



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO ADITIVO DE PTEROESTILBENO Y VINCRISTINA  
EN EL TRATAMIENTO DE CÉLULAS JURKAT DE  
LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA TIPO T”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA  
JENIFER LÓPEZ GOMAR**

**DIRIGIDA POR  
Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**

**SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2018.**



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**"EFECTO ADITIVO DE PTEROESTILBENO Y VINCRISTINA  
EN EL TRATAMIENTO DE CÉLULAS JURKAT DE  
LEUCEMIA LINFOCÍTICA AGUDA TIPO T"**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JENIFER LÓPEZ GOMAR**

**DIRIGIDA POR**

**Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**

**SINODALES**

**Dra. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER  
DIRECTORA**

**Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA  
SINODAL**

**Dra. JESICA ESTHER ESCOBAR CABRERA  
SINODAL**

**QFB. CLAUDIA GUTIÉRREZ GARCÍA  
SINODAL**

Esta tesis se realizó bajo la dirección de la Dra. Guadalupe García Alcocer y con la colaboración y supervisión de la Q.F.B. Claudia Gutiérrez, en la Universidad Autónoma de Querétaro; agradezco el apoyo de mis profesores y a la directora del proyecto en especial.

Dedico este trabajo a las personas más importantes para mí y que han significado mucho en esta etapa de mi vida, familia y amigos.

José Luis López, María Irma Gomar, Luis Alberto López, José Gomar, Irma Alonso,  
Moises Gomar, José Antonio Gomar y Claudia Gomar

Eliott Tenorio Montes

Fernanda Anahí Vega

Priscila Artigas

Efraín Navarrete

Rodrigo Valencia

## AGRADECIMIENTOS

Principalmente quiero agradecer a mis padres José Luis y María Irma por sus consejo y enseñanzas, y a mi familia por ser mi pilar y darme todo el cariño que necesitaba en momentos difíciles que tuve que afrontar.

A mi pareja Elliott Tenorio por, todo el apoyo que me brindó a lo largo de la carrera, por estar siempre a mi lado y brindarme su apoyo, tanto en los buenos como en los malos momentos.

A la Sra. Alma Montes, por todo el apoyo que me ha brindado en mi carrera, además del apoyo en todo momento por parte de ella y su familia desde que la conozco, además de brindarme cariño y confianza.

A mis amigos por ser como mis hermanos, por darme su apoyo y amistad, con quienes he compartido muchos de mis éxitos y fracasos.

A Guadalupe García Alcocer, mi directora de tesis, por brindarme la oportunidad de desarrollar este proyecto, apoyarme en todo momento y por todas sus enseñanzas.

## ÍNDICE GENERAL

Índice General	i
Índice de Cuadros	iii
Índice de Figuras	iv
Resumen	
1. Antecedentes	1
1.1 Sistema Hematopoyético	1
1.2 Hematopoyesis	2
1.3 Leucemia	3
1.4 Clasificación de Leucemia	3
1.4.1 Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)	4
1.4.2 Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA)	5
1.4.3 Leucemia Mieloblástica Crónica (LMC)	6
1.4.4 Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)	6
1.5 Datos epidemiológicos	7
1.6 Patología de las leucemias	10
1.7 Cuadro clínico de las leucemias	11
1.8 Tratamiento	11
1.8.1 Pteroestilbeno	13
1.8.2 Vincristina	15
2. Hipótesis	18
3. Objetivos	19
3.1 Objetivo general	19
3.2 Objetivos Específicos	19
4. Metodología	20
4.1 Materiales	20
4.2 Material biológico	20
4.3 Reactivos	20

4.4	Equipos	20
4.5	Métodos	21
4.5.1	Cultivo Celular	21
4.5.2	Curvas concentración-respuesta de pteroestilbena	21
4.5.3	Curvas concentración-respuesta de vincristina	22
4.5.4	Evaluación del efecto aditivo de pteroestilbena y vincristina	23
4.5.5	Análisis Estadístico	24
5.	Resultados	25
5.1	Curva dosis respuesta de pteroestilbena en células Jurkat	25
5.2	Curva dosis respuesta de vincristina en células Jurkat	25
5.3	Efecto de Pteroestilbena y Vincristina en células Jurkat.	26
6.	Discusiones	28
7.	Conclusiones	30
8.	Referencias	31

## Índice de Cuadros

Cuadro		Página
1	Características generales de las leucemias agudas y crónicas	3
2	Clasificación de la Leucemia Linfocítica Aguda	4
3	Clasificación de Leucemia Mieloblástica Aguda	5
4	Diferencias entre cáncer pediátrico y cáncer en adultos	8

## Índice de Figuras

Figura		Página
1	Médula ósea: tejido principal en la producción de células madre para el proceso de hematopoyesis (diferenciación y maduración)	1
2	Hematopoyesis: esquematización de la diferenciación de las células hematopoyéticas	2
3	Porción estimada de nuevos casos de leucemia en 2017, de los diferentes tipos de leucemia en niños y adultos	7
4	Frecuencia en porcentaje de los principales subtipos morfológicos de leucemias, en México. LLA, LMA, LMC y LLC.	9
5	Comparación entre una muestra de sangre de una persona sana y una muestra de sangre de un paciente con leucemia.	10
6	Síntomas comunes de la leucemia: hepatoesplenomegalia, inflamación de ganglios linfáticos, moretones, falta de aire y dolor en las articulaciones	11
7	Estructura química de pteroestilbena	13
8	Estructura química de vincristina	15
9	Distribución de las concentraciones de PTS en la caja multiplaca 4 x 6 (Caja P24).	22
10	Distribución de las concentraciones de VCR en la caja multiplaca 4 x 6 (Caja P24).	23
11	Tratamiento que se aplicará en la caja multiplaca 4 x 6 (Caja P24).	24
12	Curva dosis respuesta de pteroestilbena en células Jurkat.	25
13	Curva dosis respuesta de vincristina en células Jurkat.	26
14	Distribución de concentraciones para el tratamiento de células Jurkat expresado en el punto 4.5.4	27
15	Efecto de Pteroestilbena y Vincristina en células Jurkat.	27

## Resumen

La leucemia es una enfermedad neoplásica progresiva del sistema hematopoyético caracterizada por la proliferación no regulada de las células hematopoyéticas; esta enfermedad puede ser clasificada en dos amplios grupos: aguda y crónica. El tratamiento estandar es la quimioterapia, y el objetivo principal es erradicar todas las células malignas dentro de la médula ósea. La vincristina es un *vinca* alcaloide el cual ejerce un efecto anticancerígeno a nivel microtubular. La terapia con vincristina suele asociarse con diferentes efectos adversos entre ellos pérdida de cabello, bajo conteo sanguíneo, neuropatía periférica, entre otras, además de fiebre, diarrea y pérdida de peso principalmente. En la presente investigación se presenta la hipótesis de que el pteroestilbeno, un compuesto natural con actividad anticancerígena, puede incrementar de manera significativa el efecto antiproliferativo de la vincristina, es decir, producir un efecto aditivo, al aplicarlo como tratamiento en cultivos de células Jurkat de Leucemia Linfocítica aguda tipo T. Para probar la hipótesis se llevaron a cabo procedimientos de tratamiento para la determinación de la viabilidad celular por ensayo de azul tripano, para obtener el porcentaje de proliferación por conteo utilizando una cámara de Neubauer, y de esta manera determinar las concentraciones inhibitorias 50 (CI<sub>50</sub>) de ambos compuestos, y posteriormente el efecto de la combinación de ambos tratamientos. En los resultados obtenidos se logró comprobar un efecto antiproliferativo, además de un efecto aditivo en el tratamiento combinado a través de un análisis *post hoc* con una prueba de Tukey, que prueba diferencias significativas contra el control.

## Abstract

Leukemia is a progressive neoplastic disease of the hematopoietic system characterized by unregulated proliferation of hematopoietic cells; this disease can be classified into two broad groups: acute and chronic. The standard treatment is chemotherapy and the primary goal is to eradicate all malignant cells within the bone marrow. Vincristine is a *vinca alkaloid* that achieves an anti-carcinogenic effect at microtubular level. Vincristine therapy is usually associated with other adverse effects including hair loss, low blood content, peripheral neuropathy, among others, in addition to fever, diarrhea and weight loss mainly. In the present investigation, the hypothesis is presented that pterostilbene, a natural compound, with anti-cancer activity, can significantly increase the anti-proliferative effect of vincristine, that is, produce an additive effect, when applying it as a treatment, in cultures of Jurkat cells of acute lymphocytic leukemia type T. To test the hypothesis, treatment procedures were carried out for the determination of cell viability by trypan blue assay, to obtain the percentage of proliferation by counting, using a Neubauer chamber, and in this way to determine inhibitory concentrations 50 (IC<sub>50</sub>) of both compounds, and subsequently the effect of combination of both treatments. In the results obtained, an antiproliferative effect was verified, as well as an additive effect in the combined treatment through a *post hoc* analysis with a Tukey test which tests significant differences against the control.

# 1 Antecedentes

## 1.1 Sistema Hematopoyético

El sistema hematopoyético incluye tejidos y órganos involucrados en la proliferación, maduración y destrucción de células sanguíneas; los órganos y tejidos del sistema hematopoyético son: sistema fagocítico-mononuclear, bazo, ganglios linfáticos, timo, hígado y médula ósea, siendo esta última el tejido con mayor importancia como precursor de las células hematopoyéticas y se aprecia en la Figura 1 (McKenzie y col., 2000).

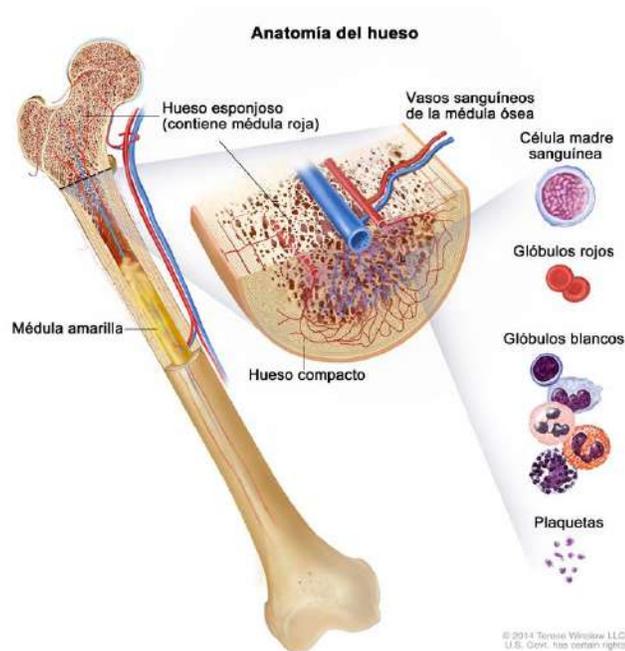


Figura 1. Médula ósea: tejido principal en la producción de células madre para el proceso de hematopoyesis (diferenciación y maduración) (NIH, 2017).

El sistema hematopoyético depende fundamentalmente de la existencia de células madre, para mantener la producción de células sanguíneas maduras, siendo la autorrenovación y diferenciación su propiedad básica (Almaguer y Jaime, 2009).

## 1.2 Hematopoyesis

La hematopoyesis es un complejo proceso de diferenciación y maduración de células madre, para convertirse en las diferentes células sanguíneas (glóbulos rojos, glóbulos blancos y plaquetas), tal como se observa en la Figura 2, donde se representa gráficamente el proceso de maduración a partir de una célula hematopoyética basal. Este proceso se lleva a cabo en la médula ósea, en donde se encuentra un compartimento hematopoyético, formado por islotes de células hematopoyéticas, de las diferentes líneas celulares en sus diferentes estadios madurativos (Palomo y col., 2009).

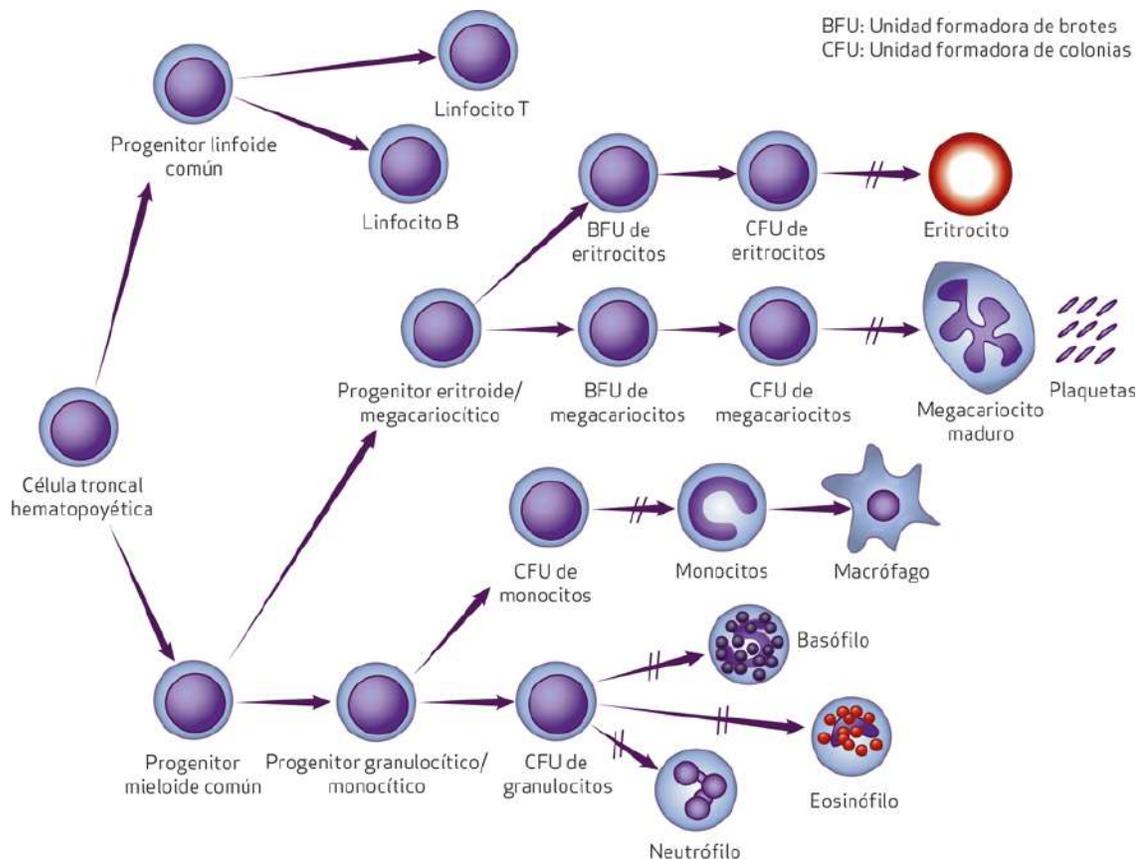


Figura 2. Hematopoyesis: esquematización de la diferenciación de las células hematopoyéticas (Fortoul T, 2017).

Dentro del sistema hematopoyético se pueden desarrollar diferentes patologías que afectan a las células sanguíneas, entre las más comunes se encuentra la leucemia (Palomo y col., 2009).

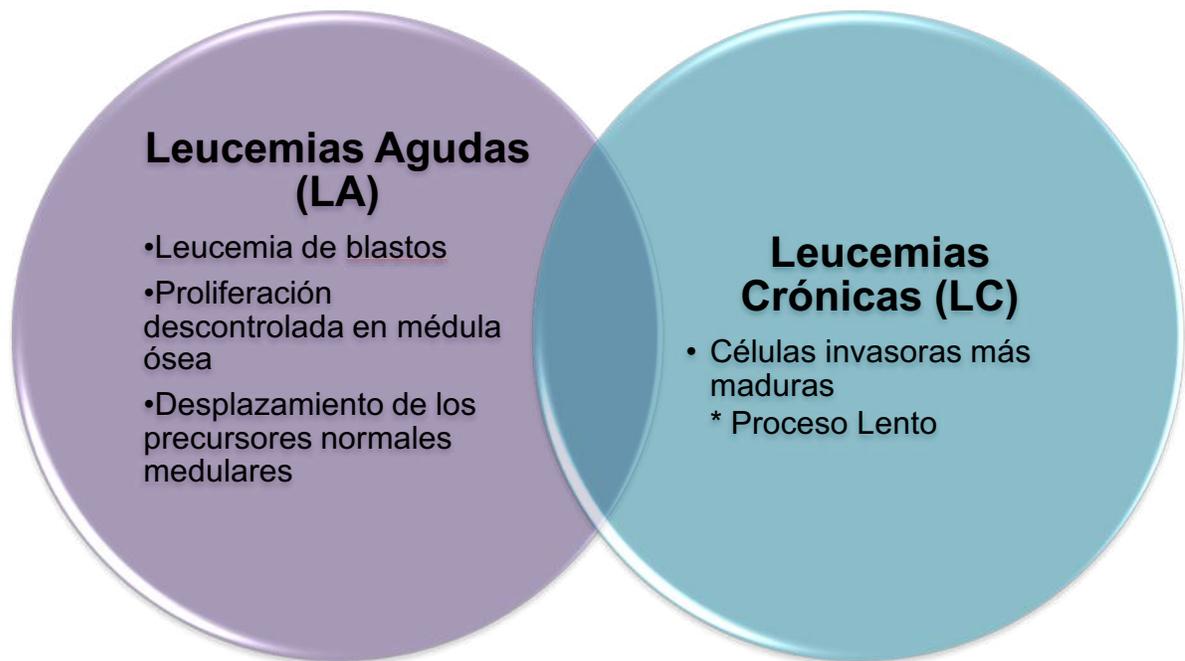
### 1.3 Leucemia

La leucemia es una enfermedad neoplásica del sistema hematopoyético, que se caracteriza principalmente por la proliferación descontrolada y anormal de los precursores de las células sanguíneas, a causa de las alteraciones en los mecanismos que regulan los procesos de síntesis y maduración de dichas células, y las cuales, a su vez, invadirán progresivamente los tejidos del organismo; la clasificación de las leucemias se da por las características morfológicas de las células sanguíneas que se observan (Hurtado, 2012).

### 1.4 Clasificación de Leucemia

La Leucemia puede ser clasificada en dos amplios grupos con base en la agresividad de la enfermedad: Aguda y Crónica. En el Cuadro 1 se esquematizan las características generales de éstos grupos de leucemia (NIH, 2013).

Cuadro 1. Características generales de las leucemias agudas y crónicas (NIH, 2013).



A su vez estos dos grupos se sub clasifican en mieloides o linfoides, de acuerdo al origen de la clona de la célula progenitora leucémica, vinculando, simultáneamente, la agresividad de la enfermedad y el origen de la célula. Siendo los cuatro principales tipos de leucemia los siguientes:

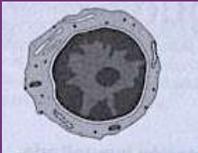
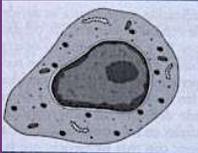
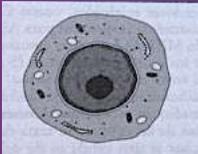
- Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)
- Leucemia Mielocítica Aguda (LMA)
- Leucemia Mielocítica Crónica (LMC)
- Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)

(NIH, 2013)

#### 1.4.1 Leucemia Linfocítica Aguda (LLA)

La LLA es un desorden hematológico maligno causado por la excesiva producción de linfoblastos, los cuales se acumulan principalmente en la médula ósea y sangre periférica. Este es el tipo de leucemia más frecuente en la población infantil, ya que afecta de un 25 a un 30% de infantes (Andrade y col., 2014). Según la clasificación Francesa-Americana-Británica (FAB), se clasifica a este tipo de leucemia según la morfología de los linfoblastos en L1, L2 y L3, tal como se muestra en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Clasificación de la LLA (McKenzie y col., 2000).

	<p style="text-align: center;"><b>L1</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Blastos pequeños</b></li> <li>• <b>Cromatina uniforme</b></li> <li>• <b>Escaso citoplasma</b></li> <li>• <b>Núcleo redondo</b></li> <li>• <b>Nucleolo pequeño / no visible</b></li> </ul>
	<p style="text-align: center;"><b>L2</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Blastos grandes</b></li> <li>• <b>Citoplasma Irregular</b></li> <li>• <b>Núcleo irregular</b></li> <li>• <b>Nucleolo prominente</b></li> </ul>
	<p style="text-align: center;"><b>L3</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• <b>Blastos grandes</b></li> <li>• <b>Abundante citoplasma</b></li> <li>• <b>Vacuolas</b></li> <li>• <b>Núcleo Redondo</b></li> <li>• <b>Nucleolo prominente</b></li> </ul>

### 1.4.2 Leucemia Mieloblástica Aguda (LMA)

La LMA también conocida como leucemia aguda no linfocítica, es una proliferación y transformación maligna de células linfoides progenitoras en la médula ósea, la sangre y sitios extramedulares. Aproximadamente un 80% de niños es afectado con este tipo de leucemia, pero en adultos representa una enfermedad particularmente peligrosa (American Cancer Society, 2016). Se puede clasificar en ocho subtipos, según la clasificación FAB (French-American-British), que va desde la M0 a la M7, los cuales son identificados de acuerdo al tipo de célula que lo cause, tal como se muestra en el Cuadro 3 (McKenzie y col., 2000).

Cuadro 3. Clasificación de la LMA según la FAB (McKenzie y col., 2000).

FAB	Tipo Celular	Descripción
M0	Indiferenciado	
M1	Mieloblástico	Blastos con características blandas
M2	Mieloblástico	Blastos con diferenciación granulocítica temprana
M3	Promielocítico	Características promielocíticas claras
M4	Mielomonocítico	Características combinadas de granulocitos y monocitos
M5	Monocítico	Características monocíticas evidentes
M6	Eritroleucocémico	Blastos con características eritroides
M7	Megacariocítico	Blastos con propiedades megacariocíticas

A pesar de que el criterio de la FAB es comúnmente utilizado, esta clasificación no toma en consideración varios factores que afectan al pronóstico de la leucemia. La Organización Mundial de la Salud desarrolló un nuevo sistema de clasificación que incluye los factores que la clasificación FAB no considera, entre ellos las anomalías genéticas:

- LMA con una translocación entre los cromosomas 8 y 21
- LMA con una translocación o inversión en el cromosoma 16
- LMA con una translocación entre los cromosomas 9 y 11
- LMA (M3) con una translocación entre los cromosomas 15 y 17
- LMA con una translocación entre los cromosomas 6 y 9
- LMA con una translocación o inversión en el cromosoma 3
- LMA (megacarioblástica ) con una translocación entre los cromosomas 1 y 22

(Vardiman y col., 2009; American Cancer Society, 2016).

#### 1.4.3 Leucemia Mieloblástica Crónica (LMC)

Este tipo de leucemia es capaz de evolucionar a la enfermedad de la forma aguda, debido a la transformación de las células tumorales en blastos, en varios casos este tipo de leucemia se debe a una mutación genética llamada cromosoma Philadelphia (Pokharel, 2012).

#### 1.4.4 Leucemia Linfocítica Crónica (LLC)

Es una enfermedad tumoral que se da con mayor frecuencia en adultos, la cual es originada por la proliferación de linfocitos B, y en una menor frecuencia originada por la proliferación de linfocitos T, con un estadio relativamente avanzado de maduración; además, tiene como característica resaltante, que es posible presentar formas benignas de tumoración a la par con formas agresivas (Pokharel, 2012).

### 1.5 Datos epidemiológicos

A nivel mundial, los últimos datos provenientes del Informe Mundial sobre el Cáncer 2014 de la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer, por sus siglas en inglés, IARC (International Agency for Research on Cancer), señalan que en 2012 hubo aproximadamente 14 millones de casos nuevos y 8.2 millones de defunciones por esta causa, así como 32.6 millones de personas sobrevivientes a la enfermedad. Por regiones, África, Asia, América Central y Sudamérica concentran más del 60% de los casos nuevos y 70% de las defunciones por cáncer. En la Figura 3 se aprecia la distribución de casos y el porcentaje equivalente para los principales tipos de leucemia que afectan a la población mundial.

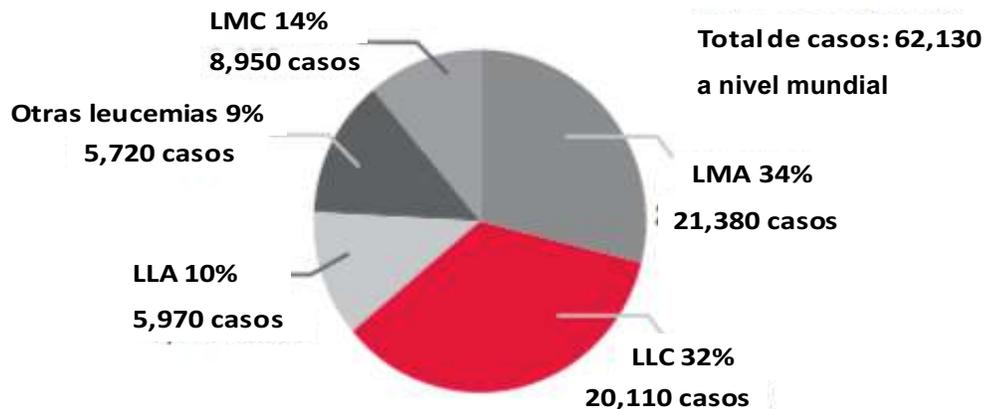


Figura 3. Porción estimada de nuevos casos de leucemia en 2017, de los diferentes tipos de leucemia en niños y adultos (Leukemia & Lymphoma Society, 2017).

En 2012, la OMS señala que los tipos de cáncer diagnosticados con mayor frecuencia a nivel mundial son los de pulmón, hígado, estómago, colon, recto, mama y esófago. Por sexo, los cinco principales en las mujeres son el de mama, colon y recto, pulmón, cuello uterino y estómago, mientras que en los varones son el de pulmón, próstata, colon y recto, estómago e hígado. Se debe tomar en cuenta que el comportamiento del cáncer cambia según la edad de la persona, ya sea menor de 20 años o mayor de 20 años, siendo de mayor importancia el que se desarrolla en niños, debido a que su sistema inmunológico puede llegar a

debilitarse con gran facilidad, provocando que la enfermedad avance rápidamente (INEGI, 2017). En el Cuadro 4, se expresan las principales diferencias en cuanto al cáncer en niños y en adultos, donde se presentan.

Cuadro 4. Diferencias entre cáncer pediátrico y cáncer en adultos (INEGI, 2017).

Parámetro	Niños	Adultos
Sitio	Tejidos	Órganos
Estado al diagnóstico	80% Diseminado	Local o regional
Detección Temprana	Generalmente accidental	Mejora con educación y tamizaje
Tamizaje	Difícil	Adecuado
Respuesta	La mayoría responde con quimioterapia	Menor respuesta con quimioterapia
Prevención	Improbable	80%

En México la leucemia es una enfermedad que se presenta tanto en hombres como en mujeres, sin embargo, la incidencia que tiene en ambos géneros recae en el tipo de leucemia que se presente; en el caso de las leucemias crónicas afectan en mayor frecuencia al género masculino, correspondiente a un 58.1%, mientras que al género femenino en un 41.9%. Por otro lado, en el caso de las leucemias agudas las mujeres se ven afectadas en un 51%, mientras que los hombres en un 49% (Sánchez y col., 2016).

En la Figura 4 se representa de forma gráfica la frecuencia en porcentaje de los subtipos morfológicos de leucemia, donde se aprecia que la predominante es la LLA, L2, por el lado de las leucemias agudas, mientras que en las crónicas se presenta con mayor frecuencia la del tipo mielóide que el linfóide.

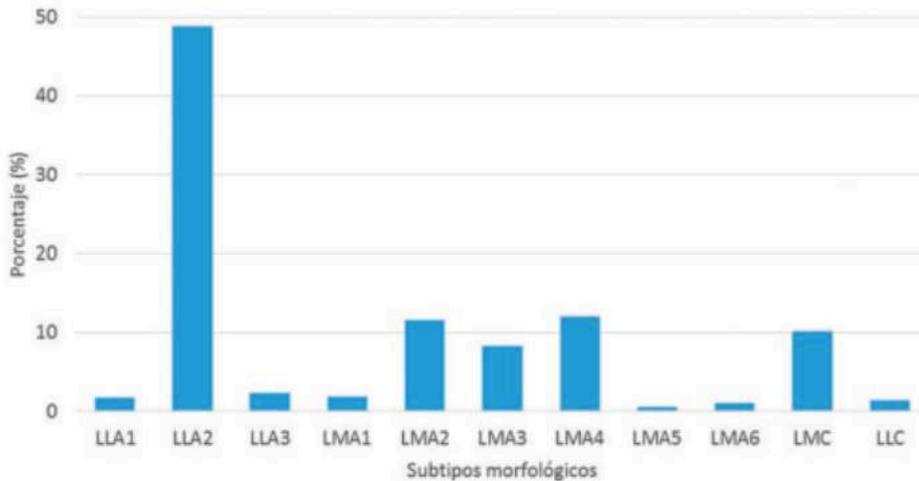


Figura 4. Frecuencia en porcentaje de los principales subtipos morfológicos de leucemias, en México. LLA, LMA, LMC y LLC (Sánchez y col., 2016).

La LLA es la que se presenta con una mayor frecuencia en la infancia, constituyendo un 80% del total de leucemias en edad pediátrica y es responsable de un 3% del 30% de muertes de dichos pacientes; la supervivencia de aquellos que padecen esta enfermedad, ha ido en incremento en los últimos 30 años, además, un porcentaje aproximado del 15 al 20% de los casos fallan en el tratamiento y el porcentaje de muertes presentado se debe en su mayoría, a una terrible respuesta ante la quimioterapia y a las complicaciones hemorrágicas que conlleva. Por otro lado, la LMA es un tipo de leucemia que suele afectar en un 80% a la población infantil, siendo los neonatos los más afectados en su mayoría a comparación de niños de edades un poco más avanzadas (4-12 años) y en adultos resulta ser una enfermedad devastadora. En cuanto a la LLC, se observa una mayor incidencia en individuos mayores o de mediana edad. La supervivencia del paciente, a 5 años, es de alrededor de un 60%, pero depende de la etapa en la que se encuentre la enfermedad. Por último, la LMC, este tipo de leucemia representa

un 9% del total de nuevos casos de leucemia y es la primera en la que se ha demostrado que existe una anomalía genética adquirida (Alvarado y Córdoba, 2010).

La patología de las leucemias no es muy diferente cuando se trata del mismo tipo, es decir, si son agudas o crónicas, pero influye en cuanto a la mortalidad que representan, siendo las leucemias agudas las de mayor agresividad, y por tanto de mayor cuidado.

### 1.6 Patología de las leucemias

La deficiencia en la hematopoyesis normal es la consecuencia más grave de las leucemias. La causa de la leucemia es propiamente desconocida, ya que no se ha determinado un factor concreto y determinante como la causa de esta enfermedad; se puede considerar como posible causa de la enfermedad, a que existan algunos cambios en la estructura genética de la célula, que conlleven a que estas células no puedan madurar, de la manera en la que se encuentran programadas originalmente y el crecimiento de estas células inmaduras pueda llegar a invadir cada uno de los tejidos del organismo. La principal característica de las leucemias agudas es la presencia de blastos correspondientes a la línea mieloide (LMA) o Linfocítica (LLA) en médula ósea; en una muestra de sangre periférica se pueden observar las células precursoras, es decir sin haber madurado, las cuales predominan sobre las células hematopoyéticas maduras, tal como se muestra en la Figura 5 (Alvarado y Córdoba, 2010).

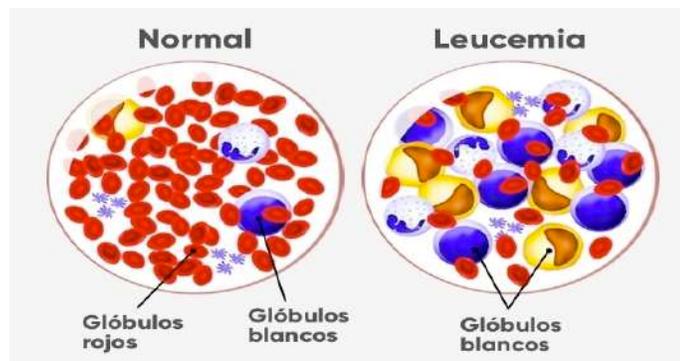


Figura 5. Comparación entre una muestra de sangre de una persona sana y una muestra de sangre de un paciente con leucemia (Pokhael, 2012).

## 1.7 Cuadro clínico de las leucemias

Los síntomas más frecuentes se vinculan con la anemia, trombocitopenia o neutropenia. Los principales problemas clínicos son: anemia, infección y episodios hemorrágicos, también se presenta dolor en los huesos y pérdida de peso; en el examen físico se muestra hepatoesplenomegalia y ocasionalmente linfadenopatía. Las células leucémicas pueden infiltrar cualquier tejido del cuerpo, especialmente el bazo, hígado, ganglios linfáticos, SNC y la piel; algunos de los síntomas comunes de la leucemia se encuentran representados en la Figura 6, donde se esquematiza que el daño puede ser sistémico, muscular e inclusive psicológico. Las lesiones producidas van desde exantemas hasta tumores (Pokhael, 2012).

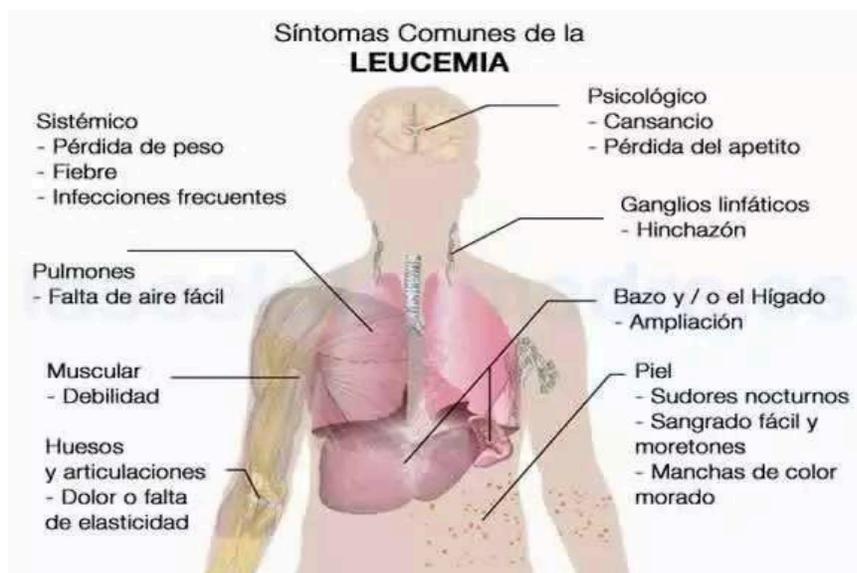


Figura 6. Síntomas comunes de la leucemia: hepatoesplenomegalia, inflamación de ganglios linfáticos, moretones, falta de aire y dolor en las articulaciones (Pokhael, 2012).

## 1.8 Tratamiento

El tratamiento por elección para cualquier tipo de leucemia es la Quimioterapia, la cual es crucial para el cáncer, la leucemia y el linfoma; su objetivo principal es erradicar todas las células malignas dentro de la médula ósea. Este tratamiento tiene varios efectos colaterales y puede presentar clínicamente una resistencia a la

dosis de los fármacos suministrados (Zhiou y col., 2017). El tratamiento quimioterapéutico tiene varias fases: inducción a la remisión, intensificación y mantenimiento. En la primera fase lo que se pretende es eliminar los signos y síntomas específicos de la enfermedad, además de inducir a la desaparición de los blastos, o células leucémicas, de la sangre periférica y la recuperación las células normales en sangre periférica. En la segunda fase de la quimioterapia, se intenta destruir en su totalidad la enfermedad residual, con el objetivo de evitar una recaída; en esta fase se incrementan las dosis considerablemente, sobre todo en el caso de que posteriormente exista un trasplante de médula con células autólogas. En la última etapa se pretende prevenir que una infiltración de algún tipo de célula residual al SNC. Un problema que enfrenta este tratamiento es que los fármacos utilizados no son específicos para células leucémicas, por lo que a lo largo del tratamiento muchas de las células normales y órganos tales como los riñones, el corazón y el sistema nervioso terminan dañándose, a causa de las sustancias que se liberan en el torrente sanguíneo con la destrucción de las células leucémicas. Datos señalan que es posible evitar el daño provocado por la leucemia administrando líquidos y medicamentos adicionales, tal como, bicarbonato y alopurinol (Alvarado y Córdoba, 2010).

Entre los grupos de fármacos más utilizados para tratar la leucemia se encuentran: anti metabolitos, agentes alquilantes y antibióticos.

- Los anti metabolitos son antagonistas de la purina o la pirimidina, por lo que inhiben la síntesis del DNA. Este tipo de fármacos matan a las células en el ciclo celular y afectan a cualquier célula en rápida división; además tienden a matar células que recubren el intestino, el epitelio germinal y células hematopoyéticas normales.
- Los alquilantes no son específicos para células en ciclo, pero matan a las células tanto en reposo como proliferantes. El fármaco se enlaza con moléculas del DNA para interferir con su síntesis.
- Los antibióticos se enlazan con moléculas tanto del DNA como del RNA e interfieren con la replicación celular (McKenzie y col., 2000).

Los polifenoles obtenidos de fuentes naturales poseen un vasto rango de propiedades quimiopreventivas del cáncer (Suganya y col., 2014). Un ejemplo es el pteroestilbeno, perteneciente a la familia de estilbenos, metabolitos secundarios considerados polifenoles.

### 1.8.1 Pteroestilbeno

El pteroestilbeno (PTS) (3,5 – dimetoxi-4-hidroxiestilbeno), representado en la Figura 7, es una fitoalexina y un análogo dimetilado del resveratrol (3,5,4 – trihidroxiestilbeno); además de ser un compuesto derivado natural encontrado abundantemente en arándanos. El PTS con sus dos grupos metoxi y un grupo hidroxilo, posee mayor lipofilidad y un gran potencial de captación celular. La evidencia sustancial sugiere que el pteroestilbeno, puede tener numerosas propiedades preventivas y terapéuticas en una amplia gama de enfermedades humanas que incluyen trastornos neurológicos, cardiovasculares, metabólicos y hematológicos (Estrela y col., 2013).

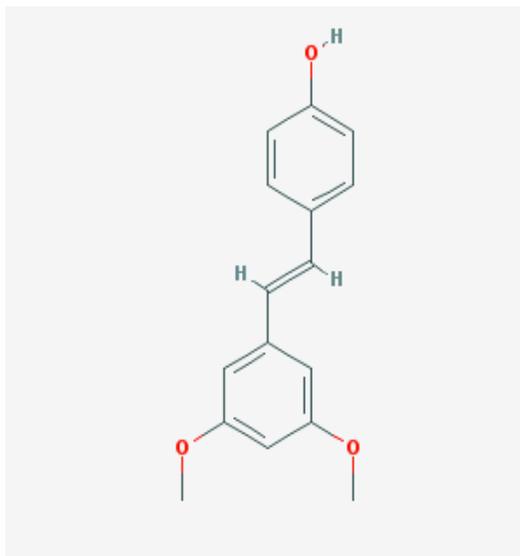


Figura 7. Estructura química del pteroestilbeno (PubChem, 2017).

Los resultados de investigaciones recientes realizados por D. McCormack y D. McFadden, en 2013, indicaron que este compuesto tiene otras propiedades, entre las que se incluye la acción que tiene como un potente anticancerígeno en varias neoplasias malignas. Estos autores sugieren que el pterostilbeno exhibe una biodisponibilidad incrementada debido a la presencia de dos grupos metoxi que hacen que presente una mayor absorción lipófila y oral a comparación del resveratrol.

Por otro lado, haciendo referencia a estudios realizados por Mikstacka y colaboradores en 2007 que demuestran que tanto el resveratrol como sus análogos, incluyendo el PTS, pueden inhibir la actividad catalítica de los citocromos P4501A2 Y P4502E1. La sustitución de los grupos hidroxilo del resveratrol con grupos metoxi incrementa la inhibición de CYP1A2, sin importar la posición en que tenga lugar la sustitución.

La actividad quimiopreventiva en cáncer del PTS, fue reportada por Rimando y colaboradores en 2002, quienes fueron los primeros en utilizar un modelo de cultivo de órganos mamarios, en el cual observaron que las lesiones carcinogénicas inducidas antes de la neoplasia, fueron significativamente inhibidas por el PTS.

Así mismo, se observa que el PTS inhibe la síntesis de prostaglandinas al bloquear a COX-1, y débilmente a COX-2, como resultado del tratamiento a glándulas mamarias de ratón con PTS.

En los estudios realizados por Hasiah y colaboradores en 2011, se demostró que el PTS provoca la detención del crecimiento e incremento de la apoptosis en diversas líneas celulares de cáncer, a través de la activación de la vía de caspasa mitocondrial, la liberación aumentada de los nucleosomas, el arresto del ciclo celular y el daño al ADN modificando las proteínas ciclo-reguladoras celulares tales como la ciclina.

El PTS juega un papel importante en la regulación de la expresión de mas de un gen inflamatorio, mediante la inhibición de múltiples vías de señalización como: NF- $\kappa$ B y AP-1 (Pan y col., 2007). Estudios realizados por Remsberg y colaboradores en 2007 reportan que en ciertas líneas celulares se produce una disminución de la concentración de PTS, a causa de una glucuronidación inducida por la presencia

de un metabolito glucuronidado al introducir PTS en el tratamiento; además, en la línea celular Hep-G2 se observa la inhibición de proliferación celular y tiene como característica ser un inductor de apoptosis. Estos estudios son importantes ya que demuestran que existe una inhibición en una vía específica de señalización celular que tiene como consecuencia la apoptosis de las células leucémicas.

Suganya y colaboradores en 2014, realizaron un estudio a partir de la línea celular HepG2, donde demostraron que el PTS tiene un efecto citotóxico dependiente de la dosis y del tiempo, con una concentración  $CI_{50}$  de 60  $\mu$ M. El PTS también incrementa el nivel de generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y causa un severo estrés oxidativo produciendo apoptosis.

### 1.8.2 Vincristina

La vincristina (VCR), molécula representada en la Figura 8, es un agente quimioterapéutico que se deriva de la planta de la planta *Catharanthus roseus*, el fármaco se usa como sulfato de vincristina.

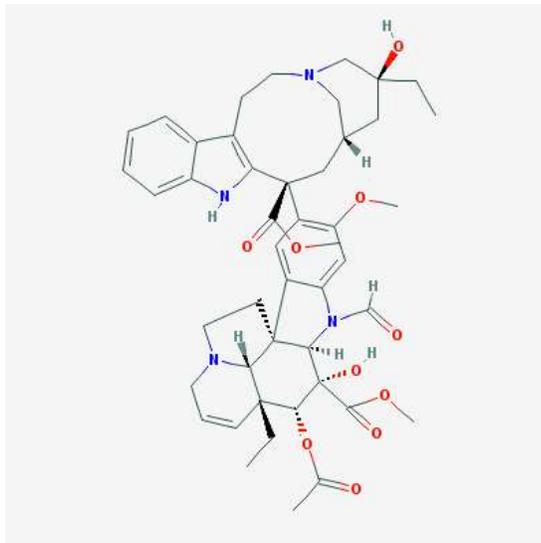


Figura 8. Estructura química de vincristina (Pubchem, 2017).

La vincristina es una amina lipofílica que entró al mercado como agente anticancerígeno hace 45 años, su mecanismo de acción está asociado a la disrupción del ciclo celular, porque se une directamente a los microtúbulos y evita

su despolimerización en la fase M de dicho ciclo. Cuando la vincristina se usa a bajas dosis puede inducir el arresto mitótico, con poco efecto en la polimerización de microtúbulos y en dosis altas se asocia con la despolimerización de microtúbulos y citotoxicidad. También se ha reportado que la vincristina induce necrosis tumoral al impedir el flujo sanguíneo. Entre los mecanismos involucrados en los efectos secundarios de esta droga, se ha propuesto que afecta los procesos de transporte intracelulares, lo que afecta el funcionamiento axonal e induce su degradación lo que ocasiona polineuropatía. A partir del 2012 la vincristina se aplica en inyección liposomal, la cual ha sido bien tolerada y evita las limitaciones farmacocinéticas de la vincristina no liposomal (Trisha y col., 2013).

La vincristina es uno de los fármacos gracias a los cuales se ha podido incrementar la probabilidad de sobrevivencia de la leucemia linfocítica aguda a un 80-90%. Dicho agente quimioterapéutico se combina con otros fármacos como esteroides y asparaginasa, así como el tratamiento posterior de consolidación con metotrexato por uno o dos años (Kato y Manabe, 2017; Varedi y col., 2017).

Actualmente se propone que la combinación de agentes anti-leucémicos como vincristina, asparaginasa y metotrexato pueden ser favorecidos con estudios farmacogenómicos para conocer las variantes entre los diferentes pacientes y con ello lograr disminuir la toxicidad de las drogas (Lee y Yang, 2017).

El tratamiento para la leucemia linfocítica aguda con fármacos quimioterapéuticos, como se mencionó antes consiste en la inducción, consolidación y mantenimiento. Cuando se lleva a cabo la primera etapa se pretende la completa remisión, así como la restauración de la hematopoyesis normal. Para esta etapa regularmente se utilizan drogas como vincristina, corticoesteroides y antraciclina. En niños se usa L asparaginasa, sin embargo, para adultos tiene más reacciones adversas y se cambia por drogas distintas como la vincristina que proporciona un tratamiento más eficaz, ya que tiene un sitio de acción fundamental. El tratamiento de inducción se divide en dos fases, en una de las cuales se trata con mercaptopurina y metotrexato. Después de la inducción se trata con metotrexato, leucovorina y asparaginasa. Se pueden administrar distintos esquemas de tratamiento en los

que se incluye vincristina, ciclofosfamida, doxorubicina, así como metotrexato (Terwilliger y Abdul, 2017).

Mei y colaboradores en 2015, reportan que la vincristina es capaz de unirse a los dímeros de la túbulina, lo cual interfiere con la formación y la dinámica del huso mitótico, dando como resultado una muerte celular prematura.

Zhang y colaboradores en 2016, realizaron un estudio para observar el efecto de vincristina en combinación con un diterpenoide [(Andrografólido (AND))] en el tratamiento para nefroblastoma; se trató la línea celular SK-NEP-I con vincristina y el diterpenoide (AND) por separado en concentraciones de 0-15 nM y 0-25  $\mu$ M respectivamente, y se obtuvo una  $IC_{50}$  de VCR de 10.8 nM a 48 horas del tratamiento. Como resultado obtuvieron que la combinación de AND con VCR suprimió significativamente la proliferación de células SK-NEP-1 *in vitro* e inhibió el crecimiento del tumor de xenoinjerto *in vivo*, en comparación con el tratamiento AND o VCR solo. El efecto antitumoral sinérgico de AND en las células se debió a un aumento de la apoptosis y no a la autofagia. Además, demostraron que se puede aumentar el efecto de VCR con un metabolito secundario natural.

De acuerdo a lo anterior, se sabe que los medicamentos quimioterapéuticos pueden ser muy tóxicos en grandes cantidades, por lo que se busca disminuir la concentración a la que se administran, sobre todo, a niños, ya que poseen una mayor vulnerabilidad a desarrollar una intoxicación severa. Los compuestos naturales, pueden contribuir a disminuir las dosis en las que son administrados este tipo de medicamentos, volviendo al tratamiento menos agresivo para el paciente y desarrollando una alternativa para acelerar el tratamiento sin la necesidad de que se aumente la concentración del fármaco.

## **2 Hipótesis**

El pteroesetilbano es capaz de incrementar de manera significativa el efecto anticancerígeno de la vincristina en cultivos de células Jurkat de leucemia tipo T.

### **3 Objetivos**

#### 3.1 Objetivo general

Determinar el efecto del pteroestilbena en combinación con vincristina para el tratamiento de líneas celulares Jurkat de leucemia tipo T.

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Elaborar curvas de concentración – respuesta para evaluar el efecto del pteroestilbena, sobre la viabilidad y la proliferación de líneas celulares Jurkat de leucemia linfocítica aguda de tipo T y establecer la  $CI_{50}$  del pteroestilbena.
- Elaborar curvas de concentración – respuesta para evaluar el efecto de la vincristina, sobre la viabilidad y la proliferación de líneas celulares Jurkat de leucemia linfocítica aguda de tipo T y establecer la  $CI_{50}$  del fármaco.
- Evaluar el efecto aditivo de vincristina y pteroestilbena, como tratamiento, sobre la viabilidad y la proliferación de líneas celulares Jurkat de leucemia linfocítica aguda de tipo T.

## 4 Metodología

### 4.1 Materiales

- Cajas Petri
- Cajas multiplaca para cultivo de 4 x 6 pozos
- Cámara de Neubauer
- Criotubos
- Micropipetas 10-1000  $\mu$ L
- Microespátula
- Microscopio
- Tubos Falcon de 50 mL
- Tubos Eppendorf de 0.5, 1 y 2 mL

### 4.2 Material biológico

- Línea Celular Jurkat

### 4.3 Reactivos

- Vincristina (Sulfato)
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Medio RPMI 1640
- Pteroestilbeno
- Solución azul de tripano al 0.04% en PBS
- Solución penicilina/estreptomina/fungizona (10 000 UI/mL/ 10 000  $\mu$ g/mL/ 250  $\mu$ g/mL)
- Suero fetal bovino

### 4.4 Equipos

- Campana de flujo laminar Clase II LABCONCO Delta Series  $\Delta$
- Incubadora CO<sub>2</sub>
- Microscopio invertido Axioskop 2 plus ZEISS
- Microscopio óptico AxioStar plus
- Baño de agua StovallLifeScience

## 4.5 Métodos

### 4.5.1 Cultivo Celular

El cultivo y mantenimiento de la línea de células Jurkat se realizó en medio RPMI - 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino y 1% de una mezcla de antibióticos y fungicida (penicilina-estreptomina-fungizona). Se mantuvieron en cajas Petri, en una incubadora humidificada a 37°C en una atmósfera de CO<sub>2</sub> al 5%. Se les adicionó medio cada tercer día, en cantidades de 500 µL-1000 µL, en caso de ser fin de semana, se le adicionaron 2500 µL, con la finalidad de asegurar el crecimiento y supervivencia de las células.

Se realizaron lavados celulares aproximadamente cada 2 ó 3 días, según fuese necesario, esto para poder mantener una concentración de  $5 \times 10^5$  células viables/mL.

La viabilidad celular se determinó a partir de un ensayo con azul de tripano, para lo cual se realizó una dilución 1:2 tomando 50 µL de células y 50 µL de solución de azul tripano en un tubo Eppendorf. Se homogenizó la muestra y se colocaron 10 µL en cada zona de la cámara de Neubauer y se procedió con el conteo utilizando el microscopio óptico.

### 4.5.2 Curvas concentración-respuesta de pterostilbeno

En primera instancia se observaron al microscopio las cajas Petri que se tenían en la incubadora, y se procedió a seleccionar la que tuviera una mayor confluencia, por consiguiente se realizó un conteo para verificar la viabilidad de las células y poder calcular la cantidad de microlitros a sembrar en cada pozo, mediante un ensayo de azul tripano. Se sembraron los microlitos determinados (por pozo), en una caja multiplaca de 4 x 6 pozos (P24) y se incubó por 24 h. Post-incubación se agregaron 50 µL de cada una de las diluciones de PTS realizadas, en un rango de concentraciones de 150 a 1250 µM, tal como se muestra en la Figura 9.

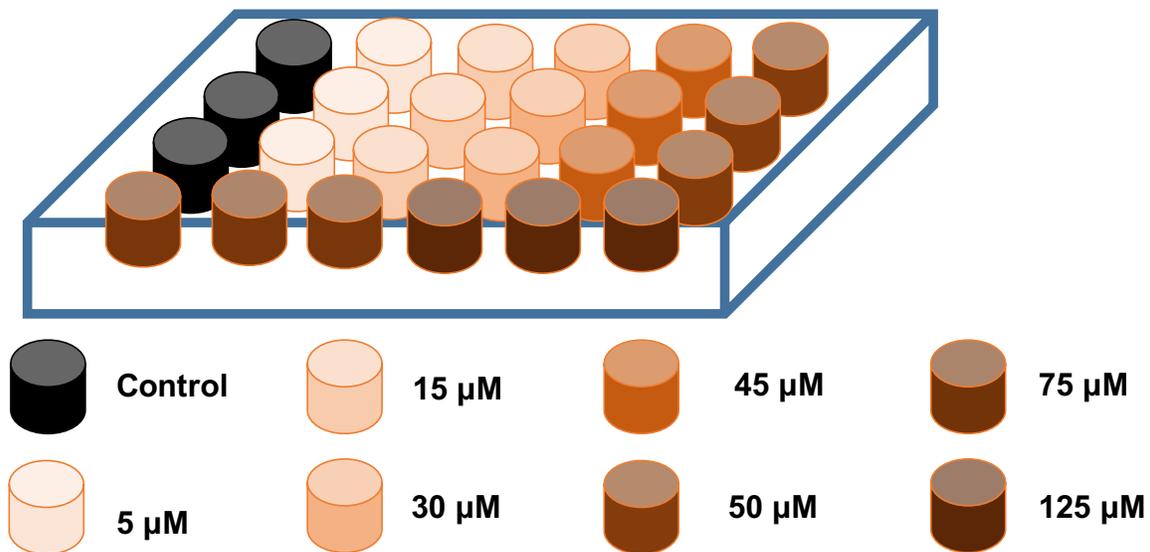


Figura 9. Distribución de las concentraciones de PTS en la caja multiplaca 4 x 6 (Caja P24).

Una vez con el tratamiento administrado del compuesto natural, se incubó la caja 24 h más. Pasadas las 24 h se procedió a realizar el conteo para evaluar la viabilidad de las células tratadas con PTS y se determinó el porcentaje de proliferación celular, con el cual se obtuvo la  $CI_{50}$  del mismo, a partir de la curva sigmoidea que se elaboró con las concentraciones designadas. Este procedimiento se realizó por triplicado.

#### 4.5.3 Curvas concentración-respuesta de vincristina

Para el experimento de vincristina se siguió el mismo procedimiento: se observaron al microscopio las cajas Petri que se tenían en la incubadora, y se seleccionó la que tuviera una mayor confluencia, después se realizó un conteo para verificar la viabilidad de las células y poder calcular la cantidad de microlitros a sembrar en cada pozo, mediante un ensayo de azul tripano. Se sembraron los microlitros determinados (por pozo), en una caja P24 y se incubó por 24 h. Pasadas las 24 h se administró el tratamiento con vincristina, agregando 50  $\mu\text{L}$  de cada una de las diluciones de VCR realizadas en un rango de concentraciones de 1 nM a 1000 nM, tal como se muestra en la Figura 10.

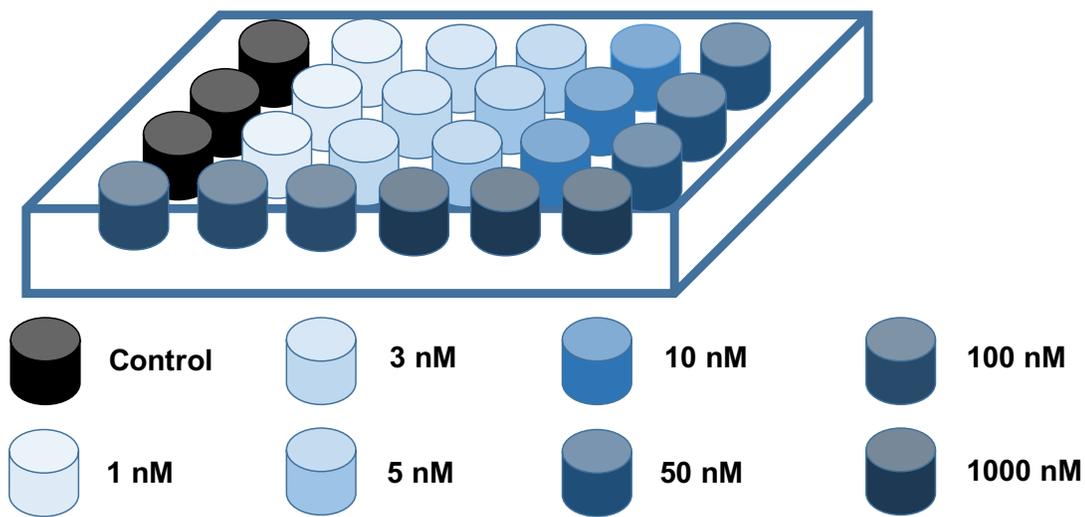


Figura 10. Distribución de las concentraciones de VCR en la caja multiplaca 4 x 6 (Caja P24).

Una vez con el tratamiento administrado del fármaco, se incubó la caja otras 24 h. Pasadas las 24 h se realizó el conteo para evaluar la viabilidad de las células tratadas con VCR y se determinó el porcentaje de proliferación celular, con el cual se obtuvo la  $CI_{50}$ , a partir de la curva sigmoidea que se elaboró con las concentraciones designadas. Al final se realizaron tres experimentos por triplicado.

#### 4.5.4 Evaluación del efecto aditivo de pterostilbeno y vincristina

Se evaluó el efecto aditivo de PTS y VCR, se siguió el mismo procedimiento para la incubación y tratamiento de las células: se observaron al microscopio las cajas Petri que se tenían en la incubadora, y se seleccionó la que tuviera una mayor confluencia, después se realizó un conteo para verificar la viabilidad de las células y poder calcular la cantidad de microlitros a sembrar en cada pozo, mediante un ensayo de azul tripano. Se sembraron los microlitros determinados (por pozo), en una caja P24 y se incubó por 24 h. Pasadas las 24 h se administró el tratamiento, acorde a la Figura 11.

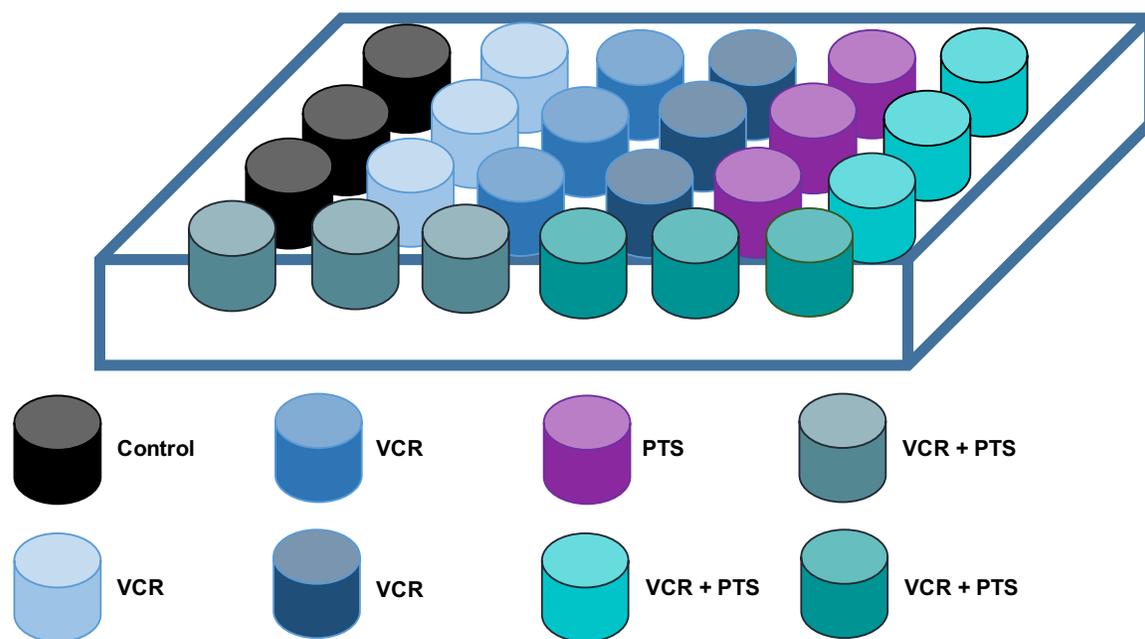


Figura 11. Tratamiento combinado que se aplicará en la caja multiplaca 4 x 6 (Caja P24).

Una vez con el tratamiento combinado administrado se incubó la caja otras 24 h. Pasadas las 24 h se realizó el conteo y se determinó el porcentaje de proliferación celular, se comparó el tratamiento combinado con el tratamiento a concentración baja y alta de VCR y la  $CI_{50}$  de PTS. Al final se realizaron tres experimentos por triplicado.

#### 4.5.5 Análisis Estadístico

A partir de un análisis estadístico se evaluó y determinó la viabilidad celular como un porcentaje en contraste con el grupo control de cada experimento. Los resultados fueron analizados con ayuda del programa PRISMA, donde se llevó a cabo una prueba ANOVA de una vía y adicional a ella se realizó un análisis *post hoc* utilizando una prueba de TUKEY para determinar las diferencias de los resultados contra el grupo control y probar si existe una diferencia significativa entre cada uno de los tratamientos.

## 5 Resultados

### 5.1 Curva dosis respuesta de pteroestilbeno en células Jurkat

A partir del conteo realizado, se obtuvo una curva sigmoidea como la que se observa en la Figura 12, la cual se realizó con el programa PRISMA. Con base en la curva obtenida se determinó la  $CI_{50}$  del PTS.

De acuerdo al análisis realizado se obtuvo una  $CI_{50}$  de PTS de 24  $\mu$ M.

#### Curva dosis respuesta de pteroestilbeno en células Jurkat

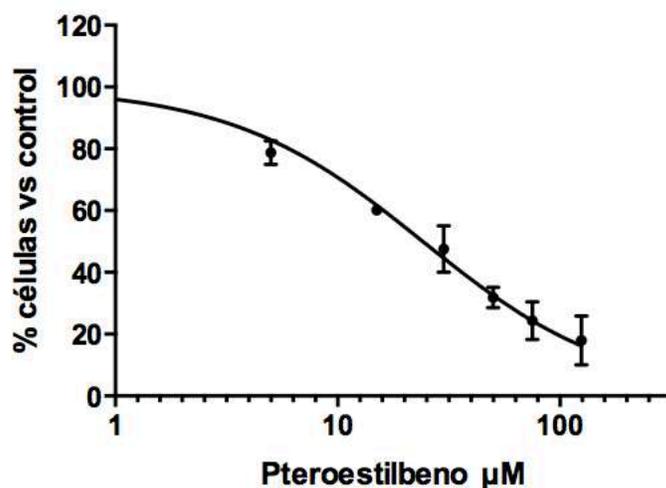


Figura 12. Curva dosis respuesta de pteroestilbeno en células Jurkat. Se muestra la media con la desviación estándar de 3 repeticiones y son representativos de tres conjuntos independientes de experimentos.

### 5.2 Curva dosis respuesta de vincristina en células Jurkat

A partir del conteo realizado, se obtuvo una curva sigmoidea como la que se observa en la Figura 13, donde se graficaron las concentraciones en escala logarítmica en el tratamiento con vincristina; de esta manera se hizo un análisis y se determinó la  $CI_{50}$  de VCR.

De acuerdo al análisis realizado se obtuvo una  $CI_{50}$  de 3.34 nM.

### Curva concentración respuesta de Vincristina en células Jurkat

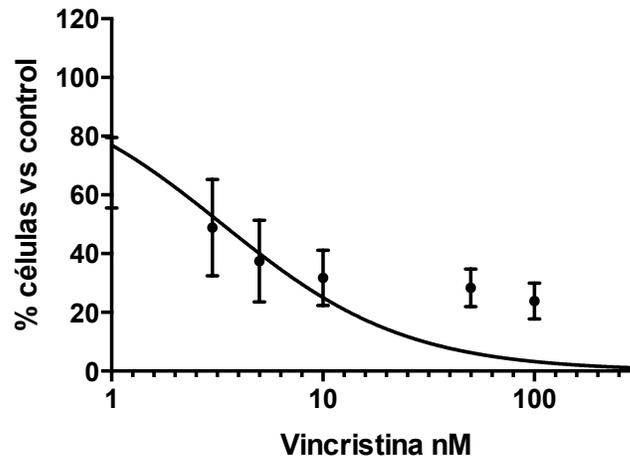


Figura 13. Curva dosis respuesta de vincristina en células Jurkat. Se muestra la media con la desviación estándar de 3 repeticiones y son representativos de tres conjuntos independientes de experimentos.

### 5.3 Efecto de Pteroestilbena y Vincristina en células Jurkat.

Una vez determinada la concentración inhibitoria cincuenta de pteroestilbena, así como la de vincristina, se procedió a evaluar el efecto aditivo en contraste con el efecto de cada compuesto de manera singular, en el caso de vincristina se consideraron las concentraciones de 1.7, 3.3 y 12 nM (las cuales se consideraron con base en la curva de concentraciones realizada), en el caso de pteroestilbena la CI 50, en la Figura 14 se representa gráficamente la distribución de las concentraciones en el tratamiento de las células Jurkat, propuesto en el punto 4.5.4.

Después del tratamiento se procedió a realizar un análisis *post hoc* con la prueba de Tukey a partir de una prueba de ANOVA de una vía, en donde se compararon los tratamientos individuales y combinados contra el control. A partir de esto se obtuvo la gráfica representada en la Figura 15.

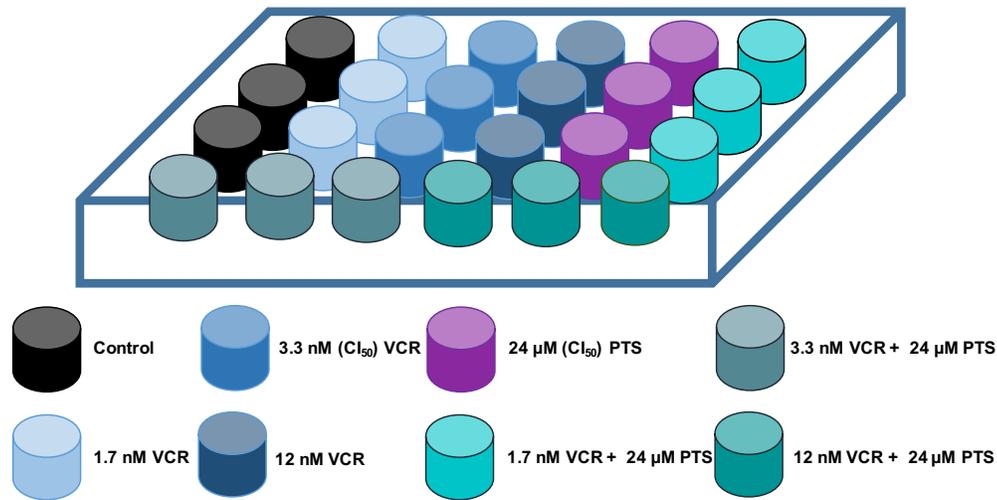


Figura 14. Distribución de concentraciones para el tratamiento de células Jurkat expresado en el punto 4.5.4

### Análisis de la combinación de ambos fármacos

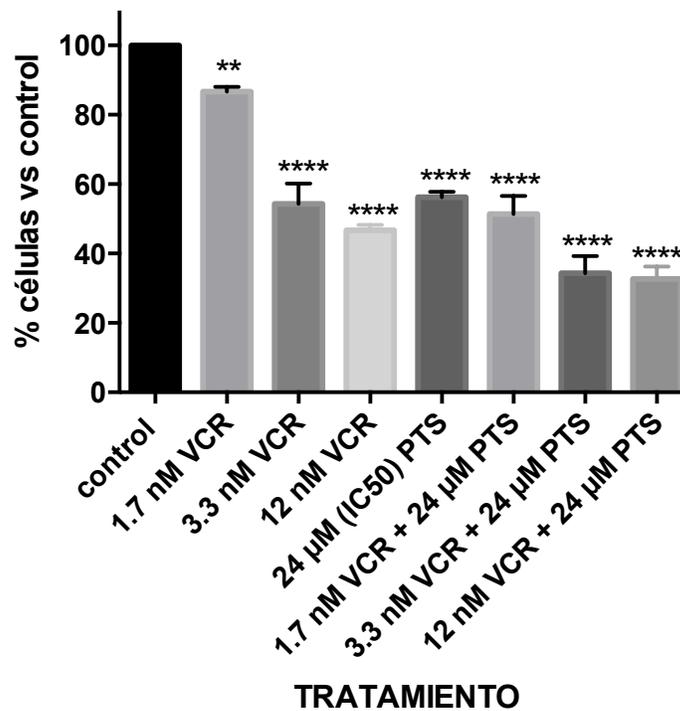


Figura 15. Tratamiento aplicado para observar el efecto de Pterostilbena y Vincristina en células Jurkat. Se muestra la media con la desviación estándar de 3 repeticiones y son representativos de tres conjuntos independientes de experimentos.

## 6 Discusiones

En el presente trabajo de investigación se determinó el efecto aditivo de un compuesto natural y un fármaco con potencial actividad anticancerígena, pteroesilbano y vincristina, con el propósito de evaluar la efectividad del tratamiento.

De los resultados obtenidos, primeramente, se puede observar que se tiene un efecto anti proliferativo significativo en el tratamiento con pteroesilbano a diferentes concentraciones, donde se obtuvo una CI50 de 24  $\mu$ M. La disminución en la proliferación celular, se puede atribuir al arresto celular en fase S, tal como reportan Chang y colaboradores en 2017, donde se observa este fenómeno a concentraciones de 5, 10 y 20  $\mu$ M, siendo consistente con la CI50 obtenida de este trabajo. Se puede deducir que el pteroesilbano genera señales moleculares rápidas capaces de interferir con la división celular, además de inducir un arresto celular en fase S, impidiendo a las células cancerígenas replicarse e interrumpir el ciclo celular y por consecuencia una disminución significativa de la proliferación celular, en correlación con lo expresado por Ferrer y colaboradores en 2005, quienes reportan la existencia de este tipo de señales moleculares, tales como las MAPK, que interfieren con el proceso de división celular.

Por otro lado, se observó el comportamiento del fármaco vincristina, de igual manera a diferentes concentraciones y se obtuvo una CI50 de 3.3 nM; este fármaco es reconocido por su mecanismo de acción, el cual se lleva a cabo a nivel de microtúbulos, siendo un fármaco antimetabólico; al interferir directamente con los microtúbulos, se tiene un impacto directo en la división celular en la fase M, además, podría tener un papel importante en la fase G1, tal como lo reportan Kothari y colaboradores en 2017, quienes proponen que en la fase G1 las células son más propensas a morir directamente, además de que se observa que se tiene este efecto después de 24 h con el fármaco, siendo consistente con los resultados obtenidos en el presente trabajo, donde la disminución de crecimiento celular se puede atribuir a este fenómeno durante el ciclo celular.

En última instancia se evaluó el efecto aditivo entre el pteroesilbano y la vincristina en contraste con el tratamiento individual, donde se observó que existe una

disminución en el porcentaje celular, es decir, un efecto anti proliferativo significativo, con el tratamiento combinado entre la CI50 de pterostilbena y la CI50 de vincristina, mostrando una diferencia significativa con respecto al control, además de que no existe diferencia significativa cuando se lleva a cabo el tratamiento a una dosis mayor de vincristina con respecto a cuando se utiliza una dosis menor, en este caso la CI50 de VCR (3.3 nM). Por lo tanto, se puede deducir que el efecto obtenido con el tratamiento combinado, es resultado de un conjunto de señales moleculares que interfieren con el ciclo celular, inhibiendo la división celular y por lo tanto disminuyendo el porcentaje celular; esto debido a que el mecanismo del pterostilbena y de la vincristina convergen, ya que se produce un arresto celular en fase S, por parte del pterostilbena, mientras la VCR produce arresto celular en fase G1 y en la fase M donde su objetivo son los microtúbulos.

Dados los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 15 se deduce que el tratamiento combinado con una dosis de 3.3 nM de VCR y 24  $\mu$ M de PTS, proporciona un mayor efecto anti proliferativo, además de presentar diferencia significativa contra el control y por consecuencia se evidencia que es posible disminuir la dosis de VCR en el tratamiento de Leucemia Linfocítica Aguda tipo T; tal como lo demuestran Pérez y colaboradores en 2013, quienes reportan que al combinar vincristina con un flavolignano, es posible disminuir la dosis de vincristina y obtener el efecto anti proliferativo deseado, que se obtendría al utilizar una dosis mayor; por tanto se tiene coherencia con lo reportado en la literatura y los resultados obtenidos en el presente trabajo.

## **7 Conclusiones**

El pteroestilbena a una concentración de 24  $\mu\text{M}$  inhibe la proliferación de la línea celular Jurkat de Leucemia Linfocítica Aguda tipo T en un cincuenta por ciento.

La vincristina a una concentración de 3.3 nM en combinación con la  $\text{CI}_{50}$  de pteroestilbena, posee una mayor actividad anti proliferativa a comparación de la actividad observada en los tratamientos singulares de pteroestilbena y vincristina, además de mostrar una diferencia significativa en cuanto a éstos y el control.

La combinación de pteroestilbena y la vincristina genera un efecto aditivo en la inhibición de la proliferación celular.

## 8 Referencias

**Almaguer D**, Pérez JC. Hematología: La sangre y sus enfermedades. 2a. edición. México D.F. Editorial McGraw Hill, **2009**;16:71-76

**Alvarado J**, Córdoba JA. Hematología: Leucemias, Fisiopatología y Generalidades. **2010**. Universidad Juárez Autónoma de Tabasco.

**American Cancer Society**, How is acute myeloid leukemia classified?. **2016**; [Serie en internet] [https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/detection-diagnosis-staging/how-classified.html#written\\_by](https://www.cancer.org/cancer/acute-myeloid-leukemia/detection-diagnosis-staging/how-classified.html#written_by)

**Andrade A. Borges K. Silveira V.** Update on the Use of L-Asparaginase in Infants and Adolescent Patients with Acute Lymphoblastic Leukemia. **2014**. Clinical Medicine Insights: Oncology:8 95–100 doi: 10.4137/CMO.S10242.

**Chang G.** Xiao W. Xu Z. Yu D. Li B. Zhang Y. Sun X. y col. Pterostilbene induces cell apoptosis and cell cycle arrest in T-Cell Leukemia/Lymphoma by suppressing the ERK1/2 pathway. **2017**. BioMed Research International. 1:1-11

**Estrela JM**, Ortega A, Mena S, Rodríguez ML, y Asensi M. Pterostilbene: Biomedical applications. **2013**. Critical Reviews in Clinical Laboratory Science.50(3):65-78

**Ferrer P**, Asensi M, Segarra R, Ortega A, Benlloch M, Obrador E, Varea M, Asensio G, Jordá L y Estrela J. Association between Pterostilbene and Quercetin Inhibits Metastatic Activity of B16 Melanoma. **2005**. Polyphenols Decrease Melanoma Metastases, Research Article Neoplasia. 7(1):37-47

**Fortoul T**, González A, Carrillo P. Histología y Biología Celular. 3a. edición. México D.F. Editorial McGraw Hill. **2017**. Capítulo 10

**Hasiah AH**, Ghazali AR, Weber JF, Velu S, Thomas, NF, Inayat-Hussain SH. Cytotoxic and antioxidant effects of methoxylated stilbene analogues on HepG2 hepatoma and Chang liver cells: Implications for structure activity relationship. **2011**. Hum. Exp.Toxicol;30:138–144.

**Hurtado R**, Solano B, Vargas P. Leucemia para el médico general. **2012**. Revista de la Facultad de Medicina de la UNAM; 55(2)

**INEGI**. Estadísticas a propósito del día mundial contra el cáncer. 2017. [Serie en internet] **2017**. [Consultado 03 Junio 2017] Aguascalientes, México P. 1-13.

**Disponible en:**

[http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017\\_Nal.pdf](http://www.inegi.org.mx/saladeprensa/aproposito/2017/cancer2017_Nal.pdf)

**Kato M**, Manabe A. Treatment and biology of pediatric acute lymphoblastic leukemia. **2017**. *Pediatr Int*. Doi;10.1111/ped.13457

**Kothari A**, Hittelman W, Chambers T. Cell cycle dependent mechanisms underlie vincristine-induced death of primary acute lymphoblastic leukemia cells. **2016**. *HHS Public Access: Cancer Research*; 15; 76(12): 3553-3561

**Lee SHR**, Yang JJ. Pharmacogenomics in acute lymphoblastic leukemia. **2017**. *Best Pract Res Clin Haematol*;30(3):229-236.

**Leukemia & Lymphoma Society (LLS)**. Fighting blood cancers 2016-2017. American Cancer Society. **2017**

**McCormack D**, McFadden D. A Review of Pterostilbene Antioxidant Activity and Disease Modification. **2013**. Hindawi Publishing Corporation *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*; Vol. 2013, Article ID 575482

**McKenzie S**. y col. *Hematología Clínica*. 2ª Edición. **2000**. Editorial Manual Moderno. México D.F.

**Mei L**, Ontiveros E, Griffiths E, Thompson J, Wang E, y Wetzler M. Pharmacogenetics predictive of response and toxicity in acute lymphoblastic leukemia therapy. **2015** *Blood Rev*; 29(4): 243–249.

**Mikstacka R**, Przybylska D, Rimando AM, Baer-Dubowska W. Inhibition of human recombinant cytochromes P450 CYP1A1 y CYP1B1 by trans-resveratrol methyl ethers. **2007**. *Mol. Nutr. Food Research*;51(5):517-24

**NIH: Instituto Nacional del Cáncer**. What you need to know about Leukemia. **2013**. National Cancer Institute: NIH;13:3775 P. 1-25;

**NIH: Instituto Nacional de Cáncer**. Diccionario de cáncer: Médula ósea.2017. [Serie en internet] **2017**. [Consultado 10 Febrero 2018] Querétaro, México. Disponible en:

<https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/medula-osea>

**Palomo GI**, Pereira J, Palma J. *Hematología: Fisiopatología y Diagnóstico*.. Universidad de Talca, Chile.**2009**; 43-65

**Pan MH**, Chang YH, Badmaev V, Nagabhushanam K, Ho CT. Pterostilbene induces apoptosis and cell cycle arrest in human gastric carcinoma cells. **2007**. J. Agric. Food Chem; 55: 7777–7785.

**Pérez L**, Pan L, Sass E, Gupta S, Lehman A, Douglas A, Lucas D. Potentiating Effect of the Flavonolignan (-)-Hydnocarpin in Combination with Vincristine in a Sensitive and P-gp-Expressing Acute Lymphoblastic Leukemia Cell Line. **2013**. NIH Public Acces; Phytother Research; 27(11); 1-10

**Pokhael M**. Leukemia: A Review Article; **2012**. IJARPB (International Journal of Advanced Research in Pharmaceutical and Bio sciences; 2(3); 397-407.

**PubChem**. Pterostilbene. 2018. [Serie de internet] **2018**. [Consultado 10 Febrero 2018] Querétaro, México. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/5281727#section=Top>

**PubChem**. Vincristine. 2018. [Serie de internet] **2018**. [Consultado 10 Febrero 2018] Querétaro, México. Disponible en: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/249332#section=Top>

**Remsberg CM**, Yañez JA, Ohgami Y, Vega-Villa K, Rimando AM y Davies N. Pharmacometrics of Pterostilbene: preclinical, pharmacokinetics, and metabolism, anticancer, antiinflammatory, antioxidant and analgesic activity. **2007**. Phytotherapy Research. 22:169-179

**Rimando AM**, Cuendet M, Desmarchelier C, Mehta RG, Pezzuto JM y Duke SO. Cancer chemopreventive and antioxidant activities of Pterostilbene, a naturally occurring analogue of Resveratrol. **2002**; J. Agricultural & Food Chemistry. 50(12):3453-7.

**Sánchez A**, Ramos C, Saavedra A, González L, Martínez A, Olarte I, Collazo J. Frecuencias de edad y género de pacientes con leucemia observada en dos centros de referencia del Valle de México. **2016**. Gac. Med. Mex; 2016;152:208-12

**Suganya N**, Bhakkiyalakshmi E, Subin TS, Krishnamurthi K, Saravana Devi S, Lau K, Sekar TV, Paulmurugan R, Ramkumar KM. Proteomic Identification of Pterostilbene-Mediated Anticancer Activities in HepG2 Cells. **2014**. Chemical Research in Toxicology. ACS; 1:A-J (1-10)

**Trisha A.** Soosay Raj, Amanda M Smith, and Andrew S Moore. Vincristine sulfate liposomal injection for acute lymphoblastic leukemia. **2013**. *Int J Nanomedicine*; 4361–4369. doi: 10.2147/IJN.S54657.

**Terwilliger T**, Abdul-Hay M. Acute lymphoblastic leukemia: a comprehensive review and 2017 update. **2017**. *Blood Cancer J*; 7(6): e577 .doi: 10.1038/bcj.

**Vardiman J**, Thiele J, Arber D, Brunning R, Borowitz M, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. **2009**; 114:937-951

**Varedi M.** McKenna R, Lamberg EM. Balance in children with acute lymphoblastic leukemia. **2017**. *Pediatr Int.* ;59(3):293-302. doi: 10.1111/ped.13141.

**Zhang M.**, Xue E., y Shao W. Andrographolide promotes vincristine-induced SK-NE P-1 tumor cell death via PI3K-AKT-p53 signaling pathway. **2016**. *Drug Design, Development and Therapy*:10 3143–3152

**Zhiou D**, Chen G, Wang J, Li N. Natural Cancer chemopreventive reagents from food and herbals. **2017**. *Springer*; 3:138-149