

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO Y  
APOPTÓTICO ENTRE CEFOURINA-1 Y  
6-MERCAPTOPURINA EN LA LÍNEA CELULAR  
LEUCÉMICA JURKAT”**

**PROTOCOLO DE TRABAJO DE  
INVESTIGACIÓN**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA

VALERIA JACQUELINE SOTO ONTIVEROS

DIRIGIDO POR

DR. EDGARDO BECERRA BECERRA

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2022.



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO ANTIPROLIFERATIVO Y  
APOPTÓTICO ENTRE CEFOURINA-1 Y  
6-MERCAPTOPURINA EN LA LÍNEA CELULAR  
LEUCÉMICA JURKAT”**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA**

**PRESENTA**

**VALERIA JACQUELINE SOTO ONTIVEROS**

**DIRIGIDO POR**

**Dr. EDGARDO BECERRA BECERRA**

**SINODALES**

**Dr. EDGARDO  
DIRECTOR**

---

**Dra. GUADALUPE  
SINODAL**

---

**Dra. LAURA CORTÉS  
SINODAL**

---

## ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
1. ANTECEDENTES	1
1.1 Leucemia linfoblástica aguda de células T	1
1.3 Quimiorresistencia	4
1.3.1 Proteína 4 de resistencia a múltiples fármacos	4
1.3.2 Inhibidores de MRP4	7
1.3.2.1 Cefourina-1 y cefourina-2	8
1.4 Acoplamiento y dinámica molecular	9
1.4.1 Acoplamiento molecular	9
1.4.2 Dinámica molecular	10
1.4.2.1 <i>Umbrella Sampling</i>	10
2. HIPÓTESIS	11
3. OBJETIVO	11
3.1 General	11
4. METODOLOGÍA	12
4.1 Materiales y Métodos	12
4.1.1 Fármacos	12
4.1.2 Cultivo celular	12
4.1.3 Ensayo de proliferación y viabilidad	13
4.1.4 Ensayo de apoptosis	13
4.1.5 Disposición de residuos	13
4.1.6 Análisis estadísticos	14

4.1.7 Índice de combinación	14
4.1.8 Acoplamiento molecular	14
4.1.9 Simulaciones <i>Umbrella Sampling</i>	15
5. RESULTADOS	15
5.1 Proliferación celular	15
5.2 Viabilidad celular	18
5.3 Acoplamiento molecular y simulaciones <i>Umbrella Sampling</i>	21
6. DISCUSIÓN	23
7. CONCLUSIONES	27
8. REFERENCIAS	28

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Concentraciones de 6-MP y Ceef1 para los ensayos de proliferación y viabilidad.	13

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras	Página
1. Vías de señalización implicadas en la fisiopatología de la leucemia linfoblástica aguda de células T. ....	2
2. Tratamiento de primera línea para leucemia linfoblástica aguda. ....	3
3. Representación esquemática de la activación de 6-MP y su mecanismo de acción. ....	5
4. Estructura de MRP4. ....	6
5. Impacto de la sobreexpresión de MRP4 en el eflujo de 6-MP. A).....	7
6. Inhibidores conocidos de MRP4 y su bioactividad. ....	8
7. Curva de proliferación concentración-respuesta de 6-MP. ....	16
8. Curva de proliferación concentración-respuesta de cefourina-1. ....	16
9. Tratamientos individuales y en combinación de 6-MP y Ceef1 en células Jurkat y en células CRL-1991, para comprobar su efecto sobre la proliferación celular. ....	17
10. Curva de apoptosis concentración-respuesta de 6-MP. ....	18
11. Curva de apoptosis concentración-respuesta de cefourina-1. ....	19
12. Tratamientos individuales y en combinación de 6-MP y Ceef1 en células Jurkat y en células CRL-1991, para comprobar su efecto sobre la inducción de la apoptosis. ....	20
13. Diagrama de interacción del ligando 6-MP en MRP4. ....	21
14. Diagrama de interacción del ligando Ceef1 en MRP4. ....	22
15. Representación de la estructura completa de MRP4 en complejo con 6-MP, y un acercamiento al sitio de unión de 6-MP. ....	22
16. Representación de la estructura completa de MRP4 en complejo con Ceef1, y un acercamiento al sitio de unión de sitio de unión de 6-MP. ....	23

## RESUMEN

La leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) es un cáncer hematológico agresivo. El tratamiento de primera línea logra tasas de supervivencia altas (80-90%), sin embargo, del 20-40 % de los pacientes sufren una recaída y actualmente no existe un tratamiento 100 % efectivo. Las altas tasas de recaída pueden ser debidas a la quimiorresistencia adquirida a 6-mercaptopurina (6-MP), fármaco utilizado ampliamente en la terapia de mantenimiento. Dicha quimiorresistencia está mediada por la proteína 4 de resistencia a múltiples fármacos (MRP4), al efluirla de las células leucémicas. Adicionalmente, MRP4 está relacionado con el aumento en el eflujo de cAMP en células leucémicas, conduciendo a una mayor proliferación y a la inhibición de la apoptosis. La cefourina-1 se reportó como un inhibidor selectivo de MRP4, pero actualmente no es usada en ningún protocolo de tratamiento. En el presente trabajo, se determinó la actividad potenciadora de cefourina-1 sobre el efecto antiproliferativo y apoptótico de 6-MP en células leucémicas Jurkat y línea celular de linfoblastos normales (CRL-1991) mediante el ensayo de azul tripán y citometría de flujo. Además, se determinaron los sitios de unión de 6-MP y cefourina-1 a MRP4 mediante acoplamiento molecular y dinámica molecular. La cefourina-1 tuvo un efecto aditivo en la inhibición de la proliferación y un efecto sinérgico en la actividad apoptótica de 6-MP de las células Jurkat, mientras que en las células CRL-1991 ambos efectos fueron significativamente menores. Los ensayos de acoplamiento y dinámica molecular determinaron que ambas moléculas se unen en el mismo sitio a MRP4 y que cefourina-1 tiene una mayor afinidad teórica; así, se propone a cefourina-1 como un antagonista competitivo para la unión de 6-MP a MRP4, evitando su eflujo de las células. Por lo tanto, cefourina-1 podría ser considerada una buena opción de tratamiento en protocolos de quimioterapia combinada en LLA-T.

## 1. ANTECEDENTES

### 1.1 Leucemia linfoblástica aguda de células T

La leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T) es un cáncer hematológico agresivo, caracterizado por la proliferación clonal de precursores de células T inmaduras que surgen del timo y se infiltran en la médula ósea y la sangre periférica (Tan y col., 2017; Fattizzo y col., 2020). Los niños, adolescentes y adultos jóvenes comprenden el 70 % de los casos de LLA (Shiraz y col., 2021). La LLA-T representa del 10-15 % de los casos de LLA pediátrica y hasta el 25 % de los casos de LLA en adultos (Cordo' y col., 2020). La incidencia mundial de LLA varía de 2.0 a 3.5 casos por cada 100 000 habitantes por año, mientras que en Latinoamérica la incidencia es mayor, siendo en México de 6 casos por cada 100 000 habitantes por año. Además, las tasas de mortalidad infantil han mostrado una tendencia creciente a lo largo de los años siendo en 2018 de 1.7 por cada 100 000 (Colunga-Pedraza y col., 2018; Shiraz y col., 2021; Muñoz-Aguirre y col., 2022).

El desarrollo de LLA-T requiere de alteraciones genéticas en oncogenes y supresores tumorales cruciales a través de diferentes mecanismos recurrentes (Figura 1), como:

- Translocaciones cromosómicas.
- Reordenamientos intracromosómicos.
- Mutaciones en genes codificadores de proteínas o elementos potenciadores.
- Anomalías epigenéticas.

Las alteraciones mencionadas previamente suelen afectar a genes necesarios para el crecimiento, la supervivencia y la diferenciación celular durante el desarrollo normal de las células T (Tan y col., 2017).

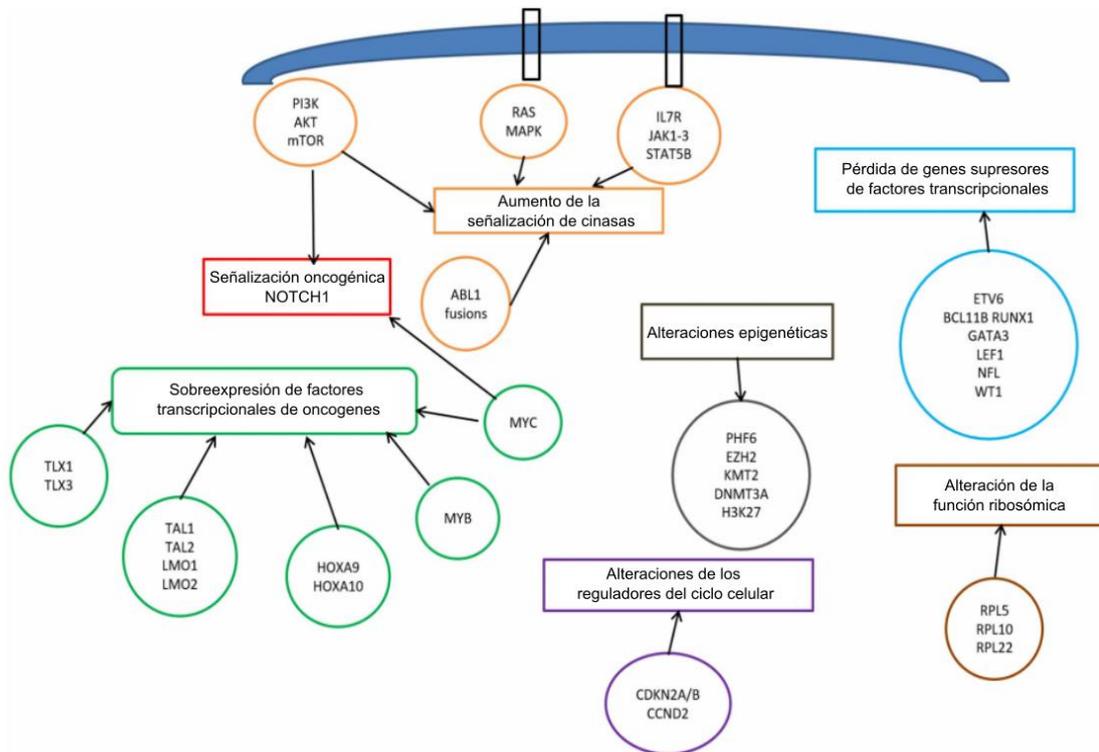


Figura 1. Vías de señalización implicadas en la fisiopatología de la leucemia linfoblástica aguda de células T. Modificado de Fattizzo y col., 2020.

## 1.2 Tratamiento actual

Históricamente, los tratamientos de primera línea para LLA se han administrado sin distinguir entre inmunofenotipos T y B, y consisten en una quimioterapia combinada de alta intensidad que típicamente incluye 4 fases (Figura 2):

Fase 1 (inducción): tiene como objetivo la remisión completa, la cual se caracteriza por la ausencia de células leucémicas en biopsias de médula ósea, presencia de células normales en médula y recuentos sanguíneos en niveles normales (Malard y Mohty, 2020; American Cancer Society, 2021).

La fase 1 tiene una duración aproximada de un mes. Se pueden utilizar diferentes combinaciones de quimioterapéuticos, pero normalmente incluyen: un glucocorticoide (dexametasona o prednisona), vincristina, asparaginasa, y una antraciclina (doxorubicina o daunorubicina) (Malard y Mohty, 2020; American Cancer Society, 2021).

Fase 2 (consolidación): si se logra entrar en remisión, la siguiente fase suele consistir en quimioterapias cada 2 semanas durante un periodo aproximado de 12 semanas. Usualmente se administran dosis bajas de citarabina, dosis altas de metotrexato (MTX) (>500 mg/m<sup>2</sup>), vincristina, asparaginasa, 6-mercaptopurina, y glucocorticoides (Malard y Mohty, 2020; American Cancer Society, 2021).

Fase 3 (intensificación): la consolidación va seguida de una intensificación tardía (terapia de reinducción), que incluye fármacos similares a los utilizados en el tratamiento durante la terapia de inducción (Malard y Mohty, 2020; American Cancer Society, 2021).

Fase 4 (mantenimiento): en la terapia de mantenimiento se utiliza 6-mercaptopurina diaria y MTX semanal, con o sin vincristina, y pulsos de glucocorticoides cada 1-3 meses. El mantenimiento se administra durante 2-3 años tras lograr la remisión (Malard y Mohty, 2020; American Cancer Society, 2021).

\*Tratamiento dirigido al sistema nervioso central (SNC): suele aplicarse como profilaxis del SNC para evitar que las células leucémicas se extiendan al mismo o como tratamiento si ya se ha extendido al SNC. Se suele iniciar a la par con la terapia de inducción y puede continuar durante las demás fases del tratamiento. Las estrategias terapéuticas actuales pueden incluir: quimioterapia intratecal con MTX solo o asociado con citarabina e hidrocortisona en combinación con altas dosis de MTX intravenoso y citarabina (Malard y Mohty, 2020).

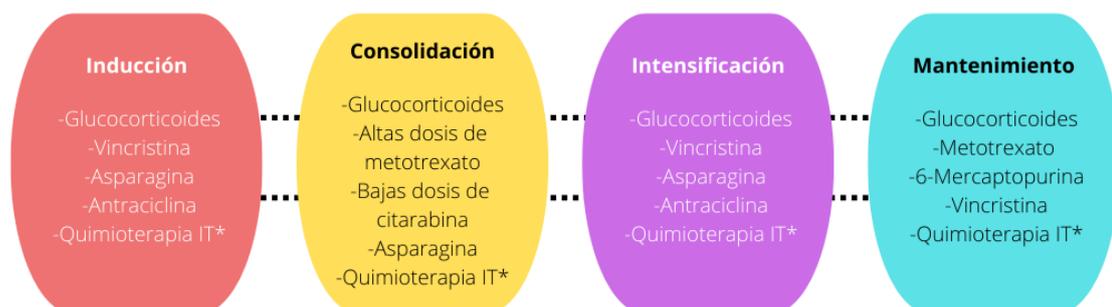


Figura 2. Tratamiento de primera línea para leucemia linfoblástica aguda.  
\*Quimioterapia intratecal (IT).

Los regímenes de tratamiento logran una tasa de supervivencia a 5 años en el 80-90 % de pacientes pediátricos, mientras que en adultos son mucho más bajas <45 % (Malard y Mohty, 2020; Patel y col., 2020).

A pesar de las elevadas tasas de remisión completa (80-90%) tras el tratamiento de primera línea, aproximadamente el 20 % de los pacientes pediátricos y el 40 % de los adultos sufrirán una recaída. A diferencia de la LLA de precursores de células B, en la que se han desarrollado anticuerpos monoclonales altamente eficaces, así como células T con receptores de antígenos quiméricos (CAR) dirigidos a CD19, en la LLA-T sólo el análogo de nucleósido de purina nelarabina está autorizado para los pacientes en recaída/refractarios. El tratamiento de la LLA-T recidivante/refractaria es, por lo tanto, una necesidad no cubierta y sólo nuevas estrategias dirigidas tendrán el potencial de cambiar el destino de estos pacientes (Fattizzo y col., 2020).

### 1.3 Quimiorresistencia

Las altas tasas de recaída pueden ser explicadas por la quimiorresistencia adquirida a 6-mercaptopurina (6-MP), ampliamente utilizada en la terapia de mantenimiento.

La hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (HGPRT, por sus siglas en inglés) convierte 6-MP en monofosfato de tioinosina (TIMP, por sus siglas en inglés) compitiendo con los derivados naturales de las purinas, hipoxantina y guanina, que los convierte generalmente en inosina monofosfato (IMP). El TIMP inhibe varias reacciones químicas, incluida la conversión de IMP en monofosfato de xantosina (XMP) y monofosfato de adenosina (AMP), impidiendo la síntesis de bases púricas y el ensamblaje del ADN, lo que provoca la muerte celular de las células cancerígenas (Figura 3) (Follini y col., 2019).

#### 1.3.1 Proteína 4 de resistencia a múltiples fármacos

La proteína 4 de resistencia a múltiples fármacos (MRP4, por sus siglas en inglés) es un transportador dependiente de ATP y es el cuarto miembro de la subfamilia ABCC. MRP4 actúa como una bomba de exportación unidireccional de aniones orgánicos a través de las membranas biológicas contra un gradiente de

concentración. Dentro de los sustratos endógenos que transporta se encuentran principalmente moléculas señalizadoras (los eicosanoides prostaglandina E<sub>2</sub>, leucotrieno B<sub>4</sub> y tromboxano TXB<sub>2</sub>) y segundos mensajeros (los nucleótidos cíclicos cAMP y cGMP), así como ácidos biliares, esteroides conjugados, y ácido fólico. Así, MRP4 puede desempeñar un papel clave en la protección de las células y en las vías de transducción de señales extracelulares (Chen y col., 2018; Berthier y col., 2019).

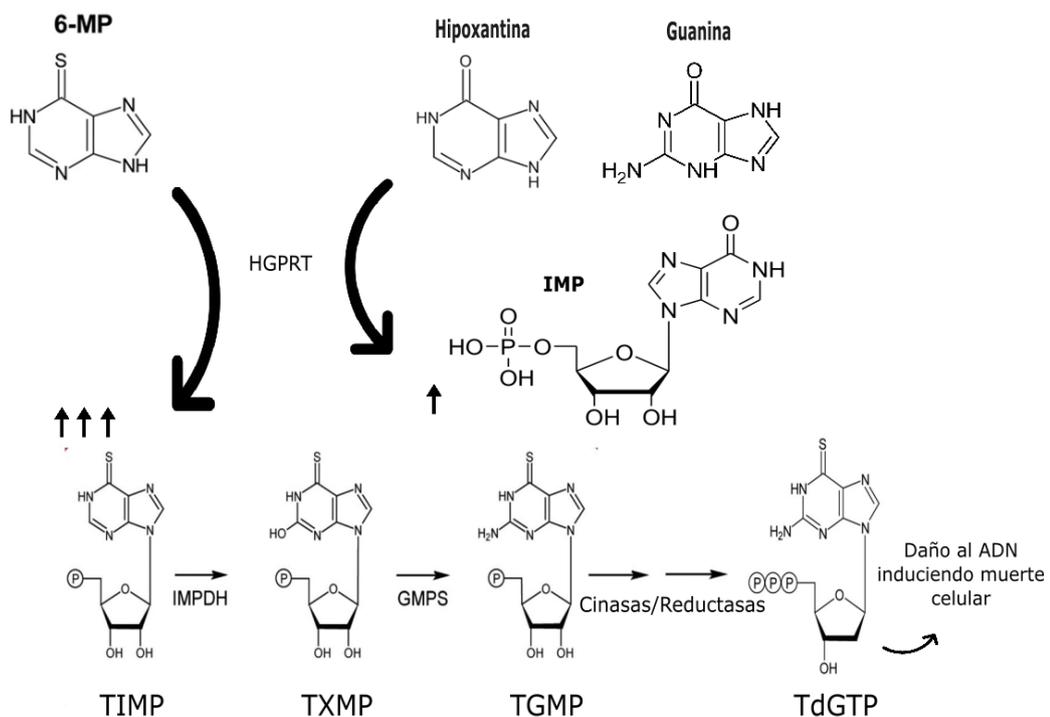


Figura 3. Representación esquemática de la activación de 6-MP y su mecanismo de acción. ↑↑↑: concentración más alta de monofosfato de tioinosina (TIMP); ↑: concentración más baja de monofosfato de inosina (IMP); HGPRT: hipoxantina-guanina fosforibosil transferasa; TXMP: monofosfato de tioxantósina; TGMP: monofosfato de tioguanina; TdGTP: trifosfato de tioguanina; IMPDH: inosina 5'-monofosfato deshidrogenasa; GMPS: guanina monofosfato sintasa. Modificado de Tzoneva y col., 2018.

MRP4 está compuesto por dos dominios transmembranales (TMD, por sus siglas en inglés) y dos dominios de unión a nucleótidos (NBD, por sus siglas en inglés). Cada TMD consta de seis hélices transmembranales (TMHs) que son importantes para la unión del ligando. Los NBDs unen e hidrolizan el ATP para favorecer el transporte (Figura 4) (Chen y col., 2018).

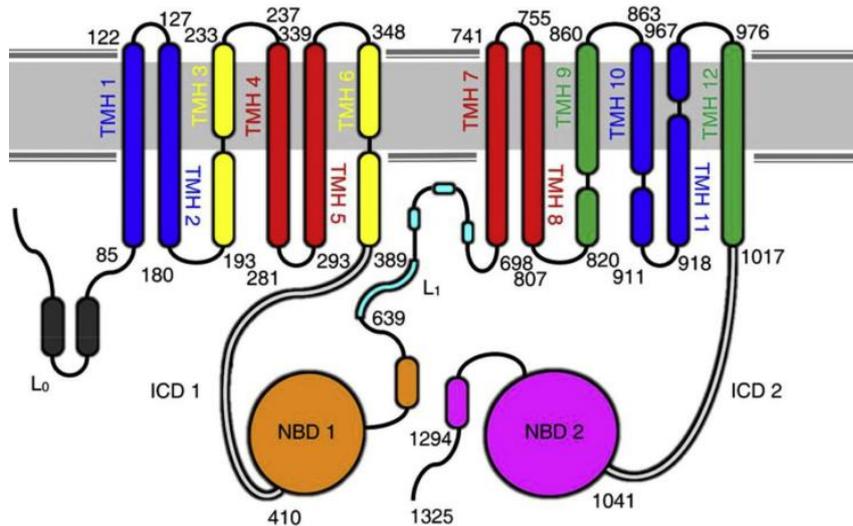


Figura 4. Estructura de MRP4. TMH: hélices transmembranales; L1 y L0: puentes; NBD: dominios de unión a nucleótidos; ICD: dominio intra-citoplasmático. Los números indican el aminoácido. Tomado de Chen y colaboradores, 2018.

MRP4 también tiene la habilidad de transportar una variedad de agentes terapéuticos, particularmente fármacos anticancerígenos como tiopurinas, camptotecinas, y metotrexato; se sabe que está asociado a la resistencia a múltiples fármacos (Cheung y col., 2014; Chen y col., 2018; Berthier y col., 2019). Se ha demostrado que la quimiorresistencia a 6-MP está mediada por MRP4 al efluirlo de las células LLA-T por ser un análogo a sus sustratos naturales, aumentando así la supervivencia de las células quimiorresistentes. Además, en células LLA-T existe una desregulación metabólica de transportadores, estando la expresión de MRP4 aumentada y la de los transportadores de influjo disminuida (Figura 5) (Peng y col., 2008; Liu y col., 2017; Berthier y col., 2019).

Adicionalmente, MRP4 es el principal regulador de los niveles intracelulares del monofosfato de adenosina cíclico (cAMP) en las células de leucemia humana, al regular su eflujo. El cAMP es un segundo mensajero que desempeña un papel fundamental en la respuesta celular a numerosos estímulos extracelulares. La vía de señalización del cAMP controla una amplia gama de eventos celulares, como la proliferación, la diferenciación y la apoptosis, incluyendo el desarrollo hematopoyético. La inhibición de MRP4 se asocia con un aumento de cAMP, lo que conduce a una menor proliferación, promoción de la diferenciación celular y activación de la apoptosis intrínseca en células leucémicas (Copsel y col., 2011; Pérez y col., 2016).

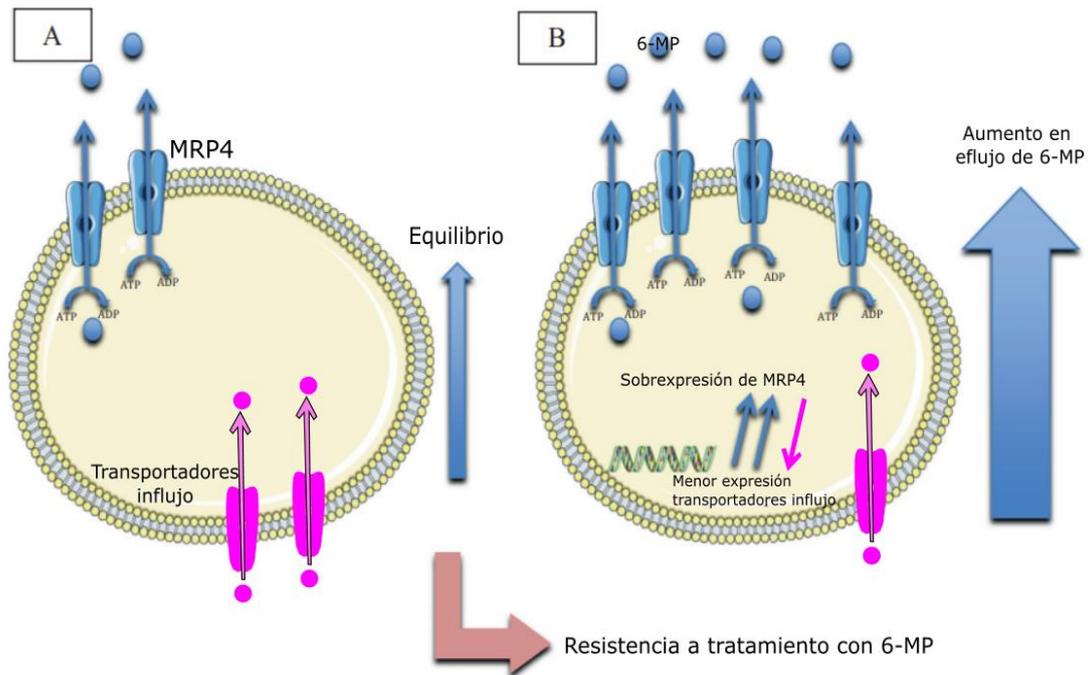


Figura 5. Impacto de la sobreexpresión de MRP4 en el eflujo de 6-MP. A) Condiciones normales. B) Quimiorresistencia a 6-MP (esferas azules). Modificado de Berthier y col., 2019.

El efecto de la elevación de los niveles intracelulares de cAMP puede ser pro-apoptótico o anti-apoptótico, dependiendo del tipo celular. En leucemias/linfomas, la elevación del cAMP es pro-apoptótico, mientras que en las células sanguíneas normales es anti-apoptótico (Pérez y col., 2016). De acuerdo con esta afirmación, la disminución del eflujo de cAMP mediante la inhibición de MRP4, podría ser suficiente para desencadenar selectivamente la apoptosis en las células leucémicas, las cuales dependen del eflujo de cAMP como mecanismo de supervivencia.

### 1.3.2 Inhibidores de MRP4

A pesar del rol fundamental de MRP4 en la fisiopatología del cáncer, su inhibición farmacológica es limitada debido a que se dispone de relativamente pocas moléculas inhibitoras pequeñas (SMI, por sus siglas en inglés). Los inhibidores conocidos son generalmente de baja potencia y especificidad (Figura 6) (Chen y col., 2018).

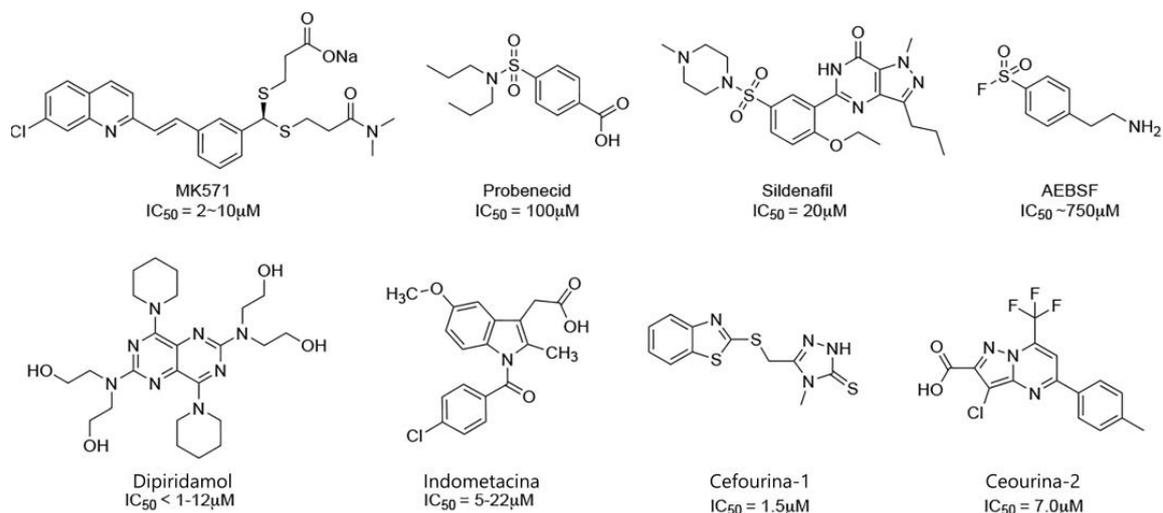


Figura 6. Inhibidores conocidos de MRP4 y su bioactividad. Tomada de Chen y col., 2018.

El MK571 (ácido (*E*)-3-[[[3-[2-(7-cloro-2-quinolinil)etenil]fenil]-[[3-dimetilamino]-3-oxopropil]tio]metil]tio)-propanoico), un compuesto probado clínicamente, es un inhibidor no selectivo de MRP4, ya que también inhibe MRP1, MRP2, MRP3, MRP5, el transportador de captación OAT1B1/SLCO1B1, antagoniza el receptor cisteinil leucotrieno 1 y a fosfodiesterasas (Keppler, 2010; Cole, 2014; Xie y col., 2011). Además, probenecid, sildenafil, AEBSF, dipiridamol e indometacina, son inhibidores débiles y no selectivos de MRP4. Cheung y colaboradores identificaron a la cefourina-1 y la cefourina-2 como inhibidores altamente selectivos de MRP4 mediante el cribado de alto rendimiento (HTS, por sus siglas en inglés) de una biblioteca diversa de moléculas pequeñas, pero actualmente no son utilizados en ningún protocolo de quimioterapia (Cheung y col., 2014; Chen y col., 2018).

### 1.3.2.1 Cefourina-1 y cefourina-2

La cefourina-1, un compuesto que contiene benzotiazol, y la cefourina-2, una pirazolopirimidina, demostraron tener el potencial de ser inhibidores selectivos para MRP4 y tener la capacidad de resolver algunos de los problemas derivados del uso de los inhibidores no selectivos descritos anteriormente.

Los experimentos realizados por Cheung y colaboradores demostraron que:

- Cefourina-1 y cefourina-2 son eficaces en inhibir la función de MRP4 a concentraciones micromolares bajas con una  $IC_{50}$  de 1.5  $\mu$ M y 7  $\mu$ M, respectivamente.
- Las cefourinas bloquean el transporte de diversos sustratos de MRP4, incluyendo:
  - 6-MP.
  - SN-38.
  - cAMP.
  - D-luciferina.
  - E217 $\beta$ G.
- Las cefourinas no tienen ningún efecto detectable en la actividad de transporte mediada por los homólogos de MRP4 (MRP1, 2, 3 o 5), y no afectaron a la actividad de transportadores con una relación genética más distante como P-gp y ABCG2.
- Las cefourinas son relativamente poco tóxicas por sí mismas y son bien toleradas en una amplia gama de líneas celulares (fibroblastos, neuroblastoma, hepatocarcinoma, carcinoma de próstata, glioblastoma, carcinoma de mama), con valores de  $IC_{50}$  típicamente  $>50 \mu$ M.

La propuesta de la capacidad de cefourina-1 para modular el eflujo de cAMP a través de la inhibición de MRP4 según Cheung y col., fue confirmada por diversos autores al demostrar una inhibición en la proliferación de células de leucemia mieloide aguda, astrocitos, y células epiteliales de las vías respiratorias humanas, como consecuencia de la inhibición del eflujo de cAMP (Jördens y col., 2015; Rodríguez-González y col., 2020; Nguyen y col., 2021).

## 1.4 Acoplamiento y dinámica molecular

### 1.4.1 Acoplamiento molecular

El acoplamiento molecular es una herramienta clave en la biología molecular estructural y el diseño de fármacos asistido por computadora. El acoplamiento molecular suele realizarse entre una molécula pequeña y una macromolécula

objetivo, denominado comúnmente acoplamiento ligando-proteína. El acoplamiento ligando-proteína sirve para predecir el modo o modos de unión predominantes de un ligando con una proteína de estructura tridimensional conocida (Morris y Lim-Wilby, 2008).

El acoplamiento puede utilizarse para realizar un cribado virtual de grandes bibliotecas de compuestos, clasificar los resultados y proponer hipótesis estructurales sobre la forma en que los ligando inhiben la diana (Morris y Lim-Wilby, 2008).

#### 1.4.2 Dinámica molecular

Las simulaciones de dinámica molecular (DM) han evolucionado como poderosas herramientas para explorar mecanismos de interacción a nivel atómico, que suelen estar fuera del alcance de las herramientas experimentales actuales. Las simulaciones de DM sirven para estudiar los sistemas biomoleculares complementando los experimentos al proporcionar información sobre la dinámica estructural relevante para las funciones biológicas a escala atómica (Zheng y col., 2018; Liao, 2020).

La dinámica molecular es una herramienta numérica basada en las ecuaciones de movimiento de Newton para la simulación de sistemas de  $N$  cuerpos mediante la actualización iterativa de las fuerzas de las partículas y las energías potenciales del sistema compuestas por potenciales interatómicos/intraatómicos o campos de fuerza mecánicos. Durante las simulaciones de DM, las coordenadas, las velocidades, las fuerzas, y las energías potenciales se calculan en cada paso iterativo, cuyo espacio temporal entre uno y otro se denomina "paso de tiempo". Cuanto más pequeño sea el paso de tiempo, más precisa será la simulación, pero más intensiva en términos de cálculo (Zheng y col., 2018).

##### 1.4.2.1 *Umbrella Sampling*

Las simulaciones de *Umbrella Sampling* (US), una variante de DM, es uno de los métodos que permiten calcular la energía libre (afinidad teórica) a lo largo de una coordenada de reacción, sirve para determinar la energía de unión de una molécula a una proteína (Kästner, 2011).

En US, los potenciales de polarización a lo largo de una coordenada de reacción (unidimensional o más) conducen un sistema de un estado termodinámico a otro (por ejemplo, unión proteína-ligando). Los pasos intermedios están cubiertos por una serie de ventanas, en cada una de las cuales se realiza una simulación DM. A partir de la distribución muestreada del sistema a lo largo de la coordenada de reacción, se puede calcular el cambio de energía libre en cada ventana. A continuación, las ventanas se combinan mediante métodos como el del análisis del histograma ponderado o la integración *Umbrella*. Si el potencial de polarización se adapta para dar lugar a una distribución uniforme entre los estados finales, entonces todo este rango puede ser abarcado por una ventana (US de polarización adaptativa). En este caso, el cambio de energía libre se obtiene directamente de la polarización. El muestreo en cada ventana puede mejorarse mediante métodos de intercambio de réplicas; ya sea mediante el intercambio entre ventanas sucesivas o realizando simulaciones adicionales a temperaturas más altas (Kästner, 2011).

Haciendo uso del acoplamiento y dinámica molecular se pueden identificar los sitios de unión de 6-MP y cefourina-1 a MRP4, así como determinar la energía de unión de ambos. Lo cual permitirá dilucidar cómo cefourina-1 inhibe el transporte de 6-MP y cAMP al interactuar con MPR4.

## 2. HIPÓTESIS

Cefourina-1 (Ceef1) administrado en conjunto con 6-mercaptopurina aumentará significativamente el efecto antiproliferativo y apoptótico en las células leucémicas Jurkat, pero no en la línea celular linfoblástica normal CRL-1991.

## 3. OBJETIVO

### 3.1 General

Determinar y comparar el efecto antiproliferativo y apoptótico de la combinación de 6-mercaptopurina y cefourina-1 en células leucémicas Jurkat y linfoblastos normales (CRL-1991), y analizar si tienen un efecto aditivo o sinérgico.

### 3.2 Específicos

- Determinar la concentración de 6-MP y Ceef1 necesaria para inducir el 20 % y el 40 % de inhibición de la proliferación siguiendo el protocolo de azul tripán.
- Determinar la concentración de 6-MP y Ceef1 necesaria para inducir el 20 % y el 40 % de apoptosis con el kit de detección de apoptosis FITC Anexina V.
- Calcular el índice de combinación (IC) entre 6-MP y Ceef1 con la ecuación del índice de combinación.
- Identificar los sitios de unión y las interacciones intermoleculares de 6-MP y Ceef1 en MRP4 mediante acoplamiento molecular y dinámica molecular.
- Calcular la afinidad teórica de 6-MP y Ceef1 a MRP4 mediante *Umbrella Sampling*.

## 4. METODOLOGÍA

El trabajo de investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Química Biomolecular ubicado en el edificio del Posgrado en Ciencias Químico Biológicas de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro.

### 4.1 Materiales y Métodos

#### 4.1.1 Fármacos

Para llevar a cabo los ensayos de apoptosis y proliferación, 6-mercaptopurina (ab142389) y cefourina-1 (ab145144) se obtuvieron de la empresa ABCAM, con una pureza >98 %.

#### 4.1.2 Cultivo celular

Las células Jurkat (ATCC TIB-152) y T1 (174 x CEM.T1) (ATCC CRL-1991) se obtuvieron de la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, EE.UU.) y se cultivaron a 37 °C en una atmósfera humidificada de 95 % de aire/ 5 % de CO<sub>2</sub>. Las células Jurkat se cultivaron en medio RPMI 1640 (ATCC 30-2001), y las células CRL-1991 se cultivaron en medio Dubelcco modificado de

Iscove, ambos medios con un 10 % de suero fetal bovino (FBS, ATCC 30-2020) y antibióticos (penicilina y sulfato de estreptomicina).

Cuadro 1. Concentraciones de 6-MP y Ceef1 para los ensayos de proliferación y viabilidad.

		<b>Concentración <math>\mu\text{M}</math></b>			
6-MP	0.1	1.0	5.0	10	50
Cefourina-1	0.1	1.5	10	50	--

#### 4.1.3 Ensayo de proliferación y viabilidad

Para determinar el efecto de 6-MP y Ceef1 sobre la proliferación y viabilidad celular, se trataron  $1 \times 10^6$  células/mL con las concentraciones listadas en el Cuadro 1 y se contaron después de 24 h. El recuento celular se realizó en un contador celular CytoSmart, procesamiento de imágenes basado en la nube para realizar recuento celular de Corning (número de cat. 6749), siguiendo el protocolo de azul tripano (Strober, 2015).

#### 4.1.4 Ensayo de apoptosis

El ensayo de apoptosis se realizó con el kit de detección de apoptosis FITC Anexina V (nº 556547), según las instrucciones del fabricante. Brevemente, se trataron  $1 \times 10^6$  células con diferentes concentraciones de 6-MP y Ceef1 (Cuadro 1). Tras 24 h de tratamiento con el fármaco, las células se lavaron dos veces con tampón fosfato salino (PBS, por sus siglas en inglés) frío y luego se resuspendieron en tampón de unión a una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL. Se transfirió una cantidad de 100  $\mu\text{L}$  ( $1 \times 10^5$  células) a un tubo de cultivo de 5 mL, y las células se tiñeron con 5  $\mu\text{L}$  de FITC Anexina V y 5  $\mu\text{L}$  de yoduro de propidio. La suspensión celular se mezcló suavemente con un vórtex y se incubó durante 15 min a temperatura ambiente. Después de la incubación, se añadieron 400  $\mu\text{L}$  de tampón de unión 1x a cada tubo, y las células se analizaron por citometría de flujo en un sistema BD FACSVerse™ (BD Biosciences, MH, México) y el software BD FACSuite™, en un plazo máximo de 1 h.

#### 4.1.5 Disposición de residuos

Los cultivos celulares, clasificados como nivel 1 de bioseguridad, generados en la experimentación se envasaron en bolsas de polietileno rojo marcadas con el

símbolo universal de riesgos biológico y la leyenda Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos (RPBI). Se almacenaron temporalmente para su posterior recolección y transporte por la empresa ECOSERVI Industrial, quienes se encargaron del tratamiento para su correcta disposición final. Con base en la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.

#### 4.1.6 Análisis estadísticos

Los datos se normalizaron a la señal máxima y las curvas de concentración-respuesta se ajustaron con un modelo logístico de tres parámetros mediante regresión no lineal utilizando el programa GraphPad Prism 8 para determinar la concentración que inhibía el 20 % y el 40 % de la proliferación y la concentración que inducía el 20 % y el 40 % de la muerte celular. Para determinar las diferencias significativas entre los grupos se representaron con letras diferentes ( $p$ -value  $\leq 0.05$ ), según el ANOVA de dos vías y la prueba de comparación múltiple de Bonferroni.

#### 4.1.7 Índice de combinación

Para calcular el índice de combinación se utilizó la ecuación 1 (Yunos y col., 2011):

$$Ec\ 1. \quad IC = \frac{D_1}{D_{1x}} + \frac{D_2}{D_{2x}}$$

donde  $D_1$  y  $D_2$  son las dosis de los fármacos 1 y 2 en combinación para lograr  $x$  % de inhibición, mientras que  $D_{1x}$  y  $D_{2x}$  en el denominador representan las dosis de los fármacos 1 y 2 que logran  $x$  % de inhibición cuando son usados por separado.

#### 4.1.8 Acoplamiento molecular

Para estudiar el sitio de unión y las interacciones intermoleculares de 6-MP y la Ceef1 en el MRP4, se realizaron estudios de acoplamiento molecular utilizando el software AUTODOCK 4.2.6 (The Scripps Research Institute, San Diego, CA, USA) (Morris y col., 2009). La estructura del MRP4, modelada previamente

(Becerra y col., 2021), se utilizó como entrada para el AUTODOCK 4.2.6. Los mapas se calcularon con un espacio de 0.375 Å entre los puntos de la cuadrícula. El centro de la caja de la cuadrícula se definió como sigue: [-0.65 8.78 28.26], correspondiente a Glu103, Gly359, Arg362 y Ser328 según informes anteriores (Ravna y Sager, 2009). Las dimensiones de la caja del sitio activo se fijaron en 40 x 60 x 80 puntos. Se realizó un acoplamiento rígido-flexible para los compuestos y cada sistema acoplado se construyó utilizando AUTODOCK, con 25 ejecuciones utilizando el algoritmo genético Lamarckiano con 5 millones de evaluaciones de energía máxima por ejecución para determinar las diferencias en las interacciones intermoleculares con MRP4 relacionadas con la estructura química entre cada grupo.

#### 4.1.9 Simulaciones *Umbrella Sampling*

Para calcular la energía de unión de 6-MP y Ceef1 a MRP4, se realizaron simulaciones *Umbrella Sampling* utilizando el MRP4 C1 de la trayectoria AA-MD anterior de 25 ns (Becerra y col., 2021), el sistema se construyó bajo las condiciones mencionadas en la sección 4.1.5. Una vez que se obtuvo el sistema y se relajó utilizando el protocolo de relajación AA-MD, se realizó una simulación de acoplamiento molecular de 10 ns (100 frames) en el módulo Metadinámica de Desmond utilizando la distancia del centro de masa de la proteína y del ligando como variable colectiva, con 0.3 kcal/mol de altura y 0.1 kcal/mol de anchura como parámetros Gaussianos para el protocolo *Umbrella*, en un sistema NPT a 310.15 K y 1.01325 bar. Por último, el análisis se realizó en el módulo de Análisis Metadinámico de Desmond.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Proliferación celular

Las concentraciones de 6-MP descritas en el Cuadro 1 se probaron para determinar aquellas que inhibían el 20 % y el 40 % de la proliferación de las células Jurkat en un periodo de 24 h; siendo estas 4.25 µM y 8.5 µM, respectivamente. En la Figura 7 se puede observar que la reducción en el porcentaje de proliferación es dependiente de la concentración, pero no es lineal. Para el

recuento de células se utilizó el azul tripán, por lo que las células observadas podían estar vivas o muertas, según el principio del ensayo de proliferación.

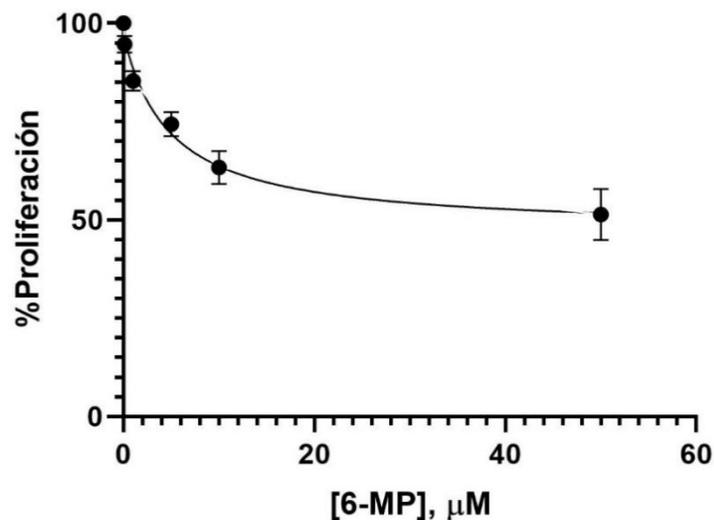


Figura 7. Curva de proliferación concentración-respuesta de 6-MP. La media  $\pm$  desviación estándar es mostrada en cada punto.

Además, también se ensayaron cuatro concentraciones de cefourina-1 en células Jurkat para determinar si este inhibidor de MRP4 interfería en la proliferación celular y así posteriormente poder evaluarlo en combinación con 6-MP. Como puede apreciarse en la Figura 8, el efecto antiproliferativo de la cefourina-1 es dependiente de la concentración, al igual que 6-MP. Las concentraciones de CeeF1 que inhibían el 20 % y el 40 % de la proliferación fueron 1.5  $\mu\text{M}$  y 12  $\mu\text{M}$ , respectivamente.

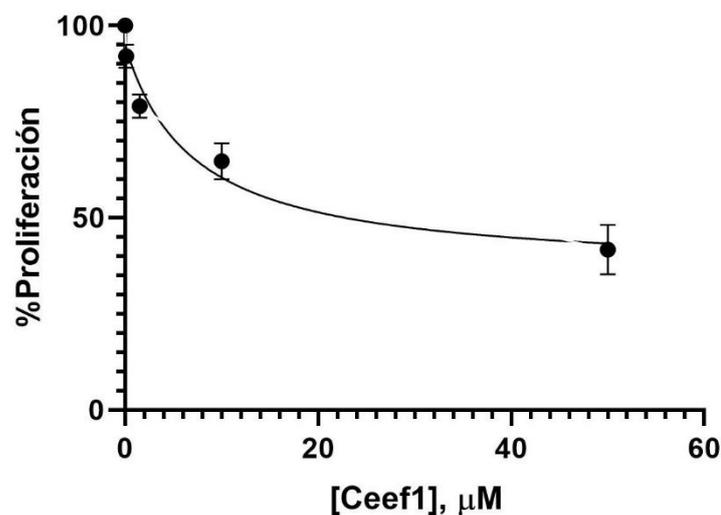


Figura 8. Curva de proliferación concentración-respuesta de cefourina-1. La media  $\pm$  desviación estándar es mostrada en cada punto.

Para determinar si Ceef1 coopera o potencia la actividad de 6-MP sobre la proliferación de las células Jurkat *in-vitro*, las células fueron tratadas con diferentes combinaciones de 6-MP y Ceef1, como se indica en la Figura 9. Adicionalmente estas combinaciones también se probaron en células CRL-1991 con el objetivo de estudiar si ambas líneas celulares presentan respuestas diferentes a los tratamientos, teniendo en cuenta que son metabólicas y genéticamente diferentes, aunque deriven del mismo linaje.

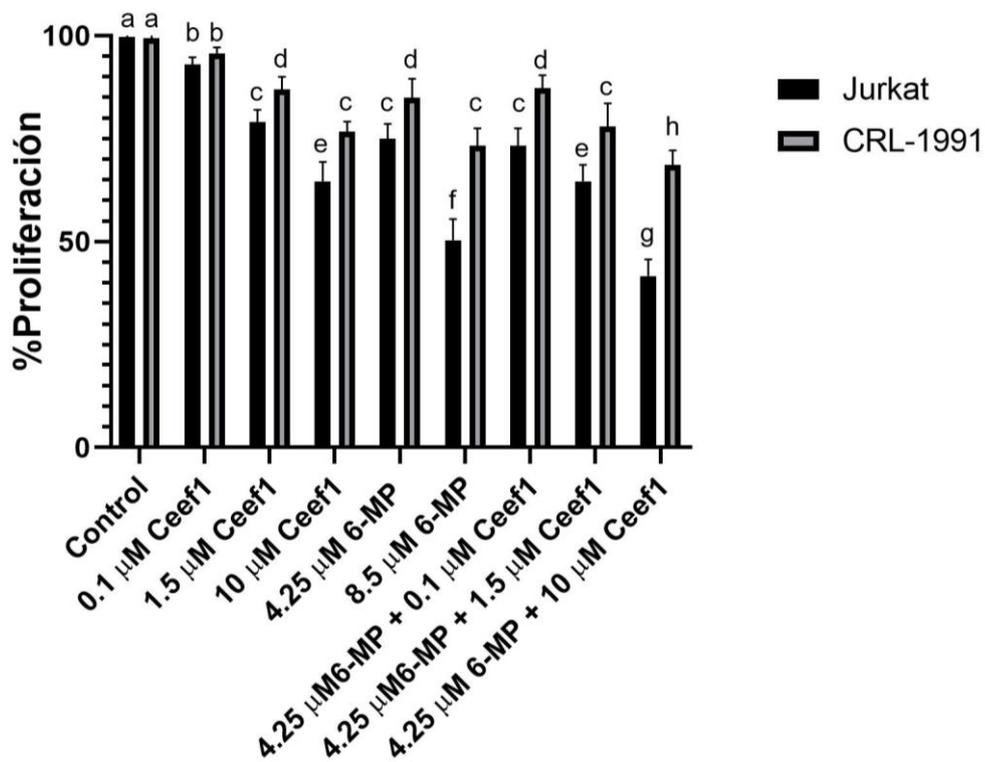


Figura 9. Tratamientos individuales y en combinación de 6-MP y Ceef1 en células Jurkat y en células CRL-1991, para comprobar su efecto sobre la proliferación celular. La media  $\pm$  desviación estándar es mostrada en cada columna. Las diferencias significativas entre grupos se representan con letras diferentes (valor  $p \leq 0.05$ ).

En las células Jurkat todos los tratamientos redujeron significativamente la proliferación celular en comparación con el grupo control. Los tratamientos de 4.25  $\mu$ M 6-MP y 4.25  $\mu$ M 6-MP + 0.1  $\mu$ M Ceef1 redujeron la proliferación celular de manera similar, lo que indica que Ceef1 a 0.1  $\mu$ M no potenció el efecto de 6-MP, al menos a las 24 h de tratamiento. Sin embargo, el tratamiento de 4.25  $\mu$ M 6-MP + 1.5  $\mu$ M Ceef1 si redujo significativamente la proliferación celular en comparación a los tratamientos previamente mencionados.

La combinación de 4.25  $\mu\text{M}$  6-MP + 10  $\mu\text{M}$  Ceef1 tuvo un efecto aditivo en la reducción de la proliferación celular de la misma manera que la suma de sus efectos por separado. Al mismo tiempo, este tratamiento redujo significativamente la proliferación celular en mayor medida que 8.5  $\mu\text{M}$  6-MP, que representa una concentración más elevada y con posibles efectos tóxicos.

En las células CRL-1991 todos los tratamientos probados indujeron una menor inhibición de la proliferación celular en comparación con la observada en las células Jurkat, lo que indica que, teóricamente, la proliferación de las células normales de un organismo vivo no se vería afectada de la misma manera que las células cancerosas. Estadísticamente, los tratamientos de 4.25  $\mu\text{M}$  6-MP y 4.25  $\mu\text{M}$  6-MP + 0.1  $\mu\text{M}$  Ceef1 tuvieron el mismo efecto en la inhibición de la proliferación celular. El mismo efecto fue observado para los tratamientos 8.5  $\mu\text{M}$  6-MP y 4.25  $\mu\text{M}$  6-MP + 1.5  $\mu\text{M}$  Ceef1 en las células CRL-1991, pero 8.5  $\mu\text{M}$  6-MP indujo una mayor inhibición en la proliferación de las células Jurkat en comparación con 4.25  $\mu\text{M}$  6-MP + 1.5  $\mu\text{M}$  Ceef1. El tratamiento de 4.25  $\mu\text{M}$  6-MP + 10  $\mu\text{M}$  Ceef1 ejerció la mayor inhibición de la proliferación celular en ambas líneas celulares.

## 5.2 Viabilidad celular

La evaluación de la inducción de la viabilidad por 6-MP y Ceef1 se llevó a cabo de la misma manera que el ensayo de proliferación: con el mismo tiempo, las mismas concentraciones y las mismas líneas celulares.

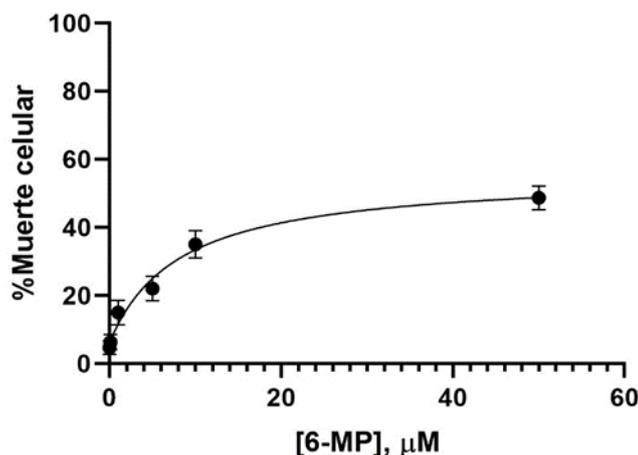


Figura 10. Curva de apoptosis concentración-respuesta de 6-MP. La media  $\pm$  desviación estándar es mostrada en cada punto.

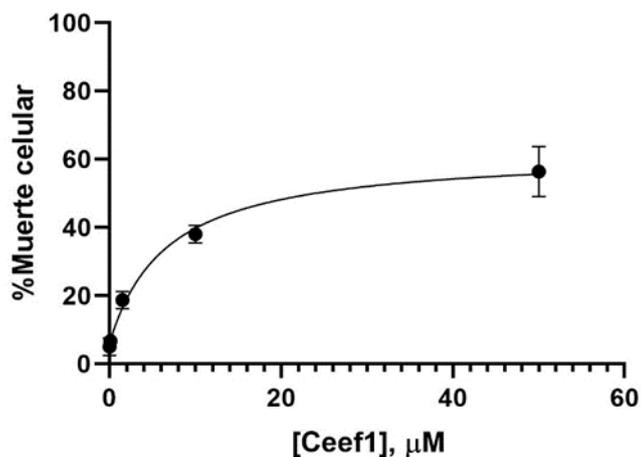


Figura 11. Curva de apoptosis concentración-respuesta de cefourina-1. La media  $\pm$  desviación estándar es mostrada en cada punto.

Las concentraciones de 6-MP que indujeron el 20 % y el 40 % de la muerte celular fueron 6.75  $\mu$ M y 13.5  $\mu$ M, respectivamente. Mientras que para Ceeft1 fueron 1.5  $\mu$ M y 12.5  $\mu$ M, respectivamente. Las figuras 10 y 11 muestran las curvas concentración-respuesta de muerte celular de 6-MP y Ceeft1, respectivamente; y podemos apreciar que el efecto en la inducción de la muerte celular era dependiente de la concentración en ambos casos.

Las concentraciones mínimas de 6-MP y Ceeft1 necesarias para inducir apoptosis significativamente diferente con respecto al control negativo fueron de 1.0  $\mu$ M y 1.5  $\mu$ M, respectivamente. Estas concentraciones fueron similares a las concentraciones necesarias para inducir la inhibición de la proliferación celular. A la concentración más alta probada, 50  $\mu$ M, Ceeft1 indujo la muerte de las células en torno al 56 %, un 8 % más que 6-MP a la misma concentración (Figuras 10 y 11).

Para comprobar si Ceeft1 potencia el efecto apoptótico de 6-MP, las células Jurkat fueron tratadas como se indica en la Figura 12. Todos los tratamientos indujeron significativamente un mayor porcentaje de apoptosis que el control negativo, y en todos los tratamientos se observaron diferencias significativas. Aunque 0.1  $\mu$ M Ceeft1 no indujo una apoptosis mayor que el control negativo, potencia el efecto apoptótico de 6.75  $\mu$ M 6-MP. El tratamiento de 6.75  $\mu$ M 6-MP + 1.5  $\mu$ M Ceeft1 indujo una apoptosis ~2.5 superior a la de 6.75  $\mu$ M 6-MP y significativamente superior a la de 13.5  $\mu$ M de 6-MP. Podría sugerirse que 6.75  $\mu$ M 6-MP en conjunto

con 1.5  $\mu\text{M}$  de Ceef1 ejercen una cooperación sinérgica ( $\text{IC} = 0.625$ ) en lugar de aditiva en la inducción de la apoptosis (Hernández y col., 2019). Además, la combinación 6.75  $\mu\text{M}$  6-MP + 10  $\mu\text{M}$  Ceef1 indujo el mayor porcentaje de apoptosis, alrededor del 75 %

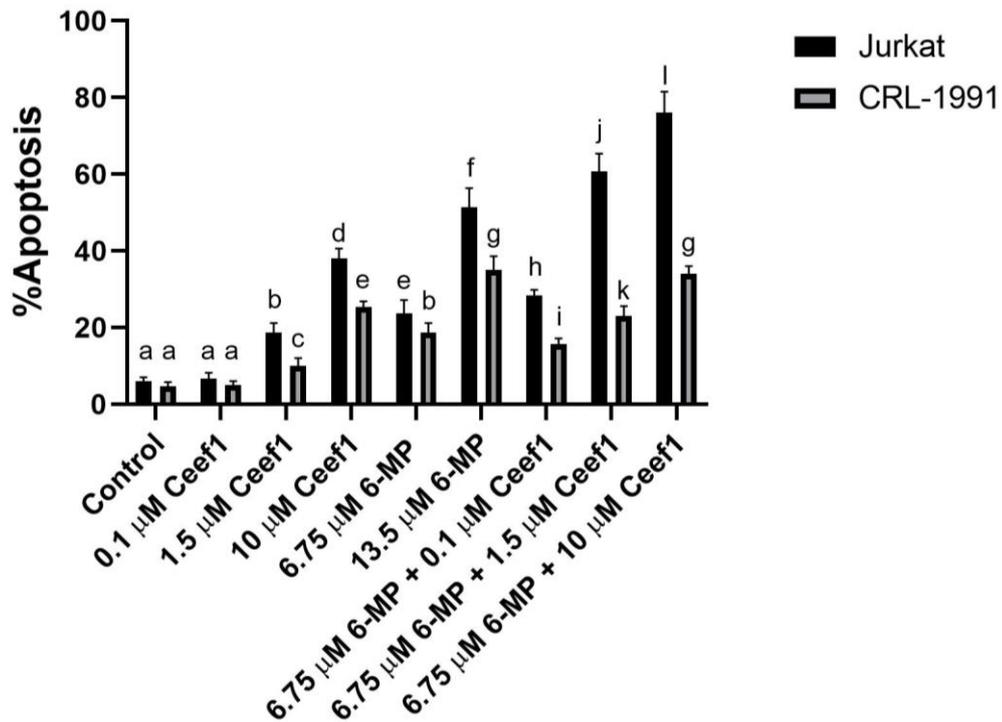


Figura 12. Tratamientos individuales y en combinación de 6-MP y Ceef1 en células Jurkat y en células CRL-1991, para comprobar su efecto sobre la inducción de la apoptosis. La media  $\pm$  desviación estándar es mostrada en cada columna. Las diferencias significativas entre grupos se representan con letras diferentes (valor  $p \leq 0.05$ ).

Por otra parte, los mismos tratamientos con 6-MP y Ceef1 indujeron una apoptosis significativamente menor en las células CRL-1991 que la observada en las células Jurkat, lo que sugiere que ambas moléculas ejercieron efectos citotóxicos en las células leucémicas mayores que en las células normales, al menos *in-vitro*.

La combinación de 6.75  $\mu\text{M}$  de 6-MP y 0.1  $\mu\text{M}$  de Ceef1 indujo una apoptosis significativamente menor que la de 6.75  $\mu\text{M}$  de 6-MP solo, y 13.5  $\mu\text{M}$  de 6-MP indujo significativamente una apoptosis mayor que la de 6.75  $\mu\text{M}$  de 6-MP combinada con 1.5  $\mu\text{M}$  de Ceef1. La combinación de 6.75  $\mu\text{M}$  de 6-MP con 10  $\mu\text{M}$  de Ceef1 promovió la apoptosis de las células CRL-1991, de forma similar a la de

13.5  $\mu\text{M}$  de 6-MP por sí sola, lo que indica que Ceef1 no potencia la apoptosis de forma tan significativa como lo hace en las células Jurkat. Finalmente, 6.75  $\mu\text{M}$  6-MP + 1.5  $\mu\text{M}$  Ceef1 y 6.75  $\mu\text{M}$  6-MP + 10  $\mu\text{M}$  Ceef1 indujeron una apoptosis mayor en las células Jurkat que en las células CRL-1991.

### 5.3 Acoplamiento molecular y simulaciones *Umbrella Sampling*

Los sitios de unión de los sustratos e inhibidores de MRP4 pueden estar localizados en diferentes regiones de los dominios transmembrana (TMDs) de la proteína. Tomando como base la afirmación anterior, se realizaron simulaciones de acoplamiento molecular entre los complejos 6-MP-MRP4 y Ceef1-MRP4, para determinar si ambas moléculas compartían un sitio de unión similar. En la Figura 13 se muestra el diagrama de interacción del ligando (LID) a 6-MP con MRP4. La 6-MP forma puentes de hidrógeno con la leucina 836 y la treonina 839 en un bolsillo hidrofóbico de unión donde 6-MP no encaja perfectamente. Curiosamente, Ceef1 interactúa en el mismo sitio de unión que 6-MP, pero no por puentes de hidrógeno (Figura 14). Sin embargo, Ceef1 parece encajar perfectamente en su bolsillo de unión hidrofóbico, donde sus interacciones son principalmente hidrofóbicas.

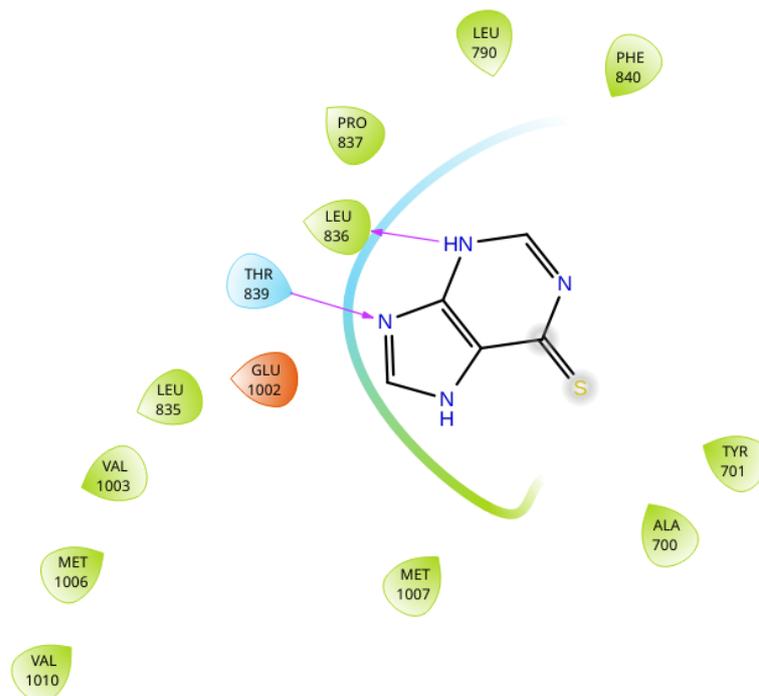


Figura 13. Diagrama de interacción del ligando 6-MP en MRP4. Verde: interacción hidrofóbica. Azul: interacción polar. Naranja: interacción con residuo de carga negativa. Flecha rosa: puente de hidrógeno.

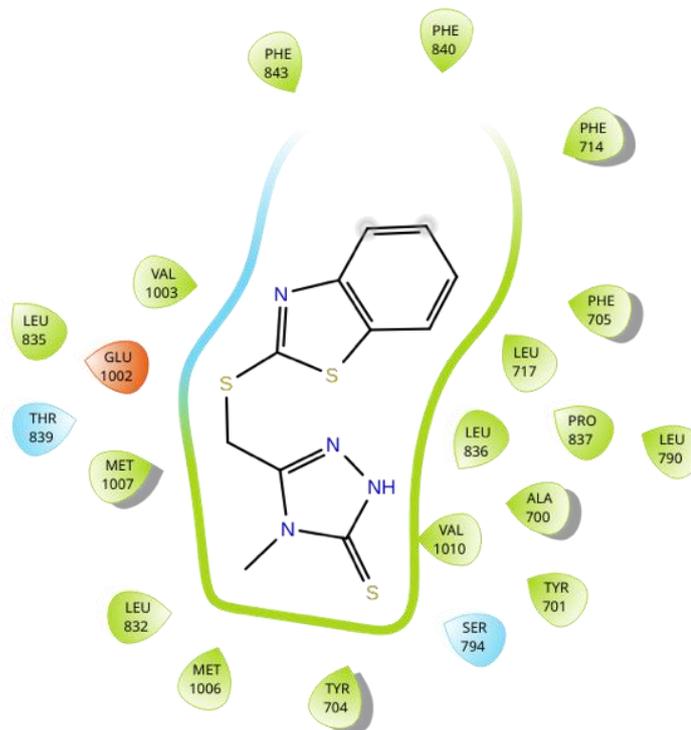


Figura 14. Diagrama de interacción del ligando Ceef1 en MRP4. Verde: interacción hidrofóbica. Azul: interacción polar. Naranja: interacción con residuo de carga negativa.

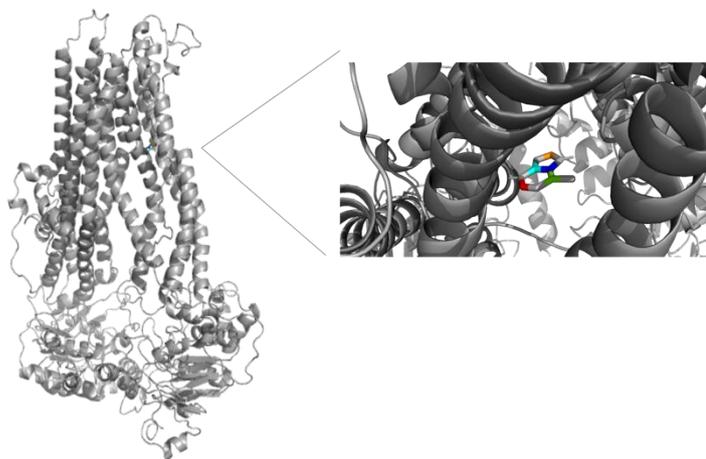


Figura 15. Representación de la estructura completa de MRP4 en complejo con 6-MP, y un acercamiento al sitio de unión de 6-MP. La 6-MP está representada por la estructura con los colores del arco iris.

Las figuras 15 y 16 muestran los sitios de unión de 6-MP y Ceef1 a MRP4, respectivamente. Para ambas moléculas el sitio de unión se encuentra en el TMD2, cerca de la cavidad interna. La estructura de Ceef1 es más grande que la de 6-MP e interactúa con más residuos encajando mejor en el sitio de unión hidrofóbico. Por la proximidad de los sitios de unión de 6-MP y Ceef1 a MRP4, se

realizaron simulaciones *de Umbrella Sampling* para determinar su afinidad teórica a MRP4, expresada como energía libre de unión ( $\Delta G$ ), siendo -17.86 kcal/mol para 6-MP y -26.12 kcal/mol para Ceef1, siendo esta última significativamente mayor.

Dichos resultados sugieren que el complejo Ceef1-MRP4 es más estable que el complejo 6-MP-MRP4, lo cual es interesante en relación con el eflujo por MRP4 teniendo en cuenta que 6-MP y Ceef1 estarían en la célula al mismo tiempo.

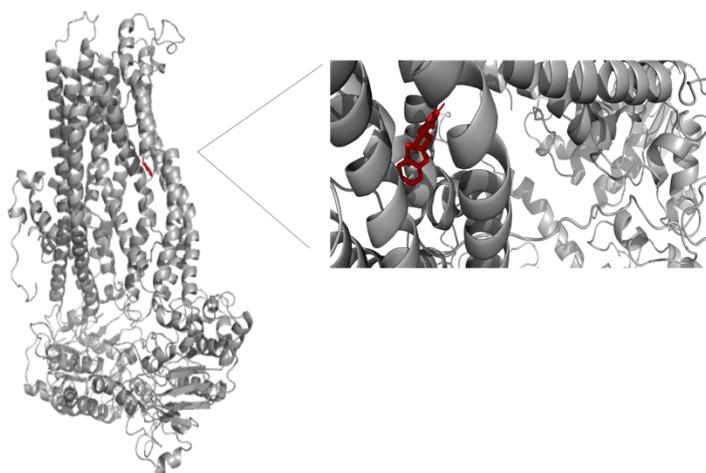


Figura 16. Representación de la estructura completa de MRP4 en complejo con Ceef1, y un acercamiento al sitio de unión de 6-MP. Ceef1 está representado por la estructura roja.

## 6. DISCUSIÓN

La combinación de dos o más fármacos se ha utilizado para tratar el cáncer durante muchos años, y representa tanto la primera línea de quimioterapia como la principal fuente de toxicidad derivada de los fármacos (Nurgali y col., 2018). El diseño de la quimioterapia combinada se basa en la actividad farmacológica de los medicamentos, cuya acción debe ser complementaria entre sí, el fármaco A potencia la acción del fármaco B. En el presente trabajo, se probó el efecto antiproliferativo y apoptótico de Ceef1 tanto en células Jurkat como en células CRL-1991 para determinar si potencia la acción de 6-MP.

La concentración 0.1  $\mu\text{M}$  6-MP no fue capaz de interferir en la proliferación ni en la inducción de apoptosis en las células Jurkat de manera significativa. Tales resultados son consistentes con informes anteriores, y ningún investigador ha reportado un efecto antiproliferativo ni apoptótico a concentraciones inferiores a

1  $\mu\text{M}$  (Cheung y col., 2014; Singh y col., 2018). Además, 6-MP se metaboliza en sus formas activas también llamadas nucleótidos de tioguanina (TGN), que a su vez son sustratos del MRP4 (Zou y col., 2021), lo que lleva a una concentración de metabolitos activos aún más baja que 0.1  $\mu\text{M}$ . Cualquier concentración de 6-MP una vez dentro de la célula será disminuida por la actividad de MRP4. Sin embargo, se observó que es necesario al menos 1  $\mu\text{M}$  de 6-MP para interferir significativamente en la proliferación celular, teniendo en cuenta que una fracción de 6-MP ha sido previamente metabolizada y efluída. Aunque el efecto antiproliferativo de 6-MP es dependiente de la concentración, no es lineal porque a mayor nivel intracelular de 6-MP mayor sería la actividad de las enzimas metabolizadoras y de MRP4 (Haglund y col., 2017).

La 6-MP actúa mediante numerosos mecanismos para inducir efectos antiproliferativos y apoptóticos, que incluyen su incorporación a las cadenas de ADN promoviendo la detención del ciclo celular y la posterior apoptosis. También inhibe la síntesis de *ново* de purinas, que es más importante para la proliferación de los linfocitos que la vía de salvamento, y hay pruebas que sugieren que los fármacos con tiopurinas podrían regular los puntos de control metabólicos que promueven la reprogramación en células T normales y leucémicas como las células Jurkat (Karran y Attard, 2008). Dichos puntos de control incluyen mTOR, cinasas activadas por AMP (AMPK, por sus siglas en inglés), Myc, y HIF-1 $\alpha$ . Y todas estas acciones requieren una concentración mayor a 0.1  $\mu\text{M}$  de 6-MP (Fernandez-Ramos y col., 2016).

En esta línea, se probó Ceef1 a varias concentraciones para determinar si su capacidad previamente probada de inhibir MRP4 también induce apoptosis o interfiere con la proliferación celular (Cheung y col., 2014). En concordancia con 6-MP, Ceef1 a 0.1  $\mu\text{M}$  no indujo un efecto antiproliferativo significativo en las células Jurkat, posiblemente porque dicha concentración no es suficiente para regular la actividad de MRP4. Ceef1 es un compuesto que contiene el grupo benzotiazol, los derivados de éste son conocidos por sus actividades anticancerígenas, antiinflamatorias, antivirales, anticonvulsivas y antidiabéticas, entre otras. Esto significa que Ceef1 puede interactuar con otras dianas, por lo que el efecto antiproliferativo se observó tenuemente a 0.1  $\mu\text{M}$  (Abrol y col., 2019).

Sin embargo, cuanto más se incrementaba la concentración de Ceef1 (1  $\mu\text{M}$  hasta 50  $\mu\text{M}$ ), se observaba un efecto antiproliferativo y apoptótico más significativo, pero sin seguir un comportamiento lineal.

Según evidencias anteriores, la inhibición de MRP4 conduce a un aumento de los niveles de cAMP promoviendo una mayor activación de la apoptosis intrínseca una vez que cAMP activa a la proteína cinasa A (PKA, por sus siglas en inglés), siendo éste el mecanismo más probable por el cuál Ceef1 induce apoptosis (Copsel y col., 2014; Pérez y col., 2016). Sin embargo, la cuestión principal es cómo Ceef1 potenció la apoptosis inducida por 6-MP. Si 6-MP es un sustrato del MRP4, y su concentración intracelular depende de la actividad del transportador, la explicación más adecuada sería que Ceef1 inhibe a MRP4, y, por tanto, bloquea el eflujo de 6-MP. Cuando tratamos las células con 13.5  $\mu\text{M}$  de 6-MP, una cierta cantidad de este debe ser efluída por MRP4, pero una vez que añadimos Ceef1, una menor cantidad de 6-MP pudo ser efluída dando lugar a una mayor biodisponibilidad dentro de la célula. La medición de 6-MP intracelular debe realizarse para demostrar esta hipótesis.

En cuanto a la afirmación anterior, cuanto mayor es el nivel de Ceef1 en el interior de la célula, mayores niveles de 6-MP y de sus metabolitos activos estarían biodisponibles, debido a la inhibición de MRP4 por Ceef1. Sin embargo, ¿se inhibe realmente MRP4 o cómo regula Ceef1 su actividad? Una explicación teórica de la actividad inhibidora de Ceef1 puede abordarse a través de las simulaciones de acoplamiento molecular y *Umbrella Sampling* realizadas. Las simulaciones de acoplamiento molecular indicaron que tanto Ceef1 como 6-MP comparten el mismo sitio de unión a MRP4, y se puede inferir que compiten por dicho sitio de unión, donde Ceef1 se ajusta mejor que 6-MP. Adicionalmente, la energía de unión libre de Ceef1 fue significativamente menor que la energía de unión libre de 6-MP, lo que indica que Ceef1 es un antagonista competitivo que interfiere con la unión de 6-MP en MRP4.

Además, se ha determinado que 6-MP induce un rápido agotamiento de ATP en las células Jurkat, aunque la base bioquímica de dicho mecanismo sigue sin establecerse, y dicho agotamiento puede afectar a la función de MRP4 debido a

que requiere ATP para iniciar el ciclo de transporte (Beis, 2019; Fernández-Ramos y col., 2016). El agotamiento de ATP promueve el estrés metabólico, y podría ser un posible mecanismo para inhibir la proliferación celular y quizás la apoptosis. Este estrés metabólico podría ser mayor en las células Jurkat porque tienen un nivel de ATP intracelular alto, y podrían ser más sensibles a los cambios en estos niveles (Ledderose y col., 2016).

La inhibición de la proliferación celular y la inducción de la apoptosis fueron significativamente mayores en las células Jurkat que en las células CRL-1991, y puede ocurrir debido a la acción del cAMP y a la sensibilidad de cada línea celular a niveles más altos de este. Más de 2000 artículos publicados han demostrado la relación entre el cAMP y la apoptosis o la inhibición de la proliferación celular, y se informó de que tales efectos dependerían del tipo de célula. En este sentido, se ha reportado que el aumento cAMP intracelular es pro-apoptótico en las células leucémicas y anti-apoptótico en las células hematopoyéticas normales como CRL-1991, siendo la razón por la que algunos tratamientos contra el cáncer utilizan análogos del cAMP, inhibidores de la fosfodiesterasa E y activadores de la adenil ciclasa (Insel y col., 2012).

Además, el mecanismo más eficaz para aumentar los niveles intracelulares de cAMP es a través de la inhibición de MRP4; estudios en células de linfoma S49 han determinado que desencadena la apoptosis a través de un mecanismo intrínseco dependiente de las mitocondrias dirigido por PKA (Zhang y col., 2008). Otro factor relacionado con la apoptosis selectiva es la implicación de las isozimas I y II de PKA, la desregulación del equilibrio entre estas se ha relacionado con varios tipos de cáncer, y su manipulación puede aumentar o disminuir la apoptosis mediada por el cAMP (Insel y col., 2012). Con respecto a las células CRL-1991, se informó que el factor de intercambio de nucleótidos de guanina Epac, un segundo efector del cAMP, también tiene un efecto anti-apoptótico una vez que los niveles de cAMP se incrementan (Gao y col., 2010). Además, se ha informado de que la fosforilación de la proteína relacionada con la dinamina 1 por parte de PKA protege contra la apoptosis (Cribbs y col., 2007). Estos eventos pueden explicar la menor sensibilidad de CRL-1991 a 6-MP y Ceef1.

## 7. CONCLUSIONES

El efecto antiproliferativo y apoptótico de la combinación 6-MP y Ceef1 fue evaluado en células Jurkat y CRL-1991, demostrándose un efecto aditivo en la inhibición de la proliferación celular y un efecto sinérgico en la inducción de muerte celular. También se determinó un posible mecanismo molecular para dichos efectos. Por lo tanto, el inhibidor específico de MRP4, Ceef1, podría ser una opción de tratamiento en protocolos de quimioterapia combinada tras realizarse estudios complementarios.

## 8. REFERENCIAS

**Abrol S**, Bodla BR, Goswami C. A comprehensive review on benzothiazole derivatives for their biological activities. *Int J Pharm Sci Res* **2019**; 10: 3196–3209. DOI: 10.13040/IJPSR.0975-8232.10(7).3196-09

**American Cancer Society**. Typical treatment of acute lymphocytic leukemia (ALL). [monografía en internet]. Cancer.Org, 2021 [consultado 2022 mayo 31]. Disponible en: <https://www.cancer.org/cancer/acute-lymphocytic-leukemia/treating/typical-treatment.html>

**Becerra E**, Aguilera-Durán G, Berumen L, Romo-Mancillas A, García-Alcocer G. Study of endogen substrates, drug substrates and inhibitors binding conformations on MRP4 and its variants by molecular docking and molecular dynamics. *Molecules* **2021**; 26 (4): 1051. DOI: 10.3390/molecules26041051

**Beis K**. Structural basis for the mechanism of ABC transporters. *Biochem Soc Trans* **2015**; 43: 889–893. DOI: 10.1042/BST20150047

**Berthier J**, Arnion, H, Saint-Marcoux F, Picard N. Multidrug resistance-associated protein 4 in pharmacology: overview of its contribution to pharmacokinetics, pharmacodynamics and pharmacogenetics. *Life Sci* **2019**; 231: 116540. DOI: 10.1016/j.lfs.2019.06.015

**Chen Y**, Yuan X, Xiao Z, Jin H, Zhang L, Liu Z. Discovery of novel multidrug resistance protein 4 (MRP4) inhibitors as active agents reducing resistance to anticancer drug 6-mercaptopurine (6-MP) by structure and ligand-based virtual screening. *PLoS ONE* **2018**; 13(10): e0205175. DOI: 10.1371/journal.pone.0205175

**Cheung L**, Flemming CL, Watt F, Masada N, Yu DM, Huynh T, et al. High-throughput screening identifies ceefourin 1 and ceefourin 2 as highly selective inhibitors of multidrug resistance protein 4 (MRP4). *Biochem Pharmacol* **2014**; 91(1): 97–108. DOI: 10.1016/j.bcp.2014.05.023

**Cole SP.** Targeting multidrug resistance protein 1 (MRP1, ABCC1): past, present, and future. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2014**; 54(1): 95–117. DOI: 10.1146/annurev-pharmtox-011613-135959

**Colunga-Pedraza PR,** Gomez-Cruz GB, Colunga-Pedraza JE, Ruiz-Argüelles GJ. Geographic hematology: some observations in Mexico. *Acta Haematol* **2018**; 140: 114–120. DOI: 10.1159/000491989

**Copsel S,** Bruzzone A, May M, Beyrath J, Wargon V, Cany J, et al. Multidrug resistance protein 4/ ATP binding cassette transporter 4: a new potential therapeutic target for acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **2014**; 5: 9308–9321. DOI: 10.18632/oncotarget.2425

**Copsel S,** Garcia C, Diez F, Vermeulem M, Baldi A, Bianciotti LG, et al. Multidrug resistance protein 4 (MRP4/ABCC4) regulates cAMP cellular levels and controls human leukemia cell proliferation and differentiation. *J Biol Chem* **2011**; 286(9): 6979–6988. DOI: 10.1074/jbc.m110.166868

**Cordo' V,** van der Zwet JC, Canté-Barrett K, Pieters R, Meijerink JP. T-cell acute lymphoblastic leukemia: a roadmap to targeted therapies. *Blood Cancer Discov* **2020**; 2(1): 19–31. DOI: 10.1158/2643-3230.bcd-20-0093

**Cribbs JT,** Strack S. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* **2007**; 8: 939–944. DOI: 10.1038/sj.embor.7401062

**Fattizzo B,** Rosa J, Giannotta JA, Baldini L, Fracchiolla NS. The physiopathology of T-cell acute lymphoblastic leukemia: focus on molecular aspects. *Front Oncol* **2020**; 10: 273. DOI: 10.3389/fonc.2020.00273

**Fernández-Ramos AA,** Poindessous V, Marchetti-Laurent C, Pallet N, Lorient MA. The effect of immunosuppressive molecules on T-cell metabolic reprogramming. *Biochimie* **2016**; 127: 23–36. DOI: 10.1016/j.biochi.2016.04.016

**Follini E**, Marchesini M, Roti G. Strategies to overcome resistance mechanisms in T-Cell acute lymphoblastic leukemia. *Int J Mol Sci* **2019**; 20(12): 3021. DOI: 10.3390/ijms20123021

**Gao N**, Hibi Y, Cueno M, Asamitsu K, Okamoto T. A-kinase-interacting protein 1 (AKIP1) acts as a molecular determinant of PKA in NF-kappaB signaling. *J Biol Chem* **2010**; 285: 28097–28104. DOI: 10.1074/jbc.M110.116566

**Haglund S**, Vikingsson S, Almer S, Söderman J. Combination treatment with 6-mercaptopurine and allopurinol in HepG2 and HEK293 cells—effects on gene expression levels and thiopurine metabolism. *PLoS ONE* **2017**; 12: e0173825. DOI: 10.1371/journal.pone.0173825

**Hernández JL**, Padilla L, Dakhel S, Coll T, Hervas R, Adan J, et al. Therapeutic targeting of tumor growth and angiogenesis with a novel anti-S100A4 monoclonal antibody. *PLoS ONE* **2013**; 8(9): e72480. DOI: 10.1371/journal.pone.0072480

**Insel PA**, Zhang L, Murray F, Yokouchi H, Zambon AC. Cyclic AMP is both a pro-apoptotic and anti-apoptotic second messenger. *Acta Physiol* **2012**; 204: 277–287. DOI: 10.1111/j.1748-1716.2011.02273.x

**Jördens MS**, Keitel V, Karababa A, Zemtsova I, Bronger H, Häussinger D, et al. Multidrug resistance-associated protein 4 expression in ammonia-treated cultured rat astrocytes and cerebral cortex of cirrhotic patients with hepatic encephalopathy. *Glia* **2015**; 63(11): 2092–2105. DOI: 10.1002/glia.22879

**Karran P**, Attard N. Thiopurines in current medical practice: molecular mechanisms and contributions to therapy-related cancer. *Nat Rev Cancer* **2008**; 8: 24–36. DOI: 10.1038/nrc2292

**Kästner J**. Umbrella sampling. *WIREs Comput Mol Sci* **2011**; 1(6): 932–942. DOI: 10.1002/wcms.66

**Keppler D**. Multidrug resistance proteins (MRPs, ABCs): importance for pathophysiology and drug therapy. En: *Drug transporters, Handbook of*

Experimental Pharmacology. Heidelberg: Springer Berlin, **2010**: 299-323. ISBN: 9783642145414

**Ledderose** C, Woehrle T, Ledderose S, Strasser K, Seist R, Bao, Y, et al. Cutting off the power: inhibition of leukemia cell growth by pausing basal ATP release and P2X receptor signaling? *Purinergic Signal* **2016**; 12: 439–451. DOI: 10.1007/s11302-016-9510-y

**Liao** Q. Enhanced sampling and free energy calculations for protein simulations. *Prog Mol Biol Transl Sci* **2020**; 170: 177-213. DOI: 10.1016/bs.pmbts.2020.01.006

**Liu** C, Janke LJ, Yang JJ, Evans WE, Schuetz JD, Relling MV. Differential effects of thiopurine methyltransferase (TPMT) and multidrug resistance-associated protein gene 4 (MRP4) on mercaptopurine toxicity. *Cancer Chemother Pharmacol* **2017**; 80(2): 287–293. DOI: 10.1007/s00280-017-3361-2

**Malard** F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet* **2020**; 395(10230): 1146–1162. DOI: 10.1016/s0140-6736(19)33018-1

**Morris** GM, Lim-Wilby M. Molecular Docking. En: *Molecular Modeling of Proteins. Methods Molecular Biology™*. Human Press, **2008**; vol. 443: 365–382. ISBN: 9781597451772

**Morris** GM, Huey R, Lindstrom W, Sanner MF, Belew RK, Goodsell DS, et al. AutoDock4 and AutoDock-Tools4: automated docking with selective receptor flexibility. *J. Comput. Chem* **2009**; 30: 2785–2791. DOI: 10.1002/jcc.21256

**Muñoz-Aguirre** P, Zapata-Tarrés M, Espinosa-Tamez P, Sánchez-Blas H, Brochier M, Lamadrid-Figueroa H. Mortalidad por leucemia linfoblástica aguda en niños y adolescentes mexicanos: análisis de tendencias 1998-2018. *Salud Pública Mex* **2022**; 64: 26-34. DOI: 10.21149/13210

**Nguyen** JP, Bianca M, Huff RD, Tiessen N, Inman MD, Hirota JA. Modulation of cAMP metabolism for CFTR potentiation in human airway epithelial cells. *Sci Rep* **2021**; 11(1): 904. DOI: 10.1038/s41598-020-79555-w

**Norris MD**, Smith J, Tanabe K, Tobin P, Flemming C, Scheffer GL, et al. Expression of multidrug transporter MRP4/ABCC4 is a marker of poor prognosis in neuroblastoma and confers resistance to irinotecan in vitro. *Mol Cancer Ther* **2005**; 4(4): 547–553. DOI: 10.1158/1535-7163.mct-04-0161

**Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002**, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. **2003**.

**Nurgali K**, Jagoe RT, Abalo R. Adverse effects of cancer chemotherapy: anything new to improve tolerance and reduce sequelae? *Front Pharmacol* **2018**; 9: 245. DOI: 10.3389/fphar.2018.00245

**Patel AA**, Thomas J, Rojek AE, Stock W. Biology and treatment paradigms in T cell acute lymphoblastic leukemia in older adolescents and adults. *Curr Treat Options Oncol* **2020**; 21(7): 57. DOI: 10.1007/s11864-020-00757-5

**Peng XX**, Shi Z, Damaraju VL, Huang XC, Kruh, GD, Wu HC, et al. Up-regulation of MRP4 and down-regulation of influx transporters in human leukemic cells with acquired resistance to 6-mercaptopurine. *Leuk Res* **2008**; 32(5): 799–809. DOI: 10.1016/j.leukres.2007.09.015

**Perez DR**, Smagley Y, Garcia M, Carter MB, Evangelisti A, Matlawska-Wasowska K, et al. Cyclic AMP efflux inhibitors as potential therapeutic agents for leukemia. *Oncotarget* **2016**; 7(23): 33960–33982. DOI: 10.18632/oncotarget.8986

**Ravna AW**, Sager G. Molecular modeling studies of ABC transporters involved in multidrug resistance. *Mini Rev Med Chem* **2009**; 9: 186–193. DOI: 10.2174/138955709787316065

**Rodríguez-González A**, Sahores A, Díaz-Nebreda A, Yaneff A, di Siervi N, Gómez N, et al. MRP4/ABCC4 expression is regulated by histamine in acute myeloid leukemia cells, determining cAMP efflux. *FEBS J* **2020**; 288(1): 229–243. DOI: 10.1111/febs.15344

**Shiraz P**, Jehangir W, Agrawal V. T-cell acute lymphoblastic leukemia—current concepts in molecular biology and management. *Biomedicines* **2021**; 9(11): 1621. DOI: 10.3390/biomedicines9111621

**Singh B**, Sarli VN, Kinne HE, Shamsnia A, Lucci A. Evaluation of 6-mercaptopurine in a cell culture model of adaptable triple-negative breast cancer with metastatic potential. *Oncotarget* **2019**; 10: 3681–3693. DOI: 10.18632/oncotarget.26978

**Strober W**. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Cur. Protoc Immunol* **2015**; 111: A3.B.1–A3.B3. DOI: 10.1002/0471142735.ima03bs111

**Tan SH**, Bertulfo FC, Sanda T. Leukemia-initiating cells in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol* **2017**; 7: 218. DOI: 10.3389/fonc.2017.00218

**Tzoneva G**, Dieck CL, Oshima K, Ambesi-Impiombato A, Sánchez-Martín M, Madubata CJ, et al. Clonal evolution mechanisms in NT5C2 mutant-relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature* **2018**; 553(7689): 511–514. DOI: 10.1038/nature25186

**Xie M**, Rich TC, Scheitrum C, Conti M, Richter W. Inactivation of multidrug resistance proteins disrupts both cellular extrusion and intracellular degradation of cAMP. *Mol Pharmacol* **2011**; 80(2): 281–293. DOI: 10.1124/mol.111.071134

**Yunos NM**, Beale P, Yu JQ, Huq F. Synergism from sequenced combinations of curcumin and epigallocatechin-3-gallate with cisplatin in the killing of human ovarian cancer cells. *Anticancer Res* **2011**; 31 (4): 1131-1140. PMID: 21508356.

**Zhang L**, Zambon AC, Vranizan K, Pothula K, Conklin BR, Insel PA. Gene expression signatures of cAMP/protein kinase A (PKA)-promoted, mitochondrial-dependent apoptosis. Comparative analysis of wild-type and cAMP-deathless S49 lymphoma cells. *J Biol Chem* **2008**; 283: 4304–4313. DOI: 10.1074/jbc.M708673200

**Zheng** L, Alhossary AA, Kwoh CK, Mu Y. Molecular Dynamics and Simulation. En: Encyclopedia of bioinformatics and computational biology. Elsevier, **2018**; vol. 2: 550-566. ISBN: 9780128114322

**Zou** Y, Mei D, Yuan J, Han J, Xu J, Sun N, et al. Preparation, characterization, pharmacokinetic and therapeutic potential of novel 6-mercaptopurine-loaded oral nanomedicines for acute lymphoblastic leukemia. Int J Nanomed, **2021**; 16: 1127–1141. DOI: 10.2147/IJN.S290466