

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO APOPTÓTICO DEL PÉPTIDO
O1P4BAD EN CÉLULAS JURKAT DE LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA Y PBMC”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ANA MAYRA RESENDIZ CORONA

DIRIGIDA POR

Dra. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2024

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciante no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciante.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO

FACULTAD DE QUÍMICA

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO APOPTÓTICO DEL PÉPTIDO
O1P4BAD EN CÉLULAS JURKAT DE LEUCEMIA
LINFOBLÁSTICA AGUDA Y PBMC”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIOLÓGO

PRESENTA

ANA MAYRA RESENDIZ CORONA

DIRIGIDA POR

DRA. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO

SINODALES

Dra. ALICIA IRASEMA MENDIETA TREJO

DIRECTORA

Dr. EDGARDO BECERRA BECERRA

SINODAL

Dra. MARIA GUADALUPE GARCIA ALCOCER

SINODAL

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODAL

DEDICATORIA

A mis padres, Maribel e Isidro,

a mis sobrinas Ari y Ani, a mi hermana Violeta, a mis hermanos, mi cuñada y a todos aquellos que estuvieron a mi lado en este camino.

Gracias por su apoyo incondicional, por creer en mí y por enseñarme a hacerlo también.

AGRADECIMIENTOS

A la doctora Lupita, por su invaluable guía, su paciencia y su apoyo incondicional en cada adversidad. Gracias por enseñarme a creer en mí misma, en mis habilidades y por ayudarme a siempre sacar lo mejor de mí. La quiero y admiro enormemente.

A la doctora Irasema, por su apoyo constante, su paciencia, su acompañamiento y la amistad que me ha brindado. Le expreso mi más sincera admiración, cariño y respeto.

Al doctor Edgardo, por su infinita paciencia al explicarme con claridad y por estar siempre dispuesto a atender mis mensajes de auxilio cuando algo se me dificultaba. Agradezco profundamente las valiosas observaciones que me brindó a lo largo de este camino. Toda mi admiración, aprecio y respeto.

A la doctora Laura, por estar siempre atenta a mi bienestar y brindarme su apoyo incondicional. La admiro, respeto y aprecio mucho.

A Dulce, por las minuciosas revisiones de mi tesis, por tus valiosos consejos y tu apoyo en la redacción, así como por todas las técnicas y enseñanzas que generosamente compartiste conmigo. Pero, sobre todo, agradezco la gran amistad que me has brindado. Te quiero y te admiro.

A mis padres, Maribel e Isidro, por su apoyo incondicional, por creer siempre en mí y en mi potencial, por estar a mi lado en cada nueva aventura que emprendía, y, sobre todo, por inspirarme con su fortaleza y perseverancia a ser mejor cada día. Sin ustedes, nada de esto habría sido posible. Los quiero y admiro profundamente.

A mi hermana Violeta, por estar siempre a mi lado, por tu apoyo incondicional, por creer en mí y enseñarme a hacerlo también. Sin ti y sin tu apoyo, no habría podido lograrlo. Gracias por inspirarme constantemente y por nunca dejarme sola. Te quiero y te admiro muchísimo.

A mis amigos, a Sebastián, por los valiosos consejos y toda la ayuda que me brindaste para mi tesis. A Vale y Xime, por acompañarme durante horas en el laboratorio y siempre brindarme su apoyo incondicional. Muchas gracias por estar siempre a mi lado y por creer en mí. Los quiero muchísimo, hicieron que mi vida universitaria fuera mucho más feliz.

A mi novio, Juan Jesús, por acompañarme y ayudarme en mis interminables conteos de células, por tu cariño y paciencia, y por creer siempre en mí y recordarme siempre lo capaz que soy. Te quiero muchísimo.

A la doctora Rosalía, por su entrega y dedicación en sus clases, que no solo me hicieron enamorarme de la ciencia, sino que también me impulsaron a emprender el camino de la tesis.

A mis amigos Esbeydi, Desilos, Diego, Emmanuel y a mis compañeros del laboratorio de Biología Molecular, por su apoyo incondicional, por enseñarme, inspirarme y estar siempre a mi lado. A Andrés, por motivarme a comenzar esta aventura de la tesis y por creer en mí en todo momento.

Muchas gracias a todos por ser parte de esta aventura. Ha sido un placer compartir este camino con ustedes.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE FIGURAS.....	iii
ABREVIACIONES	iv
RESUMEN.....	v
INTRODUCCIÓN.....	1
I. ANTECEDENTES	3
I.1. Cáncer.....	3
I.2. Carcinogénesis.....	4
I.3. Hematopoyesis.....	7
I.4. Leucemia.....	9
I.5. Leucemia linfoblástica aguda	10
I.7. Tratamientos.....	12
I.8. Tratamientos con péptidos	14
II. JUSTIFICACIÓN	17
III. HIPÓTESIS.....	19
IV. OBJETIVOS.....	20
IV.1. General.....	20
IV.2. Específicos	20
V. METODOLOGÍA	21
V.1. Desarrollo experimental.....	21
V.1.1. Cultivo de células Jurkat	21
V.1.2. Péptido y Vincristina	21
V.1.3. IC ₅₀ del péptido O1P4Bad en células Jurkat.....	22

V.1.4.	Cultivo de células PBMC	22
V.1.5.	IC ₅₀ del péptido O1P4Bad sobre las células PMBC	23
V.1.6.	Análisis estadístico	23
V.1.7.	Manejo de RPBI.....	24
VI.	RESULTADOS.....	25
VI.1.	Proliferación de las células Jurkat	25
VI.2.	Determinación de la concentración inhibitoria media (IC50) del péptido O1P4Bad en las células Jurkat.....	25
VI.3.	Citotoxicidad del péptido O1P4Bad sobre las células PBMC	28
VII.	DISCUSIÓN	30
VIII.	CONCLUSIONES	33
IX.	BIBLIOGRAFÍA	34
X.	ANEXOS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1.....	4
Figura 2.....	6
Figura 3.....	8
Figura 4.....	25
Figura 6.....	27
Figura 7.....	28
Figura 8.....	29
Figura 9.....	47

ABREVIACIONES

LLA - Leucemia linfoblástica aguda

LLA-T - Leucemia linfoblástica aguda tipo T

CML - Células madre Linfoides

SFB - Suero fetal bovino

PBS - Tampón de fosfato salino

RPMI – Medio de cultivo del Roswell Park Memorial Institute, por sus siglas en inglés

°C - Grados Celsius

μM – Micromolar

μL – Microlitros

RFU – Unidades relativas de Fluorescencia

RESUMEN

El cáncer es una familia de enfermedades en la cual las células sanas sufren uno o múltiples daños genéticos que las convierte en células cancerígenas, con una amplia capacidad de dividirse y expandirse por el cuerpo, generando tumores o leucemias. Las leucemias son de las principales causas de muerte infantil en México, particularmente la leucemia linfocítica, dentro de la cual se encuentra la leucemia linfoblástica aguda tipo T que, aunque es poco frecuente, es de gran interés debido a que es un subtipo complejo y heterogéneo a nivel genético, además posee pocas alternativas terapéuticas nuevas. Actualmente se utilizan los quimioterapéuticos convencionales, como es el caso de la vincristina, asociada a efectos adversos como el daño neuronal y las afecciones en el sistema nervioso periférico. Debido al desafío clínico que representa la leucemia linfoblástica aguda tipo T (LLA-T) se tiene la oportunidad de desarrollar terapias dirigidas más específicas para esta, como es el caso del péptido O1P4Bad, diseñado para interactuar con Bcl-2 y promover la apoptosis. Es por esto, que en este trabajo de investigación se estudió el efecto citotóxico del péptido mencionado comparándolo con el efecto citotóxico inducido por la vincristina tanto en células de leucemia linfoblástica aguda tipo T (Jurkat) y en células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

INTRODUCCIÓN

La palabra cáncer hace referencia a una familia de enfermedades caracterizadas por la proliferación descontrolada de células que sufrieron un daño genético. Esta enfermedad representa un problema de salud a nivel mundial que evita el aumento de la esperanza de vida de la población, debido a su prevalencia.

El análisis epidemiológico del cáncer en México mostró que uno de los principales tipos de cáncer que se presentan en la población mexicana son las leucemias, este tipo de cáncer es el cáncer de las células sanguíneas que se nombra según la estirpe celular afectada, la mielóide o linfoide; así como, de acuerdo con su evolución que puede ser lenta (crónica) o de forma rápida (aguda).

Las leucemias son de las principales causas de muerte infantil en México, particularmente la leucemia linfoide, que tiene como subtipos la leucemia linfoblástica aguda de tipo T (LLA-T) derivada de progenitores tempranos de células T. Esta leucemia resulta de gran interés ya que es un subtipo complejo y heterogéneo a nivel genético, además tiene pocas alternativas innovadoras para su tratamiento.

En la actualidad se utilizan quimioterapéuticos convencionales con una efectividad del 40 %, como la vincristina, sin embargo, ha sido asociado efectos adversos como el daño neuronal y afecciones en el sistema nervioso periférico.

El desafío clínico que representa la LLA-T, nos permite desarrollar terapias dirigidas más específicas como el uso de péptidos. Los péptidos han demostrado ser promisorios para la inmunoterapia contra el cáncer, también pueden ser dirigidos para favorecer o inhibir procesos celulares específicos con actividad terapéutica, utilizando blancos muy específicos como algunos sitios de escisión o proteínas transportadoras.

En este trabajo de investigación se estudió el efecto citotóxico del péptido O1P4Bad, diseñado previamente por nuestro grupo de trabajo para inhibir a Bcl-2 y promover la apoptosis de las células tumorales. Utilizamos como modelo de estudio las células humanas de leucemia linfoblástica aguda tipo T (Jurkat) y el cultivo primario de

células mononucleares de sangre periférica (PBMC), para exponerlas a diferentes concentraciones (1,10,50,100 y 200 μM) del péptido O1P4Bad y posteriormente compararlo con el efecto citotóxico que tiene el quimioterapéutico convencional Vincristina (en una concentración de 10 μM) sobre estas mismas líneas celulares.

El objetivo de este trabajo es evaluar la actividad citotóxica del péptido y brindarnos respuestas de un posible tratamiento innovador sobre la leucemia linfoblástica aguda.

I. ANTECEDENTES

I.1. Cáncer

El cáncer es un conjunto de enfermedades capaces de originarse en cualquier órgano o tejido del cuerpo cuando células anormales se desarrollan de manera descontrolada, exceden los límites habituales e invaden tejidos u órganos vecinos a donde se originaron (Organización Mundial de la Salud, 2024).

De acuerdo con el Instituto Nacional de Salud Pública, en México, el cáncer infantil es la principal causa de muerte infantil entre los 5 a 14 años y la sexta en infantes menores de 5 años, representa cerca del 70 % de la carga total de cáncer en estos grupos de edad. Fueron registradas 847,716 defunciones en 2022, de las cuales un 10.6 % fueron a causa de tumores malignos. Con estos datos fue posible observar que de los principales tipos de cáncer que afectaron a los grupos de edad entre 0 a 19 años fue la leucemia (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2024).

La principal causa de defunción por tipo de cáncer fue la leucemia entre las edades de 20 a 29 años. En hombres hay una tasa de 2.69 por cada 100 mil y en mujeres de 1.84 por cada 100 mil (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2024).

La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más común en niños y adolescentes mexicanos. Un 75 % de los pacientes que padecen leucemia, menores a 20 años fueron diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda, aproximadamente un 85 % a 90 % de las leucemias linfoblásticas agudas pertenecen al tipo B, sólo un 10% a 15 % al T. Sin embargo, aquellos pacientes que presentan al fenotipo de las células T tienen una asociación a malos pronósticos clínicos, ya que se considera compleja, lo cual se podría adjudicar a su heterogeneidad y a los diversos subtipos que tiene. La LLA B responde mejor al tratamiento que la LLA T, por ello la leucemia linfoblástica aguda tipo T necesita de tratamientos de quimioterapia intensificados (Dorantes-Acosta E., y col., 2013; Jiménez-Morales S., y col.,2018).

I.2. Carcinogénesis

El cáncer es definido como una familia de enfermedades en la que algunas células del cuerpo sufren un daño genético, convirtiéndolas en células cancerígenas con características de supervivencia mejorada, un crecimiento progresivo, con facilidad de migración e invasión (Figura 1). El cáncer es originado por mutaciones iniciadoras que promueven el crecimiento y esparcimiento de las células por medio de la activación de vías de señalización implicadas en la proliferación y supervivencia, además de la inhibición de puntos de control del ciclo celular (Puente y de Velasco, 2019; Rivas y col., 2022).

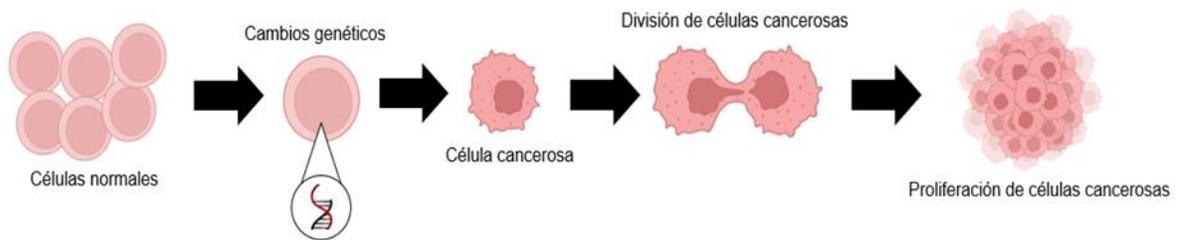


Figura 1. Desarrollo y progresión del cáncer (Adaptado de Puente y de Velasco, 2019).

Dentro de las posibles causas del desarrollo de cáncer, se encuentran los cambios en los genes encargados del funcionamiento de las células (sobreexpresión de protooncogenes e inhibición de genes supresores de tumores), en específico de cómo estas se forman, multiplican y reparan. Estos eventos ocurridos en los genes se adjudican a factores que han sido definidos como agentes cancerígenos, como es el caso de los rayos UV, los alimentos procesados, el consumo de tabaco, entre otros. Estos agentes son los responsables de causar las mutaciones heredables y las somáticas (Griffiths y col., 2020; Rivas y col., 2022).

El cuerpo humano por sí mismo es capaz de eliminar aquellas células que presentan un daño en el ADN antes de que estas se conviertan en células cancerígenas, sin embargo, esta capacidad del cuerpo disminuye a medida que las personas envejecen. La capacidad de las células de morir al detectar un daño en su ADN es un proceso de muerte celular que puede ocurrir de una manera programada y no

programada. La muerte celular no programada, es conocida como necrosis, esta ocurre generalmente en condiciones de daño físico a los tejidos, y cuando la célula se ve expuesta a un estrés agudo y excesivo. Es en este caso, la célula presenta un hinchamiento de orgánulos, aumento del retículo endoplásmico, rompimiento de la membrana plasmática y liberación explosiva del contenido citoplasmático al espacio extracelular, dando como resultado la muerte de la célula. Por el contrario, la muerte celular programada o apoptosis se inicia con señales moleculares específicas que llevan a la célula a su muerte. La apoptosis mantiene un balance funcional entre la multiplicación y la eliminación celular. Este proceso inicia con la condensación celular y termina con la formación de vesículas que después serán fagocitadas por células vecinas (Xu y col., 2019).

Son conocidas dos vías de inducción a la apoptosis (Figura 2), la vía intrínseca o mitocondrial y la vía inducida por receptores de muerte, denominada vía extrínseca. La vía intrínseca es a consecuencia de la liberación del citocromo C hacia el citoplasma, el cual depende de la concentración de proteínas proapoptóticas (BAX, BAK) y de las anti-apoptóticas (BCL-2, BCL-X, MCL1). Cuando la célula no recibe una señal de supervivencia o sufre de algún daño, se produce un aumento de P53 (gen supresor de tumores) que detecta el daño al ADN y aumenta la expresión de las proteínas proapoptóticas, las que serán encargadas de producir un poro en la mitocondria que será el que permita el paso del citocromo C hacia el citoplasma y una vez fuera, el citocromo C va a interactuar con APAF1, quien a su vez recluta a la procaspasa 9 para formar un complejo conocido como apoptosoma, que será quien active a la caspasa 3 efectora, que es la encargada de desencadenar la apoptosis. En la vía extrínseca están involucrados, el receptor de factor de necrosis tumoral tipo 1 (TNF-1) y el receptor Fas (CD95). Esta vía se comienza con la célula detectando el daño celular, es entonces cuando Fas va a interactuar con su ligando, provocando a nivel intracelular una serie de procesos que unen a tres receptores Fas, que van a configurar un sitio de unión a la proteína FADD, una vez que FADD se une al dominio citoplasmático de Fas, la procaspasa 8 se une a FADD, convirtiéndose así en la caspasa 8 activa que es la encargada de iniciar la cascada

de caspasas, que a su vez va a ayudar en la activación de las caspasas efectoras (Caspasa 3) y finalmente llevar a la muerte celular. La vía extrínseca, también puede conectarse con la vía intrínseca, mediante la generación de BID truncado (tBID) por medio de la caspasa 8 activa. tBID puede ingresar a las mitocondrias y causar permeabilización de la membrana externa mitocondrial por la activación de BAX y BAK1. Las dos vías se unen en la fase efectora de la apoptosis, donde se activan las caspasas iniciadoras (9 y 10), que como consecuencia da la activación de las caspasas efectoras (3 y 7), estas son las caspasas que van a producir todos los daños que se producen a nivel intracelular (Tang y col., 2019; Xu y col., 2019).

Una vez que se han producido todos los procesos de desencadenamiento de la apoptosis, se forman vesículas citoplasmáticas, las cuales son liberadas de la célula hacia el medio interno, como cuerpos apoptóticos, teniendo ligandos para receptores celulares fagocíticos, permitiendo la unión a los fagocitos quienes serán los que degraden estos cuerpos apoptóticos (Tang y col., 2019; Xu y col., 2019).

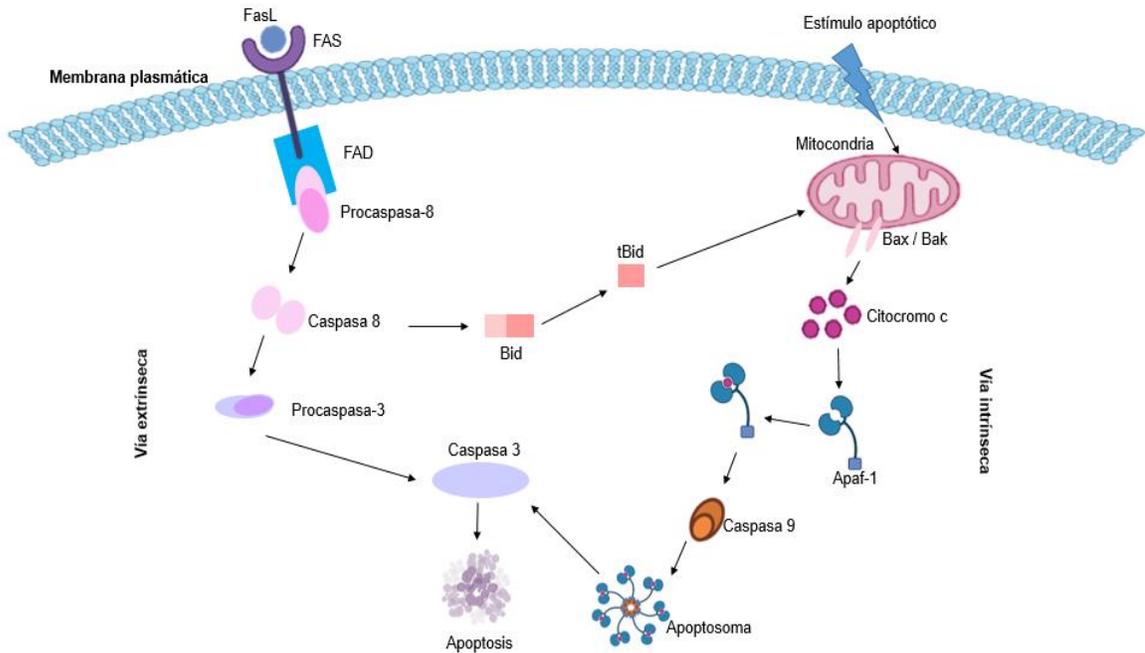


Figura 2. Vías de inducción a la apoptosis: extrínseca e intrínseca (Adaptado de Tang y col., 2019).

Las células cancerígenas tienen la capacidad de evadir la muerte celular, por lo tanto, se diseminan a cualquier parte del cuerpo y a causa de estas multiplicaciones se llegan a formar masas, conocidas como tumores o neoplasias, que al expandirse pueden destruir o sustituir a los tejidos normales. Sin embargo, también existe el cáncer de origen sanguíneo que resulta incapaz de producir tumores (Puente y de Velasco, 2019).

El cáncer hematológico se refiere a las afecciones en la médula ósea o en células del sistema inmunitario. Este tipo de cáncer es de las principales causas de muerte entre los niños y adolescentes, representando un 25 % del porcentaje de los cánceres detectados (Vera Malavé, y col., 2023).

I.3. Hematopoyesis

Para comprender de una mejor manera como es que se desarrolla el cáncer hematológico, primero hay que conocer el proceso de formación de las células sanguíneas, este proceso es conocido como hematopoyesis (Figura 3), el cual consta de dos etapas, la hematopoyesis prenatal y posnatal. La prenatal se divide en tres fases:

- Fase vitelina, se presenta una hematopoyesis extraembrionaria, en esta las células mesodérmicas dan lugar a los eritroblastos que son los precursores de los eritrocitos, en esta fase la hematopoyesis continúa hasta aproximadamente la semana 6 de gestación.
- Fase hepática, entre la semana 4 y 5 de gestación. En esta los eritroblastos migran al hígado como consecuencia de la circulación sanguínea fetal, dando lugar a la generación de los eritroblastos primitivos y los definitivos, los granulocitos, megacariocitos y hemoglobinas.
- Fase de hematopoyesis mieloide, donde las células hematopoyéticas son establecidas en la médula ósea, esta fase inicia una vez finalizado el sexto mes de gestación y perdura hasta después del nacimiento. Es en esta fase donde se da la generación de representantes de las distintas etapas de maduración de las líneas celulares, eritropoyetina, hemoglobina fetal y adulta.

La hematopoyesis posnatal, inicia una vez sucedido el nacimiento y continua a lo largo de la vida para producir incontables células sanguíneas. En esta hematopoyesis se tiene una menor cantidad de células madre hematopoyéticas, y células madre linfoides (CML), quienes proliferan y originan células madre unipotentes específicas de la línea linfoides de tipo T y B. Las células madre linfoides del tipo T viajan por la sangre desde la médula ósea hasta el timo, donde son diferenciadas a células pro-T, que se convertirán en pre-T, y madurando, convirtiéndose en linfocitos T. En comparación con las células madre linfoides de tipo B quienes se quedan en la médula ósea (Ucedo, y col., 2022).

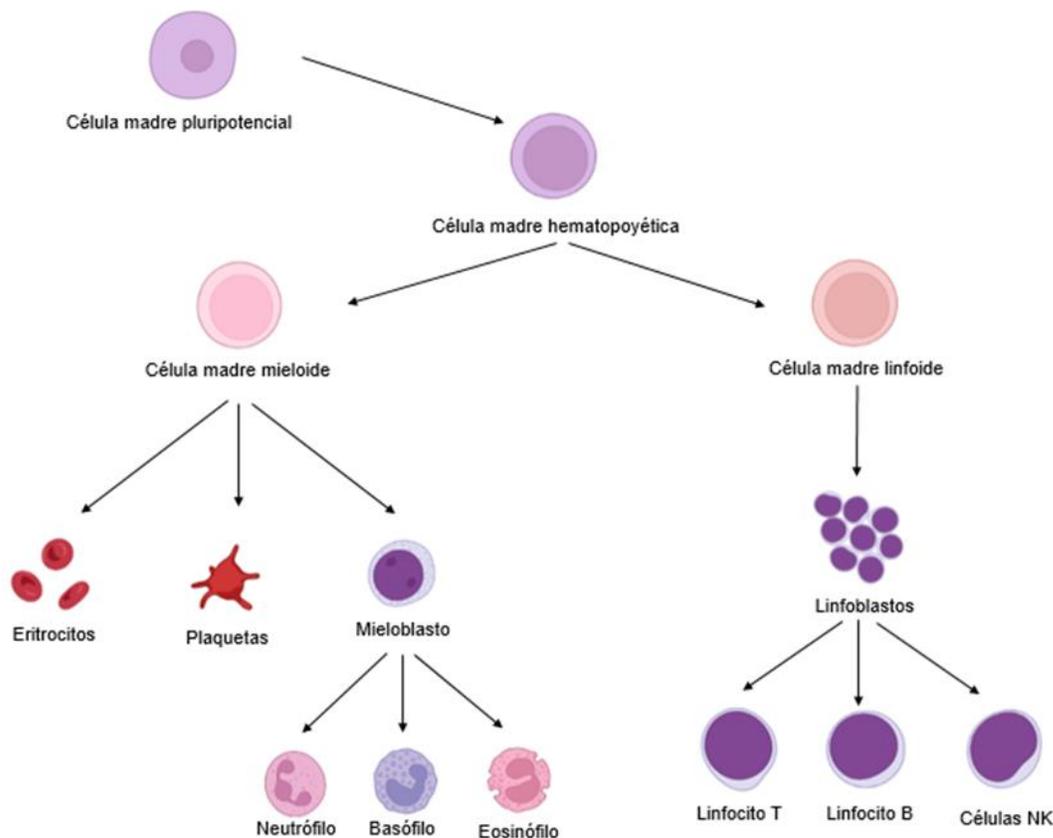


Figura 3. Diferenciación y generación de las células sanguíneas (Adaptado de Carr y Rodak, 2023).

Algunos mecanismos como el desbloqueo de la plasticidad fenotípica dan lugar a alteraciones en la diferenciación celular; como desdiferenciación de estados maduros hacia los progenitores, diferenciación bloqueada de estados de células progenitoras y el paso a estados celulares diferentes, los cuales corrompen de diversas maneras

la diferenciación normal de las células progenitoras en células maduras de linajes de desarrollo, provocando que la tumorigénesis y la progresión maligna se faciliten en las células de origen, dando lugar al cáncer (Hanahan, 2022).

I.4. Leucemia

La leucemia es el cáncer de las células sanguíneas que presentaron cambios en su formación durante el desarrollo humano. En las leucemias la célula madre hematopoyética ya no es capaz de continuar con su proceso normal de maduración, entonces se desencadena la proliferación de blastos (células inmaduras), estas se depositan en la médula ósea y otros tejidos hematopoyéticos, a causa de mecanismos como la diferenciación bloqueada, la disminución de la apoptosis y la proliferación descontrolada (Ma y col., 2021; Steliarova-Foucher y col., 2018).

La leucemia implica un problema en la producción de células sanguíneas, por lo general afecta a los glóbulos blancos o leucocitos. Los glóbulos blancos anormales que se desarrollan de manera descontrolada y dan paso a la leucemia, ya que afectan la capacidad de la médula ósea de producir cantidades suficientes de plaquetas, glóbulos rojos y glóbulos blancos normales, por el espacio que ocupan y al no ser células inmunitarias funcionales (Nemkov y col., 2019).

De acuerdo con el curso normal y el grado de diferenciación de la leucemia, esta se puede dividir en aguda, que es una neoplasia maligna con células hematopoyéticas inmaduras, progresa de una manera más rápida, esto porque tiene un grave fallo en la función de la médula ósea y la crónica que es caracterizada por la transformación de las células hematopoyéticas parcialmente maduras, esta se caracteriza por una lenta evolución de la enfermedad (Ma y col., 2021; Nemkov y col., 2019).

La leucemia es de las principales causas de muerte por cáncer en México, entre los niños y adolescentes. Específicamente la más común de estas neoplasias es la leucemia linfoblástica aguda, representando aproximadamente un 75 % de las leucemias diagnosticadas (Dorantes-Acosta y col., 2013).

I.5. Leucemia linfoblástica aguda

La leucemia linfoblástica aguda (LLA), es una enfermedad hematológica que se caracteriza porque células progenitoras linfoides se transforman y proliferan en la médula ósea, sitios extramedulares y en la sangre periférica. Esta es un tipo de cáncer que ha sido atribuido a translocaciones cromosómicas y mutaciones que dan lugar a la leucemogénesis. (DeAngelo y col., 2020; Rehman y col., 2018; Bastidas-Sánchez y col., 2023). La leucemia linfoblástica aguda afecta a los glóbulos blancos, conocidos también como linfocitos, quienes son los encargados de combatir infecciones y proteger al cuerpo de enfermedades. Aquellos pacientes que son diagnosticados con LLA tienen una gran cantidad de glóbulos blancos inmaduros en la médula ósea, pero estos, no funcionan de manera normal. En cambio, se encargan de desplazar a los glóbulos blancos maduros, a los rojos y a las plaquetas normales, provocando que el paciente se encuentre inmunocomprometido, con aspecto pálido y que presente problemas de sangrado (Chargoy-Vivaldo y col., 2018).

La leucemia linfoblástica aguda se da a causa de la transformación de los progenitores de las células hematopoyéticas T o B. Esta es una enfermedad diversa que se caracteriza por presentar una señalización atípica y un metabolismo retardado. Se ha asociado que esta puede ser inducida al igual que la leucemia mieloide crónica por la expresión de diferentes genes como Bcr-Abl y la presencia del cromosoma filadelfia, es decir el cromosoma 22 alterado, lo cual ocurre frecuentemente en adultos (Nemkov y col., 2019).

El diagnóstico de la leucemia linfoblástica aguda es basado en el inmunofenotipo, la morfología y las anomalías genéticas. Los métodos generales para determinar la LLA son:

- Examen físico: Tiene como objetivo verificar de manera general el estado de salud del paciente o signos patológicos que den indicios de alguna enfermedad.
- Historia clínica de los pacientes: Se consideran las enfermedades y tratamientos que los pacientes hayan tenido, buscando enfermedades heredadas que pueden favorecer al desarrollo del cáncer.

- Análisis sanguíneos: Se emplea un hemograma completo, el cual es de utilidad para hacer un recuento de cada uno de los tipos de células que hay en la sangre, además este análisis deja observar la presencia de células de leucemia anormales.
- Frotis de sangre periférica: Con este análisis es posible observar los cambios en el aspecto y conteo de las células, lo cual ayuda también en el diagnóstico de la LLA.
- Análisis de médula ósea: Se analiza si la muestra tiene células de leucemia, así como también se identifican si estas células de leucemia se originaron en linfocitos B o T.
- Citometría de flujo: Las células son teñidas con un tinte sensible a la luz, se colocan en un líquido y se pasan en forma de flujo ante un láser u otro tipo de luz. Lo que se busca es medir la cantidad de células, porcentaje de células vivas y algunas características, como el tamaño, forma y la presencia de marcadores de marcadores de leucemia sobre la superficie de la célula.

Además de estos hay otras pruebas de diagnóstico para la LLA, como lo son: la punción lumbar, la cariotipificación, ensayos moleculares y las pruebas de diagnóstico por imagen (Mancero Rodríguez, y col.,2020).

La LLA es el cáncer más común en niños y adolescentes mexicanos. Cerca de un 85 % de las leucemias linfoblásticas agudas pertenecen al tipo B, y al tipo T un 15 %. Pero estudios han establecido que el fenotipo de las células T tienen una asociación a malos pronósticos clínicos, en comparación la del tipo B que tiene una mejor respuesta a los tratamientos (Dorantes-Acosta y col., 2013; Jiménez-Morales y col., 2018).

I.6. Leucemia linfoblástica aguda tipo T

La leucemia linfoblástica aguda de células T es una rara variante de la leucemia linfoblástica, se relaciona con anomalías genéticas heterogéneas. Esta leucemia se deriva de progenitores tempranos de células T y usualmente ocurre más en adolescentes o adultos que en pacientes pediátricos. Los linfoblastos T y B son poco

distinguibles por morfología. Aunque en algunas ocasiones es posible diferenciarlos porque los linfoblastos T presentan nucléolos prominentes y contornos nucleares irregulares, además de un aumento en la actividad mitótica en las secciones de tejido. La leucemia linfoblástica tipo T posee características específicas que la hacen diferente a otros tipos de cánceres, por ejemplo, presenta una predisposición masculina, una infiltración rápida y leucocitosis. Aproximadamente el 50 % de los pacientes que padecen LLA-T presentan hiperleucocitosis, es decir que tienen alto el recuento de glóbulos blancos, lo cual la hace ser considerada una enfermedad de mayor riesgo, comparada con la leucemia linfoblástica aguda de células B (Lato y col., 2021; Luca, 2021).

Cerca del 10 % de los pacientes afectados con esta leucemia son más susceptibles a afectaciones del sistema nervioso central, lo cual hace que presenten síntomas, como debilidad visual, cambios de personalidad, cefalea, vómitos y disnea. Además de las recaídas y el daño al sistema nervioso central se relacionan con fracasos en el tratamiento con quimioterapia, por una alta resistencia a esta (Lato y col., 2021).

I.7. Tratamientos

Los tratamientos para el cáncer son diversos y estos dependen del tipo de cáncer que se haya diagnosticado. Los tratamientos que comúnmente utilizados, son: la quimioterapia, radioterapia, terapia dirigida, inmunoterapia, cirugía, terapia hormonal, entre otros, El objetivo principal de cada tratamiento es eliminar a las células cancerosas, procurando no dañar a las sanas, sin embargo, este propósito se ve dificultado debido a la capacidad de las células cancerosas de expandirse mediante metástasis microscópicas, lo cual dificulta la especificidad de los tratamientos. Es por ello por lo que, lo mínimo que se busca con los tratamientos, es la supresión del cáncer hasta un estado subclínico donde se mantenga el estado normal y que el paciente tenga una buena calidad de vida (Wang y col., 2018).

Cada uno de los tratamientos contra el cáncer tiene enfoques diferentes, además que se aplican en diferentes tipos de cáncer según lo que se requiera. En ocasiones

para un mejor resultado se emplea una combinación de tratamientos. (Wang J. y col., 2018).

La quimioterapia, es el tratamiento más popular y empleado en la mayoría de los cánceres por ser considerado eficaz. Básicamente consiste en la administración de medicamentos específicos para detener o hacer más lento el crecimiento de las células cancerígenas. Sin embargo, este tratamiento puede generar graves efectos secundarios porque no es específico con las células cancerígenas y también destruye a las sanas. Sus efectos secundarios pueden variar dependiendo de los medicamentos empleados, de cada individuo y su respuesta inmune, además del tipo de cáncer. (Wang J., 2018; American Cancer Society, 2023).

Los medicamentos de la quimioterapia usualmente son por vía intravenosa para para alcanzar a las células cancerosas del cuerpo, es por esto por lo que este tratamiento resulta muy útil para cánceres como la leucemia que se ha propagado por todo el cuerpo. Los medicamentos que más comúnmente se utilizan en las quimioterapias para la LLA, son: la vincristina, citarabina, 6-mercaptopurina, metotrexato, entre otras (Triarico y col., 2021; American Cancer Society, 2023).

Entre los quimioterapéuticos más utilizados en el tratamiento de la leucemia, y que se ha incorporado en los tratamientos de la LLA, se encuentra la vincristina, fármaco del tipo alcaloide vegetal, que va dirigido a los microtúbulos, interfiriendo en las divisiones mitóticas y en el crecimiento celular de las células cancerígenas, actuando sobre la fase M del ciclo celular uniéndose a la tubulina, y provocando el rompimiento del huso mitótico. La administración de altas concentraciones de este medicamento hace que le sea posible unirse a puntos de baja afinidad en la superficie de la tubulina, haciendo que la célula se quede detenida en la metafase y que los cromosomas se dispersen en el citoplasma, llevando a la muerte celular. Puede interferir también con la síntesis de proteínas, ADN y ARN, ya que bloquea la utilización del ácido glutámico. (Triarico y col., 2020; LaQuaglia y col., 2021).

La vincristina es un importante quimioterapéutico empleado en el tratamiento de la LLA, sin embargo, ha sido asociado a la neurotoxicidad periférica, que es un efecto

secundario, mayormente asociado en pacientes pediátricos con tratamiento de este medicamento. Esto sucede ya que la vincristina no sólo causa daño en los microtúbulos, sino también en las mitocondrias y en el endotelio de células del sistema nervioso. En general los tratamientos del cáncer suelen provocar alteraciones en la salud física y la calidad de vida de los pacientes, por lo cual, cada vez se busca innovar con tratamientos más específicos que causen una menor toxicidad en las células sanas (Triarico y col., 2021; Vera Malavé y col., 2023).

I.8. Tratamientos con péptidos

Los péptidos son cadenas de aminoácidos (menos de 100 aminoácidos) unidos por enlaces amida (Pérez y col., 2018).

Estudios recientes han indicado que los péptidos pueden ser beneficiosos para el descubrimiento y desarrollo de fármacos. Los péptidos que han sido estudiados hasta el momento son agrupados en péptidos naturales: obtenidos directamente de un organismo, y los péptidos sintéticos: producidos químicamente con posibilidad de modificaciones. Dentro de las limitaciones que poseen los péptidos se tiene su biodisponibilidad oral, la cual es limitada o inexistente, ya que una vez suministrado por la vía oral, los factores de degradación enzimática, y la baja absorción producida por el paso hepático que sufren los péptidos, afectan a la biodisponibilidad. Es por esto por lo que se opta por una administración intravenosa. Aunado a esto, los fármacos peptídicos muestran una vida media de circulación más corta, menor permeabilidad celular y por lo general altas tasas de degradación enzimática (Li y col., 2021).

Los avances en la tecnología han sido innovados en el descubrimiento de fármacos peptídicos. Hasta el momento han sido registradas 21,698 secuencias de péptidos con actividad biológica contra el cáncer, enfermedades cardiovasculares, diabetes, apoptosis, entre otras patologías. Además, se cuenta con el desarrollo de más de 150 péptidos, de 400 a 600 de ellos en etapa de ensayo preclínico y aproximadamente 80 ya están siendo comercializados (Pérez y Col., 2018; Li y col., 2021).

Los péptidos han demostrado ser prometedores para la inmunoterapia contra el cáncer, se tiene el ejemplo de las vacunas compuestas por péptidos, las cuales, se encargan de activar al sistema inmunológico innato y al adaptativo, al interactuar con los neutrófilos, células dendríticas (DC), macrófagos, células asesinas naturales (NK), células T, células B, entre otras. Estas vacunas tienen la ventaja de ser prácticas y costeables para el tratamiento del cáncer. Los péptidos pueden ser utilizados en compuestos avanzados, incorporando funciones de direccionamiento celular, actividades terapéuticas, sitios de escisión y transportadores de endocitosis. Los péptidos generalmente son diseñados con la finalidad de atacar a células específicas. Tal es el caso de un péptido sintético descrito en el artículo del British Journal of Cancer, en el que se le describen características como agente bloqueador de las actividades pro-metastásicas de la interleucina 13. Además, se comprobó que este péptido fue capaz de reducir el desarrollo metastásico del cáncer colorrectal y el crecimiento de glioblastoma (Yavari y col., 2018; Zhang., 2019; Bartolomé & col., 2018).

El interés en la implementación de los péptidos como tratamiento es por las características que poseen, como son:

- Baja generación de la respuesta inmune, que hace que, no presenten grandes efectos secundarios
- Capacidad de interactuar con objetos poco explorados
- Facilidad de penetrar en los tejidos
- Pueden ser moléculas pequeñas
- Su fabricación no resulta costosa, además de que son fáciles de modificar para la mejora de su estabilidad en ensayos *in vivo* y su actividad biológica (Zhang, 2019).

La necesidad de tratamientos más específicos y con menos efectos tóxicos, llevo al diseño por medio de química computacional del péptido O1P4Bad. Para su diseño, primero se cargaron lo dominios Bax y Bad BH3 en el software Anti-CP que generó varios pentadecámeros con potencial anti-cancerígeno, posteriormente las

estructuras de estos pentadecámeros fueron analizadas por medio de un modelado molecular, donde se observó que sólo dos de los péptidos BH3 adoptaron estructuras secundarias. Para estudiar las interacciones intermoleculares de los péptidos Bad y Bax BH3 y la afinidad de estos a los complejos Bcl-2, se realizaron simulaciones de dinámica y acoplamiento molecular, además de un muestreo de paraguas (“Umbrella sampling”). Con estas simulaciones y pruebas se encontró que el péptido O1P4Bad, teóricamente resulta ser cien veces más afín al dominio BH3 de Bcl-2 que Bax. y entre sus ventajas se encuentra que es pequeño, y su estructura sugiere que es más selectivo que otros medicamentos utilizados para la inmunoterapia del cáncer. Por otro lado, indica ser específico, ya que fue diseñado para dirigirse al dominio BH3 de Bcl-2, y teniendo en cuenta que es un péptido, este presenta una menor respuesta del sistema inmune (Becerra y col., 2022).

II. JUSTIFICACIÓN

El cáncer ha sido considerado una barrera en el aumento de la esperanza de vida de la población, ya que representa un problema de salud mundial. De acuerdo con estimaciones de la Organización Mundial de la Salud el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo, en 2020 se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones (Organización Mundial de la Salud, 2022). En la población menor a 15 años el cáncer en las células sanguíneas es la principal causa de muerte (Instituto Nacional de Estadística y Geografía, 2020). La leucemia linfoblástica aguda (LLA) es el cáncer más común en niños y adolescentes mexicanos. Un 75 % de los pacientes que padecen leucemia, menores a 20 años fueron diagnosticados con leucemia linfoblástica aguda, aproximadamente un 85 % a 90 % de las leucemias linfoblásticas agudas pertenecen al tipo B, sólo un 10% a 15 % al T. Sin embargo, aquellos pacientes que presentan al fenotipo de las células T tienen una asociación a un peor pronóstico clínico, ya que se considera compleja y con una menor tasa de recuperación; lo cual se podría adjudicar a su heterogeneidad y a los diversos subtipos que tiene. La LLA B responde mejor al tratamiento que la LLA T, por ello la leucemia linfoblástica aguda tipo T necesita de tratamientos de quimioterapia intensificados (Dorantes-Acosta y col., 2013; Jiménez-Morales y col., 2018). La alta tasa de mortalidad por la LLA-T lleva al uso de tratamientos intensificados efectivos para las células cancerígenas, sin embargo, causan grandes daños a las células y tejidos sanos. Esto ha sido una de las razones principales por las cuales se busca innovar en los tratamientos para la LLA-T, con alternativas que resulten en una mejora de la calidad de vida de los pacientes durante su tratamiento y que al mismo tiempo no resulten ser tan agresivos los efectos secundarios. Partiendo de esto, nuestro equipo de colaboradores diseñaron *in silico*, al péptido O1P4Bad, con el objetivo de promover un efecto apoptótico. Ya que los péptidos, en teoría, son más selectivos a su diana molecular la molécula pro-apoptótica Bad, con lo cual se espera que el tratamiento sea más eficaz y menos agresivo con los pacientes de LLA-T. Sin

embargo, aún no hay trabajos respecto a su efecto citotóxico *in vitro* (Becerra y col., 2022). El objetivo de este trabajo es evaluar, por primera vez, el efecto anti-proliferativo del péptido O1P4Bad y compararlo con el de la vincristina sobre células Jurkat, además de evaluar si tiene un menor efecto apoptótico en células sanas (PBMC).

III. HIPÓTESIS

El péptido diseñado O1P4Bad promoverá la muerte celular por apoptosis en células Jurkat de leucemia linfoblástica aguda tipo T e inducirá significativamente menos citotoxicidad en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de pacientes sanos.

IV. OBJETIVOS

IV.1. General

Determinar el efecto apoptótico del péptido O1P4Bad en células Jurkat de leucemia linfoblástica aguda tipo T y evaluar un menor efecto citotóxico en PBMC de pacientes sanos.

IV.2. Específicos

- Determinar la concentración media inhibitoria (IC_{50}) en células de leucemia linfoblástica aguda tipo T (Jurkat) inducida por el péptido O1P4Bad.
- Evaluar el efecto anti-proliferativo utilizando la IC_{50} del péptido O1P4Bad en células de leucemia linfoblástica aguda tipo T (Jurkat) y compararlo con el inducido por la vincristina.
- Evaluar y comparar el efecto anti-proliferativo del péptido O1P4Bad en células Jurkat y en células PBMC.

V. METODOLOGÍA

V.1.Desarrollo experimental

V.1.1. Cultivo de células Jurkat

Se obtuvieron células Jurkat (ATCC, No. TIB-152) de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE. UU.) y serán cultivadas a 37°C, en un aire humidificado 95 %, con una atmósfera de CO₂ al 5 %. Las células Jurkat fueron cultivadas en medio RPMI (1640 /ATCC, No. 30-2001), con un 10 % de suero fetal bovino (FBS, ATCC, No. 30-2020) y 2 % de antibióticos (penicilina y sulfato de estreptomycin). Se realizaron lavados cada tercer día y las células se mantuvieron a una densidad máxima de 250,000 células/mL. Para los tratamientos, se tomó una alícuota de 10 µL y se mezcló con 10 µL de azul tripano al 0.04 % para el conteo de células en una cámara de Neubauer y se sembraron aproximadamente 250,000 células en cada pozo de una caja de 12 pozos, posteriormente los pozos se aforaron a 400 µL. A las 24 horas de ser sembradas las células Jurkat fueron tratadas con vincristina en una concentración de 10 µM como control positivo, con RPMI como control negativo, y con 20 µL de las concentraciones de 1, 10, 50, 100 y 200 µM del péptido, finalmente a los pozos se les agregarán 100 µL más de RPMI, obteniendo un volumen final de 500 µL. Las placas fueron incubadas durante 24 horas a 37 °C con una atmósfera de CO₂ al 5 % en una incubadora humidificada. Durante dos días, cada 24 horas se tomaron 10 µL de cada pocillo y se mezclaron con azul de tripano al 0.04 % para ser contadas en la cámara de Neubauer y determinar la proliferación celular.

V.1.2. Péptido y Vincristina

El fármaco vincristina (VCR) que se utilizó en los tratamientos fue adquirido en Sigma Aldrich (número de catálogo V8388). Y el péptido O1P4Bad se mandó a sintetizar. Este fue diluido en 10 mL de RPMI, quedando en una concentración de 5300 µM, de la cual se tomó 943.4 µL para hacer el stock de la concentración de 200 µM, 471.69 µL para la de 100 µM, 235.8 µL para la de 50 µM y 47.16 µL para la de 10 µM.

V.1.3. IC₅₀ del péptido O1P4Bad en células Jurkat

Para proponer la concentración media inhibitoria (IC₅₀) a utilizar en los experimentos y determinar el efecto proliferativo de las células Jurkat, se utilizaron cajas de 24 pozos. Se colocaron aproximadamente 250,000 células en cada pozo, posteriormente se llevaron a incubar durante 24 horas a 37 °C y 5 % CO₂. Una vez transcurridas las 24 horas se trataron con las concentraciones seleccionadas (1, 10, 50, 100 y 200 µM) del péptido y con una concentración de 10 µM de vincristina como control positivo, considerando un volumen final de 500 µL para todas las muestras. Una vez adicionado el tratamiento, se contaron las células de acuerdo con el protocolo de azul tripano en el microscopio y se incubaron por 24 horas a las mismas condiciones. Transcurridas las 24 con el tratamiento, fueron nuevamente contadas al microscopio con azul tripano y se repitió este mismo procedimiento de conteo a las 48 horas del tratamiento. Fueron consideradas las tanto las células vivas como muertas para las gráficas de proliferación.

V.1.4. Cultivo de células PBMC

Para evaluar el efecto anti-proliferativo del péptido O1P4Bad en un modelo de linfocitos control (sanos) se realizó la extracción de células mononucleares de sangre periférica (PBMC), se solicitó la participación consensuada de ocho voluntarios, cuatro de ellos para la estandarización del método (cultivo y supervivencia de las PBMC) y cuatro de ellos para los experimentos finales, fueron jóvenes de entre 20-25 años (Debido a datos del INEGI, donde la principal causa de defunción por tipo de cáncer fue la leucemia en los jóvenes entre 20-29 años, de sexo indistinto, sin antecedentes de cáncer, anemia o enfermedades autoinmunes, por medio de una invitación publicada, para la extracción de sangre periférica (Anexo 1). Tres mililitros de sangre venosa periférica fueron extraídos de los participantes en las instalaciones del laboratorio de Biología Molecular y posteriormente se diluyeron con tres mililitros de buffer fosfato salino (PBS) 1X, para posteriormente depositarlos cuidadosamente sobre una solución de Ficoll- -Paque PLUS (GE, Healthcare) y se llevaron a

centrifugar a 500 rpm, durante 30 minutos a 4°C. La capa de células PMBC, fue rescatada mediante pipeteo y posteriormente se lavó con PBS 1X y Buffer de lisis 1X (Red blood Cell Lysis Solution, Roche, No. Cat.11814389001) y se centrifugo a 500 rpm durante 10 minutos a 4°C para eliminar plaquetas y el medio de separación residual. Por último, el pellet obtenido fue resuspendido con medio RPMI-1640 (GIBCO) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Gibco, Invitrogen MAYIMEX) antibiótico (penicilina, estreptomina, Gibco, Invitrogen).

V.1.5. IC₅₀ del péptido O1P4Bad sobre las células PMBC

Para los tratamientos de PMBC, se utilizaron cajas de 12 pozos. Se colocaron 400 µL de la solución madre de células (aproximadamente 1 X 10⁶ células) en cada pozo, posteriormente se llevaron a incubar durante 24 horas a 37 °C y 5 % CO₂. Una vez transcurridas las 24 horas se trataron con la concentración mínima inhibitoria del péptido seleccionada en las células Jurkat y con una concentración de 10 µM de vincristina, siendo esta el control positivo, considerando un volumen final de 500 µL. Una vez adicionado el tratamiento, fueron contabilizadas las células de cada pocillo, de acuerdo con el protocolo de azul tripano, en el microscopio y se incubarán por 24 horas a las mismas condiciones, una vez transcurridas las 24 con el tratamiento, nuevamente se contaron al microscopio con azul tripano y se repitió este mismo procedimiento de conteo a las 48 horas del tratamiento. Fueron consideradas las células vivas tanto como las células muertas para las gráficas de proliferación.

V.1.6. Análisis estadístico

Se realizaron tres experimentos independientes por triplicado por cada concentración y control a analizar y ensayo, los datos fueron analizados con la media ± desviación estándar, con un ANOVA y una prueba *post hoc* en el programa GraphPad Prism 8.

V.1.7. Manejo de RPBI

De acuerdo con la NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-087-ECOL-SSA1-2002, protección Ambiental - salud ambiental - residuos peligrosos biológico-infecciosos - clasificación y especificaciones de manejo, la sangre y los componentes de esta, incluyendo células progenitoras, así como los cultivos de células cancerígenas, y los insumos utilizados en la manipulación y manejo de estos, resultan ser residuos biológico-infecciosos. Por lo cual, en cada toma de muestra, los objetos como las jeringas, una vez utilizadas fueron desechadas en un recipiente rígido polipropileno color rojo, específico para objetos punzocortantes. Mientras que sólo aquellas torundas que fueron empapadas con sangre fueron depositadas en bolsas de polietileno rojo marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda "Residuos peligrosos Biológico-Infecciosos (RPBI)", junto las con cajas P100 que contendrán las células Jurkat y PBMC, que una vez que estas fueron utilizadas se inactivaron por al menos 15 minutos con una solución de cloro al 10 %. Posteriormente estas bolsas fueron almacenadas temporalmente para su recolección y transporte por la empresa ECOLSERVI Industrial, quienes se encargaron del tratamiento para su correcta disposición final. Con base a lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

VI. RESULTADOS

VI.1. Proliferación de las células Jurkat

Para conocer el tiempo de proliferación de la línea celular Jurkat se realizó una curva de proliferación durante 48 horas, como se observa en la figura 4, en donde se estimó un tiempo de duplicación de 36 horas, en nuestras condiciones de cultivo.

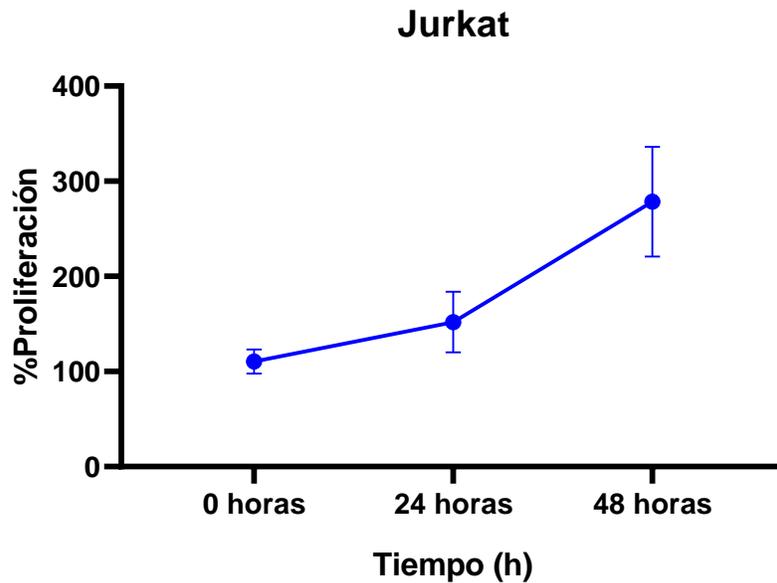


Figura 4. Curva de proliferación de las células Jurkat. Se indica el porcentaje de proliferación de las células, cultivadas con medio de crecimiento RPMI y contabilizadas a las 24 y 48 horas, mediante el ensayo de exclusión de azul tripano. Se presenta la media de tres experimentos independientes por triplicado, las barras indican error estándar (SEM).

VI.2. Determinación de la concentración inhibitoria media (IC50) del péptido O1P4Bad en las células Jurkat

Para determinar la concentración inhibitoria media se realizó una curva de dosis respuesta, la cual se observa en la figura 5. Se utilizaron concentraciones de 1, 10, 50, 100 y 200 μM del péptido y como control positivo se utilizó una concentración de 10 μM de vincristina. Podemos observar una disminución significativa en la

proliferación de las células Jurkat tratadas con el inhibidor de la proliferación (vincristina 10 μM) con respecto al control negativo. Adicionalmente, se observa una disminución significativa con respecto al control negativo en la proliferación de las células Jurkat tratadas con el péptido O1P4Bad desde la concentración de 1 μM hasta 100 μM . Se observa que la concentración de 50 μM muestra una disminución del 50 % de la proliferación desde las 24 h, por lo cual, se optó por seguir con dicha concentración para posteriores experimentos.

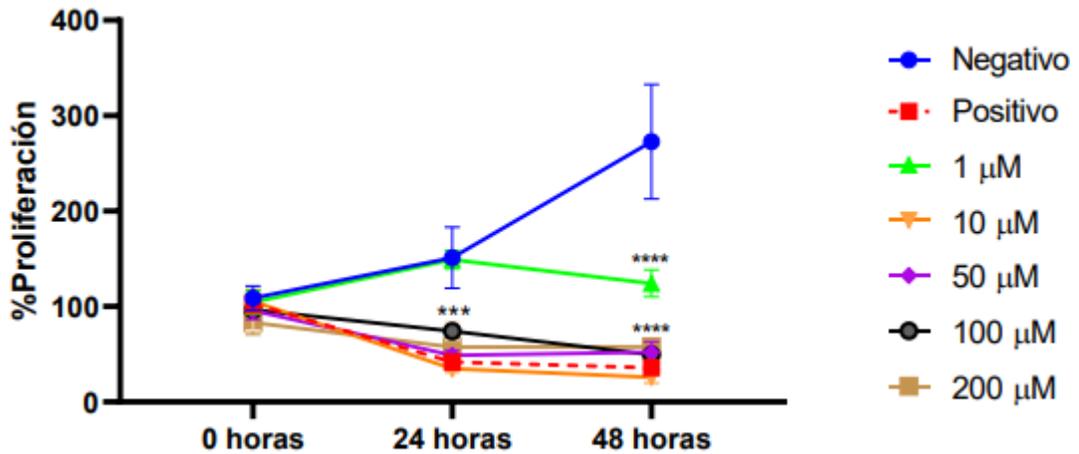


Figura 5. Gráfico de concentración respuesta del péptido O1P4Bad en la línea celular Jurkat. Se indica la media del porcentaje de proliferación de las células Jurkat sometidas a distintas concentraciones (1, 10, 50, 100 y 200 μM) del péptido O1P4Bad y vincristina 10 μM , como control positivo, comparadas contra control negativo. El análisis estadístico ANOVA de dos vías y prueba post hoc Tukey, **** $P < 0.0001$ se realizó con el paquete estadístico Graphpad Prism 8.0.1.

En la figura 6 se observa el efecto del péptido O1P4Bad en la línea celular Jurkat a 24 (A) y 48 (B) horas. En la figura 6A observamos una disminución estadísticamente significativa de la proliferación de las células Jurkat con respecto a su control, a partir de la concentración de 1 μM hasta 200 μM del péptido versus las células control. Se aprecia que el valor de IC50 del péptido sobre las células Jurkat fue en la concentración de 50 μM a las 24 horas, mostrando un porcentaje similar al control

positivo (vincristina 10 μM). En la figura 6B, se observa un porcentaje mayor de inhibición de la proliferación a las 48 horas.

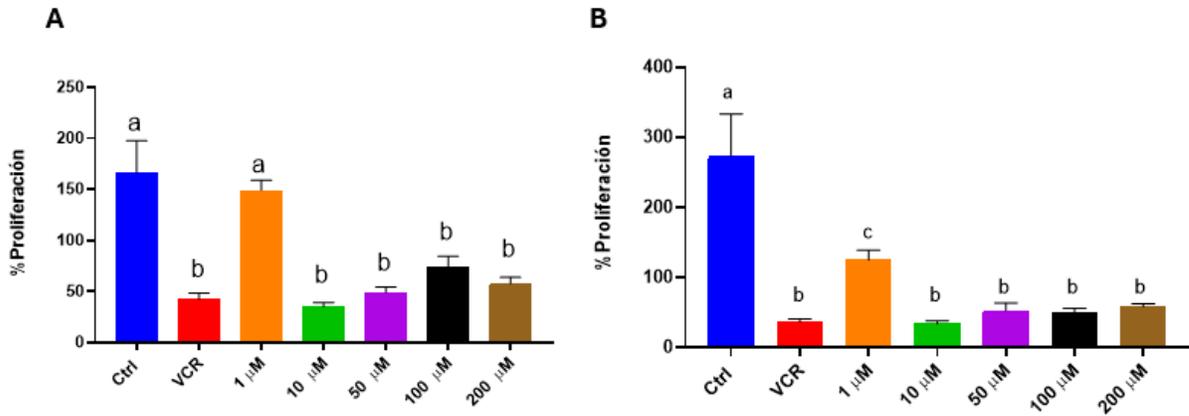


Figura 6. Efecto del péptido O1P4Bad en la proliferación de las células Jurkat a las A) 24 horas y B) 48 horas, en concentraciones de 1, 10, 50, 100 y 200 μM . Se utilizó Vincristina 10 μM , como control positivo y control (RPMI). El análisis estadístico de ANOVA de una vía, prueba *post hoc* Dunnet, **** $P < 0.0001$ con respecto al control negativo se realizó con el paquete estadístico Graphpad Prism 8.0.1.

Para determinar el porcentaje de células muertas se realizó una curva de dosis respuesta y se contaron las células positivas a azul tripano. Se utilizaron concentraciones de 1, 5, 10, 50, 100 μM del péptido O1P4Bad y como control positivo se utilizó una concentración de 10 μM de vincristina. En la figura 7 se puede observar el efecto citotóxico del péptido y la vincristina con respecto a las células control, representado por el porcentaje de células muertas que hubo en cada tratamiento a las 24 y 48 horas, se confirma la muerte del 50% de células Jurkat con la concentración de 50 μM del péptido O1P4Bad a 24 horas. Se puede observar una tendencia a incrementar el porcentaje la muerte de las células a las 48 horas, sin embargo, esta tendencia no es estadísticamente significativa.

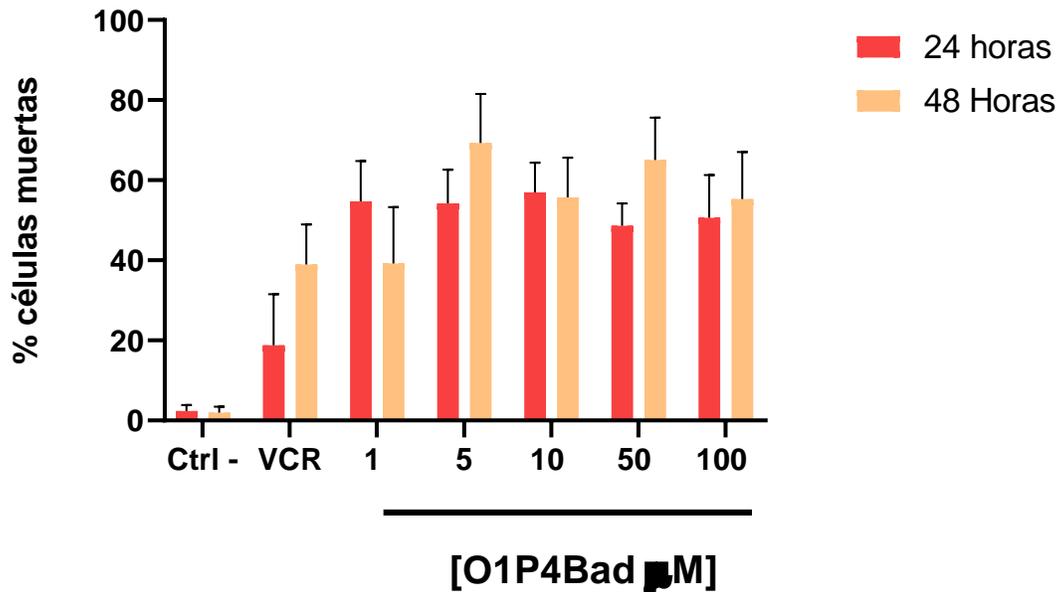


Figura 7. Efecto del péptido O1P4Bad. Tratamiento con el péptido O1P4Bad en concentraciones (1, 5, 10, 50 y 100 µM) y control positivo de Vincristina 10 µM a 24 y 48 horas, sobre la línea celular Jurkat, representado en porcentaje de células muertas. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico Graphpad Prism 8.0.1, por medio de un ANOVA de dos vías, prueba *post hoc* Tukey, ****P<0.0001.

VI.3. Citotoxicidad del péptido O1P4Bad sobre las células PBMC

A partir de los resultados obtenidos de los tratamientos de las células Jurkat con el péptido O1P4Bad, y haber determinado una IC₅₀ de 50 µM, se decidió tratar las PBMC con dicha concentración. Los tratamientos para evaluar la citotoxicidad del péptido en las células PMBC se muestran en la figura 8 a 24 horas (A) y 48 horas (B). Se observa que en las células tratadas con VCR 10 µM hubo una disminución significativa de la proliferación de las PBMCs a 24 y 48 horas (88.46 ± 7.08 vs 87.83 ± 12.10 %, respectivamente) con respecto al control. Sin embargo, el tratamiento con 50 µM del péptido O1P4Bad disminuyó la proliferación de las PBMCs a las 24 horas, con respecto al control. De manera interesante la disminución de la proliferación no se conserva hasta las 48 horas, y alcanza valores similares al control negativo.

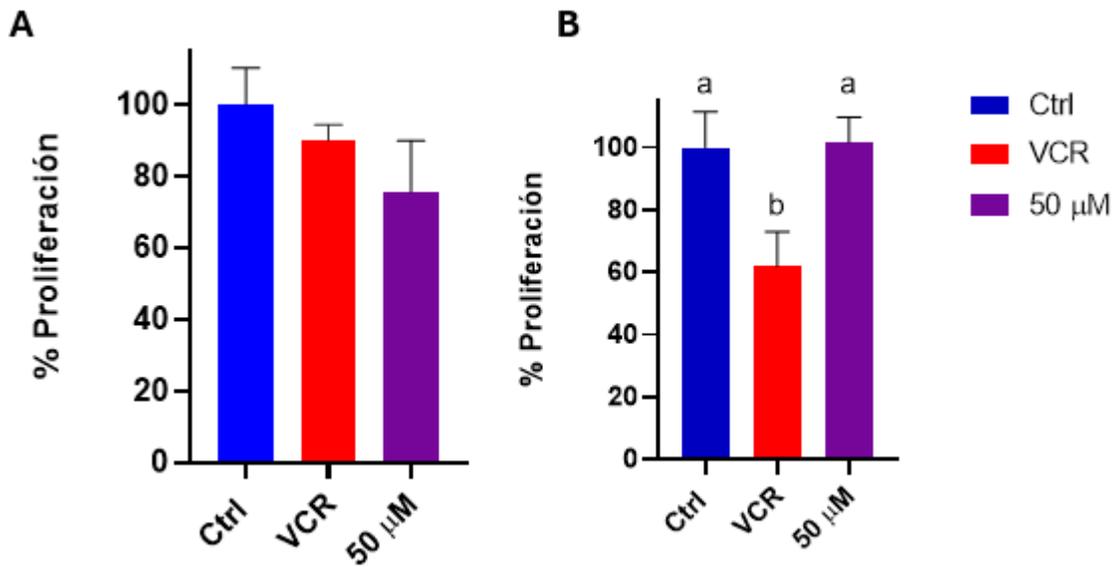


Figura 8. Efecto citotóxico de la IC50 del péptido O1P4Bad a las 24 horas A) y B) 48 horas. Tratamiento con el péptido O1P4Bad en una concentración de 50 μ M, como control positivo VCR 10 μ M y RPMI como control negativo, sobre las PMBC, representado en porcentaje de proliferación. El análisis estadístico se realizó con el paquete estadístico Graphpad Prism 8.0.1, por medio de un ANOVA de una vía, prueba post hoc Dunnet, *P<0.05.

VII. DISCUSIÓN

La leucemia linfoblástica aguda tipo T (LLA-T), representa un desafío clínico debido a su heterogeneidad y principalmente porque no responde adecuadamente a los tratamientos convencionales. En el presente trabajo de investigación se estudió el efecto anti-proliferativo del péptido O1P4Bad en comparación con un quimioterapéutico convencional (VCR) en las células Jurkat y en las PBMC.

Se realizó una curva de proliferación de las células Jurkat durante 48 horas, y se estimó un tiempo de duplicación de 36 horas, en nuestras condiciones de cultivo. Esto contrasta con la información de ATCC que indica que el tiempo de duplicación de las células Jurkat es de 48 h, sin embargo, nuestros datos concuerdan con la tasa de duplicación para esta línea celular de 25 a 35 h reportada por el instituto Leibniz DSMZ-de la colección alemana de microorganismos y cultivos celulares (ATCC 2024; Drexler, H. G. y col. 2018, Koblitz J., 2022). Los tiempos de duplicación dependen de las condiciones de cultivo, en los cuales incluso para la misma línea celular existe un rango de tiempos de duplicación, estos dependen de condiciones propias de las células como la fase de crecimiento, el tiempo de almacenamiento de las células y otras condiciones externas como el porcentaje de SFB, la densidad celular inicial, la composición y el volumen del medio; así como de factores técnicos que deben tenerse en cuenta para lograr ensayos de sensibilidad a fármacos confiables y reproducibles (Drexler, H. G. y col. 2005, Koblitz J., 2022).

Posteriormente, se analizó el efecto del péptido O1P4Bad a distintas concentraciones sobre la proliferación de las células de Jurkat de LLA-T. Se realizaron gráficas de concentración respuesta para evaluar el porcentaje de proliferación y determinar con estas la concentración mínima inhibitoria que posteriormente se utilizaría en las células PBMC.

Las concentraciones del péptido fueron elegidas tomando como referencia la de la vincristina, ya que esta según resultados de Evangelisti y col., en 2014, resulta ser citotóxica, disminuyendo la viabilidad de la línea celular Jurkat en un rango de 1 a 100 μM (Evangelisti y col., en 2014). Además, se tomó en cuenta el rango de

concentraciones (10, 20, 30 y 40 μM) usada por el grupo de trabajo de Mauricio Arias y col., en 2020, donde evaluaron diferentes péptidos de pesos moleculares similares a O1P24Bad en células Jurkat y PBMC (Arias y col., 2020). Considerando esto decidimos tomar como estándar la concentración de 10 μM , para la vincristina, probar esta misma concentración del péptido, además de otras mayores o menores, ya que estudios como el de Insuasty-Cepeda y col., en 2023 reportaron IC₅₀ de péptidos sobre líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) de 6 μM hasta 20 μM , induciendo el daño celular a través de la vía de apoptosis (Insuasty-Cepeda y col., en 2023).

Los resultados de nuestros tratamientos nos indicaron una actividad citotóxica por parte del péptido O1P4Bad sobre las células Jurkat, e inferimos que podría actuar como un péptido pro-apoptótico inhibiendo la acción anti-apoptótica de la proteína Bcl-1 y/o Bcl-xL, como Becerra y col., en 2022 propusieron en su diseño del péptido, diseñándolo con base en el dominio BH3 de la familia Bcl-2, permitiendo la formación de dímeros Bad-Bcl2 y Bad-Bcl-xL y promover así la apoptosis. Investigaciones previas han demostrado que algunas moléculas pequeñas que imitan la interacción de las proteínas del dominio BH3 con la proteína anti-apoptótica Bcl-2 pueden inducir selectivamente la apoptosis en las células Jurkat (Hamdy y col., 2021, Lee y col. 2014). Sin embargo, debido a que nuestros experimentos se limitaron a ensayos de proliferación con azul tripano, no pudimos corroborar que la disminución de la proliferación que se presentó en las células Jurkat después de ser tratadas con el péptido fuera específicamente porque se promovía la apoptosis, pero si pudimos determinar que existe citotoxicidad provocada por el péptido (como se observa en la figura 7), y se sugiere que debido a esto se generó una disminución de la proliferación de las células.

Para poder comprobar nuestra hipótesis de que el péptido O1P24Bad sería más específico atacando a las células cancerosas en mayor medida que a las células sanas (citotoxicidad selectiva), en comparación con los quimioterapéuticos convencionales, se evaluó la IC₅₀ del péptido O1P24Bad en células PBMC a 24 y 48 h. Nuestros resultados nos mostraron que, aunque a las 24 horas del tratamiento las células PMBC una disminución mayor de la proliferación (no significativa) en

comparación con sus controles negativo y positivo (vincristina). Este efecto de mayor disminución de la proliferación con respecto a sus controles no se conserva a las 48 horas de tratamiento, sugiriendo que hay una respuesta adaptativa de las células al péptido O1P24Bad. Quizá, debido a que el péptido es degradado después de las 24h y las células PBMC viables continuaron proliferando (Zaman y col. 2019).

Por otro lado, la citotoxicidad selectiva hacia las células Jurkat podría deberse a que son más sensibles a una inhibición de la vía anti-apotótica mediada por Bcl-2 y Bcl-xL, los cuales podrían ser inhibidos por nuestro péptido, de acuerdo con los estudios computacionales realizados por E. Becerra y col., en 2022. Es importante evaluar la expresión de estos marcadores pro-apoptóticos en cada una de las líneas celulares utilizadas para corroborar esta especulación (Becerra E. y col., 2022).

Además, es necesario un estudio prospectivo donde se determine que la muerte celular es efectivamente apoptosis y no necrosis, ya que algunos péptidos anticancerígenos actúan por la vía de la disrupción de la membrana celular. Así como caracterizar el mecanismo de acción del péptido, determinando si se une de manera selectiva a las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL.

El uso de péptidos como tratamientos de enfermedades hoy en día es innovador y una puerta de investigación, aunque hay poca información de estos utilizados en la quimioterapia, existen varios autores que refieren actividad citotóxica en los péptidos que probaron (Hamdy y col. 2021, Zaman y col. 2019).

Por lo tanto, los resultados que fueron obtenidos en este presente trabajo de investigación indican que el uso del Péptido O1P4Bad como tratamiento in vitro de las células de leucemia linfoblástica aguda tipo T, disminuye la proliferación de estas células siendo menos citotóxico en las células PMBC.

VIII. CONCLUSIONES

La leucemia linfoblástica aguda tipo T (LLA-T) presenta un desafío significativo debido a su heterogeneidad y la limitada eficacia de los tratamientos convencionales. En este estudio, se evaluó el efecto citotóxico del péptido O1P4Bad en células Jurkat y células mononucleares de sangre periférica (PBMC). Los resultados demostraron que el péptido O1P4Bad exhibe actividad citotóxica en células Jurkat, sugiriendo su potencial como un agente pro-apoptótico que podría inhibir las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Bcl-xL. Aunque se observó una disminución en la proliferación celular, se requieren estudios adicionales para confirmar que este efecto se debe a la inducción de apoptosis y no a otros mecanismos. Además, la citotoxicidad selectiva del péptido hacia las células cancerosas en comparación con las células sanas sugiere que O1P4Bad podría representar una alternativa prometedora a los quimioterapéuticos convencionales. Sin embargo, la respuesta adaptativa de las células Jurkat a las 48 horas plantea preguntas sobre la estabilidad y efectividad prolongada del péptido. Se necesita investigar más a fondo el mecanismo de acción del péptido y su interacción con las proteínas anti-apoptóticas para validar su uso en tratamientos futuros. En resumen, los hallazgos de este trabajo subrayan el potencial del péptido O1P4Bad como una opción terapéutica innovadora para la LLA-T, ofreciendo una nueva vía de investigación en el desarrollo de tratamientos menos tóxicos y más específicos para esta enfermedad.

IX. BIBLIOGRAFÍA

American Cancer Society. (2023b). Quimioterapia para la leucemia linfocítica aguda [monografía en internet]. <https://www.cancer.org/es/cancer/tipos/leucemia-linfocitica-aguda/tratamiento/quimioterapia.html>

Arias, M., Haney, E. F., Hilchie, A. L., Corcoran, J. A., Hyndman, M. E., Hancock, R. E. W., & Vogel, H. J. (2020). Selective anticancer activity of synthetic peptides derived from the host defence peptide tritriptin. *Biochimica et biophysica acta. Biomembranes*, 1862(8), 183228. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2020.183228>

ATCC Cell line Portal. Available at www.atcc.org/products/tib-152 (Acceso: 01/octubre/2024).

Bartolomé, R. A., Jaén, M. & Casal, J. I. (2018). Un péptido IL13R α 2 exhibe actividad terapéutica contra el cáncer colorrectal metastásico. *H. J. Cáncer* 119 , 940–949. <https://doi.org/10.1038/s41416-018-0259-7>

Bastidas-Sánchez A. N., Bigoni-Ordóñez G. D. CD20, generalidades básicas-moleculares y su posible relación como marcador de mal pronóstico en leucemia. *Rev Col Cancerol*. 2023;27(1):150-8. <https://doi.org/10.35509/01239015.892>

Becerra, E., Aguilera-Durán, G., Soto-Ontiveros, V., García-Alcocer, G., & Romo-Mancillas, A. (2022). Design and modeling of BH3-derived anticancer peptides targeting Bcl-2 protein.

Carr, J. H., & Rodak, B. F. (2023). Atlas de hematología clínica. 6ta Ed. Médica Panamericana. ISBN: 978-950-06-0101-6

Chargoy-Vivaldo E., Martínez-Hernández C., Caciue-Sánchez C., JimarézRodríguez J., Gómez-Cárdenas L. (2018). Translocaciones en leucemia linfoblástica aguda y supervivencia a cinco años en niños. *Hematología* 19(4):165-173.

DeAngelo, D. J., Jabbour, E., & Advani, A. (2020). Recent Advances in Managing Acute Lymphoblastic Leukemia. American Society of Clinical Oncology educational

book. American Society of Clinical Oncology. Annual Meeting, 40, 330–342. https://doi.org/10.1200/EDBK_280175

Dorantes-Acosta E., Medina-Sanson A., Dávila-Ornelas K., López-Martínez B. Clasificación inmunológica de las leucemias agudas linfoblásticas del Hospital Infantil de México Federico Gómez, de acuerdo al EGIL (European Group for the Immunological Classification of Leukemia). *Gac Mex Oncol.* 2013;12(3):136–42.

Drexler, H. G., MacLeod, R. A., Nagel, S., Dirks, W. G., Uphoff, C. C., Steube, K. G., & Quentmeier, H. (2005). Guide to Leukemia-Lymphoma Cell Lines on CD. *Blood*, 106(11), 4340.

Evangelisti, C., Evangelisti, C., Teti, G., Chiarini, F., Falconi, M., Melchionda, F., Pession, A., Bertaina, A., Locatelli, F., McCubrey, J. A., Beak, D. J., Bittman, R.,

Griffiths A., Doebley J., Peichel C., Wassarman D. Introduction to genetic analysis. 12a. edición. New York: Macmillan learning, 2020; vol.1:515.

Hamdy, R., Jones, A. T., El-Sadek, M., Hamoda, A. M., Shakartalla, S. B., Al Shareef, Z. M., ... & Westwell, A. D. (2021). New bioactive fused triazolothiadiazoles as Bcl-2-targeted anticancer agents. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(22), 12272.

Hanahan Douglas (2022). Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* 12 (1): 31–46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>

Instituto Nacional de Estadística y Geografía (2024). Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. Instituto Nacional de Estadística y Geografía, https://www.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/aproposito/2024/EAP_CANCER_24.pdf

Insuasty-Cepeda, D. S., Barragán-Cárdenas, A. C., Ardila-Chantre, N., Cárdenas-Martínez, K. J., Rincón-Quiñones, I., Vargas-Casanova, Y., Ochoa-Zarzosa, A., Lopez-Meza, J. E., Parra-Giraldo, C. M., Ospina-Giraldo, L. F., Fierro-Medina, R., García-Castañeda, J. E., & Rivera-Monroy, Z. J. (2023). Non-natural amino acids into

LfcinB-derived peptides: effect in their (i) proteolytic degradation and (ii) cytotoxic activity against cancer cells. *Royal Society open science*, 10(6), 221493. <https://doi.org/10.1098/rsos.221493>

Jiménez-Morales S., Hidalgo-Miranda A., Ramírez-Bello J., Leucemia linfoblástica aguda infantil: una aproximación genómica, *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, Volume 74, Issue 1, 2018, Pages 13-26, ISSN 1665-1146, <https://doi.org/10.1016/j.bmhimx.2016.07.007>.

Koblitz J., Dirks, W.G., Eberth, S., Nagel, S., Steenpass, L., & Pommerenke, C. (2022) DSMZCellDive: Diving into high-throughput cell line data. *F1000Res*, 11:420. DOI: 10.12688/f1000research.111175.2

LaQuaglia, K. A., Robertson, J. B., & Lunn, K. F. (2021). Neutropenia in dogs receiving vincristine for treatment of presumptive immune-mediated thrombocytopenia. *Journal of veterinary internal medicine*, 35(1), 226–233. <https://doi.org/10.1111/jvim.16029>

Lato, M. W., Przysucha, A., Grosman, S., Zawitkowska, J., & Lejman, M. (2021). The New Therapeutic Strategies in Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4502. <https://doi.org/10.3390/ijms22094502>

Lee, Y. J., Won, T. J., Hyung, K. E., Lee, M. J., Moon, Y. H., Lee, I. H., ... & Hwang, K. W. (2014). Bcl-2 knockdown accelerates T cell receptor-triggered activation-induced cell death in jurkat T cells. *The Korean journal of physiology & pharmacology: official journal of the Korean Physiological Society and the Korean Society of Pharmacology*, 18(1), 73.

Li, C. M., Haratipour, P., Lingeman, R. G., Perry, J. J. P., Gu, L., Hickey, R. J., & Malkas, L. H. (2021). Novel Peptide Therapeutic Approaches for Cancer Treatment. *Cells*, 10(11), 2908. <https://doi.org/10.3390/cells10112908>

Luca D. C. (2021). Update on Lymphoblastic Leukemia/Lymphoma. *ELSEVIER*. 41(3):405-416. Disponible en: <https://doi.org/10.1016/j.cl.2021.04.003>

Ma X. Y., Wei L., Lei Z., Chen Y., Ding Z., Chen Z. S. (2021). Recent progress on targeting leukemia stem cells. ELSEVIER. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2021.05.009>

Mancero Rodríguez, M., Arellano Salinas, K., Santo Cepeda, K., & Rodríguez Revelo, M. (2020). Leucemia linfoblástica aguda diagnostico. RECIMUNDO, 4(2), 53- 63. doi:10.26820/recimundo/4.(2).mayo.2020.53-63

Nemkov, T., D'Alessandro, A., & Reisz, J. A. (2019). Metabolic underpinnings of leukemia pathology and treatment. Cancer reports (Hoboken, N.J.), 2(2), e1139. <https://doi.org/10.1002/cnr2.1139>

Organización Mundial de la Salud. Cáncer (2024). [monografía en internet]. Organización Mundial de la Salud. https://www.who.int/es/health-topics/cancer#tab=tab_1

Pérez González, L., González Escudero, M., & Pérez Acosta, N. (2018). Los péptidos y su utilidad en la práctica clínica / Peptides and their usefulness in clinical practice. Panorama. Cuba y Salud, 13(2). <https://revpanorama.sld.cu/index.php/panorama/article/view/78-82>

Puente, J., & de Velasco, G. (2019, 16 diciembre). ¿Qué es el cáncer y cómo se desarrolla? - SEOM: Sociedad Española de Oncología Médica © 2019. Sociedad Española de Oncología Médica. <https://www.seom.org/informacion-sobre-el-cancer/que-es-el-cancer-y-como-se-desarrolla?showall=1&showall=1>

Rehman, A., Abbas, N., Saba, T., Rahman, S. I. U., Mehmood, Z., & Kolivand, H. (2018). Classification of acute lymphoblastic leukemia using deep learning. Microscopy research and technique, 81(11), 1310–1317. <https://doi.org/10.1002/jemt.23139>

Rivas S., Armisen R., El cáncer de pulmón de células no pequeñas en la era de la medicina de precisión, Revista Médica Clínica Las Condes, Volume 33, Issue 1, 2022, Pages 25-35, ISSN 0716-8640, <https://doi.org/10.1016/j.rmclc.2022.01.001>

Secretaría de Salud (SSA). (2002). NOM-087-ECOLSSA1-2002: Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológicoinfecciosos Clasificación y especificaciones de manejo. Ciudad de México: SSA.

Steliarova-Foucher E., Fidler M. M., Colombet M., Lacour B., Kaatsch P., Piñeros M., et al. Changing geographical patterns and trends in cancer incidence in children and adolescents in Europe, 1991-2010 (Automated Childhood Cancer Information System): a population-based study. *Lancet Oncol.* 2018 Sep;19(9):1159-1169. doi: 10.1016/S1470-2045(18)30423-6.

Tang, D., Kang, R., Vanden Berghe, T., Vandenabeele, P., & Kroemer, G. (2019). The molecular machinery of regulated cell death. *Cell Research*, 29(5), 347-364. <https://doi.org/10.1038/s41422-019-0164-5>

Triarico, S., Romano, A., Attinà, G., Capozza, M. A., Maurizi, P., Mastrangelo, S., & Ruggiero, A. (2021). Vincristine-Induced Peripheral Neuropathy (VIPN) in Pediatric Tumors: Mechanisms, Risk Factors, Strategies of Prevention and Treatment. *International journal of molecular sciences*, 22(8), 4112. <https://doi.org/10.3390/ijms22084112>

Ucedo, V. E., Rafael, H. S. S., Barbeito, C. G., & Diessler, M. E. (2022). Médula ósea y hematopoyesis. En *Introducción a la Histología Veterinaria* (pp. 188-205). Editorial de la Universidad Nacional de La Plata (EDULP). <http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/149577>

Vera Malavé, C. L., Zambrano Vélez, W. A., & Ronquillo Bueno, S. J. (2023). Hábitos alimenticios en niños de 4 a 6 años de la Institución Educativa de la provincia de Santa Elena –Ecuador. *LATAM Revista Latinoamericana de Ciencias Sociales y Humanidades* 4(1), 1640–1651. <https://doi.org/10.56712/latam.v4i1.365>

Wang, J. J., Lei, K. F., & Han, F. (2018). Tumor microenvironment: recent advances in various cancer treatments. *European review for medical and pharmacological sciences*, 22(12), 3855–3864. https://doi.org/10.26355/eurrev_201806_15270

Xu, X., Lai, Y., & Zhang, H. (2019). Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports*, 39(1). <https://doi.org/10.1042/bsr20180992>

Yavari, B., Mahjub, R., Saidijam, M., Raigani, M., & Soleimani, M. (2018). The Potential Use of Peptides in Cancer Treatment. *Current protein & peptide science*, 19(8), 759–770. <https://doi.org/10.2174/1389203719666180111150008>

Zaman, R., Islam, R. A., Ibnat, N., Othman, I., Zaini, A., Lee, C. Y., & Chowdhury, E. H. (2019). Current strategies in extending half-lives of therapeutic proteins. *Journal of controlled release*, 301, 176-189.

Zhang L., Huang Y., Lindstrom A. R., Lin T. Y., Lam KS, Li Y. Materiales basados en péptidos para inmunoterapia contra el cáncer. *Theranostics* 2019; 9(25):7807-7825. doi:10.7150/thno.37194. <https://www.thno.org/v09p7807.htm>

X. ANEXOS

X.1. Anexo 1

Consentimiento informado para la participación en el estudio del efecto anti-proliferativo del péptido O1P4Bad en células mononucleares sanas de sangre periférica (PBMC).

Introducción

El cáncer es considerado una barrera para el aumento de la esperanza de vida de la población, debido al problema de salud que representa. De acuerdo con estimaciones de la Organización Mundial de la Salud el cáncer es la principal causa de muerte en el mundo, en 2020 se atribuyeron a esta enfermedad casi 10 millones de defunciones. En la población menor a 15 años la leucemia es la principal causa de muerte y su principal característica es que, es producida en las células sanguíneas.

Objetivo

El objetivo de este trabajo es evaluar el efecto anti-proliferativo del péptido O1P4Bad comparándolo con el de la vincristina sobre células Jurkat, además de su menor citotoxicidad en células mononucleares sanas de sangre periférica (PBMC).

Criterios de inclusión

- Pacientes jóvenes de entre 20-25 años
- Sexo indistinto.

Criterios de exclusión

- Antecedentes de cáncer
- Antecedentes de enfermedades autoinmunes
- Antecedentes de Anemia

Procedimiento

La alumna Ana Mayra Resendiz Corona, con conocimientos y experiencia en química clínica, tomará una muestra de 3 mL de sangre periférica de la vena media del brazo izquierdo o derecho del paciente, dentro de las instalaciones del laboratorio de Biología molecular del edificio de Ciencias Químico-Biológicas. Para tal procedimiento, se hace uso de un torniquete, se limpia la zona con alcohol, se coloca una aguja nueva desechable en el vacutainer y se inserta dentro de la vena, inmediatamente se coloca el tubo morado (con EDTA) para recolectar la muestra sanguínea, una vez que se esté llenando el tubo, se retirará el torniquete y se esperará a que el tubo este lleno en un 80% de su capacidad. Seguido de esto se retirará el sistema vacutainer y se le colocará al participante voluntario una torunda seca en el área en donde se insertó la aguja.

Efectos adversos y molestias

El participante voluntario no sufrirá efectos adversos al donar sangre periférica, debido a las condiciones de asepsia y de seguridad, así como la cantidad que se va a extraer. Las molestias son mínimas y solo son asociadas por insertar la aguja en la vena media del brazo, lo cual resulta mínimamente invasivo y dura pocos segundos. Puede presentarse un pequeño hematoma en la zona, sin embargo, es poco probable que este se produzca.

En caso de que el paciente requiera de atención médica se acudirá a la unidad de SU SALUD UAQ con teléfono 4421921200, ubicada en el edificio 1 de la Facultad de Química, donde se cuenta con servicio médico de rápido alcance para atender al paciente donador.

Beneficios de la donación de sangre periférica para el presente estudio

El participante voluntario no asumirá ningún costo por su participación y todo lo necesario para realizar la toma de muestra será proporcionado por la tesista y su directora responsable. Así mismo, se contribuye a la investigación del efecto anti-proliferativo (citotoxicidad) del péptido O1P4Bad en células sanguíneas para determinar su propuesta en el tratamiento de la LLA-T.

Medios para la revocación del consentimiento

En cualquier momento puede solicitar la revocación del consentimiento otorgado a los investigadores para tratar sus datos personales llenado el formato de revocación de consentimiento que le será entregado antes de su toma de muestra.

Confidencialidad

Los datos recabados en el siguiente se manejarán bajo los criterios de confidencialidad que dictaminan las normas mexicanas.

Información de contacto

Investigador responsable: Dra. Alicia Irasema Mendieta Trejo

Laboratorio de Química Biomolecular

Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro

e-mail: alicia.mendieta@uaq.mx

Tel. (01 442) 1 92 12 00 Ext. 75015

CONSENTIMIENTO INFORMADO

PARTICIPANTE

Nombre del participante _____

Domicilio _____

Número de teléfono _____ Fecha _____

Firma del participante _____

TESTIGO 1

Nombre del testigo _____

Domicilio _____

Número de teléfono _____ Fecha _____

Firma del testigo _____

TESTIGO 2

Nombre del testigo _____

Domicilio _____

Número de teléfono _____ Fecha _____

Firma del testigo _____

DECLARACIÓN DE LA INVESTIGADORA

Mi directora a cargo y yo hemos expuesto al participante el propósito y objetivo del estudio, así como los posibles riesgos y beneficios de su participación en este. Considero por mi parte que el participante ha recibido la información completa con un lenguaje comprensible y apropiado, además de que sus dudas fueron resueltas.

Nombre de la investigadora o representante _____

Firma de la investigadora _____

X.2. Anexo 2

Solicitud de revocación del consentimiento para la participación en el estudio del efecto anti-proliferativo del péptido O1P4Bad en células mononucleares sanas de sangre periférica (PBMC).

FORMATO DE REVOCACIÓN DE CONSENTIMIENTO

Fecha y hora de recepción: _____

Lugar: _____

1. DATOS DEL SOLICITANTE

Nombre del titular

Apellido paterno

Apellido materno

Nombre(s)

Descripción del documento oficial que proporciona

Identificación oficial del solicitante o representante legal (anexar copia simple)

Credencial de elector

Cartilla de servicio militar

Credencial de afiliación IMSS, ISSS o INAPAM

Pasaporte vigente

Cédula profesional

2. DOMICILIO O MEDIO PARA RECIBIR NOTIFICACIONES

Domicilio del titular

Calle

Número

Colonia

C.P.

Municipio

Correo electrónico _____

3. NOMBRE DE A QUIEN DIRIGE LA SOLICITUD

4. SI LO DESEA, ANOTE EN FORMA CLARA Y PRECISA LOS DATOS PERSONALES CON RESPECTO A LOS CUALES SE SOLICITA LA REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO (OPCIONAL)

5. INDIQUE LA FINALIDAD POR LA CUAL SE REVOCA EL CONSENTIMIENTO

Es mi deseo revocar el consentimiento informado que me fue proporcionado.

Nombre y firma del solicitante

Nombre y firma de quien recibe

X.3. Anexo 3

Figura 9. Invitación de reclutamiento publicada a los voluntarios para participar en el estudio del efecto anti-proliferativo del péptido O1P4Bad en células mononucleares sanas de sangre periférica (PBMC).

¿Te gustaría ser parte de un proyecto de investigación?

¿En que consiste?
Se tomará una muestra de sangre de 3 mL de su brazo, con una duración aproximada de 5 minutos.

¿Cuál es el objetivo?
Evaluar la citotoxicidad generada por el péptido O1P4Bad sobre las células mononucleares de sangre periférica (PBMC).

¿Existen riesgos?
Son mínimos y pueden ser, molestias, un ligero dolor en la toma de muestra o aparición de hematomas en la zona.

¿Cómo serán manejados los residuos?
De acuerdo con las normativas establecidas en la NOM-087SEMARNAT-SSA1-2002.

Requisitos para ser voluntario

- Sexo indistinto
- Tener entre 20-25 años
- Encontrarse sanos antes de la toma de muestra
- No tener antecedentes de cáncer.

¿Dónde?
En el laboratorio de Investigación Genética del edificio de Posgrado en Ciencias Químico-Biológicas

¡Su participación es completamente anónima!

¿Interesado en participar?
Comunicate al:
tel. 4271636151
correo: aresendiz111@alumnos.uaq.mx

Ayúdanos a complementar nuestra investigación, itú participación es importante!