitor granulocito/macrófago (PGM), que genera monocitos, macrófagos y granulocitos, así como al progenitor megacariocítico/eritroide (PME), que produce megacariocitos, plaquetas y eritrocitos. Existen marcadores de superficie que distinguen a los diferentes tipos de progenitores y factores de transcripción que son esenciales para cada paso de la diferenciación (Figura 1).

La pérdida de control sobre el destino celular puede conducir al cáncer. Ciertos tipos de leucemia surgen de la acumulación de mutaciones en las CMH, ya que poseen tanto la propiedad de auto-renovación como la capacidad proliferativa extensa que podrían ser ventajosas para el crecimiento maligno. Además, las CMH persisten durante toda la vida y, por lo tanto, tienen muchas más oportunidades para adquirir y acumular las mutaciones necesarias, a comparación de células más maduras que sólo persisten durante un período corto (Al-Drees y col., 2015).

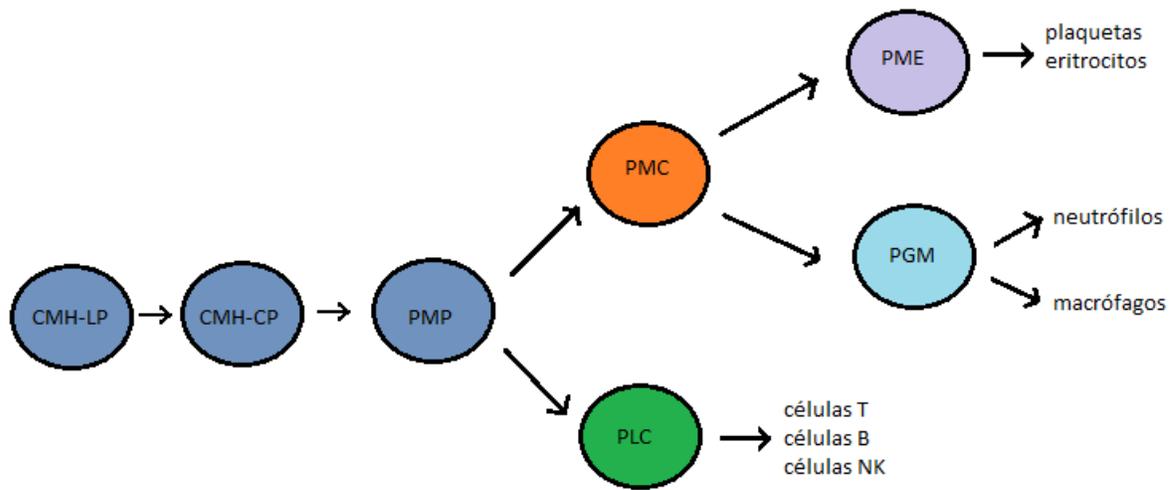


Figura 1. Esquema del sistema hematopoyético (modificado de Li y col., 2015).

1.2. Leucemia.

El cáncer, en México, es la segunda causa de muerte en los niños de entre 4 y 15 años desde el 2010, siendo leucemia el tipo de cáncer más común (49.8%), seguido de linfoma (9.9%) y de tumores en el Sistema Nervioso Central (9.4%). La tasa de mortalidad más alta de niños con cáncer en México, pertenece al estado de Tabasco, siendo de 7.7 por cada 100 000 niños por año, mientras que Durango tiene la más baja con una tasa de 3.1, y el estado de Querétaro tiene una tasa de 5.3 (Rivera y col., 2014).

La leucemia se conoce como un grupo de desórdenes hematopoyéticos malignos y es el tipo de cáncer más común de la infancia. La leucemia representa una diversa colección interna de anomalías con un perfil heterogéneo. Se caracteriza por la alteración de la proliferación, la diferenciación y la maduración de células procedentes de una célula madre hematopoyética pluripotente. La condición patológica surge de cambios en el genoma celular, particularmente en genes involucrados en la hematopoyesis fisiológica. Las células anormales, que se someten con éxito al proceso de transformación, se establecen en la médula ósea y en la sangre periférica, desplazando gradualmente a las células normales a causa

de su fenotipo excepcional que se manifiesta, por ejemplo, por la proliferación excesiva o por la resistencia a la apoptosis. Este fenómeno se inicia en una sola célula y es seguido por la adquisición de mutaciones y reordenamientos adicionales durante la división celular (Kęsy y Januszkiewicz, 2015).

1.3. Clasificación de Leucemia.

La leucemia ocurre cuando células inmaduras o maduras se multiplican en una forma incontrolada en la médula ósea. Se clasifica como linfocítica o mieloide, de acuerdo al tipo de células que se están multiplicando anormalmente, y puede ser aguda, significa que progresa rápidamente la enfermedad, con predominancia de células inmaduras (blastos), o crónica, la cual denota una enfermedad que progresa lentamente con mayor número de células maduras (Leonard, 1998).

Los distintos subtipos de leucemia, originados de los progenitores linfoides y de los mieloides, se caracterizan por anormalidades genéticas distintivas, que pueden afectar a las características clínicas y biológicas de la enfermedad (Kęsy y Januszkiewicz, 2015).

1.3.1. Leucemia linfoblástica aguda (LLA).

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es la neoplasia maligna más común en los niños. La incidencia de LLA infantil es de 3-4 casos por cada 100 000 en niños menores de 15 años de edad. A pesar de que afecta a los niños de todas las edades, los picos de incidencia son entre dos y cinco años de edad, con un ligero predominio en los varones. La LLA es una enfermedad heterogénea; los subtipos difieren en cuanto a las características biológicas, celulares y moleculares, la respuesta al tratamiento, y el riesgo de recaída, y se asocian con diferentes resultados. La tasa de supervivencia de los pacientes pediátricos con LLA ha mejorado hasta aproximadamente el 90% en los últimos años, sobre todo para los grupos con buen pronóstico (Lustosa y col., 2015).

1.3.1.1. Características de la leucemia linfoblástica aguda.

La LLA se caracteriza por ser un proceso oncogénico de múltiples etapas que conduce a la obstrucción de la maduración y la transformación maligna de progenitores hematopoyéticos linfoides. La incidencia de LLA no es homogénea en toda la vida. Como ya se mencionó, presenta un pico temprano a los 4 ó 5 años de edad (tasa de incidencia de 4.5 por cada 100.000 personas/año), una disminución de incidencia en adultos jóvenes, y un ligero aumento después de los 50 años de edad (tasa de incidencia de hasta 2 por 100.000 personas/año). La tasa de curación es menor en los adultos que en los niños, con un largo plazo de supervivencia libre de enfermedad de aproximadamente 80% en niños y 35-45% en adultos (Genescá y col., 2015).

Los signos y síntomas comunes presentes en niños, de acuerdo a tres revisiones retrospectivas de casos de leucemia infantil (en las que 75% a 100% de los casos eran LLA), incluyen fiebre (17% a 77%), letargo (12% a 39%) y sangrado (10% a 45%). Alrededor de un tercio de niños tenían síntomas musculoesqueléticos, particularmente en la columna vertebral y en los huesos largos, 75% tenían un agrandamiento del hígado o del bazo, y casi en el 60% había linfadenopatía. El compromiso del Sistema Nervioso Central está presente aproximadamente en el 7% de los niños al momento del diagnóstico (Davis y col., 2014).

Existen 2 subtipos de LLA, según el progenitor linfocito afectado: LLA-B del linaje linfocito B y LLA-T del linaje linfocito T. La LLA-T es el subtipo más complejo y heterogéneo a nivel genético y el que menos alternativas terapéuticas nuevas presenta en el momento actual. En concreto, LLA-T corresponde al 15% de las leucemias agudas de la infancia y 25% del adulto. La curva de incidencia presenta sólo un pico situado en el límite niño/adulto y la supervivencia no difiere de la de los precursores de LLA-B (Genescá y col., 2015).

1.3.1.2. Factores de riesgo.

Entre los factores de riesgo se encuentran varios síndromes genéticos, incluyendo el Síndrome de Down y la neurofibromatosis, ambos se asocian con un mayor riesgo en la infancia de LLA y de LMA. Las personas expuestas a radiación

ionizante, tales como sobrevivientes a la bomba atómica, trabajadores en la radiación médica antes 1950, y pacientes con cáncer que reciben un tratamiento de radiación, tienen un mayor riesgo de desarrollar LLA, LMA y LMC. La evidencia de estudios epidemiológicos sugiere que la cantidad de radiación a partir de dos o tres tomografías computarizadas, se asocia con un aumento estadísticamente significativo en el riesgo de cáncer, incluyendo leucemia con mayor riesgo en personas jóvenes. La exposición ocupacional y ambiental al benceno (un producto químico utilizado en la fabricación de pinturas y plásticos, y liberado en la combustión de petróleo y de carbón) es un factor de riesgo establecido para la leucemia en adultos, particularmente LMA. La exposición a pesticidas durante la vida en el útero y en los primeros tres años se ha asociado con un aumento en el riesgo de LLA en infantes. La obesidad también puede aumentar el riesgo. Un estudio de cohorte sugiere que un aumento de 5 kg por m² en el índice de masa corporal se asocia con un aumento relativo del 13% en el riesgo de padecer leucemia. Una malignidad hematológica, en la historia clínica, es también un factor de riesgo para el desarrollo de un subtipo diferente de leucemia más adelante en la vida (Davis y col., 2014).

1.3.1.3. Diagnóstico.

El diagnóstico de leucemia linfoblástica aguda (LLA) integra el estudio de la morfología celular, el inmunofenotipo y la genética/citogenética. Las neoplasias linfoides son clasificadas, de acuerdo a la asignación más reciente de la OMS, en dos categorías principales: neoplasias derivadas de precursores linfoides de linaje B y T, y neoplasias derivadas de células maduras B, T o NK. La primera etapa en la ruta de diagnóstico de LLA es la evaluación morfológica de la médula ósea, de esta manera se establece la diferenciación de la leucemia mieloide aguda (LMA), sin embargo, desde el punto de vista morfológico, no existen criterios reproducibles para distinguir entre LLA de linaje B o T. Por otro lado, el diagnóstico de inmunofenotipo por medio de citometría de flujo de múltiples canales se ha convertido en el procedimiento estándar para el diagnóstico de la LLA y para la subclasificación, además de que se ha desarrollado como herramienta útil para la

detección y el seguimiento de la Enfermedad Mínima Residual (EMR). El diagnóstico inequívoco de LLA-T se basa en la demostración de CD3 en superficie y en citoplasma. La citogenética representa un paso importante en la clasificación de LLA. El estudio de cariotipo convencional puede ser útil en la identificación de translocaciones recurrentes, así como la ganancia y la pérdida de material cromosómico. Los cambios en el cariotipo de LLA incluyen tanto alteraciones numéricas como estructurales y tienen un profundo significado pronóstico (Chiaretti y col., 2014).

De acuerdo con numerosos análisis, un amplio espectro de mutaciones y de reordenamientos afectan a vías esenciales de transducción celular, así como a genes que garantizan el curso apropiado de la hematopoyesis, a oncogenes, a supresores de tumores y a reguladores de la apoptosis. Las lesiones más comunes son: las translocaciones del *loci* del receptor de células T (TCR) en la LLA-T; las mutaciones de los factores de transcripción que regulan el desarrollo y la maduración celular del linaje B en la LLA-B; la interrupción aberrante de genes que codifican para factores de transcripción y coactivadores en la LMA; o la fusión y activación de BCR-ABL1 de múltiples quinasas en la LMC. Estas alteraciones afectan seriamente la función celular (Kęsy y Januszkiewicz, 2015).

1.3.1.4. Tratamiento de LLA.

El tratamiento de la LLA se extiende por lo general de 2 a 2.5 años. Existen 4 componentes mayores que se basan en regímenes de multifármacos para evitar el desarrollo de resistencia. La quimioterapia tendrá diferente intensidad dependiendo del riesgo, con regímenes más intensivos para las enfermedades más agresivas. La mayoría de los fármacos utilizados fueron desarrollados antes de 1970. Sin embargo, su dosis y su frecuencia de administración en quimioterapia combinada se han optimizados en base a las características biológicas de las células leucémicas, la respuesta al tratamiento, y los hallazgos de la farmacodinamia y farmacogenómica del paciente. La terapia directa al Sistema Nervioso Central se administra para prevenir una recaída, provocada por células leucémicas secuestradas en este sitio. El trasplante alogénico de células madre

hematopoyéticas es considerado para los pacientes con riesgo muy alto (Inaba y col., 2013).

Inducción a la remisión es el primer bloque de quimioterapia, durando de 4 a 6 semanas. En esta fase se pretende destruir la mayor parte de las células leucémicas y recuperar la hematopoyesis normal. Se prescriben medicamentos sin mayores efectos a la síntesis de ADN, como vincristina, prednisona y L-asparaginasa, sobre todo en niños, o antracíclicos como la daunorrubicina o mitoxantrona para adultos. Con tratamiento adecuado y cuidado de soporte efectivo, el grado de remisión actual es de 70 a 90% (Ortega y col., 2007).

El siguiente bloque de tratamiento es la consolidación, que pretende erradicar la enfermedad submicroscópica residual, que se mantiene después que se alcanzó la completa remisión, con una duración de aproximadamente 6 a 9 meses. Esta fase de quimioterapia involucra combinaciones de diferentes agentes, para maximizar la sinergia y minimizar la resistencia, generalmente se usan agentes no usados durante la inducción a la remisión, como mercaptopurina, tioguanina, metotrexato, ciclofosfamida, etoposido y citarabina (Cooper y Brown, 2015).

Mantenimiento es el bloque final y el más largo. Es un régimen menos intensivo de quimioterapia, usualmente dura 2 años, se administra de forma ambulatoria y es típicamente asociado con menor toxicidad. La piedra angular de este bloque es la terapia de antimetabolitos con metotrexato y mercaptopurina, ambos en disponibles en formulación oral, destacando que es crucial la adherencia estricta al tratamiento (Cooper y Brown, 2015).

El cuarto componente es directamente dirigido hacia el Sistema Nervioso Central. A pesar de que la remisión de la médula ósea puede ser alcanzada usando quimioterapia sistémica, la mayoría de los niños eventualmente desarrollan recaída en el SNC. Existen diversos métodos de tratamiento incluyendo la administración de quimioterapia intratecal directa, la administración de quimioterapia sistémica capaz de penetrar la barrera hematoencefálica y la radiación intratecal (Inaba y col., 2013).

Los pacientes con LLA-T están incluidos en los protocolos de alto riesgo, y los tratamientos son generalmente los mismos o muy similares a los de LLA-B. No obstante, existen diferencias entre protocolos de tratamiento entre los adultos y los niños, ya que el régimen terapéutico en este último es más intensivo, con una mayor frecuencia de ciclos y concentraciones más altas de citostáticos. En los adultos jóvenes, hay una tendencia a aplicar protocolos pediátricos y se ha observado una mejora global de supervivencia. Sin embargo, la aplicación de estos regímenes terapéuticos sólo es factible en pacientes con un máximo de edad de 45-55 años, ya que si se aplican en pacientes de mayor edad, el aumento de la mortalidad relacionada con el tratamiento neutraliza el efecto positivo del tratamiento. En general, los pacientes adultos con LLA-T y los de criterio de alto riesgo son tratados con quimioterapia seguida de trasplante alogénico de células progenitoras hematopoyéticas (Genescá y col., 2015).

1.3.2. Leucemia mieloide aguda (LMA).

Es una neoplasia hematológica que se caracteriza por un incremento en el número de células mieloides en la médula ósea, acompañado de un bloqueo en su maduración, lo que ocasiona la acumulación excesiva de blastos. De hecho, la presencia de >30% de blastos en médula ósea es un criterio necesario para el diagnóstico definitivo de esta enfermedad. Frecuentemente los pacientes con LMA presentan insuficiencia hematopoyética (granulocitopenia, trombocitopenia o anemia), con o sin leucocitosis (Montesinos y Mayani, 2002).

LMA es la leucemia más común en los adultos, en los niños es una enfermedad rara, representando 15-20% de las leucemias agudas en edad pediátrica, con un pico de incidencia en el periodo neonatal y con una relativa incidencia durante la infancia, incrementándose en el periodo adolescente. Los pacientes con LMA suelen presentar: sangrado, fatiga, infecciones refractarias, o consecuencias clínicas de un recuento muy alto de glóbulos blancos, como son dificultad para respirar, confusión, u otros síntomas de insuficiencia en órganos (Bugá y col., 2014; Showel y Levis, 2014).

1.3.3. Leucemia linfocítica crónica (LLC).

La clasificación de la Organización Mundial de la Salud (OMS) define la LLC como una neoplasia de linfocitos B monomorfos, pequeños y que van de redondeados a ligeramente irregulares presentes en la sangre periférica, médula ósea, bazo y ganglios linfáticos. Se origina a partir de linfocitos B que pueden diferir en la activación, en el estado de maduración o en el subgrupo celular. Es probable que la acumulación de las células leucémicas, se deba a la generación de señales de supervivencia producidas por el medio ambiente externo a través de diversos receptores (de la célula B, de citocinas, etc.) (Hernández y col., 2010).

LLC es el tipo de leucemia diagnosticada más comúnmente en el oeste de Europa y en Norte América, con una tasa de incidencia de 4.2/100 000. LLC es una enfermedad de adultos mayores; la edad media de diagnóstico es de 67-72 años. El inicio de la enfermedad suele ser asintomático; sólo se encuentran anomalías en el hemograma completo como leucocitosis con linfocitosis. En estadios más avanzados suele presentarse linfadenopatía, hepatomegalia/esplenomegalia, infecciones recurrentes, debilidad, palidez, diátesis hemorrágica y en general se observan síntomas tales como fiebre, pérdida de peso y sudores nocturnos (Hus y Roliński, 2015).

1.3.4. Leucemia mieloide crónica (LMC).

Es una enfermedad mieloproliferativa clonal, que se origina en las células troncales hematopoyéticas y que está caracterizada por la presencia del cromosoma Philadelphia y su producto oncogénico BCR-ABL. El cromosoma Ph es un cromosoma 22 acortado, que resulta de la translocación recíproca entre los brazos largos de los cromosomas 9 y 22 [t(9;22)]. Las células troncales leucémicas tienen alteraciones en sus mecanismos de respuesta a los diferentes estímulos provenientes del microambiente hematopoyético (incremento en sus potenciales de proliferación y disminución en sus mecanismos de muerte), lo que provoca que en la médula ósea exista un número incrementado de células troncales leucémicas, mismas que al dividirse y diferenciarse generan grandes números de progenitores y precursores anormales, teniendo como consecuencia final un elevado número de

células sanguíneas circulantes. La incidencia de la LMC en Estados Unidos es de 1 a 1.5 casos por cada 100,000 personas, siendo diagnosticados entre 3,500 y 5,000 nuevos casos por año, lo que provoca que este padecimiento sea 14% de todos los casos diagnosticados con leucemia. La frecuencia de la LMC es baja en personas menores de 40 años, tendiendo a incrementarse exponencialmente con la edad. La edad media al momento del diagnóstico es de 60 años (Chávez y col., 2009).

1.4. Folatos.

Los folatos son vitaminas B9 que sirven como donadores de un carbono en múltiples rutas biosintéticas cruciales, incluyendo la biosíntesis *de novo* de purinas y timidilato, así como en el metabolismo de aminoácidos y reacciones de metilación. Los folatos están compuestos de un anillo de pteridina, ácido p-aminobenzoico (PABA) y un residuo de glutamato. Los folatos pueden encontrarse en su forma oxidada como ácido fólico o naturalmente como folatos reducidos (Figura 2). Los mamíferos carecen de la capacidad enzimática para su síntesis, por lo que deben obtener los folatos de la dieta (Gonen y Assaraf, 2012).

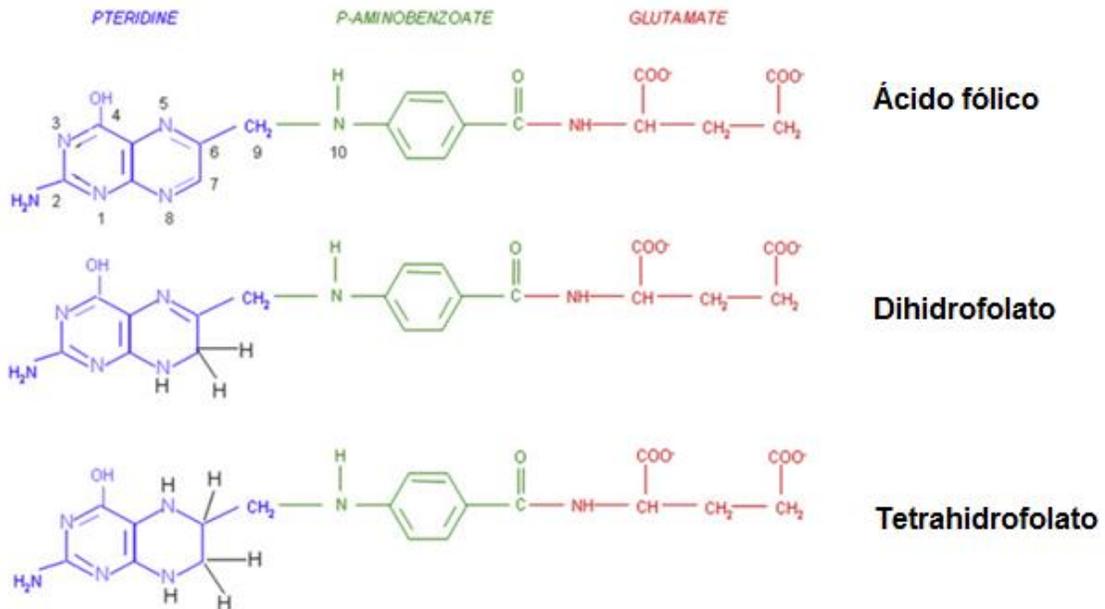


Figura 2. Estructuras químicas de ácido fólico, dihidrofolato y tetrahidrofolato. (Modificado de Visentin y col., 2012).

En la síntesis de metionina y de purinas, la molécula de tetrahidrofolato permanece intacta. Sin embargo, en la síntesis de timidilato, a partir de deoxiuridilato y 5,10-metilen tetrahidrofolato (5,10-metilen THF), este último es oxidado a dihidrofolato (DHF). En las células proliferativas, esta reacción es tan rápida que los cofactores THF rápidamente son convertidos a 5,10-metilen THF, seguida de su oxidación a DHF. La enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) rápidamente reduce DHF a THF para mantener el suministro. En la Figura 3 se muestra en la reacción 1 la síntesis de 5,10-metilen THF a partir de serina y THF, llevada a cabo por la serinametil transferasa; en la reacción 2 ocurre la síntesis de timidilato mediada por la timidilato sintasa, resultando oxidada la fracción de THF a DHF; y en la reacción 3, DHF es reducido a THF por la DHFR, enzima esencial para el mantenimiento del suministro de THF en las células de los mamíferos (Visentin y col., 2012).

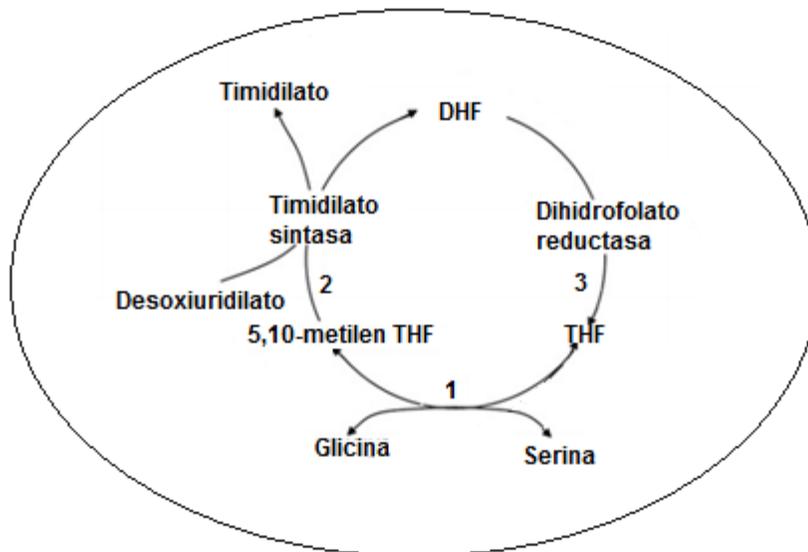


Figura 3. Reacciones folato-dependientes en la célula. (Modificado de Visentin y col., 2012).

1.4.1. Transportadores de folatos/antifolatos.

1.4.1.1. Influjos.

Los cofactores THF están cargados negativamente bajo un pH fisiológico por la ionización de la fracción dicarboxílica del ácido glutámico. Por ello, los folatos no

pueden atravesar la membrana plasmática por difusión pasiva, y necesitan un sistema de transporte para entrar a la célula. Son conocidos tres sistemas de transporte: el transportador de folato reducido (RFC, reduced folate carrier), el cual es un antiporter bidireccional que facilita el intercambio de folatos con fosfatos orgánicos; el transportador de folato acoplado a protón (PCFT, proton-coupled folate transporter), el cual funciona como un symporter unidireccional que co-transporta folatos, junto con protones adentro de la célula; y los receptores de folato (FRs), los cuales son glicoproteínas de membrana con alta afinidad de unión a folatos (Gonen y Assaraf, 2012).

1.4.1.2. Eflujo.

Los folatos y antifolatos también son sustratos de miembros de la familia de proteínas resistentes a multi-fármacos (MRPs, multidrug resistance-associated proteins). Estos exportadores dependientes de ATP oponen los efectos de concentración de RFC o PCFT para suprimir el nivel de los monoglutamatos, que se acumulan dentro de la célula y por consiguiente la formación lenta de los derivados poliglutamatos. Una vez formados los derivados poliglutamatos, ya no son sustrato para la mayoría de estos exportadores (Visentin y col., 2012).

1.4.2. Poliglutamación.

Después de su entrada a la célula, los cofactores THF y los antifolatos sufren una única reacción de metabolismo conocida como folipoliglutamación catalizada por la sintetasa de folipoli- γ -glutamato (FPGS), esta enzima cataliza la adición secuencial de ácido glutámico a la cadena γ -carboxil de los cofactores THF y de los antifolatos que contienen el residuo de glutamato. Este proceso es revertido por la actividad antagonista de la enzima lisosomal γ -glutamil hidrolasa (GGH) (Gonen y Assaraf, 2012).

1.5. Antifolatos.

Los antifolatos fueron la primera clase de antimetabolitos en entrar a la clínica hace 65 años. Estos agentes interrumpen las rutas metabólicas que requieren un carbono, el cual es suministrado por los folatos (vitaminas B9) y sus homólogos.

Algunos tejidos que continuamente se renuevan como la médula ósea y el tracto gastrointestinal son también dependientes de folatos y hay lugares que padecen de toxicidad por los antifolatos, sin embargo, la utilidad clínica de los antifolatos fue establecida con la identificación de las dosis y de la frecuencia de administración, que proveen suficiente selectividad para hacer estos fármacos efectivos en el tratamiento del cáncer y de desórdenes inflamatorios (Visentin y col., 2012).

En un estudio realizado por Sidney Farber en los años 40's (profesor de patología de la Escuela Médica de Harvard y patólogo en jefe del Centro Médico de Niños de Boston) y su grupo de colaboradores administraron ácido fólico de Laboratorios SubbaRow (primeros en sintetizarlo) a 90 pacientes con cáncer en etapa tardía, incluyendo leucemia aguda. Ellos encontraron que el ácido fólico acelera el proceso leucémico, llevando a la muerte repentina en todos los pacientes. Farber infirió que reducir los niveles de ácido fólico podría suprimir la proliferación de células malignas y restaurar la función normal de la médula ósea. El equipo de SubbaRow desarrolló una serie de antifolatos, incluyendo aminopterina, encontrando que este interrumpe el metabolismo de células leucémicas en pollos y ratones (Spain y Kadan, 2012).

De esta manera, la aminopterina, fue el primer antifolato usado en la clínica. Su introducción, reportada por primera vez en la Revista de Medicina de Nueva Inglaterra en junio de 1948, fue bienvenida con mucho entusiasmo, ya que este agente mostró producir, por primera vez, remisiones en niños con LLA. Por su toxicidad impredecible, la aminopterina fue remplazada por metotrexato (MTX) a inicios de los 50's, un antifolato menos potente pero con un índice terapéutico más favorable (Visentin y col., 2012).

1.5.1. Poliglutamables y no poliglutamables.

Décadas después, el descubrimiento de la aminopterina condujo a una nueva generación de antifolatos racionalmente diseñados. Estos antifolatos fueron diseñados para apuntar e inhibir enzimas clave dependientes de folatos, conduciendo a la inhibición de la biosíntesis de nucleótidos y la consecuente

muerte celular. Los antifolatos se pueden dividir en dos principales categorías: poliglutamables y no poliglutamables. Los poliglutamables contienen un residuo de ácido glutámico (Cuadro 1) (Gonen y Assaraf, 2012).

Cuadro 1. Resumen de propiedades de algunos antifolatos. DP= difusión pasiva. (Modificado de Gonen y Assaraf, 2012).

Antifolato	Enzima diana	Poliglutamación	Sistema de transporte	Tratamiento aprobado
Poliglutamables				
Metotrexato	DHFR	+	RFC	+
Pralatrexato	DHFR	+	RFC	+
Lometrexol	GARFT	+	RFC/FR α	-
Raltitrexed	TS	+	RFC/FR α	+
No poliglutamables				
Trimetrexato	DHFR	-	DP	-
Piritrexim	DHFR	-	DP	-
Talotrexin	DHFR	-	RFC	+
Nolatrexed	TS	-	DP	+

1.6. Metotrexato.

Metotrexato (MTX) es un antagonista del ácido fólico, es decir un antifolato, que es poliglutamable y forma parte de las columnas vertebrales en el tratamiento de LLA. Dosis altas de MTX son usadas como parte de la terapia directa al SNC (MTX intratecal), y MTX es esencial para el componente de mantenimiento del tratamiento. Este antifolato es tomado por la célula principalmente por la vía del transportador folato reducido, RFC (Reduced Folate Carrier). Después de su entrada al citoplasma, sufre la poliglutamación, única conversión metabólica catalizada por la sintetasa de folipoli-Y-glutamato (FPGS). Esta poliglutamación asegura la retención intracelular eficiente, además de sostener y mejorar la inhibición de la enzima diana. La principal diana de los poliglutamatos de MTX es la DHFR (también inhibida por los monoglutamatos de MTX), timidilato sintasa (TS) y

algunas enzimas involucradas en la síntesis de purinas. Mientras que la folipoliglutamato hidrolasa (FPGH) contrarresta la poliglutamación, incrementando el eflujo de MTX por los transportadores ABC (Wojtuszkiewicz y col., 2015).

La inhibición de la enzima DHFR por el MTX como consecuencia inhibe la biosíntesis de ADN. La reducción de la síntesis de nucleótidos disminuye la capacidad de reparación del ADN, lo que aumenta la fragilidad del ADN y el número de roturas en la cadena de ADN. Algunos de los mecanismos importantes de resistencia son la amplificación y la sobreexpresión del gen de DHFR, el flujo de salida por los transportadores ABC (MRP1-3), y mutaciones puntuales en el gen de DHFR y en el gen que codifica para la FPGS (Youns y col., 2010).

El Grupo de Oncología Pediátrica (POG), en un ensayo de fase 3, determinó la eficacia de dosis altas de metotrexato (DAM) cuando se añade a la quimioterapia multiagente basada en el régimen de Dana-Farber (Instituto de investigación para el tratamiento de LLA). Los beneficios fueron más notables en pacientes con LLA-T con características adicionales de alto riesgo, específicamente aquellas personas mayores de 10 años de edad, aquellos con un conteo inicial de células blancas de 50 000/L y de sexo masculino. El beneficio de DAM se observó principalmente en la disminución del número de recaídas únicamente en el SNC, no ósea ni de otros sitios. Este estudio demuestra la viabilidad y los beneficios de la adición de 4 ciclos de DAM a un régimen de quimioterapia multiagente. DAM han demostrado beneficiar significativamente a los pacientes con la enfermedad de linaje T, eliminando el pronóstico negativo del linaje T, frente al linaje B (Asselin y col., 2011).

Cada vez hay más evidencia del valor terapéutico de regímenes de dosis altas de quimioterapia. Sin embargo, dichos regímenes son limitados por la toxicidad hacia los tejidos normales del huésped. Metotrexato es uno de los fármacos antineoplásicos más comúnmente usados y ha demostrado causar lesiones estructurales y funcionales al tracto gastrointestinal, manifestado clínicamente como enterocolitis severa (Rubio y col., 1998).

2. HIPÓTESIS.

La combinación de metotrexato y ácido glutámico disminuye la proliferación de células (Jurkat) de Leucemia Linfoblástica Aguda Tipo T.

3. OBJETIVOS.

3.1. General.

- Evaluar el efecto de la combinación de metotrexato y ácido glutámico en el tratamiento de células (Jurkat) de Leucemia Linfoblástica Aguda Tipo T.

3.2. Específicos.

- Realizar curvas concentración-respuesta de metotrexato para establecer la CI_{50} de la línea celular Jurkat.
- Evaluar la viabilidad por efecto de la combinación de metotrexato y ácido glutámico en la viabilidad en células Jurkat.
- Explorar el efecto apoptótico de metotrexato y metotrexato + ácido glutámico en células Jurkat.

4. METODOLOGÍA.

4.1. Materiales.

- Cajas Petri
- Cajas multiplaca para cultivo de 4 x 3 pozos
- Cámara de Neubauer
- Filtros para jeringa 0.2 µm
- Jeringas desechables 20 mL
- Pipetas serológicas desechables 10 mL
- Pipetas graduadas de 1 mL y 10 mL
- Micropipetas 10-500 µL
- Matraz aforado de 10 mL
- Microespátula
- Criotubos
- Tubos *Falcon* de 10 mL y 50 mL
- Tubos para citómetro de flujo de 1 mL

4.2. Material biológico.

- Línea celular Jurkat

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

4.3. Reactivos.

- Alcohol desnaturalizado al 70%
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- L-ácido glutámico
- Medio RPMI-1640
- Metotrexato
- Solución azul de tripano al 0.04% en PBS
- Solución buffer de sales de fosfatos (PBS) 10X

- Solución penicilina/estreptomicina/fungizona (10 000 UI/mL/ 10 000 µg/mL/ 10 000 UI/mL)
- Suero fetal bovino
- Anexina V
- Yoduro de propidio
- Buffer de unión a anexina

4.4. Equipos.

- Baño de agua StovallLifeScience
- Campana de flujo laminar Clase II LABCONCO Delta Series Δ
- Centrifuga Allegra™ 64R-Beckman Coulter™
- Incubadora CO₂Lab-Line
- Microscopio invertido Axioskop 2 *plus* ZEISS
- Citómetro de flujo BD *FACSVerse*™
- Microscopio óptico Axiostar plus

4.5. Métodos.

4.5.1. Cultivo celular.

El cultivo y mantenimiento de la línea celular Jurkat se realizó en medio RPMI-1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de una mezcla de antibióticos y fungicida (penicilina-estreptomicina-fungizona) en una incubadora humidificada a 37°C en una atmósfera de CO₂ al 5%. 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 1×10^5 ó 1×10^6 células viables/mL.

Se determinó la viabilidad celular por el ensayo azul de tripano, para lo cual se sembraron 2.5×10^5 células por pozo en placas de 12 pozos, y se procedió de acuerdo a Altman y colaboradores (1993).

4.5.2. Curvas concentración-respuesta de MTX.

Se establecieron cultivos de la línea celular Jurkat con 2.5×10^5 células y se permitió que crecieran sin interrupción por 24 horas. Transcurrido el tiempo, las células fueron expuestas al tratamiento con metotrexato por 24 horas y se determinó la viabilidad celular por el ensayo azul de tripano. Cada experimento se realizó por triplicado.

Para asegurar que la curva dosis-respuesta tuviera un comportamiento sigmoideo, las dosis de metotrexato a ensayar estuvo en el rango de 0.1 a $100\mu\text{M}$ (Norris y Adamson, 2010).

La CI_{50} corresponde a la concentración de MTX a la cual se genera una inhibición del crecimiento celular de un 50% (Beesley y col., 2007).

4.5.3. Evaluación del efecto de metotrexato y ácido glutámico en el tratamiento de células Jurkat.

Se establecieron cultivos de la línea celular Jurkat con 2.5×10^5 células y se permitió que crecieran sin interrupción por 24 horas. Transcurrido el tiempo, las células fueron expuestas al tratamiento con metotrexato (a la CI_{50} establecida) y con ácido glutámico 10 ó 20 mM por 24 horas. Se determinó la viabilidad celular por el ensayo azul de tripano; cada experimento se realizará por triplicado.

4.5.4. Evaluación del efecto apoptótico de metotrexato y ácido glutámico en células Jurkat por Anexina V – PI.

Se sembraron 12 pozos con 2.5×10^5 de células viables y se dejaron crecer en la incubadora durante 24 horas. Se establecieron cuatro grupos, el primero sin tratamiento, el segundo expuesto a MTX CI_{50} , el tercero MTX CI_{50} más ácido glutámico 10mM, y el cuarto MTX CI_{50} más ácido glutámico 20 mM, y se dejaron en esas condiciones por 24 horas en la incubadora. La apoptosis fue evaluada con la tinción de Anexina V – PI (BD Pharmingen, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II). El porcentaje de células apoptóticas será determinado por citometría de flujo.

5. RESULTADOS.

5.1. CI_{50} metotrexato.

Con el objetivo de determinar la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de metotrexato, la cual fue empleada en experimentos sucesivos, nueve concentraciones del fármaco (comprendidas en un rango de 0.1-100 μ M) fueron evaluadas en la línea celular Jurkat durante 24 horas y posteriormente se evaluó proliferación celular a cada concentración ensayada.

La proliferación celular fue expresada como un porcentaje de la respuesta observada en un grupo control de células no tratadas.

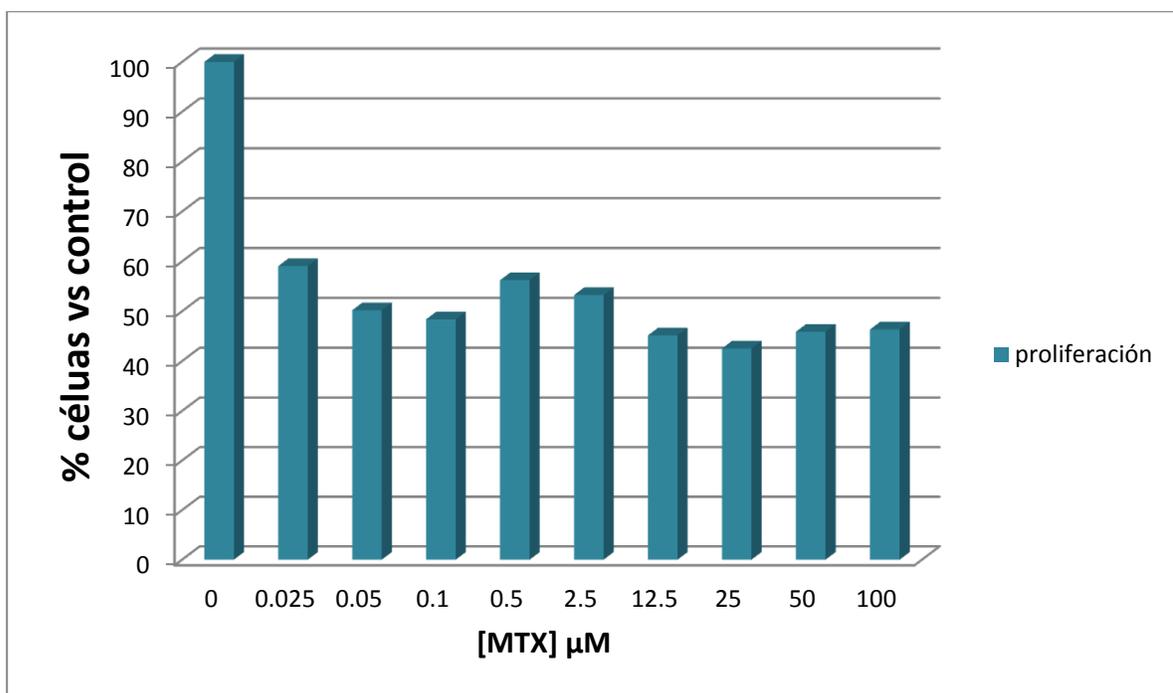


Figura 4. Gráfico concentración-respuesta de metotrexato para la línea celular Jurkat.

En este caso la CI_{50} de MTX para la línea celular Jurkat es 5.667 μ M. Los datos se muestran como la media de 3 repeticiones de cada concentración y son representativos de tres conjuntos independientes de experimentos.

5.2. Efecto de metotrexato y ácido glutámico.

Con el objetivo de determinar el efecto de la combinación de metotrexato y ácido glutámico en la línea celular Jurkat (LLA-T), éstas fueron tratadas simultáneamente con la CI_{50} de MTX ($5.667\mu M$) y ácido glutámico (GLU) 10 ó 20 mM. La proliferación celular fue evaluada por el ensayo de exclusión azul tripano después de 24 h de tratamiento.

Como se muestra en la Figura 5, la concentración inhibitoria media de MTX generó una reducción en la proliferación celular del 52.81% al comparar con el grupo control, un valor similar (57.68%) se obtuvo cuando las células fueron tratadas con CI_{50} + GLU 10 mM, lo cual no fue estadísticamente diferente. Sin embargo, el tratamiento combinado CI_{50} + GLU 20 mM disminuyó la proliferación celular significativamente ($P < 0.05$) en un 19.45% en comparación a las células que fueron expuestas únicamente a la CI_{50} de MTX. Un grupo de células fue tratado solamente con ácido glutámico 20 mM para descartar que tuviera efectos citotóxicos por sí mismo sobre las células leucémicas. Como se puede observar en la Figura 5, el ácido glutámico al ser utilizado como agente único de tratamiento no tiene efecto citotóxico.

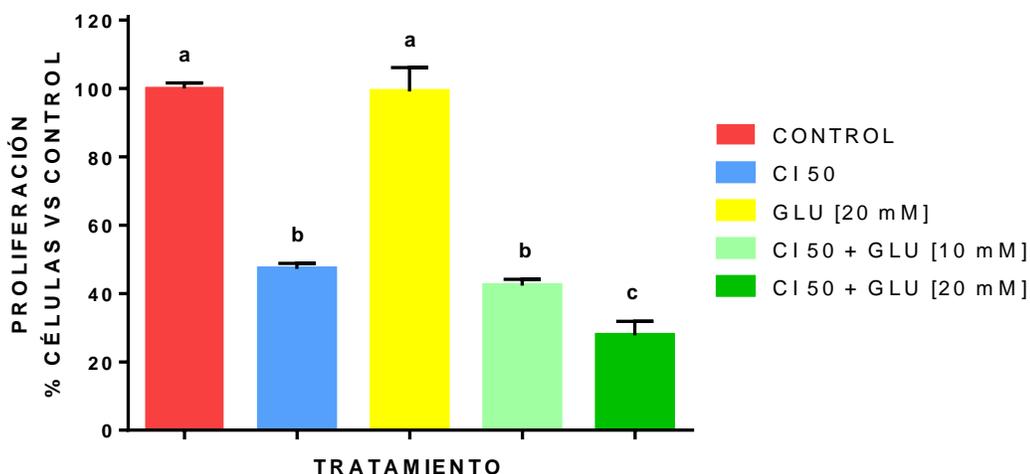


Figura 5. Efecto de metotrexato y ácido glutámico en la proliferación de la línea celular Jurkat. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

5.3. Efecto apoptótico de metotrexato y ácido glutámico.

Con el objetivo de determinar el efecto apoptótico de MTX y ácido glutámico en la línea celular Jurkat, se utilizó el ensayo de Anexina V-Ioduro de propidio después de 24 horas de tratamiento.

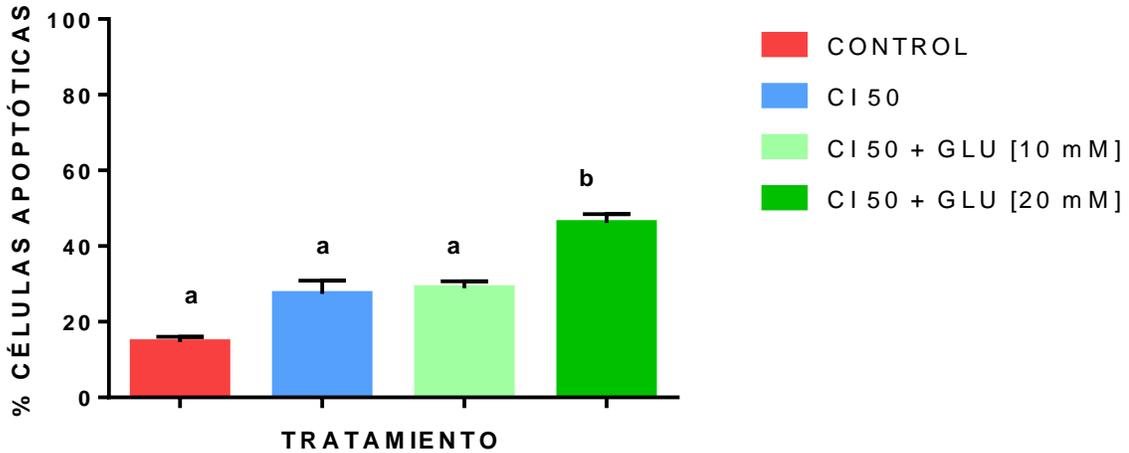


Figura 6. Efecto apoptótico de metotrexato y ácido glutámico de la línea celular Jurkat. Letras minúsculas diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos ($P < 0.05$).

En la Figura 6 se observa que el grupo tratado con CI_{50} de MTX generó un 27.36% de células apoptóticas con respecto al total de eventos (10 000) adquiridos en el citómetro de flujo, valor similar (28.88%) al obtenido con CI_{50} de MTX más ácido glutámico 10 mM, mientras que la CI_{50} más la concentración 20 mM resultó con un 46.15% de células apoptóticas, que es significativamente diferente al grupo control (14.59%) y a los demás.

La Figura 7 muestra diagramas representativos (Dotplots) de los ensayos de citometría de flujo que se realizaron con el objetivo de evaluar el efecto apoptótico de MTX y GLU. En el cuadrante inferior izquierdo se localizan las células viables, negativas tanto a Anexina V como a Ioduro de propidio (IP); en el cuadrante inferior derecho se hallan las células en apoptosis temprana, positivas únicamente a

Anexina V; en el cuadrante superior izquierdo se localizan las células necróticas, positivas solamente a IP; y en el cuadrante superior derecho se hallan las células en apoptosis tardía, positivas tanto para Anexina V como para PI.

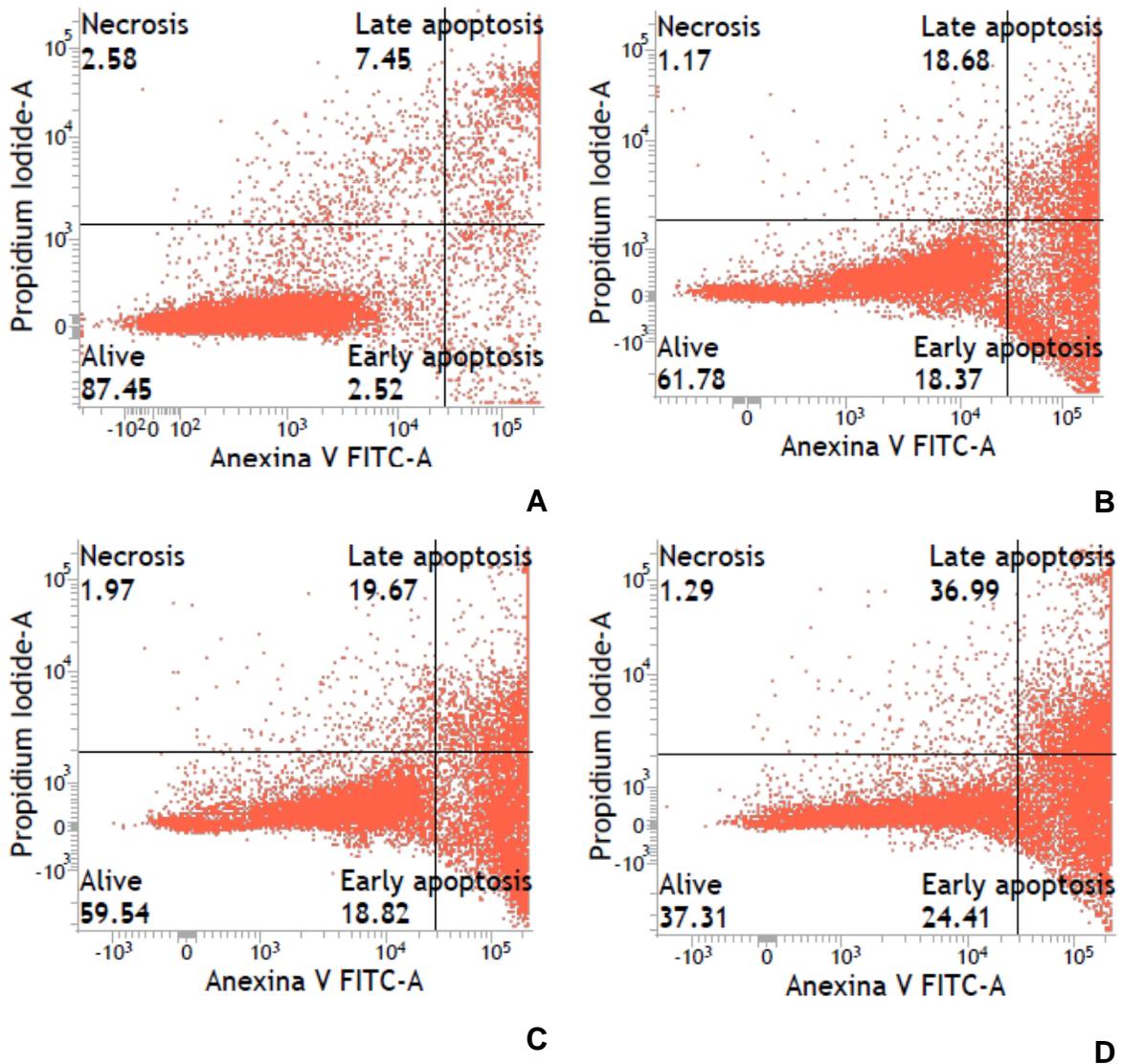


Figura 7. Diagrama de puntos decélulas Jurkat en apoptosis. A, Control. B, MTX Cl_{50} . C, MTX Cl_{50} + GLU 10 mM. D, MTX Cl_{50} + GLU 20 mM.

7. DISCUSIÓN.

Los datos obtenidos en el presente estudio indican una concentración inhibitoria media de metotrexato de 5.667 μM para la línea celular Jurkat de Leucemia Linfoblástica Aguda tipo T (LLA-T), por su parte Youns y colaboradores en el 2010 determinaron la CI_{50} de MTX en cinco líneas celulares de LLA-T incluida la línea celular Jurkat, obteniendo un valor de 0.0115 μM , el cual resulta mucho menor comparado con el que se obtuvo en este trabajo, sin embargo, esta diferencia puede atribuirse a la variación existente entre el tiempo de exposición al tratamiento en ambos ensayos, en el estudio antes citado, no se menciona este tiempo, además de que la CI_{50} fue determinada con el ensayo XTT, que se fundamenta en la conversión de una sal de tetrasolio por las deshidrogenasas a un producto anaranjado (derivado de formazan), siendo la cantidad de este colorante acorde al número de células metabólicamente activas.

Después de determinar la concentración inhibitoria media de MTX en la línea celular Jurkat, se procedió a probar ésta junto con ácido glutámico 10 y 20 mM, resultando una disminución significativa en la inhibición celular con la concentración de ácido glutámico 20 mM, que podría deberse a que la enzima foli-Y-glutamato sintasa, responsable de la adición secuencial de unidades de ácido glutámico a los antifolatos, cuenta con el suministro suficiente para llevar a cabo más reacciones de poliglutamación, reacción que impide que los poliglutamatos salgan de la célula por difusión pasiva, además de que los poliglutamatos de cadena larga (más de 3) ya no son sustrato de los transportadores de eflujo, así mismo está bien establecido que los poliglutamatos son mejores sustratos que los monoglutamatos a las enzimas folato dependientes (Gonen y Assaraf, 2012).

Es posible que la concentración 10 mM de ácido glutámico no sea suficiente para crear los poliglutamatos de MTX necesarios para inhibir las enzimas diana como son la DHFR, timidilato sintasa y algunas enzimas involucradas en la síntesis de purinas, las cuales, de acuerdo a Galpin y colaboradores son sintetizadas en mayor

cantidad como mecanismo de resistencia en la Leucemia linfoblástica aguda tipo T (Wojtuszkiewicz y col., 2015).

Una vez demostrada la inhibición de la proliferación celular de la combinación de MTX y ácido glutámico, se procedió a determinar el efecto apoptótico de este tratamiento por medio de citometría de flujo haciendo uso del ensayo de Anexina V-Ioduro de propidio. En las células apoptóticas la fosfatidilserina, un fosfolípido de membrana, se transloca del interior al exterior, exponiendo a la fosfatidilserina al ambiente extracelular. La Anexina V es una proteína dependiente de calcio con afinidad a este fosfolípido, lo cual permite determinar la apoptosis en sus etapas tempranas, debido a que la membrana celular aún se encuentra íntegra; el Ioduro de propidio, por su parte, ingresa a la célula cuando la membrana ya está dañada, y se intercala en las bases del DNA con poca o ninguna preferencia, con una estequiometría de una molécula de Ioduro de propidio por cada 4 a 5 pares de bases de DNA (Nagata y col., 2016). En este trabajo, un grupo de células fue tratado con la CI_{50} de MTX, mientras que otros dos fueron tratados con la CI_{50} de MTX junto con ácido glutámico 10 y 20 mM respectivamente, por 24 horas, posteriormente se llevó a cabo el ensayo de apoptosis. Los resultados coincidieron con la inhibición en la proliferación celular que produjo cada grupo de tratamiento, ya que se observó mayor porcentaje de células apoptóticas en los grupos tratados, siendo la diferencia significativa solo entre el grupo de CI_{50} de MTX más ácido glutámico 20 mM y los demás grupos. Para desentrañar el proceso apoptótico producido por cuatro fármacos anticancerígenos, Huschtscha y colaboradores examinaron, en una línea celular de LLA-T (CCRF-CEM.f2), el patrón de degradación de DNA, la morfología celular y un perfil por citometría de flujo, observando que las perturbaciones del ciclo celular preceden a otras características apoptóticas, sin embargo, 5-fluorouracilo indujo apoptosis morfológica sin escisión de ADN, con lo cual se puede explicar que el grupo de CI_{50} de MTX más ácido glutámico 10 mM produjo apoptosis pero no significativamente diferente al grupo control (Huschtscha y col., 1996).

8. CONCLUSIONES.

1. Se estableció en el laboratorio la CI_{50} de MTX para la línea celular Jurkat resultando de 5.63 μ M.
2. La combinación de la CI_{50} de MTX y ácido glutámico a concentración 20 mM ejerce un efecto significativo mayor en la inhibición de la proliferación celular de la línea celular Jurkat en comparación con la CI_{50} de MTX.
3. El efecto apoptótico de MTX y ácido glutámico coincide con los resultados de inhibición de proliferación celular.

9. REFERENCIAS.

Al-Drees, M y col. (2015) Making Blood: The Haematopoietic Niche throughout Ontogeny. *Stem Cells International*. 2015, 1-14.

Altman, S., Randers, L. y Rao, G. (1993) Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnol.Prog.* 9, 671-674.

Asselin B y col. (2011) Effectiveness of high-dose methotrexate in T-cell lymphoblastic leukemia and advanced-stage lymphoblastic lymphoma: a randomized study by the Children's Oncology Group (POG 9404). *Blood*. 118 (4), 874-883.

Barredo J y col. (1994) Differences in Constitutive and Post-Methotrexate Folylpolyglutamate Synthetase Activity in B-Lineage and T-Lineage Leukemia. *Blood*. 84 (2), 564-569.

Beesley, A y col. (2007) In vitro cytotoxicity of nelarabine, clofarabine and flavopiridol in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *British Journal of Haematology*. 137, 109-116.

Buga C, Glúck A y Arion C. (2014) Actual biological diagnosis of acute myeloblastic leukemia in children. *Journal of Medicine and Life*. 7 (2), 291-295.

Chávez M, Ayala M y Mayani H. (2009) La leucemia mieloide crónica en el siglo XXI: biología y tratamiento. *Revista de Investigación Clínica*. 61 (3), 221-232.

Cooper, S. L. & Brown, P. A. (2015). Treatment of Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Pediatric Clinics of North America*, 62 (1), 61-73.

Chiaretti S, Gina Zini G y Bassan R. (2014) Diagnosis and Subclassification of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases*. 6(1).

Davis S, Viera A & Mead M. (2014) Leukemia: An Overview for Primary Care. *American Family Physician*. 29 (9), 731-738.

Galpin A y col. (1997) Differences in Folypolyglutamate Synthetase and Dihydrofolate Reductase Expression in Human B-Lineage versus T-Lineage Leukemic Lymphoblasts: Mechanisms for Lineage Differences in Methotrexate Polyglutamylation and Cytotoxicity. *MOLECULAR PHARMACOLOGY*. 52, 155–163.

Genescà E, Ribera J & Ribera JM.(2015) Acute lymphoblastic leukemia of T progenitors: From biology to clinics. *Medicina Clínica*. 144(5), 223–229.

Gonen N y Assaraf Y. (2012) Antifolates in cancer therapy: Structure, activity and mechanisms of drug resistance. *Drug Resistance Updates*. 15, 183-210.

Hernández JA, González M y Hernández JM. (2010) Leucemia linfática crónica. *Medicina Clínica*. 135 (4), 172-178.

Hus I y Roliński J. (2015) Current concepts in diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Contemporary Oncology*. 19 (5), 361-367.

Huschtscha Li y col. (1996) Characteristics of cancer cell death after exposure to cytotoxic drugs invitro. *British Journal of Cancer*. 73, 54-60.

Inaba H, Greaves M y Mullighan C. (2013) Acute lymphoblastic leukaemia. *National Institute of Health*. 381(9881), 1-27.

Kęsy J y Januszkiewicz D. (2015) Genes and childhood leukemia. *Postepy Hig Med Dosw*. 69, 302-308.

Leonard, B. (1998). *Leukemia: A Research Report*. United States of America: *DIANE Publishing*.

Li X.-L. y col. (2015) Hematopoietic stem cells: cancer involvement and myeloid leukemia. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*. 19, 1829-1836.

- Lustosa**, D. W., Valdeci, F., Cavalcante, F. & Vinicios, M. (2015). Acute lymphoblastic leukemia in children and adolescents: prognostic factors and analysis of survival. *Brazilian Journal of Hematology and Hemotherapy*, 29(58), 1-7.
- Montesinos J** y Mayani H. (2002) Nuevos conceptos en la biología de la leucemia mieloide aguda. *Gaceta Médica de México*. 138 (1), 67-76.
- Nagata**, S y col. (2016) Exposure of phosphatidylserine on the cell surface. *Cell Death and Differentiation*. 23, 952–961.
- Norris**, R. y Adamson, P. (2010) Clinical potency of methotrexate, aminopterin, talotrexin and pemetrexed in childhood leukemias. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 65, 1125-1130.
- Ortega**, M. A., Osnaya, M. L. & Rosas, J. V. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de México*, 23 (1), 26-33.
- Rivera L** y col. (2014) Descriptive Epidemiology in Mexican children with cancer under an open national public health insurance program. *Biomed Central Cancer*. 14 (790) 1-8.
- Rubio**, I. T., Cao, Y., Hutchins, L. F., Westbrook, K. C. & Klimberg, S. (1998). Effect of Glutamine on Methotrexate Efficacy and Toxicity. *Annals of Surger*. 227 (5), 772-780.
- Showel M** y Levis M. (2014) Advances in treating acute myeloid leukemia. *F1000Prime Reports*. 96 (6), 1-9.
- Spain P** y Kadan N. (2012) Observations of unprecedented remissions following novel treatment for acute leukemia in children in 1948. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 105, 177-181.
- Visentin M**, Zhao R y Goldman D. (2012) *The Antifolates*. *Hematol Oncol Clin N Am*. 26, 629-648.

Wojtuszkiewicz, A., Peters, G. J., Woerden, N. L., Dubbelman, B., Escherich, G., Schmiegelow, K., Sonneveld, E., Pieters, R., Ven, P. M., Jansen, G., Assaraf, Y. G., Kaspers, G. J. & Cloos, J. (2015). Methotrexate resistance in relation to treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Journal of Hematology & Oncology*, 8 (61), 1-13.

Youns M y col. (2010) Sensitivity and resistance towards isoliquiritigenin, doxorubicin and methotrexate in T cell acute lymphoblastic leukaemia cell lines by pharmacogenomics. *NaunynSchmiedebergs Archives of Pharmacology*. 382, 221-234.