

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**  
**FACULTAD DE QUÍMICA**

**Maestría en Ciencias Químico Biológicas**

**“EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LA BETANINA Y  
COADYUVANTE CON VINCRISTINA EN CÉLULAS DE  
LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA TIPO T”**

**TESIS**

QUE COMO PARTE DE LOS REQUISITOS PARA OBTENER EL  
GRADO DE

**MAESTRA EN CIENCIAS QUÍMICO BIOLÓGICAS**

PRESENTA

**IBT. HELIANA GUADALUPE HERNÁNDEZ PAREDES**

DIRIGIDA POR

**DRA. MARÍA GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO. OCTUBRE, 2018.



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Química  
Maestría en Ciencias Químico Biológicas

EFFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LA BETANINA Y COADYUVANTE CON  
VINCRISTINA EN CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFOBLÁSTICA AGUDA TIPO T

**TESIS**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestra en Ciencias Químico Biológicas

**Presenta:**

IBT. Heliana Guadalupe Hernández Paredes

**Dirigido por:**

Dra. María Guadalupe García Alcocer

Dra. María Guadalupe García Alcocer  
Presidente



Firma

Dra. Margarita Teresa de Jesús García Gasca  
Secretario



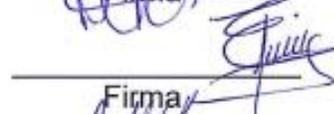
Firma

Dra. Laura Cristina Berumen Segura  
Vocal



Firma

Dra. Jesica Esther Escobar Cabrera  
Suplente



Firma

M. en C. Jesús Carlos Mendiola Précoma  
Suplente



Firma



\_\_\_\_\_  
Dra. Silvia Lorena Amaya Llano  
Directora de la Facultad de Química



\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Octubre, 2018

## RESUMEN

La leucemia es el cáncer infantil más común y representa aproximadamente el 30 % de todos los cánceres en niños. Hay distintos tipos de leucemia, dependiendo de su progresividad respecto al tiempo y el linaje celular afectado; la leucemia linfoblástica aguda tipo T (LLA-T), es un tipo de leucemia que se caracteriza por su agresividad, debido a la presencia de varias alteraciones citogenéticas que determinan su resistencia a los fármacos que conforman el protocolo de quimioterapia, donde la vincristina es uno de los principales antineoplásicos que se utilizan en el tratamiento. Sin embargo, el uso de vincristina está asociado a efectos adversos como neuropatía sensorial y motora progresiva. Debido a que la LLA-T se caracteriza por la resistencia a la quimioterapia y requiere de protocolos intensivos de administración de los fármacos, las investigaciones se centran en buscar alternativas que coadyuven al tratamiento y ayuden a disminuir los efectos colaterales. Bajo este contexto, en este trabajo de investigación, se estudió el efecto antiproliferativo de betanina y su efecto coadyuvante con vincristina en células de LLA-T. Los resultados indican que la betanina disminuye la proliferación de las células de LLA-T evaluados mediante el ensayo de exclusión azul de tripano y, que al combinarse con vincristina, potencia el efecto de manera dependiente de la concentración. Además, la betanina a las concentraciones propuestas no tuvo efectos tóxicos en células mononucleares de sangre periférica, como referencia de su inocuidad en células sanas. Así mismo, la combinación de betanina y vincristina, disminuye la cantidad de células viables, aumenta la cantidad en apoptosis temprana y arresta el desarrollo de las células primordialmente en fase G2/M, determinado por citometría de flujo. Este es el primer reporte del efecto de la betanina y vincristina en células de LLA-T, así como su asociación a apoptosis y arresto del ciclo celular.

**Palabras clave:** LLA-T, betanina, vincristina, coadyuvante, citometría de flujo.

## ABSTRACT

Leukemia is the most common childhood cancer and accounts for approximately 30% of all cancers in children. There are different types of leukemia, depending on their progressivity with respect to time and the affected cell lineage; T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL) is a type of leukemia that is characterized by its aggressiveness, due to the presence of several cytogenetic alterations that determine its resistance to the drugs that make up the chemotherapy protocol, where vincristine is one of the main antineoplastic that are used in the treatment. However, the use of vincristine is associated with adverse effects such as progressive sensory and motor neuropathy. Because T-ALL is characterized by resistance to chemotherapy and requires intensive protocols for drug administration, research focuses on finding alternatives that contribute to treatment and help to reduce side effects. In this context, in this research work, the antiproliferative effect of betanin and its adjuvant effect with vincristine in T-ALL cells were studied. The results indicate that betanin decreases the proliferation of the T-ALL cells evaluated by the trypan blue exclusion test and, when combined with vincristine, potentiates the effect in a concentration-dependent manner. In addition, betanin at the proposed concentrations had no toxic effects on peripheral blood mononuclear cells (PBMC), as a reference for its safety in healthy cells. Likewise, the combination of betanin and vincristine decreases the number of viable cells, increases the amount in early apoptosis arrests the development of cells primarily in the G2/M phase, determined by flow cytometry. This is the first report of the effect of betanin and vincristine on T-ALL cells, as well as its association with apoptosis and arrest of the cell cycle.

**Key words:** T-ALL, betanin, vincristine, coadjuvant, flow cytometry.

## DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mi bebé arcoíris, te esperé con ansias desde aquella llamada que interrumpió mi clase. A la distancia, te imaginé con mucho amor y fuiste mi impulso para enfrentarme a los retos del día.

No pudimos estar juntos durante un tiempo, pero cuando podía escucharte supe que el amor que nos une es inmenso. Agradezco a Dios el enviarte a mi vida para complementarme, para reinventarme y a ser con Any, mi pareja perfecta.

En tu mirada puedo ver tu fuerza, tus ganas de ser y quiero estar ahí para apoyarte en todo lo que este a mi alcance. Recuerda que lo que nos lleva lejos es nuestra capacidad de aprender y esa pasión que mostraste desde que sabíamos que llegarías.

Los obstáculos son importantes, no los ignores.

¡TE AMO!

FRANCO KALEB

## AGRADECIMIENTOS

Te agradezco infinitamente DIOS, por escuchar mis anhelos y colocarme bajo las circunstancias y los medios para hacer cumplir tu propósito. Gracias por darme la oportunidad de buscar mis metas y verlas realizadas tomada de tu mano. Gracias por cuidarme estando lejos de casa y guiar mi camino.

A mi mamá COCO, por esperarme en casa con los brazos abiertos, por hacerme sentir extrañada, por cuidarme a pesar de la distancia y apoyar con entusiasmo mis decisiones. A mi Dad YEYO, por ser parte de mis proyectos, impulsarme, dejarme conocer y abrirme paso para lograr mis objetivos. A mi papá FACUS, por amarme, alentarme a vivir y conocer nuevas experiencias, por cuidar de casa y proveerla de amor. A mi hermana NICE, por ser mi persona, inspirarme, por estar al pendiente a la distancia, tener tiempo para mí y por hacerme parte del milagro de la vida nuevamente. A mi nena ANY por enseñarme y sorprenderme con su potencial, por seguir mis pasos y ser mi cómplice. Al amor de mi vida GERA, por tomarme de la mano y salir a buscar nuevas experiencias; por construir un nuevo hogar lejos de nuestra familia, hacerlo nuestro y ser mi apoyo.

A la DRA. GARCÍA ALCO CER, por darme la oportunidad de ser parte de la familia UAQ, por enseñarme a construirme en un ámbito desconocido y no desistir. Gracias por creer en mí, mostrarme el camino y explotar mi potencial. Gracias a mis sinodales, DRA. LAURA, DRA. JESICA, DRA. TERE Y MAESTRO JESÚS por la revisión de la tesis, por enseñarme con paciencia y por sacar lo mejor de mí en cada tutorial, que sin duda me han fortalecido como profesionista y como ser humano.

A mi madrina del grado de Maestría YARA por compartir su vocación conmigo, por abrirme la puerta a un análisis de mi misma para ser mejor persona y vivir mi vida a lo máximo. Gracias por ayudarme a liberar el pasado, a perdonar, a valorar y a anhelar más para construirme.

A CLAU, URIEL Y DULCE por ser mis compañeros y mis nuevos amigos, por ser mi apoyo y compartirme su conocimiento. Gracias por los viajes, las comidas, por bailar y disfrutar cada instante. Ustedes fueron la mejor parte de la historia UAQ y me llevo en el corazón cada abrazo, consejo y momento compartido, nos vemos en Tlaxcala.

*“Mantente firme en las dificultades, y mejores tiempos vendrán con plena seguridad. Aspira a inspirar antes de expirar...Vive simple. Ama generosamente y que te importe todo. Habla con gentileza. Y deja todo lo demás a Dios”*

*(Palmira Moncada Wassermann)*

## ÍNDICE GENERAL

	Página
RESUMEN .....	ii
ABSTRACT .....	iii
DEDICATORIA.....	iv
AGRADECIMIENTOS .....	v
ÍNDICE GENERAL .....	vi
ÍNDICE DE TABLAS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 Génesis de la célula sanguínea .....	3
2.2 Etiopatogenia de la leucemia .....	4
2.3 Características de la leucemia y su diagnóstico.....	5
2.4 Tipos de Leucemia .....	7
2.5 Protocolos de tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA) .....	8
2.5.1 Vincristina .....	10
2.6 Betalaínas .....	11
2.6.1 Efecto de la betanina en modelos de cáncer .....	13
3. JUSTIFICACIÓN.....	18
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVOS.....	21
5.1 Objetivo general .....	21
5.2 Objetivos específicos .....	21
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
6.1 Desarrollo experimental .....	22
6.1.1 Cultivo celular .....	22
6.1.2 Fármacos y estándares.....	22

6.1.3	Curvas concentración-respuesta con betanina y vincristina .....	22
6.1.4	Aislamiento y tratamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) .....	23
6.1.5	Efecto coadyuvante de betanina y vincristina en células de LLA-T .....	24
6.1.6	Efecto de betanina y vincristina, así como de su combinación en la muerte celular.....	25
6.1.7	Efecto de betanina sola y en combinación con vincristina en el arresto celular.....	25
6.2	Análisis estadístico.....	26
7.	RESULTADOS .....	27
7.1	Curva concentración-respuesta de betanina en células de LLA-T .....	27
7.2	Curva concentración-respuesta de vincristina en células de LLA-T.....	27
7.3	Efecto citotóxico de betanina en células mononucleares de sangre periférica sanas (PBMC).....	28
7.4	Efecto coadyuvante de betanina y vincristina en células de LLA-T.....	29
7.5	Efecto de betanina sola y en combinación con vincristina en la muerte celular .....	31
7.6	Efecto de la betanina sola y en combinación con vincristina en el arresto celular .....	33
8.	DISCUSIÓN.....	35
9.	CONCLUSIÓN.....	41
10.	REFERENCIAS.....	42
	ANEXO.....	51

## ÍNDICE DE TABLAS

	Página
1. ESQUEMA DE TRATAMIENTO DE LA LLA-T (CIE 10 91.0).....	10
2. DISEÑO EXPERIMENTAL PARA EVALUAR EL EFECTO DE BETANINA MÁS VINCRISTINA EN LA PROLIFERACIÓN DE LAS CÉLULAS, ARRESTO EN EL CICLO CELULAR Y LA APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS DE LLA.....	24

## ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
1. GÉNESIS DE LA CÉLULA SANGUÍNEA	3
2. ESTRUCTURA QUÍMICA DE LA BETANINA	12
3. CURVA CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE BETANINA	27
4. CURVA CONCENTRACIÓN-RESPUESTA DE VINCRISTINA	28
5. EVALUACIÓN DE CITOTOXICIDAD DE BETANINA EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA SANAS (PBMC)	29
6. EFECTO COADYUVANTE DE BETANINA Y VINCRISTINA EN EL TRATAMIENTO DE LAS CÉLULAS JURKAT	30
7. DOT PLOTS REPRESENTATIVOS DEL ANÁLISIS DE APOPTOSIS CELULAR DE LAS CÉLULAS DE LLA-T TRATADAS CON BETANINA Y VINCRISTINA Y SU COMBINACIÓN, MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO	31
8. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS EXPERIMENTOS DE APOPTOSIS DETERMINADOS POR CITOMETRÍA DE FLUJO	32
9. HISTOGRAMAS DE LAS FASES DEL CICLO CELULAR DE LAS CÉLULAS DE LLA-T TRATADAS CON BETANINA Y VINCRISTINA SOLAS Y EN COMBINACIÓN	33
10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LA DISTRIBUCIÓN EN EL CICLO CELULAR DE LAS CÉLULAS DE LLA-T TRATADAS CON VINCRISTINA Y BETANINA SOLAS Y EN COMBINACIÓN	34

## 1. INTRODUCCIÓN

El médico francés Alfred Armand Louis Marie Velpeau describió el primer caso de leucemia en 1827 en un paciente de 63 años de edad que tenía síntomas como fiebre, debilidad y crecimiento del abdomen. Dicho paciente murió y Velpeau realizó la autopsia, en la que encontró el hígado y el bazo más grandes del tamaño normal; así mismo, notó que la sangre era como “una papilla de avena” que le parecía similar a la consistencia y el color de las levaduras del vino tinto (Ortiz, 2013). Sin embargo, fue hasta 1846 cuando el término leucemia fue introducido por el patólogo alemán Rudolf Virchow, quien describió el exceso anormal de glóbulos blancos en pacientes con síndrome clínico descrito por Velpeau. *Leukämie* proviene del griego *leuco*, λευκός: “blanca” y *emia*, αἷμα: “sangre” (Virchow, 1845).

La leucemia es un cáncer que se origina en las células progenitoras de la sangre en la médula ósea. Existen cuatro tipos de leucemias dependiendo de la estirpe celular afectada, siendo mieloides (o mielocíticas) y linfoblásticas (o linfocíticas); así como dependiendo de su evolución respecto al tiempo: agudas si avanzan de forma rápida y crónicas si su curso es indolente y lento (American Cancer Society<sup>a</sup>, 2016).

Entre los tratamientos que se utilizan para combatir la leucemia, la quimioterapia es el protocolo principal. En dicho proceso, se utilizan fármacos que inhiben la proliferación acelerada de las células cancerosas. Esta estrategia de suministro de medicamentos se divide en 3 fases: inducción, consolidación y continuación o mantenimiento. Dependiendo de la dosis, el tiempo en que se suministren los fármacos y la susceptibilidad del paciente, los efectos colaterales están asociados a la afectación de las células sanas que proliferan continuamente por naturaleza, como las células de las mucosas y de los folículos capilares, entre otras, lo que provoca que se presenten malestares generales. Además, los tratamientos pueden causar efectos adversos asociados al mecanismo de acción y el

metabolismo de los medicamentos como daño al sistema digestivo, hígado, riñones y el sistema nervioso (National Cancer Institute, 2014). La vincristina es uno de los componentes principales en los protocolos de atención de la LLA-T, sin embargo, su administración está asociada a afectaciones en el sistema nervioso central, caracterizada por neuropatía periférica que afecta la integridad de quienes padecen este tipo de cáncer (Boyette y col., 2015).

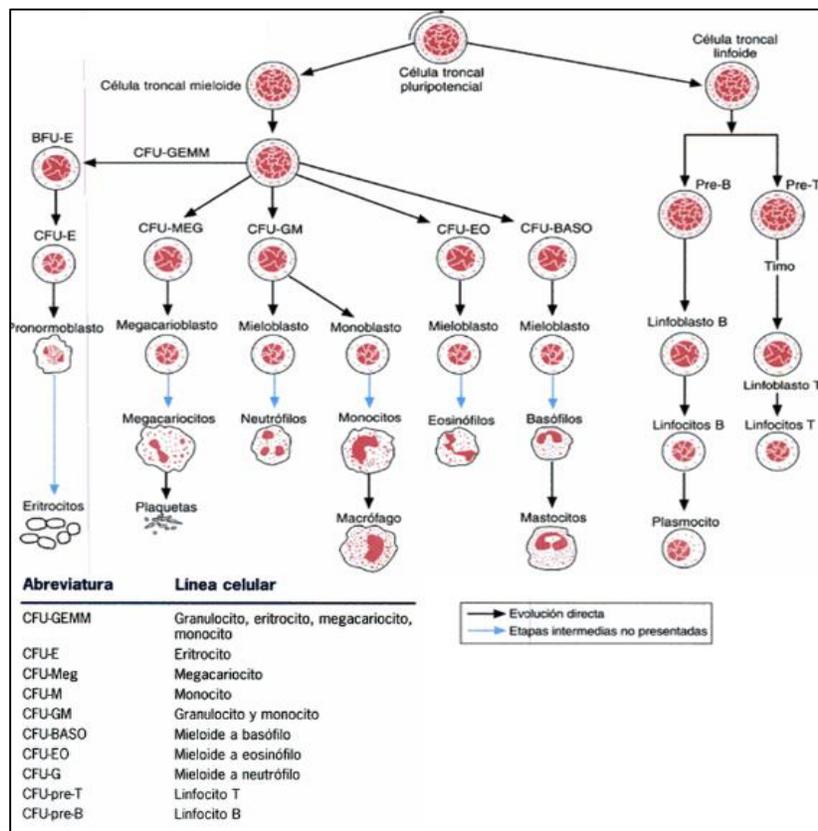
Debido a los efectos adversos que causan los distintos fármacos que conforman la quimioterapia, la búsqueda de alternativas en el tratamiento está enfocada al uso de moléculas que tengan efecto en la inhibición de la proliferación de las células malignas y que, a su vez, sean inocuas. Bajo este contexto, los pigmentos naturales presentes en alimentos como el betabel (*Beta vulgaris*) y la tuna roja (*Opuntia ficus-indica*) que se consumen con frecuencia, han sido propuestos como quimiopreventivos debido a sus mecanismos de acción asociados principalmente a la inhibición de la inflamación y a efectos antioxidantes. Particularmente se han estudiado los efectos de la betanina en líneas celulares de varios tipos de cáncer, entre ellos el de pulmón, mama, próstata, piel e hígado, que son los de mayor incidencia a nivel mundial (Kapadia y col., 1996; Kapadia y col., 2003; Reddy y col., 2005).

Basado en los antecedentes reportados del potencial antiproliferativo de la betanina en líneas celulares de origen cancerígeno, se analizó su efecto en células de LLA-T, así como su función como coadyuvante de vincristina y se determinó su relación con el proceso de apoptosis y arresto en el ciclo celular, además de su inocuidad en células sanas de referencia.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Génesis de la célula sanguínea

La hematopoyesis es el proceso en el cual se forman las células que componen la sangre, que inician a nivel de la célula tronco hematopoyética (CTH) con la auto-renovación, seguida de la diferenciación y maduración, culminando con la producción de elementos formes sanguíneos. La CTH da origen a todas las células de la sangre, que incluyen las de la serie mieloide como los eritrocitos, granulocitos (neutrófilos, eosinófilos y basófilos), mastocitos, monocitos y plaquetas, así como la línea linfoide que da origen a los linfocitos T y B (Figura 1). La hematopoyesis se lleva a cabo en la médula ósea, la cual se compone de células madre sanguíneas, células maduras productoras de sangre, adipocitos y tejido para el crecimiento celular (Ruiz y Ruiz, 2009).



**Figura 1. Génesis de la célula sanguínea.** A partir de una célula troncal pluripotencial, se obtienen los linajes celulares principales, mieloide y linfoide (Rodak, 2004).

La diferenciación y maduración de las células progenitoras, también denominadas blastos, es una secuencia de hechos genéticos y bioquímicos que le permiten a la célula sintetizar productos específicos, que le confieren potencialidad para determinada función. Cuando por diferentes causas es producida una pérdida de los mecanismos de control de la proliferación de dichas células, y por lo tanto la falta de su maduración, se habla de leucemia, un tipo de cáncer de los precursores de los formes sanguíneos (Ruiz y Ruiz, 2009).

## 2.2 Etiopatogenia de la leucemia

La leucemia puede ser causada por alteraciones en el ADN ocasionando la activación de los oncogenes o la desactivación de los genes supresores de tumores. Estos cambios genéticos pueden ser heredados o surgir durante la vida de una persona por factores ambientales relacionados a leucemogénesis como la exposición a derivados del benceno, pesticidas y radiaciones ionizantes, porque pueden provocar mutaciones en el ADN y de esta forma alterar la proliferación de las células (Turner y col., 2010). También existen factores biológicos como los virus que alteran los mecanismos reguladores de la proliferación; entre ellos cabe mencionar el virus linfotrópico de células humanas tipo T (HTLV, por sus siglas en inglés) el cual, origina la leucemia en aproximadamente el 5 % de los individuos infectados, después de un período de latencia clínica significativa de varias décadas (Panfil y col., 2016).

Las patologías originadas por inestabilidad cromosómica también pueden culminar en leucemia como es la anemia de Falconi, trisomía del cromosoma 21 (síndrome de Down), Ataxia-telangiectasia, síndrome de Li-Fraumeni, síndrome de Bloom y cromosoma Filadelfia (American Cancer Society<sup>b</sup>, 2016). Este último se observa en más del 90 % de los pacientes de leucemia granulocítica crónica (Gómez, 2009).

Los tratamientos utilizados para combatir el cáncer también están relacionados con la etiología de la leucemia, como los agentes alquilantes o fármacos que contienen platino utilizados en la quimioterapia. Dichos fármacos están asociados con un riesgo aumentado de LMA que alcanza su nivel más alto alrededor de 8 años después de la quimioterapia. Ciclofosfamida, mecloretamina, procarbazona, clorambucil, melfalán, busulfán y la carmustina son ejemplos de estos agentes alquilantes y los medicamentos que contienen platino incluyen cisplatino y carboplatino (American Cancer Society<sup>a</sup>, 2016).

Para la mayoría de los tipos de leucemia, los factores de riesgo y las causas no se conocen exactamente, sin embargo, el tipo de leucemia más común en los adultos es la LMA y en los niños la LLA (Rodríguez y col., 2007; Whelan y Alva, 2018).

### 2.3 Características de la leucemia y su diagnóstico

Las anomalías durante la génesis de las células sanguíneas, entre las que se encuentran las mutaciones, pueden llegar a convertir estas células en neoplásicas, lo que se conoce como leucemia. La leucemia comprende una colección de condiciones heterogéneas, todas procedentes de la alteración de los progenitores de las células sanguíneas durante su diferenciación en la médula ósea donde se producen glóbulos blancos anormales, que no funcionan adecuadamente. Estas células leucémicas pueden multiplicarse y sobrevivir mejor que las células normales (Rodríguez y col., 2007). La falla de los mecanismos de control negativo del crecimiento clonal mutante, casi siempre se debe a cambios en los genes reguladores, lo que conduce a su proliferación sin sentido y, por ende, a su incapacidad de madurar y funcionar normalmente (Ruiz y Ruiz, 2009).

Los síntomas de la leucemia varían entre pacientes, sin embargo, pueden considerarse como los más comunes:

- Piel pálida, cansancio o falta de energía debido a la falta de glóbulos rojos conocida como anemia.
- Heridas que demoran en cicatrizar, hematomas y sangrado excesivo debido a la trombocitopenia.
- Infecciones frecuentes por el déficit de la maduración de los glóbulos blancos que se encargan del sistema de defensa del organismo.
- Dificultad para respirar provocada por el agrandamiento del timo o de los ganglios linfáticos.
- Cloroma o sarcoma granulocítico.
- Dolores en los huesos o articulaciones, debido a la expansión de la cavidad medular por la proliferación celular monoclonal.

Cuando se presentan algunos o varios de estos síntomas, se realizan estudios para diagnosticar la leucemia. Entre los estudios más utilizados está el hemograma o conteo sanguíneo completo, que mide la cantidad de células sanguíneas y puede mostrar niveles altos o bajos de glóbulos blancos y células leucémicas en la sangre que se caracterizan por ser blastos, los cuales solo se encuentran en la médula ósea. También se efectúan estudios de extendido de sangre periférica, punción lumbar y biopsia de médula ósea para confirmar el diagnóstico y para buscar anomalías cromosómicas (Ruiz y Ruiz, 2009).

Después de confirmar el diagnóstico, se hacen estudios para determinar el tipo de leucemia. Las técnicas utilizadas incluyen la inmunohistoquímica, la cual, se basa en la adhesión de anticuerpos específicos a proteínas que presentan las células leucémicas. Estas pruebas son útiles para determinar el inmunofenotipo de leucemia y se realiza con mayor frecuencia en las células de la médula ósea, pero también se puede hacer en las células de la sangre y los ganglios linfáticos (Manascero, 2003).

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés), es una prueba de alta sensibilidad y especificidad para encontrar alteraciones

cromosómicas en las células leucémicas, muchas de las cuales son específicas para cada subtipo de leucemia. La PCR también ofrece información para el pronóstico de las leucemias y la detección de la enfermedad mínima residual durante la remisión clínica (Artigas y col., 2002). La citometría de flujo también se utiliza para calcular la cantidad de ADN en las células leucémicas, lo cual es importante especialmente en la LLA, ya que las células con más ADN son con frecuencia más sensibles a la quimioterapia, y estas leucemias tienen un mejor pronóstico (American Cancer Society<sup>a</sup>, 2016).

La caracterización de las células leucémicas permite la clasificación de la enfermedad para establecer el protocolo de atención, así como predecir la respuesta al tratamiento.

## 2.4 Tipos de Leucemia

Con base en los estudios realizados, se puede determinar el tipo de células leucémicas que están presentes. La leucemia puede ser clasificada de acuerdo a la célula progenitora afectada dentro de la médula ósea: como mielógena o mielóide, si la neoplasia tiene lugar en la célula progenitora de eritrocitos, algunos tipos de leucocitos y plaquetas o si la alteración cancerosa, tiene lugar en la célula que forma linfocitos, denominándose así linfocítica o linfoblástica (Leukemia and Lymphoma Society, 2012). Otro criterio para su clasificación involucra los síntomas y su progresión respecto al tiempo, siendo aguda o crónica. Las formas agudas de leucemia avanzan rápidamente y las células que se producen no funcionan como las normales, debido a su falta de maduración (blasto). En cambio, las leucemias crónicas a menudo progresan lentamente, incluso sin tratamiento inmediato, su curso es indolente y la ausencia de células muy indiferenciadas las distingue de las leucemias agudas (Ruiz y Ruiz, 2009). Considerando esta clasificación, existen cuatro tipos diferentes de leucemia:

- Leucemia mielóide (mielógena) aguda (LMA)

- Leucemia mieloide (mielógena) crónica (LMC)
- Leucemia linfoblástica (linfocítica) aguda (LLA)
- Leucemia linfoblástica (linfocítica) crónica (LLC)

Cada tipo de leucemia, tiene subtipos dependiendo de las características morfológicas, citogenéticas e inmunofenotípicas de las células presentes. Dentro de la LLA, existen dos tipos principalmente, la leucemia linfoblástica aguda de células B (LLA-B) y la leucemia linfoblástica aguda de células T (LLA-T). Esta última, es menos frecuente pero sus características son más agresivas.

#### 2.4.1 Leucemia linfoblástica aguda tipo T (LLA-T)

La leucemia linfoblástica aguda tipo T (LLA-T) es un subtipo de leucemia que se caracteriza por leucocitosis, inflamación de ganglios linfáticos y afectación al sistema nervioso central. La LLA-T, representa un 15 % de la LLA pediátrica, sin embargo, el pronóstico es significativamente peor en comparación con LLA tipo B que representa mayor porcentaje de incidencia (Pieters y Carroll, 2008; Möricke y col., 2010; Pui, 2011). En la LLA-T hay alteraciones en vías de señalización como NOTCH, genes asociados a proliferación como TAL1, re-arreglos cromosómicos como hiperdiploidía y disfunción de metiltransferasas (Belver y Ferrando, 2016; Iacobucci y Mullighan, 2017). Las alteraciones citogenéticas anteriormente mencionadas, hacen que este subtipo de leucemia sea resistente al protocolo de tratamiento ordinario y sea necesario el uso de quimioterapéuticos de forma intensiva.

#### 2.5 Protocolos de tratamiento de la leucemia linfoblástica aguda (LLA)

El tratamiento de las leucemias depende principalmente del tipo de leucemia diagnosticado, además de las características iniciales del enfermo como la edad, el género, padecimientos relacionados o el estado de salud en general. Estos factores también pueden predecir la respuesta a la estrategia terapéutica y las

posibilidades de supervivencia prolongada, incluso la remisión (Instituto Nacional de Salud Pública, 2001). La quimioterapia es el tratamiento de primera opción independientemente del tipo de leucemia diagnosticado, en el que se utilizan fármacos para destruir las células cancerígenas y pueden administrarse por vía intravenosa, oral e intratecal (National Cancer Institute, 2014).

La quimioterapia se divide en las siguientes fases (Ruiz y Ruiz, 2009):

- 1) Inducción a la remisión: en esta fase se pretende destruir la mayoría de las células leucémicas y recuperar la hematopoyesis normal.
- 2) Consolidación: el objetivo es destruir las células residuales que han sobrevivido en la etapa previa.
- 3) Tratamiento de continuación o mantenimiento: tiene como objetivo destruir los últimos vestigios de leucemia residual.

En las leucemias agudas se utilizan tratamientos que incluyen la ciclofosfamida, altas dosis de metotrexato, etopósido y citarabina (Ortega y col., 2007). Los pacientes de alto riesgo requieren quimioterapia intensificada antes de la inducción a la remisión y posterior a la fase de consolidación. La combinación de vincristina y un glucocorticoide (prednisona y prednisolona son los más usados para este propósito), los cuales inducen la remisión de aproximadamente el 85 % de los casos de LLA pediátrica y en combinación con L-asparaginasa la remisión puede incrementarse hasta el 95 % de los casos (Layton, 2015).

La vincristina es un componente principal de los protocolos para combatir las células de leucemia, sin embargo, presenta efectos colaterales, principalmente neurotóxicos. Es uno de los fármacos utilizados como agentes anticancerígenos que impiden que se lleve a cabo el ciclo celular de las células malignas, impidiendo la formación del huso mitótico (Carozzi y col., 2015). Específicamente el esquema de tratamiento de la leucemia linfoblástica tipo T en México, es establecida por el Sistema de Protección Social en Salud (SPSS), el cual se basa en la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas

Relacionados con la Salud (CIE-10) de la Organización Panamericana de la Salud. Dicho esquema de tratamiento se muestra en la tabla 1, en el que se puede observar que la vincristina es uno de los fármacos principales.

**Tabla 1. Esquema de tratamiento de la LLA-T (CIE 10 91.0).** Adaptado del Protocolo de la atención para leucemia linfoblástica. Guía clínica y esquema de tratamiento. Instituto Nacional De Salud Pública (2001).

<b>LLA Alto Riesgo “T”</b>		
Inducción 4 semanas	Quimioterapia Terapia Triple Intratecal (TTI)	6 Mercaptopurina Ciclofosfamida Citarabina L-asparaginasa Prednisona Vincristina TTI (Metrotexate, ARA-C, HDC)
Consolidación 3 semanas	Quimioterapia TTI	6 Mercaptopurina Metrotexate TTI (Metrotexate, ARA-C, HDC)
Reinducción	Quimioterapia TTI Radioterapia a encéfalo (sin infiltración a SNC: 12 Gy, con infiltración a SNC: 18 Gy en niños menores de 2 años y 24 Gy en mayores de 2 años)	6 Mercaptopurina Ciclofosfamida Citarabina Dexametasona L-asparaginasa Vincristina TTI (Metrotexate, ARA-C, HDC)
Mantenimiento 130 semanas	Quimioterapia	6 Mercaptopurina Metrotexate
Pseudorreinducción	Quimioterapia	Prednisona Vincristina

### 2.5.1 Vincristina

El fármaco vincristina, se utiliza como agente quimioterapéutico en la fase de inducción y mantenimiento de la LLA-T. La vincristina se dirige a la subunidad  $\beta$ -tubulina de los microtúbulos e induce citotoxicidad en las células de cáncer por interrumpir la dinámica del huso mitótico (Mora y col., 2016). Para las líneas celulares de leucemia humana, la vincristina provoca la muerte celular apoptótica que aumenta con el tiempo de exposición y la fracción de células en mitosis. Sin embargo, todavía hay escasez de datos sobre sus efectos a largo plazo en los

sobrevivientes de LLA y su impacto en la función y calidad de vida en los individuos afectados (Tay y col., 2017).

Debido a la afinidad de la vincristina a los microtúbulos, también afecta los microtúbulos que son componentes importantes de las fibras nerviosas, causando neuropatía sensorial y motora progresiva. Varios mecanismos adicionales de neuropatía periférica inducida por vincristina se han propuesto a partir de modelos celulares y animales (Boyette y col., 2015; Carozzi y col., 2015), sin embargo, el mecanismo exacto aún no se entiende completamente. La neuropatía periférica inducida por vincristina es experimentada por casi todos los niños que reciben tratamiento con vincristina (Toopchizadeh y col., 2009; Lavoie y col., 2015).

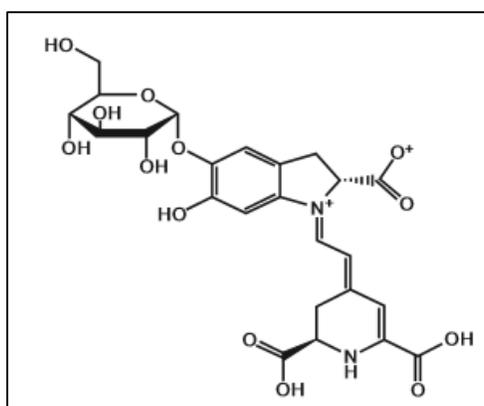
A causa de los efectos tóxicos que provoca vincristina y al ser uno de los principales agentes en el tratamiento de la LLA-T, es necesario buscar alternativas que coadyuven en su efecto terapéutico y minimicen los efectos adversos. Bajo este contexto, las betalaínas han sido parte de las investigaciones para determinar su potencial antiproliferativo o sinérgico de tratamientos en enfermedades como el cáncer.

## 2.6 Betalaínas

Desde hace años se sabe que los jugos y néctares vegetales son fuentes importantes de diferentes factores nutricionales, sin embargo, en las últimas décadas, la industria alimentaria y de suplementos nutricionales han mostrado interés en las betalainas desde que fueron identificadas como antioxidantes naturales (Pátkai y col., 1997). Las betalaínas son pigmentos hidrosolubles presentes en vacuolas de plantas pertenecientes al orden *Caryophyllales* y algunas especies de hongos del género *Amanita* e *Hygrocybe*. Este grupo de pigmentos son derivados del ácido betalámico y hay dos tipos de betalaínas: betaxantinas que en su estructura tienen diferentes aminas y aminoácidos, y

betacianinas, en las que el ácido betalámico aparece condensado con ciclo-dihidroxifenilalanina (ciclo-DOPA) (Gandía y García, 2013).

El betabel (*Beta vulgaris*) también conocido como remolacha, es de las fuentes principales de betalaínas y contiene tanto betacianinas que son características de tonalidades rojas o violetas y betaxantinas que dan origen a tonalidades amarillas o naranjas. De las betacianinas presentes en el betabel, del 75 al 95 % es betanina (Figura 2), lo que lo convierte en el pigmento principal de esta raíz (Kapadia y col., 2003; Gandía y García, 2013).



**Figura 2. Estructura química de la betanina** (Adaptado de Kapadia y col., 2011).

La betanina fue aprobada por la Unión Europea y por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) en los Estados Unidos como aditivo de alimentos E-162, caracterizado por presentar un color rojo muy intenso y ser más potente que la mayoría de los colorantes sintéticos de uso común (Kapadia y col., 2011). Aunque es susceptible a la degradación por efecto de la temperatura, luz y oxígeno, para uso comercial, la betanina, se estabiliza con ácido ascórbico, se acidifica con ácido cítrico y es adecuado para la coloración de productos congelados, secos y de vida útil corta (Azeredo, 2009).

Medicinalmente, el betabel se emplea como un remedio popular para estimular el sistema inmunológico y hematopoyético, el tratamiento de enfermedades hepáticas y renales y forma parte de la dieta en el tratamiento del cáncer

(Zielińska y col., 2016). Así mismo, el extracto de betabel ha sido objeto de estudios experimentales de quimiopreención, en el que se ha estudiado su potencial respecto a prevenir o detener el desarrollo de tumores y la latencia del cáncer, reducir la mortalidad por cáncer y evitar el proceso de metástasis de varios tipos de cáncer, entre ellos los de mayor incidencia en la población mundial.

### 2.6.1 Efecto de la betanina en modelos de cáncer

Desde hace varias décadas se centró el interés en pigmentos de origen natural principalmente para su uso como aditivos alimentarios, sin embargo, una de las pruebas clave en el desarrollo de compuestos para consumo humano es su propiedad inocua para ser ampliamente distribuidos en la industria. Por esta razón, se determinó la capacidad de los pigmentos betalainos de betabel rojo para iniciar o promover el cáncer de hígado en modelos *in vivo*. Los resultados indicaron que los pigmentos ensayados no iniciaron, ni promovieron células cancerosas en el hígado de ratas, por lo que estos hallazgos proporcionaron evidencia adicional de que los colorantes de betalainas pudieran ser alternativas en el uso de colorantes sintéticos utilizados como aditivos alimentarios (Schwartz y col., 1983).

Posteriormente, se llevaron a cabo estudios de los extractos y derivados químicos de verduras, frutas, colorantes naturales de comida y remedios herbales que tuvieran propiedades quimiopreventivas, inclusive inhibitorias de cáncer. En estos estudios, se identificó que la betanina tenía potencial como agente preventivo del cáncer tanto *in vivo* como *in vitro* (Kapadia y col., 1996; Kapadia y col., 2003), por lo que, continuando con los estudios de la betanina, se evaluó su efecto en ratones donde la coadministración oral de 0.0025 % de betanina exhibía un efecto quimiopreventivo en cáncer de piel inducido por carcinógenos. A la misma dosis, la betanina proporcionó una protección significativa en el modelo de cáncer de piel de ratón y también inhibió la incidencia de tumores hepáticos y esplenomegalia (Kapadia y col., 2003).

Así mismo, se han evaluado una variedad de pigmentos naturales que se encuentran en los alimentos de origen natural como las betacianinas y antocianinas que son solubles en agua y el licopeno, la bixina, el  $\beta$ -caroteno y la clorofila que son liposolubles. Estos compuestos se aislaron de *Beta vulgaris*, *Bixa orellana*, *Lycopersicum esculentum*, *Spinacia oleracea*, *Daucus carota* y *Prunus cerasus* y se evaluó su potencial solo y en combinación, frente a la inhibición de ciclooxigenasas (COX) enzimas que catalizan la conversión del ácido araquidónico para generar mediadores químicos de la inflamación, inhibición de la peroxidación lipídica y su efecto en líneas células tumorales de mama (MCF-7), colon (HCT-116), estómago (AGS), sistema nervioso central (SF-268) y pulmón (NCI-H460). Únicamente la betanina, la cianidina-3-O-glucósido, el licopeno y el  $\beta$ -caroteno inhibieron la peroxidación lipídica, sin embargo, todos los pigmentos ensayados inhibieron a la COX-1 y COX-2. Adicionalmente, la betanina indujo inhibición del crecimiento de líneas celulares de cáncer de mama, colon, estómago, SNC y pulmón con concentraciones inhibitorias que disminuían el 50 % de la proliferación (CI50) de 162, 142, 158, 164 y 147  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente. Sin embargo, los resultados indicaron que no todas las combinaciones eran tan eficaces como los componentes solos. Este fue el primer informe de una evaluación comparativa y el impacto en las actividades biológicas de estos pigmentos solos y en combinación (Reddy y col., 2005).

Los efectos antiproliferativos de la betanina aislada de *Opuntia ficus-indica*, fueron evaluados por Sreekanth y colaboradores en 2007 y se determinaron en la línea celular de leucemia mieloide crónica humana (K562). Los resultados indicaron que la betanina entró a las células y provocó inhibición proliferativa dependiente de la concentración con una CI50 de 40  $\mu\text{M}$ ; las células mostraron características apoptóticas tales como la condensación de la cromatina, el encogimiento celular, la alteración de la membrana, la liberación de citocromo c en el citosol, así como la fragmentación del ADN. El análisis de citometría de flujo de las células tratadas con betanina mostró 28.4 % de las células en fase sub G0/G1 e indujo la escisión de la polimerasa PARP, la desregulación de Bcl-2 y la reducción en los potenciales de membrana, por lo cual se infiere que la betanina induce apoptosis

por la vía intrínseca (Sreekanth y col., 2007). Esta evidencia es la más importante al ser el único estudio que reporta su actividad antiproliferativa en la línea de las leucemias.

El efecto citotóxico del extracto de betabel se comparó con doxorubicina, fármaco elegido por presentar una estructura química similar a la betanina y ser un agente quimioterapéutico utilizado en una amplia variedad de cánceres que incluyen el de vejiga, mama, hígado, pulmón, ovario, páncreas, próstata, estómago, linfomas y ciertos tipos de leucemia pero que presenta diversos efectos adversos que incluyen desde náuseas, alopecia y neutropenia hasta el riesgo de padecer insuficiencia cardíaca congestiva e incluso llevar a la muerte (Kapadia y col., 2011). El potencial antiproliferativo de la betanina se determinó en las líneas celulares de cáncer de mama (MCF-7) y próstata (PC-3), en las cuales, la citotoxicidad del extracto de betabel fue significativamente menor en comparación con la doxorubicina, pero disminuyó la tasa de crecimiento de las células cuando se probó a la concentración de 29 µg/mL mientras que la doxorubicina, a la misma concentración, inhibió completamente el crecimiento de ambas líneas celulares en tres días. Cabe señalar que los estudios comparativos en las líneas celulares normales de piel e hígado mostraron que el extracto de betabel tenía un efecto citotóxico significativamente menor que la doxorubicina (8.6 % frente a 100 %, respectivamente, a una concentración de 29 µg/mL). Por lo tanto, el uso del extracto solo o en combinación con agentes quimioterapéuticos, pudiera ser utilizado como coadyuvante para mitigar los efectos secundarios de fármacos anticancerígenos comúnmente utilizados (Kapadia y col., 2011).

El efecto sinérgico de betanina y doxorubicina, fue evaluado posteriormente al estudio comparativo de ambos compuestos (Kapadia y col., 2011). Kapadia y colaboradores en 2013 evaluaron la combinación de betanina y doxorubicina en células tumorales pancreáticas (PaCa), de mama (MCF-7) y de próstata (PC-3). Se evaluaron concentraciones de betanina y doxorubicina establecidas anteriormente (Kapadia y col., 2011), que iban de 0.29 a 290 µg/mL y en distinta relación Betanina: Doxorubicina = 1:0, 1:1, 5:1, 1:5 y 0:1. Los datos de

citotoxicidad se analizaron mediante el método de índice de combinación de Chou-Talalay (2006) para establecer la sinergia entre betanina y doxorubicina; los resultados indicaron que hay efecto sinérgico de betanina con doxorubicina en las tres líneas celulares. Este es el único reporte publicado del efecto combinado de betanina con un fármaco anticancerígeno (Kapadia y col., 2013).

También se ha evaluado la actividad quimiopreventiva de betanina en dos modelos *in vivo* de tumores en pulmón en ratones, inducido por los carcinógenos carbamato de vinilo y el benzo (a) pireno, que están presentes en el humo del cigarrillo e inducen adenocarcinoma. En dichos estudios, se encontró que el consumo oral de 25 mg/mL y 100 mg/mL de betanina, disminuyó significativamente la multiplicidad tumoral inducida por ambos carcinógenos. Así mismo, el efecto de la betanina se vio reflejado al reducir el número de microvasos endoteliales (positivos al marcador CD31) y aumentó la expresión de la caspasa-3. La betanina también indujo apoptosis a través de la activación de la cascada de caspasas-3, -7, -9 y la escisión de PARP en los modelos de cáncer de pulmón (Zhang y col., 2012).

Por otra parte, se ha estudiado el efecto de betalaínas aisladas de *Beta vulgaris L.* en células de cáncer de hígado humano (HepG2). Después del tratamiento con betanina y betaína a concentraciones que oscilaban entre 0 y 400 µg/mL y de 0 a 800 µg/mL durante 48 horas, respectivamente, la betanina inhibió el 49 % de la proliferación de las células hepáticas a 200 µg/mL mientras que la betaína produjo una inhibición del 25 % a 800 µg/mL, lo que implicó una mayor citotoxicidad de la betanina en comparación con la betaína (Lee y col., 2014).

El efecto citotóxico de betanina/isobetanina obtenido de *Beta vulgaris* fue evaluado en la línea celular de cáncer de mama MCF-7 por Nowacki y colaboradores en 2015. El concentrado de betanina/isobetanina disminuyó significativamente la proliferación y viabilidad de dichas células en cultivo celular 2D y 3D; este último, bajo el fundamento de imitar las condiciones del tumor como la comunicación célula-célula y células cancerígenas con la matriz celular. Además, el extracto

también fue evaluado en líneas celulares normales de pulmón y umbilicales (MRC-5 y HUVEC, respectivamente) y no tuvo efecto citotóxico significativo. Los resultados indican que la mezcla de betanina/isobetanina aislada de betabel, aumentó la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis como Bad, TRAIL-R4, FAS y p53. Además, alteró el potencial de la membrana mitocondrial y se observaron vesículas de autofagosomas en células tratadas, lo que sugiere también la muerte celular autofágica en el tratamiento con betanina/isobetanina. Esta publicación, hace la comparación con las concentraciones utilizadas en estudios reportados por Kapadia y colaboradores (2011) y Reddy y colaboradores (2005), que son superiores a la concentración que indujo inhibición significativa del crecimiento de las células de cáncer utilizadas en este análisis, lo cual se debe al contenido de betanina o el grado de pureza de los extractos usados (Nowacki y col., 2015).

Basado en los antecedentes reportados del potencial de la betanina como agente quimiopreventivo y coadyuvante de tratamientos contra el cáncer, es de suma importancia estudiar su efecto en líneas celulares de LLA-T, con el objetivo de disminuir la toxicidad del tratamiento convencional, principalmente los efectos adversos que produce la vincristina relacionados a neurotoxicidad.

### 3. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, el cáncer es la segunda causa de muerte por enfermedades no transmisibles y se le atribuyen 8.8 millones de defunciones ocurridas en el mundo en el año 2015; casi una de cada seis defunciones en el mundo se debe a esta enfermedad y se prevé que los casos anuales aumentarán a 22 millones en las próximas dos décadas. Además, cerca del 70 % de las muertes por cáncer se registran en países de ingresos medios y bajos (Organización Mundial de la Salud, 2018). Al año se diagnostican aproximadamente 215 000 casos de cáncer en menores de 15 años. En los países desarrollados, representa menos del 1 % de todos los casos de cáncer, sin embargo, en entornos de bajos recursos la proporción puede ser hasta 5 veces mayor (International Agency for Research on Cancer, 2016).

La leucemia es el cáncer de mayor incidencia a nivel mundial en niños y adolescentes de 0 a 15 años de edad. El 75 % de los casos de leucemia, son específicamente de LLA (International Agency for Research on Cancer, 2017). En México, las leucemias agudas tienen una tasa de incidencia de 75.3 por millón de personas por año y representan el 50.8 % de los tipos de cáncer infantil (Cubria y col., 2017).

La LLA-T tiene una incidencia del 15 % sin embargo, se caracteriza por su resistencia a fármacos, por lo que los protocolos de atención son intensivos. El tratamiento para la LLA-T se basa principalmente en distintas fases de quimioterapia, en la que se suministran fármacos anticancerígenos en distintas combinaciones y dosis. En México, el Sistema de Protección Social en Salud (SPSS), determinó el diseño de tratamiento de la LLA-T, basado en la Clasificación Estadística Internacional de Enfermedades y Problemas Relacionados con la Salud (CIE-10) de la Organización Panamericana de la Salud. Sin embargo, a pesar del acceso a los tratamientos para las leucemias agudas, la

tasa de supervivencia a 5 años basada en la población sigue siendo < 50 % (Cubria y col., 2017).

El tratamiento de la LLA-T con quimioterapia, incluye fármacos como L-asparaginasa, citarabina, mercaptopurina, metotrexato y vincristina en distintas fases y combinaciones durante alrededor de 140 semanas de tratamiento, en el que la recaída a la enfermedad o la presencia de infecciones y la baja respuesta al tratamiento pueden reiniciar el proceso de quimioterapia, durando más tiempo de lo establecido (Instituto Nacional de Salud Pública, 2001). A pesar de los efectos colaterales que provocan los medicamentos utilizados, los protocolos son intensivos y no pueden suspenderse hasta completar los ciclos de tratamiento. Específicamente la vincristina, uno de los fármacos más importantes que conforman la quimioterapia de la LLA-T, provoca neuropatía periférica que se caracteriza por dolor en extremidades, alteración sensorial, entumecimiento y pérdida del sentido posicional (Jaggi y Singh, 2012).

Debido a los efectos colaterales que provoca la vincristina en el tratamiento de la LLA-T, se necesitan alternativas que coadyuven al efecto anticancerígeno y permitan disminuir las dosis del fármaco para mejorar la calidad de vida de los pacientes durante el tratamiento e inducir la remisión en menor tiempo. Bajo este contexto, la betanina presente en alimentos de fácil acceso como el betabel (*Beta vulgaris*) y la tuna roja (*Opuntia ficus-indica*) ha mostrado tener efectos quimiopreventivos y antiproliferativos en líneas celulares de varios tipos de cáncer, entre ellos los de mayor incidencia a nivel mundial como pulmón, mama y próstata (Reddy y col., 2005); sin embargo, no hay reportes publicados respecto a su potencial en la LLA-T.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antiproliferativo y coadyuvante de betanina con vincristina, así como sus mecanismos asociados a apoptosis y arresto en el ciclo celular, además de su inocuidad en células sanas, para determinar la propuesta de dicho compuesto como parte de los protocolos de atención de la LLA-T.

#### **4. HIPÓTESIS**

La betanina tiene efecto antiproliferativo y coadyuvante con vincristina, induciendo la apoptosis y el arresto en el ciclo celular a las células de LLA-T y no es tóxica para las células sanas a las concentraciones probadas en los experimentos.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antiproliferativo de betanina sola y en combinación con vincristina, en células de leucemia linfoblástica aguda tipo T (LLA-T), determinando su posible mecanismo asociado a apoptosis y arresto celular y verificando su inocuidad en células sanas a las concentraciones propuestas en los experimentos.

### 5.2 Objetivos específicos

1. Determinar el efecto antiproliferativo de betanina, así como vincristina en células de LLA-T a través del ensayo de exclusión de azul de tripano.
2. Evaluar el efecto citotóxico de las concentraciones propuestas de betanina en células mononucleares de sangre periférica sanas.
3. Estudiar el efecto coadyuvante de combinaciones propuestas de betanina y vincristina en cultivo de células de LLA-T a través del ensayo de exclusión de azul de tripano.
4. Evaluar el efecto de betanina, vincristina y la combinación elegida de ambos compuestos en la inducción de muerte celular (apoptosis) de las células de LLA-T, mediante citometría de flujo.
5. Analizar la acción de betanina, vincristina y la combinación elegida de ambos compuestos, en el arresto celular de las células de LLA-T, a través de citometría de flujo.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Desarrollo experimental

#### 6.1.1 Cultivo celular

Los experimentos se establecieron a partir de la línea celular de LLA-T también conocida como células Jurkat de la compañía American Type Culture Collection (ATCC), clon que fue obtenido a partir de la sangre periférica de un niño de 14 años con leucemia linfoblástica aguda por Schneider y colaboradores en los años setenta. Las células Jurkat se sembraron en medio de cultivo RPMI-1640 (ATCC) con 10 % de suero fetal bovino (Gibco, Invitrogen) y 1 % de una mezcla de antibióticos y fungicida (penicilina, estreptomina y anfotericina B, Gibco, Invitrogen). Las condiciones de incubación fueron las siguientes: 95 % aire, 5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C y humidificación constante. El mantenimiento de las líneas celulares se realizó por la adición de medio de cultivo fresco o reemplazo del mismo cada 2 días, manteniendo una concentración de  $1 \times 10^5$  células viables/mL. Se determinó la viabilidad celular por el ensayo de exclusión de azul de tripano.

#### 6.1.2 Fármacos y estándares

La betanina (BET) y el fármaco vincristina (VCR) utilizado para los experimentos fueron adquiridos en Sigma Aldrich (número de catálogo CDS000584 y V8388, respectivamente). Se diluyeron en agua inyectable estéril (PiSA BioPharm), la cual, también fue adicionada en los controles de los tratamientos. Para el control positivo de los experimentos de apoptosis por citometría de flujo, se utilizó camptotecina (CAMPT) adquirida en Sigma Aldrich (número de catálogo C9911).

#### 6.1.3 Curvas concentración-respuesta con betanina y vincristina

Para proponer las concentraciones inhibitorias (CI) a utilizar en los experimentos y determinar su efecto antiproliferativo de las células de LLA-T, se utilizaron cajas de

cultivo de 24 pozos. Se sembraron inicialmente 100,000 células en cada pozo, llevadas a volumen de 450  $\mu$ L con medio RPMI-1640. Las células se incubaron durante 24 horas a 37 °C en 95 % de aire y 5 % CO<sub>2</sub>. Después de 24 horas se trataron con diferentes concentraciones establecidas para betanina (5, 20, 40, 50, 100, 500 y 1000  $\mu$ M) y para vincristina (25, 50, 100, 500, 1000, 2000 y 10,000 nM), considerándose un volumen final de 500  $\mu$ L, se incubaron por 24 horas a las mismas condiciones y protegidas de la luz, por sensibilidad de las moléculas a ser degradadas. Finalmente se contaron 50  $\mu$ L de las células tratadas mediante el ensayo de exclusión de azul tripano (Altman y col., 1993), antes de ser observadas bajo el microscopio, haciendo uso una cámara de Neubauer. Se consideraron únicamente las células vivas para hacer las curvas de concentración-respuesta, con el porcentaje de proliferación respecto al control, en función de la concentración de betanina y vincristina respectivamente.

#### 6.1.4 Aislamiento y tratamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBMC)

Para realizar el experimento del efecto citotóxico de betanina en células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés), se solicitó la participación bajo consentimiento informado de voluntarios sanos para la extracción de sangre periférica (ver Anexo). Nueve mililitros de sangre venosa periférica anticoagulada se diluyeron con 2 volúmenes de buffer fosfato salino (PBS) 1X y luego se depositaron cuidadosamente sobre la solución Ficoll-Paque PLUS (GE, Healthcare) y se centrifugaron a 1500 rpm durante 35 minutos a 15 °C. La capa de PBMC, se recogió mediante pipeteo y se lavó dos veces con PBS 1X y se centrifugó a 1500 rpm durante 15 minutos a 15 °C para eliminar las plaquetas y el medio de separación residual (Bittersohl y Steimer, 2016). Después, las PBMC se resuspendieron con medio RPMI 1640 (ATCC) suplementado con suero bovino fetal al 10 % (Gibco, Invitrogen) antibiótico y antimicótico (penicilina, estreptomycin y anfotericina B, Gibco, Invitrogen). Para los tratamientos, se tomó una alícuota de 50  $\mu$ L y se mezclaron con 50  $\mu$ L de solución al 0.04 % de azul de

tripano para el conteo de células en una cámara de Neubauer y se sembraron  $1 \times 10^5$  células en placas de 24 pozos en un volumen de 450  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, las PBMC se trataron con 50  $\mu\text{L}$  de soluciones de betanina de 50 a 500  $\mu\text{M}$  y agua estéril como control. Las placas se incubaron durante 24 horas a 37 °C con una atmósfera de  $\text{CO}_2$  al 5 % en una incubadora humidificada y en condiciones de oscuridad debido a la sensibilidad de la molécula a ser degradada. Al final del tratamiento, 50  $\mu\text{L}$  de cada suspensión de células tratadas, se mezclaron con azul de tripano al 0.04 % y luego se contaron 10  $\mu\text{L}$  de células en una cámara Neubauer para determinar la viabilidad de las PBMC.

### 6.1.5 Efecto coadyuvante de betanina y vincristina en células de LLA-T

Para evaluar el efecto de betanina y vincristina sobre la proliferación de las células de LLA-T, se diseñó el experimento como lo muestra la tabla 2. Se sembraron  $1 \times 10^5$  células por pozo, en una caja de 24 pozos, con un volumen de 450  $\mu\text{L}$  y se dejaron en incubación 24 horas a 37° C, 5 % de  $\text{CO}_2$  y humidificación constante. Posteriormente, se realizaron los tratamientos con los controles y las combinaciones correspondientes, considerando un volumen final de 500  $\mu\text{L}$  y se dejaron incubadas nuevamente 24 horas en las mismas condiciones. Para evaluar el efecto en la proliferación de las células, se llevó a cabo el conteo de células bajo microscopio con la cámara de Neubauer teñidas con azul de tripano al 0.04 %.

**Tabla 2. Diseño experimental para evaluar el efecto de betanina más vincristina en la proliferación de las células, arresto en el ciclo celular y la apoptosis en las células de LLA.**

TRATAMIENTO		Vincristina (VCR)		
		0 nM	Concentración propuesta 1	Concentración propuesta 2
Betanina (BET)	0 $\mu\text{M}$	Control	30.61 nM	10.20 nM
	Concentración propuesta 1	91.84 $\mu\text{M}$	Combinación 1	
	Concentración propuesta 2	275.5 $\mu\text{M}$	Combinación 2	

#### 6.1.6 Efecto de betanina y vincristina, así como de su combinación en la muerte celular

Después de analizar los resultados del efecto coadyuvante de betanina y vincristina, se eligió la combinación betanina 275.5  $\mu\text{M}$  + vincristina 10.20 nM por inhibir la proliferación de las células de LLA-T con más potencia que la combinación de betanina 91.84  $\mu\text{M}$  + vincristina 30.61 nM. Se establecieron los tratamientos durante 24 horas en las mismas condiciones de incubación para después evaluar su efecto en la inducción de apoptosis celular mediante citometría de flujo el Kit BD Pharmingen, FITC Annexin V Apoptosis Detection Kit II RUO (número de catálogo 556547).

Después de las 24 horas de tratamiento, las suspensiones celulares expuestas a las distintas concentraciones de betanina y/o vincristina, así como el control positivo (tratadas con 12  $\mu\text{M}$  de CAMPT) y el control negativo (tratado con agua inyectable), se lavaron con PBS 1X frío. Posteriormente, la suspensión de células se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos y se retiró el sobrenadante. Las células se resuspendieron en el buffer de unión a anexina 1X hasta tener una concentración de  $1 \times 10^6$  células/mL y de esta suspensión celular se utilizaron 100  $\mu\text{L}$ . Posteriormente, se adicionarán 5  $\mu\text{L}$  de anexina V y 5  $\mu\text{L}$  de yoduro de propidio 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  a la suspensión celular y se incubaron a temperatura ambiente, en condiciones de oscuridad durante 15 minutos. Después de la incubación se adicionaron 400  $\mu\text{L}$  de buffer de unión a anexina 1X y las muestras se analizaron por citometría de flujo antes de 1 hora a una longitud de onda de 530 nm (BD FACSVerse Optical System).

#### 6.1.7 Efecto de betanina sola y en combinación con vincristina en el arresto celular

Se estudió el efecto de la betanina y vincristina, así como de combinación elegida de betanina 275.5  $\mu\text{M}$  + vincristina 10.20 nM en el arresto de las células de LLA-T mediante citometría de flujo (Kit BD Cycletest Plus DNA número de catálogo

340242). La suspensión celular se centrifugó a 1500 rpm por 5 minutos a temperatura ambiente. Se decantó todo el sobrenadante y se añadieron 250  $\mu$ L de la solución A (amortiguador con tripsina) y se mezcló suavemente con la pipeta. La suspensión se incubó con la solución A por 10 minutos a temperatura ambiente sin remover la solución. Posteriormente, se agregaron 200  $\mu$ L de la solución B (amortiguador con inhibidor de la tripsina y ribonucleasa) y nuevamente se mezclaron suavemente con la pipeta. Se incubó con esta solución durante 10 minutos a temperatura ambiente sin remover la solución. Finalmente se añadieron 200  $\mu$ L de solución C (solución de tinción, yoduro de propidio, de 2 a 8° C) y la mezcla se realizó de forma suave y se incubó por 10 minutos en oscuridad y en hielo. Las muestras analizaron en el citómetro de flujo (BD FACSVersé Optical System) dentro de las 3 horas después de la adición de la solución C.

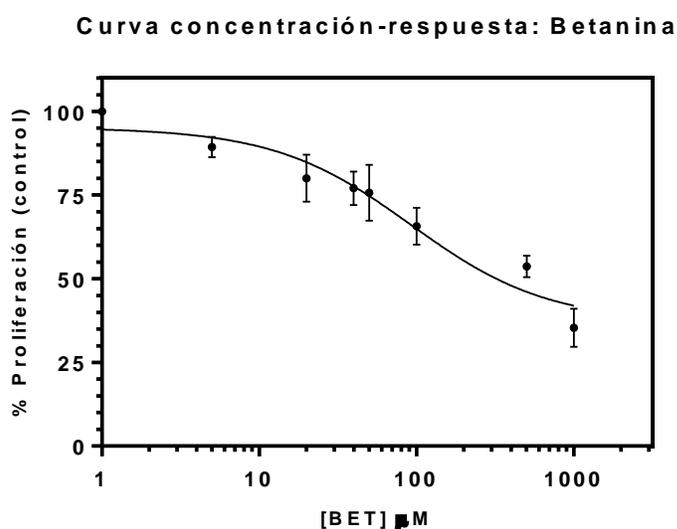
## 6.2 Análisis estadístico

Se realizaron al menos tres experimentos independientes por triplicado en cada prueba, los datos fueron presentados como la media  $\pm$  desviación estándar y para evaluar la diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) se utilizó ANOVA de una vía. Para evaluar diferencias significativas entre grupos y respecto al control se utilizaron las pruebas *post hoc* Tukey y Dunnet, respectivamente (De Veaux y col., 2009).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Curva concentración-respuesta de betanina en células de LLA-T

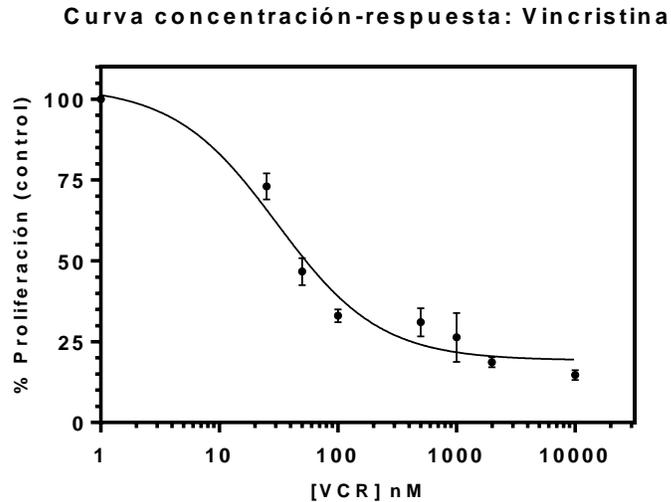
Para conocer el efecto de la betanina en la proliferación de las células de LLA-T, se probaron concentraciones de 5, 20, 40, 50, 100, 500 y 1000  $\mu\text{M}$  durante 24 horas y se determinó el porcentaje de proliferación de las células respecto al control tratado solo con agua estéril. Los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism 6 para determinar las concentraciones inhibitorias propuestas, las cuáles fueron 91.84  $\mu\text{M}$  y 275.5  $\mu\text{M}$  (Figura 3).



**Figura 3. Curva concentración-respuesta de betanina.** Se indica el porcentaje de proliferación respecto al control *versus* la concentración de betanina en micromolar. El ensayo de proliferación fue evaluado a las 24 horas mediante el ensayo de azul de tripano y se presenta la media de al menos tres experimentos independientes por triplicado con barras que indican la desviación estándar.

### 7.2 Curva concentración-respuesta de vincristina en células de LLA-T

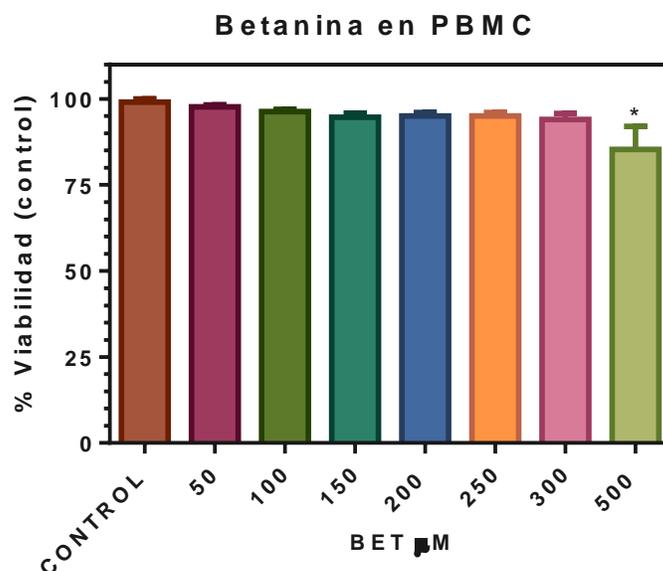
Con el objetivo de evaluar el efecto de vincristina en la proliferación las células de LLA-T, se trataron las células con un rango de concentraciones de vincristina de 1 a 10,000 nM durante 24 horas. De acuerdo a la curva concentración-respuesta de vincristina que se muestra en la figura 4, se propusieron dos concentraciones para evaluar en los siguientes experimentos, siendo 30.61 nM y 10.20 nM.



**Figura 4. Curva concentración-respuesta de vincristina.** Se indica la media del porcentaje de proliferación respecto al control *versus* la concentración de vincristina en nanomolar de tres experimentos independientes con barras de desviación estándar.

### 7.3 Efecto citotóxico de betanina en células mononucleares de sangre periférica sanas (PBMC)

Con la perspectiva de proponer a la betanina como coadyuvante en el tratamiento de la LLA-T, se determinó si la betanina era inocua para las células sanas en las concentraciones probadas sobre las células de LLA-T. Se estableció el cultivo *in vitro* de células mononucleares de sangre periférica de pacientes sanos y se trataron con el mismo rango de concentraciones de betanina utilizados para la curva concentración-respuesta (de 50 a 500  $\mu$ M) durante 24 horas. Posteriormente se evaluó la viabilidad de las células mediante el ensayo de azul de tripano. La figura 5, indica los resultados de tres experimentos por triplicado y el análisis para conocer diferencia estadística de cada grupo respecto al control (sin tratamiento) para determinar la citotoxicidad de la betanina en las células PBMC.



**Figura 5. Evaluación de citotoxicidad de betanina en células mononucleares de sangre periférica sanas (PBMC).** Se probaron concentraciones de 50 a 500  $\mu\text{M}$  de betanina para determinar su citotoxicidad en las células durante 24 horas. Se llevaron a cabo tres experimentos independientes por triplicado y se evaluó la viabilidad mediante el ensayo de azul de tripano. Para determinar diferencia estadística (\* $p < 0.05$ ) se realizó ANOVA de una vía y *post hoc* Dunnet para comparar las células tratadas respecto al control.

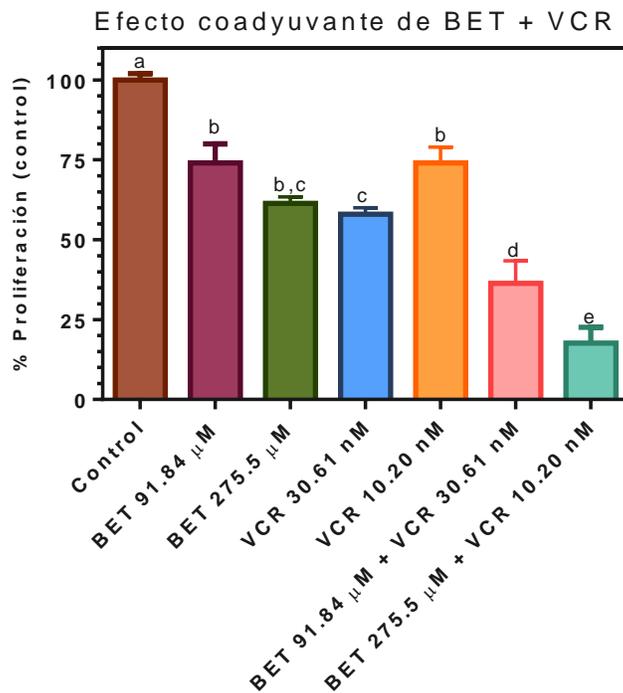
Se puede observar en la figura 5 que 500  $\mu\text{M}$  de betanina fue la única concentración con diferencia estadística respecto al control, indicando citotoxicidad en las células PBMC, por lo tanto, las concentraciones propuestas de betanina para los siguientes experimentos se consideran inocuas para células sanas. Así mismo, las propuestas se realizaron en base a los antecedentes en los que se utilizan concentraciones similares (Reddy y col., 2005).

#### 7.4 Efecto coadyuvante de betanina y vincristina en células de LLA-T

Después de establecer las concentraciones inhibitorias de betanina y vincristina a analizar respecto su potencial antiproliferativo, se propusieron dos combinaciones para los siguientes experimentos. La primera combinación propuesta fue de betanina 91.84  $\mu\text{M}$  más vincristina 31.60 nM. La segunda combinación se eligió con el objetivo

de proponer a la betanina como coadyuvante y disminuir la dosis utilizada de vincristina, siendo 275.5  $\mu\text{M}$  de betanina más 10.20 nM de vincristina.

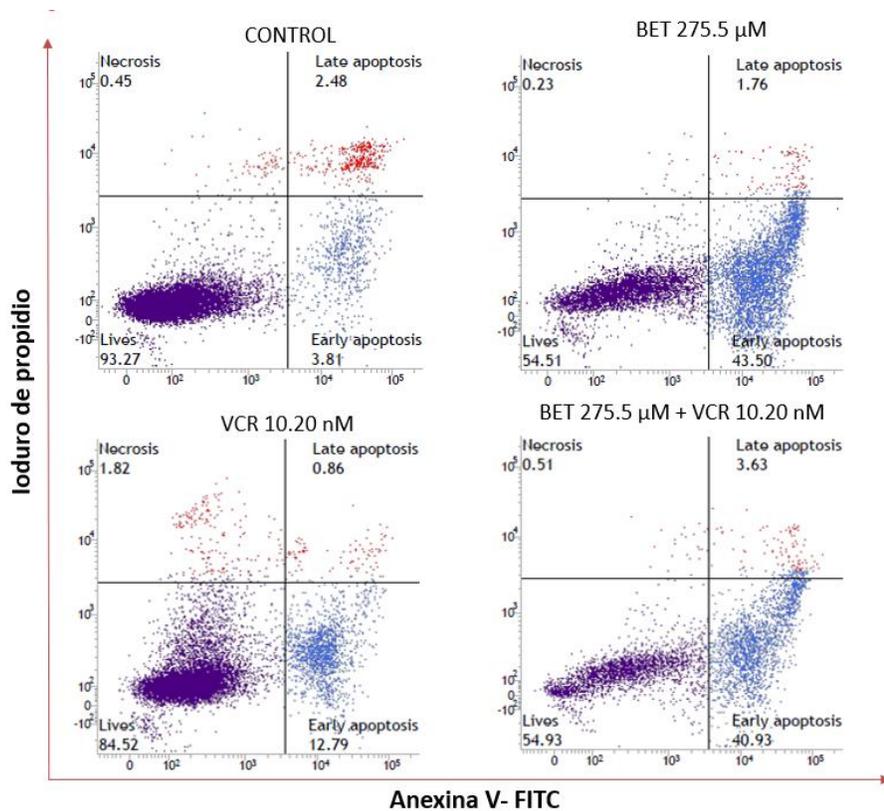
En la figura 6 se observa el efecto sobre la proliferación celular de las distintas concentraciones propuestas de betanina y vincristina, individual y en combinación. Todos los tratamientos ejercieron un efecto antiproliferativo mayor con respecto al control (células no tratadas) y se determinó la diferencia estadística entre los grupos de acuerdo al análisis de ANOVA de una vía y *post hoc* de Tukey,  $p < 0.05$ . El uso combinado de betanina 275.5  $\mu\text{M}$  + vincristina 10.20 nM tuvo mejor efecto en la disminución de la proliferación de las células que el ejercido por la combinación de betanina 91.84  $\mu\text{M}$  + vincristina 30.61 nM, así como de los compuestos individuales.



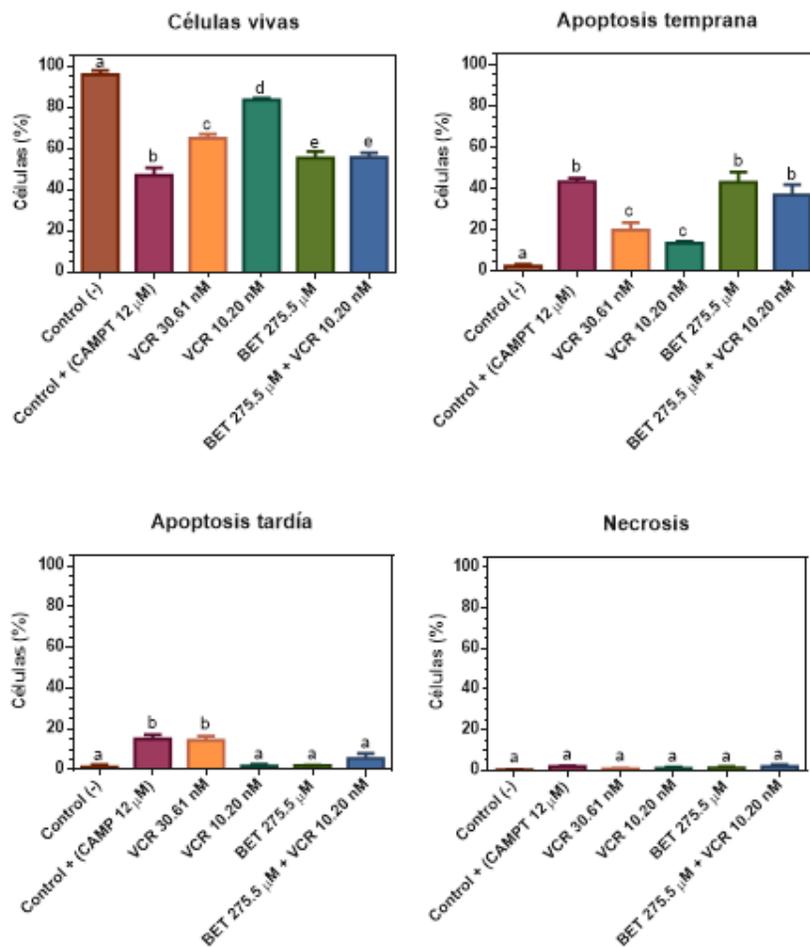
**Figura 6. Efecto coadyuvante de betanina y vincristina en el tratamiento de las células Jurkat.** Se propusieron dos combinaciones con base en la curva concentración-respuesta de cada compuesto y se evaluaron después de 24 horas a través del ensayo de exclusión de azul de tripano. En la gráfica se indican las medias de tres experimentos independientes con barras de desviación estándar, así como diferencia estadística representada por letras para cada grupo, establecida a partir del análisis de ANOVA de una vía y *post hoc* Tukey ( $p < 0.05$ ).

## 7.5 Efecto de betanina sola y en combinación con vincristina en la muerte celular

Considerando que la combinación de betanina 275.5  $\mu\text{M}$  + vincristina 10.20 nM tuvo mayor potencial antiproliferativo en las células de LLA-T, se analizó su efecto en la inducción de apoptosis mediante citometría de flujo. La figura 7 consta de los dotplots representativos para las células control y las células tratadas con betanina 275.5  $\mu\text{M}$  y vincristina 10.20 nM, así como de la combinación. Cada dot plot se divide en cuatro cuadrantes, dependiendo de la respuesta a la tinción con yoduro de propidio y anexina V, siendo viables (negativas a ambas tinciones), en apoptosis temprana (positivas solo a anexina V), en apoptosis tardía (positivas a ambos marcajes) y en necrosis (solo positivas a yoduro de propidio). Así mismo, en la figura 8 se representa el análisis estadístico de cada grupo tratado en tres experimentos independientes, por triplicado.



**Figura 7. Dot plots representativos del análisis de apoptosis celular de las células de LLA-T tratadas con betanina y vincristina y su combinación, mediante citometría de flujo.** El eje de las ordenadas indica intensidad de tinción con yoduro de propidio y el eje de las abscisas la intensidad de marcaje con Anexina V-FITC.



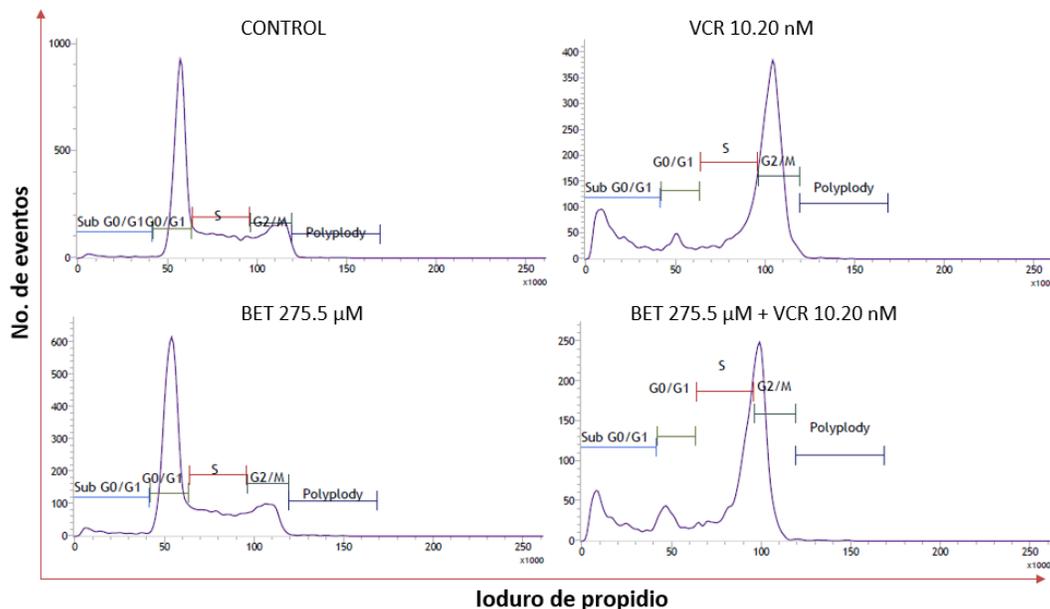
**Figura 8. Análisis estadístico de los experimentos de apoptosis determinados por citometría de flujo.** El porcentaje de células de LLA-T tratadas con betanina y vincristina individuales y en combinación, así como de los controles fue determinado a partir de la respuesta positiva a los marcajes con yoduro de propidio y anexina V. Las barras representan la media de tres experimentos independientes con desviación estándar y para evaluar diferencias estadísticas de los grupos se realizó ANOVA de una vía ( $p < 0.05$ ) y *post hoc* Tukey, representada por letras para cada grupo.

Como se puede observar en las gráficas, el mayor porcentaje en los grupos de tratamiento se distribuyen en células viables y en apoptosis temprana. Es importante resaltar que el tratamiento con la combinación propuesta betanina 275.5  $\mu\text{M}$  + vincristina 10.20 nM, contiene menor cantidad de células vivas en comparación a la 30.61 nM de vincristina, cumpliendo con el objetivo de disminuir las dosis del fármaco y utilizar la betanina como coadyuvante del tratamiento de las células *in vitro*. Por otra parte, la combinación de betanina y vincristina tiene un mayor porcentaje de

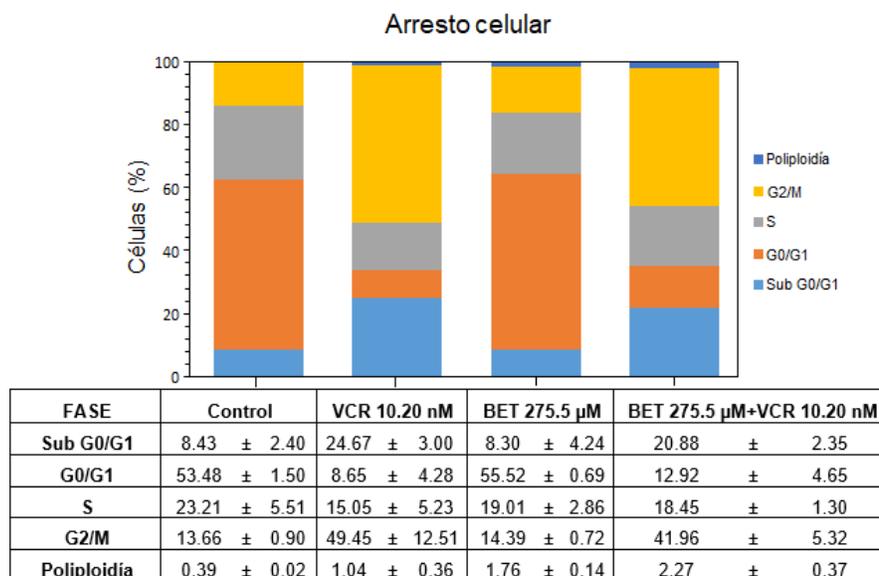
células en apoptosis temprana, lo cual, favorece la propuesta del tratamiento coadyuvante.

### 7.6 Efecto de la betanina sola y en combinación con vincristina en el arresto celular

Para determinar el efecto de betanina y vincristina individualmente y en combinación en el arresto de las células de LLA-T, se realizaron los experimentos conforme al diseño establecido de exposición a los compuestos individuales y en combinación durante 24 horas y posterior a ello, se analizó mediante citometría de flujo. La figura 9, indica los histogramas representativos de los grupos correspondientes a cada tratamiento y su distribución en las distintas fases del ciclo celular debido a la unión estequiométrica con yoduro de propidio según la cantidad de ADN. También se indica el análisis estadístico de los tres experimentos independientes por duplicado, de cada tratamiento y su distribución en el ciclo celular (figura 10).



**Figura 9. Histogramas de las fases del ciclo celular de las células de LLA-T tratadas con betanina y vincristina solas y en combinación.** El eje de las ordenadas representa la cantidad de eventos detectados en citometría de flujo y el eje de las abscisas la distribución de dichos eventos en el ciclo celular, dependiendo de su relación a la tinción con yoduro de propidio.



**Figura 10. Análisis estadístico de la distribución en el ciclo celular de las células de LLA-T tratadas con vincristina y betanina solas y en combinación.** Las barras representan el cien por ciento de cada grupo y sus secciones muestran a la distribución del ciclo celular de las células. Los resultados de los tres experimentos independientes por duplicado se promediaron para realizar la gráfica apilada y en la tabla se muestran los promedios correspondientes, así como su desviación estándar.

En los resultados del estudio de arresto celular que se indican en la figura 10, se observa que la combinación propuesta de betanina más vincristina tiene mayor cantidad de células en la fase sub G0/G1, lo que indica células en proceso apoptótico; esto corresponde con los resultados del marcaje con anexina V e ioduro de propidio. Con el uso combinado también incrementa la cantidad de células en la fase G2/M en comparación al grupo control (sin tratamiento).

## 8. DISCUSIÓN

La leucemia linfoblástica aguda tipo T se caracteriza por presentar resistencia a los fármacos que conforman la quimioterapia y que el uso intensivo y prolongado de los antineoplásicos, provoquen efectos adversos considerables. Es por ello, que, en el presente trabajo, se estudió el efecto antiproliferativo de la betanina y el efecto coadyuvante con vincristina en células de LLA-T. En primera instancia, se analizó el efecto de la betanina, así como de vincristina en la inhibición de la proliferación de las células de LLA-T, mediante las curvas concentración-respuesta, para determinar las concentraciones inhibitorias a utilizar en los experimentos.

La concentración propuesta de betanina 91.84  $\mu\text{M}$ , difiere con la utilizada por Sreekanth y colaboradores en 2007, la cual fue de 40  $\mu\text{M}$  de betanina en la línea celular de leucemia mieloide crónica humana (K562). La diferencia se debe principalmente a que las líneas celulares utilizadas son distintas a pesar de pertenecer al linaje de las leucemias, por lo que las células tienen características diferentes, entre ellas, el grado de maduración, la función relativa de las células, las vías de señalización alteradas y la presencia de transportadores que influyen en la farmacodinamia del compuesto, lo cual, resulta en la susceptibilidad a los tratamientos con betanina, siendo la LLA-T más resistente (American Cancer Society, 2014; Nowacki y col., 2015).

Las diferencias en las concentraciones utilizadas en los experimentos también pueden asociarse a que en el estudio de Sreekanth y colaboradores (2007), los estudios de citotoxicidad fueron llevados a cabo mediante el ensayo de MTT, el cual determina la actividad metabólica de las células y en el presente trabajo, la inhibición de la proliferación fue evaluada mediante el ensayo de exclusión de azul de tripano. Otra razón por la que pueden diferir es que la betanina utilizada en los experimentos de este proyecto, tiene una pureza del 95 – 105 % (Sigma Aldrich), mientras que la utilizada por Sreekanth y colaboradores, fue obtenida del extracto de *Opuntia ficus-indica*, pudiendo tener moléculas adicionales que interfieran con los resultados,

potenciando o disminuyendo determinado efecto (Reddy y col. 2005; Nowacki y col., 2015).

Con base en lo reportado, se propuso utilizar 275.5  $\mu\text{M}$  de betanina además de 91.84  $\mu\text{M}$ , para evaluar el efecto al aumentar la concentración de betanina. Los resultados del efecto antiproliferativo de la betanina con dicha concentración en las células de LLA-T, es comparable con lo reportado por Reddy y colaboradores en 2005, quienes realizaron un estudio *in vitro* con el extracto de *Beta vulgaris* y lo evaluaron en distintas líneas celulares: mama (MCF-7), colon (HCT-116), estómago (AGS), sistema nervioso central (SF-268) y pulmón (NCI-H460) en donde las CI50 oscilaron entre 142 y 164  $\mu\text{g/mL}$  que son equivalentes a 257 y 297  $\mu\text{M}$  considerando que el compuesto mayoritario es betanina (Nowacki y col., 2015). Reddy y colaboradores atribuyen el efecto de inhibición de la proliferación por parte de la betanina debido a su acción como antioxidante y anti-inflamatorio, lo cual se vio reflejado en los resultados de los experimentos que incluyen la inhibición de peroxidación lipídica y la inhibición de las ciclooxygenasas (Reddy y col., 2005).

Por otra parte, en el análisis del efecto antiproliferativo de vincristina en células de LLA-T, se determinó la concentración inhibitoria propuesta de 30.61 nM lo cual, es consistente con lo obtenido por Evangelisti y colaboradores en 2014, quienes evaluaron la citotoxicidad de vincristina en dos líneas celulares de LLA-T (Molt-4 y Jurkat), donde los resultados indican que hay disminución de la viabilidad en un rango de 1 y 100 nM de vincristina. De forma similar, Li y colaboradores en 2015, estudiaron el efecto de la vincristina en células de LLA-T (CCRF-CEM y Jurkat) en un rango de 1.3 a 10 nM de vincristina lo cual, difiere con el rango en el que se encuentra la concentración inhibitoria propuesta en este trabajo, pero esto puede asociarse a que los experimentos de Li y colaboradores se realizaron durante 48 horas, y fueron evaluados mediante citometría de flujo. Con base en lo reportado, también se propuso utilizar una concentración inferior de vincristina con la perspectiva de disminuir la dosis del fármaco y combinarla con betanina para evaluar si había efecto coadyuvante, siendo 10.20 nM.

Con el objetivo de incrementar la validez de las concentraciones propuestas de betanina para evaluar su efecto coadyuvante con vincristina, se determinó su citotoxicidad en células sanas de referencia, para ello se utilizaron células mononucleares de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés). Los resultados indicaron que no hay diferencia estadística hasta 300  $\mu\text{M}$  de betanina respecto a las células no tratadas lo cual, es consistente con el estudio reportado por Zielińska y colaboradores en 2012, quienes reportaron que hasta 500  $\mu\text{M}$  de betanina en neutrófilos no hay efecto citotóxico. Los resultados de citotoxicidad de la betanina, también son consistentes con lo reportado por Cho y colaboradores en 2017, quienes evaluaron hasta 1816.63  $\mu\text{M}$  de betanina en esplenocitos murinos observando que la betanina no tuvo efectos citotóxicos respecto al control.

La betanina (EEC No. E-162) está aprobada como colorante de alimentos por la Unión Europea y por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA, por sus siglas en inglés) en los Estados Unidos. El efecto de la betanina depende del modelo biológico en el que se evalúa su efecto, así como de las concentraciones o dosis y tiempos de exposición. Además, debido a la ausencia de un estudio exhaustivo sobre diversos mediadores celulares, la expresión génica, la localización y estabilidad intracelular, así como la biotransformación de la betanina, no se concluye con certeza como la betanina protege a las células sanas y, por otra parte, regula disfunciones fisiológicas (Khan, 2016).

Al analizar la combinación de betanina y vincristina en las células de LLA-T, los resultados indicaron que hay un efecto coadyuvante concentración-dependiente y que mejora al aumentar la concentración de betanina y disminuir la concentración de vincristina. Estos resultados son consistentes con lo observado por Kapadia y colaboradores en 2013, en el que hay un efecto sinérgico al combinar betanina y doxorubicina en líneas celulares de próstata, mama y páncreas (PC-3, MCF-7 y PaCa). Kapadia y colaboradores, atribuyen el efecto antiproliferativo de betanina y doxorubicina a la similitud en la estructura molecular, por lo que sugieren que estén actuando por el mismo mecanismo de acción que, si bien para betanina no está bien

elucidado, para doxorubicina sus efectos anticancerígenos se deben a que se intercala con las bases del ADN e inhibe la función de la topoisomerasa I y II.

Para determinar el efecto de betanina y vincristina en la apoptosis de las células de LLA-T, se realizaron los tratamientos con las combinaciones y se analizaron por citometría de flujo. Los resultados obtenidos después de 24 horas, indican que hay diferencia estadística respecto a la cantidad de células vivas al utilizar en conjunto betanina y vincristina en comparación al tratamiento solo con vincristina. Así mismo, la cantidad de células en apoptosis temprana es mayor con el tratamiento combinado que con el fármaco solo. Los efectos apoptóticos pueden estar relacionados a la acción de la betanina, que induce la liberación de citocromo c en el citosol, la incisión de la poli-ADP-ribosa (PARP), la regulación negativa Bcl-2 y la reducción en los potenciales de membrana (Sreekanth y col., 2007). Por otra parte, la vincristina detiene a la célula durante la mitosis debido a que interrumpe la dinámica de los microtúbulos, lo que puede inducir apoptosis (Egbelakin y col., 2011). Este es el primer reporte publicado en que la betanina y la vincristina se evalúan en conjunto y se compara con sus efectos individuales respecto a la inducción de apoptosis en células de LLA-T mediante citometría de flujo.

También se evaluó el efecto de la betanina y la vincristina en la inducción al arresto celular de las células de LLA-T. Los resultados obtenidos indican que en el tratamiento con 10.20 nM de vincristina hay mayor proporción de células en fase G2/M, lo que puede deberse al mecanismo de acción ejercido por este agente antimicrotúbulos, que actúa al detener a la célula durante el proceso mitótico, enviándola a apoptosis (Mora y col., 2016). Por otra parte, la vincristina induce distintos programas de muerte en células de LLA dependiendo de la fase del ciclo celular en la que se encuentren y de la concentración empleada en el tratamiento (Sarris y col., 2000; Kothari y col., 2016).

Con lo que respecta al tratamiento de las células de LLA-T con betanina, las proporciones en las fases del ciclo celular no difieren con el grupo control. Estos resultados no son consistentes a lo reportado por Sreekanth y colaboradores en

2007, donde el tratamiento con betanina en células de leucemia mieloide crónica (K562) aumenta la cantidad de células en fase G0/G1 en comparación con el control. Las diferencias pueden deberse a las características de las células K562 y las células de LLA-T como maduración, función parcial o nula, así como las características citogenéticas que determinan la susceptibilidad los tratamientos (Norwood y col., 2004; American Cancer Society, 2014).

Al evaluar el tratamiento combinado de betanina y vincristina en las células de LLA-T y determinar el arresto en el ciclo celular, la mayor proporción de células se ubican en la fase G2/M, pero se nota una distribución combinada de los compuestos individuales, lo que sugiere que tanto la betanina como la vincristina, están ejerciendo acción a través de diferentes vías y que las células se están deteniendo en las distintas fases del ciclo celular. La distribución de las células en las distintas fases, pueden deberse a que además de interrumpir el ensamble de los microtúbulos, la vincristina estimula la acción de p53, proteína que activa quinasas dependientes de ciclinas asociadas a la detención del ciclo celular (Pathan y col., 2001; Blagosklonny, 2002) y, por otra parte, aunque no se sabe cómo la betanina arresta a las células en el ciclo celular, su mecanismo puede estar asociado a la inhibición de la función de complejos que están activos en G0/G1 (Sreekanth y col., 2007).

Cabe mencionar, que el uso de antioxidantes durante la quimioterapia es controversial, debido a que una gran cantidad de fármacos utilizados en los protocolos, eliminan a las células cancerígenas por la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés) y los antioxidantes neutralizan este efecto. Sin embargo, la propuesta del uso combinado depende del antioxidante propuesto, el antineoplásico, las características de células cancerígenas, la fase del tratamiento, así como las concentraciones empleadas (Saeidnia y Abdollahi, 2013; Glasauer y Chandel, 2014; Tong y col., 2015).

Los resultados obtenidos en el presente trabajo de investigación, indican que el uso de betanina como coadyuvante en el tratamiento *in vitro* de las células de LLA-T permite disminuir la dosis de vincristina y potenciar el efecto antiproliferativo.

## 9. CONCLUSIÓN

La necesidad de proponer alternativas en los protocolos de atención de la leucemia linfoblástica aguda tipo T, se debe a los efectos adversos que provocan los fármacos que son parte de la quimioterapia. En el presente trabajo se determinó el efecto antiproliferativo de betanina en células Jurkat de LLA-T, así como su efecto coadyuvante con vincristina, fármaco utilizado en tratamiento de dicho tipo de cáncer el cual, se asocia con neurotoxicidad.

El uso de betanina potenció el efecto antiproliferativo de vincristina de manera concentración-dependiente en las células de LLA-T. Por otra parte, los resultados indicaron que el uso combinado de betanina más vincristina disminuye la cantidad de células vivas e induce la apoptosis temprana. Así mismo, el tratamiento con ambos compuestos, induce el arresto de las células en las distintas fases del ciclo celular, por lo que se propone que, están actuando a través de diferentes mecanismos para detener las células de cáncer y promover su muerte.

El presente trabajo de investigación es el primero en reportar el uso combinado de betanina y vincristina y da la pauta para continuar con el estudio de los mecanismos de interacción de dichos compuestos con la perspectiva de proponer alternativas en el tratamiento del cáncer y disminuir los efectos adversos que provoca el proceso de quimioterapia.

## 10. REFERENCIAS

Altman, S. A., Randers, L., Rao, G. (1993). Comparison of trypan blue dye exclusion and fluorometric assays for mammalian cell viability determinations. *Biotechnology Progress*. 9(6):671-674.

American Cancer Society (2014). ¿Qué es la leucemia linfocítica aguda? Página electrónica: <https://www.cancer.org/es/cancer/leucemia-linfocitica-aguda/acerca/que-es-leucemia-linfocitica-aguda.html>. Consultada el 29/06/2018.

American Cancer Society<sup>a</sup> (2016). Factores de Riesgo para la Leucemia Mieloide Aguda. Página electrónica: <http://www.cancer.org/espanol/cancer/leucemiamieloidenaaguda/guiadetallada/leucemia-mieloide-mielogena-aguda-causes-risk-factors>. Consultada el 01/03/2017.

American Cancer Society<sup>b</sup> (2016). Leucemia en niños. *Cancer Facts and Figures*. Atlanta, Ga.

Artigas, A. C. G., Melo, A. A., Roa, S. J. C., Páez, F. E., Vittini, R. C., Arriagada, M. M., González, O. L., Pflaumer, F. E., Roa, E. I. (2002). Detección de secuencias del gen BCR-ABL mediante RT-PCR en pacientes con leucemia en la IX Región: Chile. *Revista Médica de Chile*. 130(6):623-630.

Azeredo, H. M. C. (2009). Betalains: properties, sources, applications, and stability—a review. *International Journal of Food Science and Technology*. 44(12):2365-2376.

Belver, L., Ferrando, A. (2016). The genetics and mechanisms of T cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nature Reviews Cancer*, 16:494-507.

Bittersohl, H., Steimer, W. (2016). Intracellular concentrations of immunosuppressants. *Personalized Immunosuppression in Transplantation*. Capítulo 9:199-226.

Blagosklonny, M. V. (2002). Mechanisms of Action of Cancer Chemotherapeutic Agents: Antimicrotubule Agents. The Cancer Handbook. 1era edición. *National Cancer Institute*. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, E. U. A.

Boyette, D. J. A., Walters, E. T., Dougherty, P. M. (2015). Mechanisms involved in the development of chemotherapy-induced neuropathy. *Pain Management*. 5(4):285–296.

Carozzi, V. A., Canta, A., Chiorazzi, A. (2015). Chemotherapy-induced peripheral neuropathy: What do we know about mechanisms? *Neuroscience Letters*. 596(2):90–107.

Cho, J., Bing, S. J., Kim, A., Lee, N. H., Byeon, S. H., Kim, G. O., Jee, Y. (2017). Beetroot (*Beta vulgaris*) rescues mice from  $\gamma$ -ray irradiation by accelerating hematopoiesis and curtailing immunosuppression. *Pharmaceutical Biology*. 55(1):306-316.

Chou, T. C. (2006). Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism of drug combination studies. *Pharmacological reviews*. 58(3):621-681.

Cubria, P., Hernández, M., Romero, L., Ellis, A., Escamilla, G., Vega, L., Friedrich, P., Lehmann, L., Garay, S., Aguilar, D., Gasperin, G., Tsitsikov, E., Weinberg, O. (2017). DFCI/BCH-HITO quality improvement project for hematologic malignancies: implementation and validation of MRD by flow cytometry in pediatric acute leukemia treatment protocols. *Blood Advances*. 1:77-79.

De Veaux, R. D., Velleman, P. F., Bock, D. E. (2009). Intro stats. Tercera Edición. Editorial Pearson. Boston. 13:23-143.

Egbelakin, A., Ferguson, M. J., MacGill, E. A., Lehmann, A. S., Topletz, A. R., Quinney, S. K., Li, L., McCammack, K. C., Hall, S. D., Renbarger, J. L. (2011). Increased risk of vincristine neurotoxicity associated with low CYP3A5 expression genotype in children with acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Blood and Cancer*. 56(3):361-367.

Evangelisti, C., Evangelisti, C., Teti, G., Chiarini, F., Falconi, M., Melchionda, F., Pession, A., Bertaina, A., Locatelli, F., McCubrey, J. A., Beak, D. J., Bittman, R., Pyne, S., Pyne, N. J., Martelli, A. M. (2014). Assessment of the effect of sphingosine

kinase inhibitors on apoptosis, unfolded protein response and autophagy of T-cell acute lymphoblastic leukemia cells; indications for novel therapeutics. *Oncotarget*. 5(17):7886-7901.

Gandía, H. F., García, C. F. (2013). Biosynthesis of betalains: yellow and violet plant pigments. *Trends in Plant Science*. 18(6):334-343.

Glasauer, A., Chandel, N. S. (2014). Targeting antioxidants for cancer therapy. *Biochemical pharmacology*, 92(1):90-101.

Gómez, A. D. (2009). Leucemias crónicas. *Fundamentos de Hematología*. Editorial Panamericana, México. 159-168.

Iacobucci, I., Mullighan, C. G. (2017). Genetic Basis of Acute Lymphoblastic Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 35(9):975-983.

Instituto Nacional de Salud Pública. Sistema de Protección Social en Salud, S. P. S. (2001). Protocolo de la atención para leucemia linfoblástica. Guía clínica y esquema de tratamiento. México. Obtenido de: <http://www.salud.gob.mx/unidades/dgpfs/micsitio/ptcia/recursos/LEUCEMIA.pdf>.

Consultado el 01/03/2017.

International Agency for Research on Cancer (2016). International Childhood Cancer Day: Much remains to be done to fight childhood cancer. Obtenido de: [https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2016/pdfs/pr241\\_E.pdf](https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2016/pdfs/pr241_E.pdf). Consultado el 01/03/2017.

International Agency for Research on Cancer (2017). Latest data show a global increase of 13% in childhood cancer incidence over two decades. Obtenido de: [https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2017/pdfs/pr251\\_E.pdf](https://www.iarc.fr/en/media-centre/pr/2017/pdfs/pr251_E.pdf). Consultado el 01/09/2017.

Jaggi, A. S., Singh, N. (2012). Mechanisms in cancer-chemotherapeutic drugs-induced peripheral neuropathy. *Toxicology*. 291:1-9.

Kapadia, G. J., Azuine, M. A., Rao, G. S., Arai, T., Iida, A., Tokuda, H. (2011). Cytotoxic effect of the red beetroot (*Beta vulgaris L.*) extract compared to doxorubicin (Adriamycin) in the human prostate (PC-3) and breast (MCF-7) cancer cell lines. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*. 11:280-284.

Kapadia, G.J., Azuine, M. A., Sridhar, R., Okuda, Y., Tsuruta, A., Ichiishi, E., Mukainake, T., Takasaki, M., Konoshima, T., Nishino, H., Tokuda, H. (2003). Chemoprevention of DMBA-induced UV-B promoted, NOR-1-induced TPA promoted skin carcinogenesis, and DEN-induced phenobarbital promoted liver tumors in mice by extract of beetroot. *Pharmacological Research*. 47:141-148.

Kapadia, G. J., Rao, G. S., Ramachandran, C., Iida, A., Suzuki, N., Tokuda, H. (2013). Synergistic cytotoxicity of red beetroot (*Beta vulgaris L.*) extract with doxorubicin in human pancreatic, breast and prostate cancer cell lines. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*. 10(1):113-122.

Kapadia, G. J., Tokuda, H., Konoshima, T., Nishino, H. (1996). Chemoprevention of lung and skin cancer by *Beta vulgaris* (beet) root extract. *Cancer Letters*. 100(1-2):211-214.

Khan, M. I. (2016). Plant betalains: safety, antioxidant activity, clinical efficacy, and bioavailability. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 15(2):316-330.

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

Lavoie, S. E. M., Li, L., ChiangWei, C., Thomas, K., Hutchinson, R.J., Wells, E. M., Ho, R. H., Skiles, J., Chakraborty, A., Bridges, C. M., Renbarger, J. (2015). Patterns and severity of vincristine-induced peripheral neuropathy in children with acute lymphoblastic leukemia. *Journal of the Peripheral Nervous System*. 20(1):37–46.

Layton, T. C. F. (2015). Factores de pronóstico en leucemia linfoblástica aguda pediátrica: posibles marcadores moleculares. *Medicina e Investigación*. 3(1):85-91.

Lee, E. J., An, D., Nguyen, C.T. T, Patil, B. S., Kim, J., Yoo, K. S. (2014). Betalain and betaine composition of greenhouse- or field-produced beetroot (*Beta vulgaris L.*) and inhibition of HepG2 cell proliferation. *Journal of Agricultural Food Chemistry*. 62:1324-1331.

Leukemia and Lymphoma Society (2012). La leucemia, Fighting Blood Cancers. New York. U.S.A. 8-10. PDF disponible en: [https://www.lls.org/sites/default/files/file\\_assets/sp\\_leukemia.pdf](https://www.lls.org/sites/default/files/file_assets/sp_leukemia.pdf). Consultado el: 01/03/2017.

Li, Z., Younger, K., Gartenhaus, R., Joseph, A. M., Hu, F., Baer, M. R., Brown, P., Davila, E. (2015). Inhibition of IRAK1/4 sensitizes T cell acute lymphoblastic leukemia to chemotherapies. *The Journal of Clinical Investigation*. 125(3):1081-1097.

Manascero, A. (2003). Hematología, herramientas para el diagnóstico: Atlas de morfología celular, alteraciones y enfermedades relacionadas. Primera Edición. Centro Editorial Javeriano, CEJA. Bogotá, Colombia.

Mora, E., Smith, E. M. L., Donohoe, C., Hertz, D. L. (2016). Vincristine-induced peripheral neuropathy in pediatric cancer patients. *American Journal Cancer Research*. 6(11):2416–2430.

Möricke, A., Zimmermann, M., Reiter, A., Henze, G., Schrauder, A., Gadner, H., Ludwig, W. D., Ritter, J., Harbott, J., Mann, G., Klingebiel, T., Zintl, F., Niemeyer, C., Kremens, B., Niggli, F., Niethammer, D., Welte, K., Stanulla, M., Odenwald, E., Riehm, H., Schrappe, M. (2010). Long-term results of five consecutive trials in childhood acute lymphoblastic leukemia performed by the ALL-BFM study group from 1981 to 2000. *Leukemia*. 24(2):265-284.

National Cancer Institute (2014). Lo que usted necesita saber sobre la leucemia. Departamento de Salud y Servicios Humanos de EE. UU. Edición de Internet. 14-3775S:1-38. PDF disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/educacion-para-pacientes/necesita-saber-leucemia-PDF> Consultada el: 01/03/2017.

Norwood, K., Wang, R. Y., Hirschmann-Jax, C., Andreeff, M., Brenner, M. K., Goodell, M. A., Wulf, G. G. (2004). An *in vivo* propagated human acute myeloid leukemia expressing ABCA3. *Leukemia research*. 28(3):295-299.

Nowacki, L., Vigneron, P., Rotellini, L., Cazzola, H., Merlier, F., Prost, E., Ralanairina, R., Gadonna, J. P., Rossi, C., Vayssade, M. (2015). Betanin-enriched red Beetroot (*Beta vulgaris L.*) extract induces apoptosis and autophagic cell death in MCF-7 Cells. *Phytotherapy Research*. 29:1964-1973.

Organización Mundial de la Salud. (2018). Temas de Salud: Cáncer. Disponible en: <http://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/cancer> Consultada el 1/02/2018.

Ortega, S. M. A., Osnaya, O, M. L., Rosas, B. J. V. (2007). Leucemia linfoblástica aguda. *Medicina Interna de México*. 23(1):26-33.

Ortiz, H. C. (2013). Notas sobre la historia de la leucemia. *Patología*. 5:58-69.

Panfil, A. R., Martinez, M. P., Ratner, L., Green, P. L. (2016). Human T-cell leukemia virus-associated malignancy. *Current Opinion in Virology*. 20:40–46.

Pathan, N., Aime-sempe, C., Kitada, S., Basu, A., Haldar, S., Reed, J. C. (2001). Microtubule-targeting drugs induce Bcl-2 phosphorylation and association with Pin1. *Neoplasia*. 3(1):70-79.

Pátkai, G., Barta, J., Varsányi, I. (1997). Decomposition of anticarcinogen factors of the beetroot during juice and néctar production. *Cancer Letters*. 114(1-2):105-106.

Pieters, R., Carroll, W. L. (2008). Biology and treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Pediatric Clinics of North America*. 55(1):1–20.

Pui, C. H. (2011). Recent advances in acute lymphoblastic leukemia. *Recent Advances in Acute Lymphoblastic Leukemia*.

Reddy, M. K., Alexander-Lindo, R. L., Nair, M. G., (2005). Relative Inhibition of Lipid Peroxidation, Cyclooxygenase Enzymes, and Human Tumor Cell Proliferation by Natural Food Colors. *Journal Agricultural Food and Chemistry*. 53(23):9268–9273.

Rodak, F. B. (2004). Hematología: fundamentos y aplicaciones clínicas. Segunda Edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina.

Rodriguez, A. D., Bordoni, A., Zucca, E. (2007). Epidemiology of hematological malignancies. *Annals of Oncology*. Suppl. 1: i3-i8.

Ruiz A. G. J., Ruiz D. G. J. (2009). Leucemias agudas. Fundamentos de Hematología. Editorial Panamericana. México. 143-157.

Saeidnia, S., Abdollahi, M. (2013). Antioxidants: friends or foe in prevention or treatment of cancer: the debate of the century. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 271(1):49-63.

Sarris, A. H., Hagemester, F., Romaguera, J., Rodriguez, M. A., McLaughlin, P., Tsimberidou, A. M., Medeiros, L. J., Samuels, B., Pate, O., Oholendt, M., Kantarjian, H., Burge, C., Cabanillas, F. (2000). Liposomal vincristine in relapsed non-Hodgkin's lymphomas: Early results of an ongoing phase II trial. *Annals of Oncology*. 11:69–72.

Schneider, U., Schwenk, H. U., Bornkamm, G. (1977). Characterization of EBV-genome negative “null” and “T” cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *International Journal of Cancer*. 19(5):621-626.

Schwartz, S. J, von Elbe, J.H., Pariza, M.W., Goldsworthy, T., Pitot, H.C. (1983). Inability of red beet betalain pigments to initiate or promote hepatocarcinogenesis. *Food and Chemical Toxicology*. 21(5):531-535.

Sreekanth, D., Arunasree, M.K., Roy, K. R, Chandramohan, R. T., Reddy, G. V., Reddanna, P. (2007). Betanin a betacyanin pigment purified from fruits of *Opuntia ficus-indica* induces apoptosis in human chronic myeloid leukemia cell line-K562. *Phytomedicine*. 14(11):739-746.

Tay, C. G., Lee, V. W. M., Ong, L. C., Goh, K. J., Ariffin, H., Fong, C. Y. (2017). Vincristine-induced peripheral neuropathy in survivors of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Pediatric blood & cancer*. 64(8):1-7.

Tong, L., Chuang, C. C., Wu, S., Zuo, L. (2015). Reactive oxygen species in redox cancer therapy. *Cancer letters*. 367(1):18-25.

Toopchizadeh, V., Barzegar, M., Rezamand, A., Feiz, A. H. (2009). Electrophysiological consequences of vincristine contained chemotherapy in children: A cohort study. *Journal of Pediatric Neurology*. 7(4):351–356.

Turner, M. C., Wigle, D. T., Krewski, D. (2010). Residential pesticides and childhood leukemia: A systematic review and meta-analysis. *Ciência & Saúde Coletiva*. 16(3):1915-1931.

Virchow, R. (1845). Weisses Blut. Neue Notizen aus Gebiete der Naturund. 36:11151-11156.

Whelan, K., Alva, E. (2018). Chapter 1 - Epidemiology of Childhood Cancer. *Pediatric Cancer Genetics*. 1–20.

Zhang, Q., Pan, J., Wang, Y., Lubet, R., You, M. (2012). Beetroot red (betanin) inhibits vinyl carbamate- and benzo(a)pyrene-induced lung tumorigenesis through apoptosis. *Molecular Carcinogenesis*. 52(9):686-691.

Zielińska-Przyjemska. M., Olejnik, A., Dobrowolska-Zachwieja, A., Łuczak, M., Baer-Dubowska. W. (2016). DNA damage and apoptosis in blood neutrophils of inflammatory bowel disease patients and in Caco-2 cells *in vitro* exposed to betanin. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*. 70:265-271.

Zielińska-Przyjemska, M., Olejnik, A., Kostrzewa, A., Łuczak, M., Jagodziński, P. P., Baer-Dubowska, W. (2012). The beetroot component betanin modulates ROS production, DNA damage and apoptosis in human polymorphonuclear neutrophils. *Phytotherapy Research*. 26:845-852.

## ANEXO

### **Consentimiento informado para la participación en el estudio del efecto citotóxico de la betanina en células mononucleares sanas de sangre periférica (PBMC, por sus siglas en inglés).**

#### **Introducción**

La leucemia es el cáncer más común en niños y adolescentes y representa un tercio de incidencia a nivel mundial. Hay distintos tipos de leucemia, dependiendo de su progresividad respecto al tiempo y el linaje celular afectado; la leucemia linfoblástica aguda tipo T (LLA-T) tiene una incidencia del 15 % sin embargo, se caracteriza por su resistencia a fármacos, debido a la presencia de varias alteraciones citogenéticas. La quimioterapia es el principal protocolo de atención de la LLA-T y la vincristina es uno de los principales antineoplásicos que se utilizan, sin embargo, su uso está asociado a efectos adversos como neuropatía periférica. Debido a que la LLA-T se caracteriza por la resistencia a la quimioterapia y requiere de protocolos intensivos de administración de los fármacos, las investigaciones se centran en buscar alternativas que coadyuven al tratamiento y ayuden a disminuir los efectos colaterales.

#### **Objetivo**

El objetivo de este trabajo de investigación es evaluar el efecto antiproliferativo de betanina sola y en combinación con vincristina, en células de leucemia linfoblástica aguda tipo T (LLA-T), determinar su posible mecanismo asociado a apoptosis y arresto celular y verificar su inocuidad en células sanas a las concentraciones propuestas en los experimentos.

#### **Procedimiento**

El Químico Clínico responsable, tomará la muestra de sangre periférica de la vena media del brazo izquierdo o derecho. Para dicho procedimiento, se hace uso de un torniquete, se limpia la zona con alcohol, se coloca una aguja nueva desechable en el vacutainer y se inserta dentro de la vena, enseguida se introducirá el tubo para

muestra sanguínea color morado que contiene EDTA, se retirará el torniquete y se esperará a que el tubo este lleno a un 80 % de su capacidad. Posteriormente, se retirará el vacutainer, se colocará una torunda de alcohol en el área en donde se insertó la aguja y se pedirá al participante voluntario que mantenga doblado el brazo por unos minutos para evitar hemorragia y se podrá desechar el algodón en el recipiente adecuado.

### **Efectos adversos y molestias**

El participante voluntario no sufrirá eventos adversos al donar sangre periférica, debido a las condiciones de asepsia y de seguridad, así como a la cantidad que va a extraerse. Las molestias son mínimas y solo son causadas por insertar la aguja en la vena media del brazo, lo cual, es mínimamente invasivo y dura unos pocos segundos. También puede presentarse un pequeño hematoma en la zona, sin embargo, en la mayoría de los casos no se provoca.

### **Beneficios de la donación de sangre periférica para el presente estudio**

El participante voluntario no asumirá ningún costo por su participación y todo lo necesario para realizar la toma de muestra será proporcionado por la investigadora y el responsable Químico Clínico. Por otra parte, se contribuye a la investigación del efecto citotóxico de la betanina en células sanguíneas para determinar su propuesta en el tratamiento de la LLA-T.

### **Confidencialidad**

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

### **Información de contacto**

Investigador responsable: Dra. María Guadalupe García Alcocer

Unidad de Investigación Genética

Facultad de Química, Universidad Autónoma de Querétaro

e-mail: [guadalugar@yahoo.com.mx](mailto:guadalugar@yahoo.com.mx)

Tel. (01 442) 1 92 12 00 Ext. 5528

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

### PARTICIPANTE

NOMBRE DEL PARTICIPANTE \_\_\_\_\_  
Domicilio \_\_\_\_\_  
N° telefónico \_\_\_\_\_  
Firma del participante \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

### TESTIGO 1

Nombre del Testigo \_\_\_\_\_  
Domicilio \_\_\_\_\_  
N° telefónico \_\_\_\_\_  
Firma del Testigo \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

### TESTIGO 2

Nombre del Testigo \_\_\_\_\_  
Domicilio \_\_\_\_\_  
N° telefónico \_\_\_\_\_  
Firma del Testigo \_\_\_\_\_ Fecha \_\_\_\_\_

### DECLARACIÓN DEL INVESTIGADOR

Yo o mi representante hemos discutido con el participante la naturaleza y propósito del estudio, así como los posibles riesgos y beneficios de su participación. Considero que el participante ha recibido la información completa con un lenguaje comprensible y apropiado, además de haberle contestado sus dudas.

Nombre del investigador o representante \_\_\_\_\_

Firma del investigador \_\_\_\_\_

Fecha de la firma \_\_\_\_\_

## CONSENTIMIENTO INFORMADO

He sido informado(a) con entera satisfacción y se me ha dado la oportunidad de realizar preguntas sobre el proyecto. Declaro que mi participación es voluntaria y que tengo el derecho de no aceptar ser parte del estudio. Entiendo el objetivo de la investigación y que mis datos serán manejados con total confidencialidad. Así mismo, se me otorgado una copia de este consentimiento.

Libremente y sin ninguna presión, acepto y doy mi consentimiento para participar en este estudio.

---

Nombre del participante

---

Firma y Fecha

---

Domicilio del participante

---

Nombre del testigo 1

---

Firma y Fecha

---

Domicilio del testigo 1

---

Nombre del testigo 2

---

Firma y Fecha

---

Domicilio del testigo 2