



**RELACION ENTRE LOS NIVELES INTRACELULARES DE ROS Y LA  
RESPUESTA A LOS TRATAMIENTOS *in vitro* EN CÉLULAS TUMORALES  
K562 Y U937 CON LOS EXTRACTOS DE *Petiveria alliacea* (Anamú) Y  
*Caesalpinia spinosa* (P2Et) Y DOXORRUBICINA**

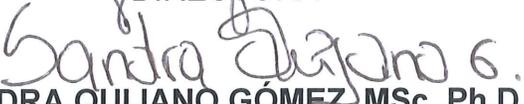
**NATALIA ALEJANDRA MURILLO VALLEJO  
ESTUDIANTE DE BACTERIOLOGÍA**

**TRABAJO DE GRADO**

**PRESENTADO COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**BACTERIOLOGA**

  
**SUSANA FIORENTINO GÓMEZ. MSc. Ph.D  
DIRECTORA**

  
**SANDRA QUIJANO GÓMEZ. MSc. Ph.D  
CODIRECTORA**

**Bogotá, D.C. Colombia  
2018**

## **NOTA DE ADVERTENCIA**

### **ARTICULO 23 DE LA RESOLUCIÓN NO 13 DE JULIO DE 1946.**

“La Universidad no se hace responsable por los conceptos emitidos por sus alumnos en sus trabajos de tesis. Sólo velará porque no se publique nada contrario al dogma y a la moral católica y porque las tesis no contengan ataques personales contra persona alguna, antes bien se vean en ellas el anhelo de buscar la verdad y la justicia”

## **AGRADECIMIENTOS**

A Dios, mis padres y a seres queridos, quienes han sido la guía y el camino para poder llegar a este punto de mi carrera. Que con su ejemplo, dedicación, esfuerzo y apoyo incondicional permitieron que siempre saliera adelante cuando se presentaron obstáculos en el camino. Los amo

Quisiera hacer extensiva mi gratitud a la Dra. Susana Fiorentino y a la Dra. Sandra Quijano por la constante orientación, compromiso, sugerencias, su incondicionalidad y sobre todo por la confianza depositada en mi para ser parte del grupo de investigación de Inmunobiología y Biología Celular donde pude llevar a cabo mi trabajo de grado. Ustedes son mujeres de admirar y son un ejemplo a seguir.

También quiero agradecer a mis compañeros del grupo de investigación de Inmunobiología y Biología Celular, especialmente a mi amigo Ricardo Andrés Ballesteros por su colaboración y apoyo durante este proceso.

A todos ellos, muchas gracias.

## TABLA DE CONTENIDO

<b>RESUMEN</b> .....	11
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	12
<b>JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b> .....	14
<b>MARCO TEORICO</b> .....	15
Leucemias Agudas (LA) .....	15
Producción de ROS en Leucemia .....	17
Antecedentes de Petiveria allicea y Caesalpinia spinosa en LMA.....	18
Efecto sinérgico en la combinación de fármacos .....	20
<b>OBJETIVOS</b> .....	21
Objetivo General.....	21
Objetivos Específicos .....	21
<b>METODOLOGIA</b> .....	22
Líneas celulares .....	22
Línea celular K562.....	22
Línea celular U937.....	23
Cultivos celulares.....	24
Caracterización inmunofenotípica de las líneas K562 y U937 .....	24
Determinación de las diferencias en la sensibilidad a los tratamientos de Anamú, P2Et y Doxorubicina en la líneas celulares leucémicas K562 y U937 mediante la técnica de MTT .....	25
Análisis Estadístico.....	25
Evaluación de la producción de ROS intracelular después de tratamiento con Anamú, P2Et y Doxorubicina en las líneas celulares K562 y U937 mediante Citometria de flujo.....	26
Análisis Estadístico.....	27
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	28
Caracterización inmunofenotípica de las líneas K562 y U937 .....	28
Determinación de las diferencias en la sensibilidad a los tratamientos de Anamú, P2Et y Doxorubicina de dos líneas celulares leucémicas K562 y U937.....	30
Evaluación de las diferencias relacionadas con la producción de ROS intracelular respecto a los tratamientos de Anamú, P2Et y Doxorubicina en las líneas celulares leucémicas K562 y U937. ....	33
Análisis de ROS en la línea leucémica K562.....	34

Niveles de ROS en la línea leucémica U937 .....	41
<b>Comparación de la producción de ROS intracelulares cuando se utilizan co-tratamientos (P2Et + Doxorrubicina) respecto a los tratamientos individuales P2Et y Doxorrubicina en la línea celular K562.....</b>	<b>48</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>54</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>55</b>

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1.** Caracterización inmunofenotípica de la línea K562

**Figura 2.** Caracterización inmunofenotípica de la línea U937

**Figura 3.** Ensayo de citotoxicidad (MTT) de los extractos y quimioterapéutico sobre la línea celular K562.

**Figura 4.** Ensayo de citotoxicidad (MTT) de los extractos y quimioterapéuticos sobre la línea celular U937.

**Figura 5.** Fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Anamú.

**Figura 6.** Histograma de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Anamú.

**Figura 7.** Representación de la media geométrica de fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Anamú.

**Figura 8.** Análisis del porcentaje de viabilidad de las células K562 con las diferentes concentraciones del extracto de Anamú.

**Figura 9.** Fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de P2Et.

**Figura 10.** Histograma de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de P2Et.

**Figura 11.** Representación de la media geométrica de fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de P2Et.

**Figura 12.** Análisis del porcentaje de viabilidad de las células K562 con las diferentes concentraciones del extracto de P2Et.

**Figura 13.** Fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Doxorrubicina.

**Figura 14.** Histograma de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Doxorrubicina.

**Figura 15.** Representación estadística de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Doxorrubicina.

**Figura 16.** Análisis del porcentaje de viabilidad de las células K562 con las diferentes concentraciones de Doxorubicina.

**Figura 17.** Fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Anamú.

**Figura 18.** Histograma de la fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Anamú.

**Figura 19.** Representación estadística de la fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Anamú.

**Figura 20.** Análisis del porcentaje de viabilidad de las células U937 con las diferentes concentraciones del extracto de Anamú.

**Figura 21.** Fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de P2Et.

**Figura 22.** Histograma de la fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de P2Et.

**Figura 23.** Representación estadística de la fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de P2Et.

**Figura 24.** Análisis del porcentaje de viabilidad de las células U937 con las diferentes concentraciones del extracto de P2Et.

**Figura 25.** Fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Doxorubicina.

**Figura 26.** Histograma de la fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Doxorubicina.

**Figura 27.** Representación estadística de la fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Doxorubicina.

**Figura 28.** Análisis del porcentaje de viabilidad de las células U937 con las diferentes concentraciones de Doxorubicina.

**Figura 29.** Histograma de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA con la combinación de Doxorubicina  $IC_{50}$  + P2Et  $IC_{50}$ .

**Figura 30.** Representación estadística de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA con la combinación de Doxorubicina  $IC_{50}$  + P2Et  $IC_{50}$ .

**Figura 31.** Análisis del porcentaje de viabilidad de las células K562 con la combinación Doxorubicina  $IC_{50}$  + P2Et  $IC_{50}$ .

**Figura 32.** Histograma de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA con la combinación de Doxorrubicina  $IC_{50/10}$  + P2Et  $IC_{50}$ .

**Figura 33.** Representación estadística de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA con la combinación de Doxorrubicina  $IC_{50/10}$  + P2Et  $IC_{50}$ .

**Figura 34.** Análisis del porcentaje de viabilidad de las células K562 con la combinación Doxorrubicina  $IC_{50/10}$  + P2Et  $IC_{50}$ .

## LISTA DE TABLAS

**Tabla 1.** IC<sub>50</sub> de los extractos y quimioterapéutico sobre la línea K562.

**Tabla 2.** IC<sub>50</sub> de los extractos y quimioterapéutico sobre la línea U937.

## ABREVIATURAS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ATO: Trióxido de Arsénico

CO<sub>2</sub>: Dióxido de Carbono

DCFDA: 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein Diacetate.

FDA: Administración de Alimentos y Medicamentos de EE. UU

GSH: Glutati6n

HO: Hemo Oxigenasa

HTLV: El Virus Linfotr6pico de C6lulas T Humanas

LA: Leucemia Aguda

LLA: Leucemia Linfoide Aguda

LMA: Leucemia Mieloide Aguda

MO: M6dula 6sea

OMS: Organizaci6n Mundial de la Salud

PRX: Peroxirredoxina

ROS: Especies Reactivas de Ox6geno

SMD: S6ndrome Mielodispl6sico

SOD: S6per 6xido Dismutasa

TRX: Tiorreoxina

VEB: Virus de Epstein-Barr

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

XO: Xantina oxidasa

## RESUMEN

Las leucemias agudas tanto mieloides como linfoides, pueden tener diversas alteraciones metabólicas como la producción de radicales libres de oxígeno (ROS) y genéticas que impactan en la biología, agresividad, resistencia y persistencia tumoral. Actualmente el tratamiento de elección para las leucemias se fundamenta principalmente en la quimioterapia con el uso de múltiples drogas dirigidas contra distintos blancos celulares, pero su eficacia se ve afectada por las propiedades biológicas intrínsecas de los tumores, las características del microambiente tumoral y en relación al tratamiento con la alta toxicidad y por la generación de mecanismos de resistencia a las drogas por parte de las células tumorales. El grupo de Inmunobiología y Biología Celular de la Pontificia Universidad Javeriana ha venido trabajando por más de 10 años con los extractos de las plantas *Petiveria alliacea* y *Caesalpinia spinosa*, como alternativa terapéutica prometedora contra el cáncer. Los extractos derivados de estas plantas que son usadas en la medicina tradicional, tienen propiedades anti-tumorales, inmunomoduladoras y pueden tener un efecto sobre los ROS en las células tumorales, incluyendo células de origen leucémico. Estos antecedentes son de gran relevancia puesto que las células leucémicas pueden ser resistentes a los tratamientos convencionales y esta resistencia puede estar o no relacionada con la producción de ROS. En el presente trabajo experimental evaluó la relación existente entre la producción de ROS intracelular y la respuesta *in vitro*, al tratamiento con Doxorrubicina y con los extractos de *Petiveria alliacea* y *Caesalpinia spinosa*, utilizando las líneas celulares derivadas de leucemia mieloide aguda K562 y U937 .

## INTRODUCCIÓN

El cáncer es un conjunto de enfermedades en las que se observa un proceso descontrolado de división, proliferación y diferenciación celular. Las células tumorales son portadoras de alteraciones genéticas y múltiples cambios moleculares que contribuyen a la heterogeneidad biológica de estas patologías, incluyendo la capacidad de invasión, extravasación, metástasis y apoptosis, entre otras funciones celulares.

Se han descrito más de 100 tipos distintos de cáncer, entre los cuales se encuentran las leucemias agudas que corresponden a tumores de origen hematopoyético con gran heterogeneidad biológica, originados a partir de células madre en la médula ósea y con capacidad de invadir órganos extra medulares que incluyen la sangre periférica, el timo, los ganglios linfáticos, el bazo y el hígado, entre otros. En Colombia, específicamente para el periodo comprendido entre 2007-2011, la leucemia fue una de las principales causas de muerte en pacientes pediátricos y en adultos, aunque la incidencia, prevalencia y mortalidad de esta enfermedad en adultos no es tan alta como en la población infantil. Sin embargo, para los dos grupos de edad el pronóstico de esta varía de acuerdo a las características biológicas de la enfermedad y en general la supervivencia especialmente para pacientes adultos es menor a 5 años.

Actualmente el tratamiento de elección para las leucemias se fundamenta principalmente en la quimioterapia con el uso de múltiples drogas, pero su eficacia se ve afectada por las propiedades biológicas intrínsecas de los tumores, las características del microambiente tumoral y en relación al tratamiento con la alta toxicidad y la generación de mecanismos de resistencia. Estas características en conjunto, influyen de manera importante en la falta de respuesta completa de los pacientes, con la persistencia de clonas residuales tumorales resistentes al tratamiento (enfermedad mínima residual positiva). La resistencia al tratamiento por parte de las células tumorales y su influencia en la calidad de vida de los pacientes, constituye una de las motivaciones principales para investigar sobre el desarrollo de nuevos medicamentos y terapias complementarias que superen estas características asociadas a un peor pronóstico de la enfermedad.

El grupo de investigación de Inmunobiología y Biología Celular de la Pontificia Universidad Javeriana ha venido trabajando por más de 10 años con los extractos de las plantas *Petiveria alliacea* y *Caesalpinia spinosa*, como alternativa terapéutica prometedora contra el cáncer. Los extractos derivados de estas plantas que son usadas en la medicina tradicional, tienen propiedades anti-tumorales, inmunomoduladoras y pueden tener un efecto sobre las especies reactivas de oxígeno (ROS) en las células tumorales, incluyendo células de origen leucémico. Estos antecedentes son de gran relevancia puesto que las células leucémicas exhiben en algunas ocasiones resistencia a los tratamientos convencionales y esta resistencia puede estar o no relacionada con la producción de ROS. A nivel funcional, se ha descrito que ROS desempeñan papeles tanto positivos como negativos en la proliferación y supervivencia de una célula; esta naturaleza dual permite a las células leucémicas promover el crecimiento, la supervivencia y la inestabilidad genómica. En el presente trabajo experimental se emplearon como modelo las líneas celulares derivadas de leucemia mieloide aguda: K562 (obtenida de un paciente con leucemia mieloide crónica con evolución a crisis blástica mieloide-eritroleucemia) y U937 (leucemia mieloide aguda monocítica humana), en las cuales se estudió la actividad citotóxica de los extractos y su papel en la modulación de los niveles de radicales libres de oxígeno (ROS).

## JUSTIFICACION Y PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las leucemias agudas tanto mieloides como linfoides, pueden tener diversas alteraciones metabólicas como la producción de ROS y alteraciones genéticas que impactan en la agresividad, resistencia y persistencia tumoral (Suganuma K, 2010). La regulación de estas propiedades puede aumentar la sensibilidad de las células tumorales a los tratamientos convencionales (Hay, N, 2016), por lo tanto, la búsqueda de reguladores metabólicos con efectos citotóxicos sobre las células tumorales es un tema de amplio interés en la terapia actual en leucemias. Las vías pro y antioxidantes pueden contribuir a la falta de respuesta o resistencia a los agentes terapéuticos, y pueden promover la proliferación y supervivencia de las células leucémicas, dependiendo del contexto y el tipo de célula, por lo tanto una mejor comprensión del entorno redox en las células leucémicas conducirá a un beneficio para los pacientes. Los extractos de plantas obtenidos de *Petiveria alliacea* y *Caesalpinia spinosa*, presentan un efecto antitumoral y modulador sobre la producción de ROS en líneas celulares de melanoma y cáncer de seno así como en líneas de células leucémicas (Castañeda, D, 2011). El extracto de *Petiveria alliacea* tiene un efecto citotóxico en varias líneas de células tumorales incluyendo las leucémicas, tiene la capacidad de retardar el ciclo celular, actividad antimitótica, altera el metabolismo glicolítico y tiene un efecto inmunomodulador (Muños,I, 2011) Por otra parte, el extracto de *Caesalpinia spinosa*, tiene una actividad antimicrobiana y antioxidante, dado que regula la producción de ROS intracelular (Hernandez,J, 2014). Un tercer elemento importante, es el hecho que en resultados preliminares del grupo se ha observado que las líneas de células leucémicas descritas previamente, responden en forma diferencial a ambos extractos, siendo algunos subtipos de leucemia más sensibles y otros más resistentes, pero la razón biológica de estas diferencias aún es desconocida (Aldana,E, 2016).

## MARCO TEORICO

### Leucemias Agudas (LA)

Son neoplasias originadas a partir de células madre hematopoyéticas que afectan distintos linajes celulares y se caracterizan por la infiltración tumoral de blástos en la médula ósea (MO), el timo, los ganglios linfáticos, el bazo y otros tejidos que incluyen además la sangre periférica. Existen dos tipos principales de leucemias agudas: leucemia linfoblástica aguda (LLA) y leucemia mieloide aguda (LMA). Cuando estas células tumorales proliferan y se expanden, alteran la diferenciación de otras líneas celulares en la MO, conduciendo a distintos grados de citopenia como anemia, trombocitopenia y granulocitopenia. Debido a que las células tumorales tienen la capacidad de migrar a nivel extra medular, infiltran distintos órganos, como el hígado, el bazo, los ganglios linfáticos, el sistema nervioso central, los riñones y las gónadas, lo cual se asocia a un peor pronóstico de la enfermedad (Rosada, J, 2007).

Aunque el proceso de leucemogénesis no está aclarado por completo, en los últimos años se han logrado grandes avances a cerca del estudio de los mecanismos que influyen en la transformación maligna de las células hematopoyéticas; entre ellos destacan los genéticos y moleculares, las inmunodeficiencias, ciertos factores ambientales y los virus.

Varios hechos vinculan a los factores genéticos en el desarrollo de las leucemias agudas; los pacientes que cursan con enfermedades portadoras de anormalidades cromosómicas tanto numéricas como estructurales como las descritas en pacientes con síndrome de Down, Klinefelter, Bloom y de Fanconi, tienen mayor riesgo de desarrollar leucemia. También, se ha visto una mayor predisposición a presentar leucemias en pacientes con inmunodeficiencias primarias, entre las que destacan la ataxia-telangiectasia, el síndrome de Wiskott Aldrich, la agammaglobulinemia y el síndrome de Schwachmany también en pacientes con inmunodeficiencias secundarias (Sanchez,L, 2011).

Se han reportado distintas causas de leucemias, y dentro de estas, eventos genéticos iniciadores del tumor como eventos genéticos secundarios que conducen a la evolución clonal y progresión de la enfermedad son claves. Dentro de los principales mecanismos se encuentra la alteración de protooncogenes celulares a oncogenes mediante

mecanismos biológicos que incluyen las mutaciones puntuales activantes de función, reordenamientos genéticos, las inserciones y las translocaciones cromosómicas (Instituto Nacional de Cáncer, 2018). De forma particular en las LMA, se han descrito múltiples tipos de alteraciones genéticas que influyen de forma diferencial en la biología, evolución y pronóstico de la enfermedad e incluye mutaciones en genes reguladores de distintas rutas de señalización celular como los protooncogenes de la familia RAS (N-ras, K-ras y H-ras), BCL-2, c-MYC, FLT3, CD117 (c-KIT), JAK2, NPM1, SRC quinasas, entre otros. Así mismo en condiciones pre-leucémicas como los síndromes mielodisplásicos, también están alterados estos genes en conjunto con otras anomalías cromosómicas como 5q-, 7q-, 20q-, etc. Lo que conduce a la evolución de estas patologías hacia LMA. Otro mecanismo de leucemogénesis, es la alteración de los genes supresores de tumor como P53 y RB (Lozano, J., 2002). También hay múltiples translocaciones cromosómicas que se asocian de forma positiva o negativa con el pronóstico de la enfermedad: t(15;17) (PML-RAR $\alpha$ ); t(8;21) (TRNX1-ETO); t(16;16) (CBFB-MYH11) y otros reordenamientos en genes que regulan diferenciación y autorenovación (MLL, NPM1), entre otros.

Ciertos factores ambientales también se vinculan con la leucemogénesis un ejemplo claro de ellos son las radiaciones ionizantes. De hecho, después de las explosiones atómicas de Hiroshima y Nagasaki se registró una alta incidencia de leucemia en la población afectada (La ciencia es noticia , 2018). Los fármacos o compuestos químicos como los benzoles, pesticidas, inmunosupresores, citostáticos y los agentes alquilantes también están relacionados con el desarrollo de estas hemopatías malignas. Infecciones con virus oncogénicos como VEB se han visto asociadas al desarrollo de leucemias de origen B y linfomas B agresivos como el linfoma de Burkitt y HTLV-I se asocia al desarrollo de la leucemia-linfoma T del adulto. La inmunosupresión causada VIH también puede conducir al desarrollo de neoplasias hematopoyéticas debido a la activación crónica del sistema inmune y la activación de virus oncogénicos como el VEB (Medina, E., 2018).

Según la OMS se considera una LMA cuando hay 20% o más blástos en sangre periférica o médula ósea junto con las características morfológicas, citoquímicas e inmunofenotípicas que definen el subtipo de leucemia. La LMA puede ocurrir de novo o por evolución de SMD (Fernández N, 2000). La LMA es más frecuente en adultos mayores, a comparación de los adultos jóvenes o niños, sin embargo, en la infancia es

donde suele ser comúnmente diagnosticada. El riesgo de presentar LMA aumenta 10 veces más desde los 30 a 34 años (1 caso por cada 100.000 personas), a los 65 a 69 años (10 casos por cada 100.000 personas), a medida que aumenta la edad, también la incidencia (Instituto Nacional de Salud, 2012).

### Producción de ROS en Leucemia

Las ROS son moléculas químicamente activas que se producen de manera natural como subproducto del metabolismo normal del oxígeno entre ellas están el anión superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), radical hidroxilo (OH) y óxido nítrico (NO). Estas contienen radicales libres y están involucrados en la modulación de diversas funciones celulares como señalización celular y la homeostasis; el equilibrio entre la generación de ROS y la actividad de las enzimas antioxidantes se regula cuidadosamente en todas las células. Mantener este equilibrio es importante para las células de leucemia, las cuales contienen niveles relativamente elevados de ROS debido a alteraciones en las vías pro y antioxidantes. La producción exacerbada de ROS contribuyen a la inestabilidad genómica, la supervivencia, la señalización del crecimiento y la motilidad (Finkel T, 2003). A partir de estudios realizados sobre la biología redox, ha surgido un paradigma donde los niveles bajos de ROS son mensajeros secundarios importantes y facilitan una serie de vías de señalización que involucran quinasas, fosfatasa y diversos factores de transcripción (Finkel T, 2011). Sin embargo, cuando los niveles de ROS aumentan más allá de un equilibrio manejable para la célula, el daño oxidativo se mantiene, lo que finalmente conduce a la muerte celular.

Los altos niveles de ROS promueven el daño oxidativo, como la peroxidación de lípidos, la oxidación de aminoácidos y el daño del ADN (245). Cuando esta sobreproducción de ROS se mantiene por las células leucémicas, estas secuelas pueden promover la leucemogénesis ya que el daño en el ADN producido por ROS puede promover la inestabilidad genómica, lo que lleva a nuevas mutaciones en el ADN que pueden ser ventajosas para el crecimiento y la supervivencia tumoral. Además, las células leucémicas alteran con frecuencia la expresión y la actividad de una variedad de enzimas antioxidantes (SOD, HO, GSH, TRX, PRX) que neutralizan los radicales libres a componentes moleculares menos reactivos, evitando un desequilibrio redox

potencialmente catastrófico (Mary E, 2011). También es importante mencionar que se ha encontrado que la expresión de algunos oncogenes celulares BCR/ABL, RAS, FLT3, c-MYC, se correlacionan con una mayor producción de ROS y pueden proporcionar a la célula tumoral ventajas proliferativas y de supervivencia (Bowen DT, 2005). Por ejemplo, los niveles de ROS inducidos por la ruta de señalización regulada por RAS promueven la proliferación independiente de factores de crecimiento en CMH humanas CD34+ (Yahata T, 2011). Por lo anterior los ROS desempeñan papeles tanto positivos como negativos en la proliferación y supervivencia de una célula.

Actualmente, existen terapias que producen ROS en la práctica y en ensayos clínicos que emplean el estrés oxidativo para inclinar la balanza desde el crecimiento y la supervivencia hasta la muerte celular. Las terapias estándar contra la leucemia aprobadas por la FDA incluyen antraciclinas, citarabina, vincristina y trióxido de arsénico; todos estos agentes han demostrado producir ROS en alguna capacidad y tener un efecto citotóxico efectivo sobre células leucémicas (Celik H, 2008) (Iacobini M, 2001) (Kanno S, 2004).

### *Antecedentes de *Petiveria allicea* y *Caesalpinia spinosa* en LMA*

La LMA es el tipo más común de leucemia aguda en adultos, y la quimioterapia basada en antraciclina es la principal opción para el tratamiento de esta enfermedad. A pesar de los avances en el tratamiento de LMA, el 20% de los pacientes no responden a la quimioterapia de inducción, y el 40-60% de los pacientes recaen. La mayoría de las fallas terapéuticas se deben a la resistencia celular a los fármacos antileucémicos y la eficacia se ve afectada por la alta toxicidad, lo que se manifiesta en falta de respuesta completa con detección de enfermedad mínima residual post tratamiento ( National Cancer Institute, 2018). Esta resistencia, se constituye en la motivación principal para el desarrollo de nuevos medicamentos o tratamientos coadyuvantes que reviertan la resistencia a las drogas y que tenga menos efectos tóxicos. Una alternativa que se puede contemplar es la medicina popular, la cual utiliza extractos acuosos y alcohólicos de plantas. El grupo de Inmunobiología y Biología Celular de la Pontificia Universidad Javeriana ha trabajado con extractos derivados de las plantas *Petiveria alliacea* y *Caesalpinia spinosa*, los cuales tienen propiedades antitumorales.

*Petiveria alliacea* (Anamú) pertenece a la familia de las fitolacáceas; es originaria de la selva tropical del Amazonas y se puede encontrar en otras áreas tropicales del mundo como América Central, África y en el sudeste de Estados Unidos. El extracto de anamú ha demostrado tener actividad citotóxica sobre diferentes líneas tumorales: como la de leucemia mieloide crónica con evolución a crisis blástica mieloide (K562), melanoma humano (A375) y melanoma murino (Mel-Rel). Adicionalmente se ha comprobado que *in vitro* en las células 4T1, de cáncer de seno murino, el extracto induce apoptosis con activación de la caspasa-3, fragmentación del ADN sin despolarización de la membrana mitocondrial y disminución de la capacidad de crecimiento de las colonias celulares. También, se ha observado que esta fracción induce cambios en la expresión de las enzimas glicolíticas que causan una disminución en la captación de glucosa y la producción de lactato, lo que promueve la regresión del tumor primario de seno en ratones BALB/c trasplantados con células 4T1 (Urueña C. , 2008).

*Caesalpinia spinosa* (P2Et) pertenece a la familia de las leguminosas y en Colombia es conocida bajo el nombre de Dividivi. Se encuentra en los Andes desde Venezuela hasta el norte de Chile y en Colombia se encuentra presente en las cordilleras Oriental y Central. El extracto de P2Et tiene actividad antimicrobiana, antioxidante y antitumoral al parecer, debido a la presencia de taninos . Al indagar los mecanismos biológicos para el extracto P2Et se encuentra que induce despolarización de la mitocondria, activación de la caspasa-3 y disminución de la clonogenicidad en la línea tumoral K562, y también se reportó que cuando se pre-tratan las células con P2Et mejora la sensibilidad a otros fármacos anti-tumorales como la Doxorubicina (Castañeda D, 2012). También se ha demostrado que este extracto tiene actividad antitumoral *in vivo* en el modelo murino de cáncer de seno 4T1, donde se observó una disminución en el tamaño de los tumores primarios, el número de focos de metastásis en bazo, hígado y pulmón, y reducción de la reacción leucemoide neutrofílica. Adicionalmente se encontró que modula la producción de citocinas por parte de las células tumorales, lo que lleva a pensar que ejerce una posible que modulación en el microambiente tumoral (Urueña C, 2013).

## Efecto sinérgico en la combinación de fármacos

La combinación de fármacos se ha utilizado en la investigación como una alternativa de tratamiento cuando se logra un sinergismo; el cual se define como la administración de dos o más medicamentos que producen un efecto terapéutico mayor, que la suma de los efectos particulares de cada uno, pueden reducir los efectos secundarios, revertir la resistencia a los fármacos, disminuir la dosis manteniendo la eficacia y modular la inmunidad antitumoral (Sinergismo farmacológico, 2013).

Con base en lo anterior, la combinación de drogas tiene principios básicos para dirigirse a sus blancos terapéuticos: fármacos que modulan el mismo blanco celular a través de diferentes vías, fármacos que modulan diferentes blancos por la misma vía, fármacos que modulan diferentes blancos mediante vías diversas y fármacos que trabajan en redes biológicas interactuando entre múltiples genes, proteínas y vías a nivel farmacológico y farmacocinético. En caso de que la combinación sea experimental como en este trabajo, se encuentra sujeta a diferentes condiciones, como lo son: la temperatura, las líneas celulares, especies, el género, la edad, la raza, la secuencia de adición de drogas, relación de combinación de fármacos, el calendario de administración del fármaco, entre otras condiciones que definen el efecto (Xue-Qing Hu, 2016).

## OBJETIVOS

### Objetivo General

Determinar la relación entre la producción de ROS intracelular y la respuesta a los tratamientos *in vitro* de células tumorales K562 y U937 con Doxorubicina y los extractos de Anamú y P2Et.

### Objetivos Específicos

Determinar las diferencias en la sensibilidad a los tratamientos de Anamú, P2Et y Doxorubicina de dos líneas celulares leucémicas K562 y U937.

Evaluar las diferencias relacionadas con la producción de ROS intracelular respecto a los tratamientos de Anamú, P2Et y Doxorubicina en las líneas celulares leucémicas K562 y U937.

Comparar la producción de ROS intracelular cuando se utilizan co-tratamientos (P2ET + Doxorubicina) respecto a los tratamientos individuales P2Et y Doxorubicina en la línea celular K562.

## METODOLOGIA

### Líneas celulares

En el presente estudio se emplearon líneas celulares de LMA humanas: leucemia mieloide crónica en crisis blástica mieloide (K562) y Leucemia Monocítica Aguda (U937) obtenidas de la *American Type Culture Collection* (ATCC).

### Línea celular K562

Es una línea celular que corresponde a una eritroleucemia proveniente de un paciente con Leucemia Mieloide Crónica (LMC) en crisis blástica mieloide, son células que crecen en suspensión y morfológicamente y fenotípicamente corresponden a mieloblastos (Klein E, 1976). Estas, pueden desarrollar características similares a precursores de línea eritroide, granulocítica y monocítica en etapa temprana. Son blanco de células NK ya que carecen del complejo CMH requerido para inhibir la actividad de NK y no están infectadas por virus de *Epstein-Barr* u otros *Herpes virus*. (Lozzio BB, 1981)

Esta línea celular posee abundantes “*aurora quinasas*” que juegan un papel en la formación de husos, la separación de cromosomas, así como la citocinesis. Las funciones anteriormente nombradas son necesarias para la división celular, la regeneración de los tejidos, y desempeñan un papel de mantenimiento en las funciones homeostáticas. Sin embargo, la sobreabundancia de “*aurora quinasas*” permite la división celular descontrolada, lo que resulta en cáncer (Fan Yanhua, 2016).

Genéticamente entre el 90-95% de las células de LMC tienen la translocación característica t (9;22) (q34.1; q11.2). Esta translocación fusiona las secuencias del gen BCR en el cromosoma 22 con las regiones de ABL1 en el cromosoma 9 (Bartram CR, 1983). La actividad de tirosina cinasa se encuentra aumentada cuando está la proteína oncogénica Bcr-Abl; esta tirosina necesaria y suficiente para causar LMC en fase crónica a través de la activación constitutiva de varias rutas de transducción de señales que incluyen JAK / STAT (crecimiento celular y supervivencia), PI3K/AKT (crecimiento celular,

supervivencia celular e inhibición de la apoptosis) y RAS/MEK (activación de factores de transcripción como NF-KB). Inmunofenotípicamente se caracterizan por ser cyMPO- y positivas para los marcadores CD45, CD34, CD33, CD13, CD117 y CD15 (Khalidi HS, 1998) (Reid AG, 2009) (Saikia T, 1988).

### Línea celular U937

Es una línea celular que corresponde a una leucemia monocítica aguda (LMA), aislada de un paciente masculino de 37 años. Son células en suspensión, redondas, pequeñas, algunas pueden tener gránulos eosinófilos, vacuolas y proyecciones citoplasmáticas. (Sundström C, 1976)

Su linaje es mieloide y estas células secretan un gran número de citocinas y quimiocinas, como IL-1, IL-10, GM-CSF y TNF $\alpha$ ; adicionalmente expresan el receptor de membrana C3 y son negativas para la producción de inmunoglobulinas y para la infección por virus de Epstein-Barr. Estas células en cultivo pueden madurar y diferenciarse en respuesta a diversos estímulos, adoptando la morfología y las características de los macrófagos maduros. (Lehmann MH, 1998.)

Genéticamente no se describe ninguna anomalía cromosómica específica en este tipo de LMA. Puede tener cariotipos complejos con múltiples anormalidades estructurales, siendo la pérdida del cromosoma 5, del (5q) y la pérdida del cromosoma 7, del (7q) siendo la alteración más común. (Sundström C, 1976)

Inmunofenotípicamente, son positivas para los marcadores CD45, CD36 y CD117 y negativas para HLA-DR y CD34 y para los antígenos asociados a linaje megacariocito CD41 y CD61 (Gebreselassie D, 2006)

## Cultivos celulares

Las líneas celulares K562 y U937 fueron cultivadas en cajas de 25 cm<sup>3</sup> con medio RPMI 1640 EURO BIO suplementado con: L-glutamina (2mM), HEPES (10mM), piruvato de sodio (1Mm), glucosa (4500 mg/L), bicarbonato de sodio (1500 mg/L), Suero Fetal Bovino (SFB) (10%) y Penicilina (100  $\mu$ g/ L), a 37°C, con 5% CO<sub>2</sub>.

La densidad celular se mantuvo aproximadamente en 250.000 células /mL, una vez el cultivo celular alcanzó una confluencia cercana al 80% en un tiempo aproximado de 48 h, las células se recogieron, se centrifugaron y se realizó el recuento celular y la evaluación de la viabilidad celular con azul de tripan. Este colorante azoico se utiliza en tinciones histológicas para ensayos de viabilidad, ya que permiten diferenciar células vivas de células muertas. Las células vivas con la membrana celular intacta no se colorean debido a que la membrana celular es selectiva respecto a qué compuestos pueden atravesarla, lo cual permite realizar un recuento en cámara de Neubauer y se cuentan como muertas las células teñidas de azul y como vivas las células refringentes (Strober W, 2001).

## Caracterización inmunofenotípica de las líneas K562 y U937

El inmunofenotipo celular (IFC) se caracterizó mediante citometría de flujo, empleando anticuerpos monoclonales dirigidos contra los antígenos: CD45-FITC, CD4-PerCPCy5.5, CD34-PECy7, CD117-APC y CD14-APCCy7. Las células marcadas, se adquirieron en el citómetro de flujo FACSAria II (BDB), empleando el programa informático FACSDiva v.6.1.3 (BDB) y almacenando la información de aproximadamente 50.000 eventos totales.

La calibración diaria del equipo se realizó empleando microesferas fluorescentes (*BDB Cytometer Setup & Tracking Beads*) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Para ajustar las señales de cada fluorescencia y los voltajes de cada detector (FL-1-FL-6) se emplearon las esferas BD™ CompBeads para diferenciar apropiadamente las señales positivas y negativas, llevando a cabo la compensación del equipo. El análisis de los datos fue realizado con el programa Infinicyt™ Cytognos SL, evaluando el porcentaje de células positivas para cada molécula.

## Determinación de las diferencias en la sensibilidad a los tratamientos de Anamú, P2Et y Doxorubicina en las líneas celulares leucémicas K562 y U937 mediante la técnica de MTT

Se realizaron ensayos de citotoxicidad para hallar las IC<sub>50</sub> de los extractos de *P. alliacea* (Anamú) y *C. spinosa* (P2Et) y del quimioterapéutico Doxorubicina en las líneas celulares de leucemia: K562 y U937. Se evaluó la viabilidad a través del método MTT (3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difenil tetrazolio bromuro), el cual se basa en la conversión de MTT en cristales de formazán por las células vivas a través de la succinato deshidrogenasa, enzima que se encuentra a nivel mitocondrial. Este ensayo se usa ampliamente para medir los efectos citotóxicos *in vitro* de los fármacos sobre líneas celulares.

Para evaluar la actividad citotóxica de los extractos y el quimioterapéutico, se utilizó una placa para microtitulación de 96 pozos, fondo redondo donde se colocó una densidad celular  $1 \times 10^4$  células por pozo en medio RPMI 1640 suplementado. Se evaluó la actividad citotóxica de cada tratamiento realizando 8 diluciones seriadas utilizando concentraciones de los extractos *Anamú* y *P2Et* desde 250 µg/ml. Para la Doxorubicina, la concentración de la cual se partió fue 10 µM. Como control negativo se utilizó Etanol (diluyente de los extractos), DMSO (diluyente de Doxorubicina) y células con RPMI suplementado. Estos tratamientos fueron incubados durante 48 horas (h) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se realizó una centrifugación de la placa a 1800 rpm por 10 minutos (min), se descartó el medio, se lavó con 100 µl de PBS por pozo y se centrifugó nuevamente a 1800 rpm por 10 min. Finalmente, se descartó el PBS e inmediatamente se adicionaron 100 µl de medio RPMI 1640 sin rojo de fenol y 50 µl de MTT (1mg/ml) por pozo, con posterior incubación por 4 h a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Las placas se centrifugaron nuevamente a 1800 rpm por 10 min y se descartó el MTT. Por último, se añadieron 100 µl de DMSO y se incubó por 20 min. La absorbancia fue leída en el lector de ELISA (Multiskan FC) a 540 nm .

### Análisis Estadístico

Al final del experimento, las absorbancias encontradas fueron digitadas en el programa Excel, donde se calcularon los porcentajes de viabilidad y mortalidad. Primero se obtuvo una absorbancia que presenta el blanco sustraído, es decir que a cada densidad óptica se le ha restado el blanco; luego se tomó la absorbancia de cada tratamiento, se dividió por

el promedio de las absorbancias de cada control y se multiplico por 100 para obtener el porcentaje de viabilidad. Para calcular el porcentaje de células muertas se toma 100 menos el porcentaje de viabilidad. Posteriormente se exportaron los porcentajes de viabilidad de los tratamientos al programa GraphPad Prism 6 para realizar las gráficas de citotoxicidad y también los porcentajes mortalidad para calcular la IC<sub>50</sub> de cada tratamiento.

### Evaluación de la producción de ROS intracelular después de tratamiento con Anamú, P2Et y Doxorubicina en las líneas celulares K562 y U937 mediante Citometria de flujo.

Para la cuatificación de ROS se empleó la sonda 2,7-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA)(10µM) que cuantifica la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> celular, es de composición apolar y tiene la capacidad de atravesar la membrana plasmática. Una vez dentro de la célula es hidrolizada por la esterasas celulares a diclorofluoresceína (DCFH) que en presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se convierte en su forma fluorescente (DCF). Esta sonda, al ser oxidada por ROS, emite fluorescencia que es directamente proporcional a la cantidad de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> celular.

Para evaluar la producción de ROS en cada una de la líneas tratadas con extractos y el quimioterapéutico, se utilizó una placa 12 pozos, fondo redondo donde se colocó una densidad celular 5x10<sup>5</sup> células por pozo en medio RPMI 1640 suplementado. Se evaluó la producción de ROS de cada tratamiento utilizando las concentraciones de IC<sub>50</sub> e IC<sub>50/10</sub> de los extractos Anamú, P2Et y Doxorubicina en ambas líneas leucémicas. Como controles se utilizó Etanol (diluyente de los extractos), DMSO (diluyente de Doxorubicina), PBS (para evaluar la expresión basal de ROS). Adicionalmente para la línea K562 se evaluó la producción de ROS cuando se utilizaban co-tratamientos (Doxorubicina IC<sub>50</sub> + P2Et IC<sub>50</sub>) y (Doxorubicina IC<sub>50/10</sub> + P2Et IC<sub>50</sub>). Estos tratamientos fueron incubados durante 6 horas (h) a 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, se pasaron las células con los tratamientos a tubos de citometría, se lavó 2 veces el pellet celular con PBS 1X, centrifugando a 1800 rpm por 10 minutos. Se agregaron 500 uL de la solución de Hanz a cada tubo se incubó 40 minutos a 37°C. Se realizó un último lavado con PBS descartando el sobrenadante y se agregaron 500 uL de PBS a cada tubo para realizar la lectura en el citómetro. Para evaluar la viabilidad celular en cada ensayo, se adicionó 1 uL de yoduro de propidio (PI) a cada tubo. Las muestras se adquirieron en el citómetro de flujo FACSAria II (BDB),

empleando el programa informático FACSDiva v.6.1.3 (BDB) y almacenando la información de aproximadamente 50.000 eventos totales. El análisis de los datos fue realizado con el programa Infinicyt 2.0™ (Cytognos SL) evaluando el porcentaje de positividad para cada uno de los marcadores inmunofenotípicos evaluados.

### Análisis Estadístico

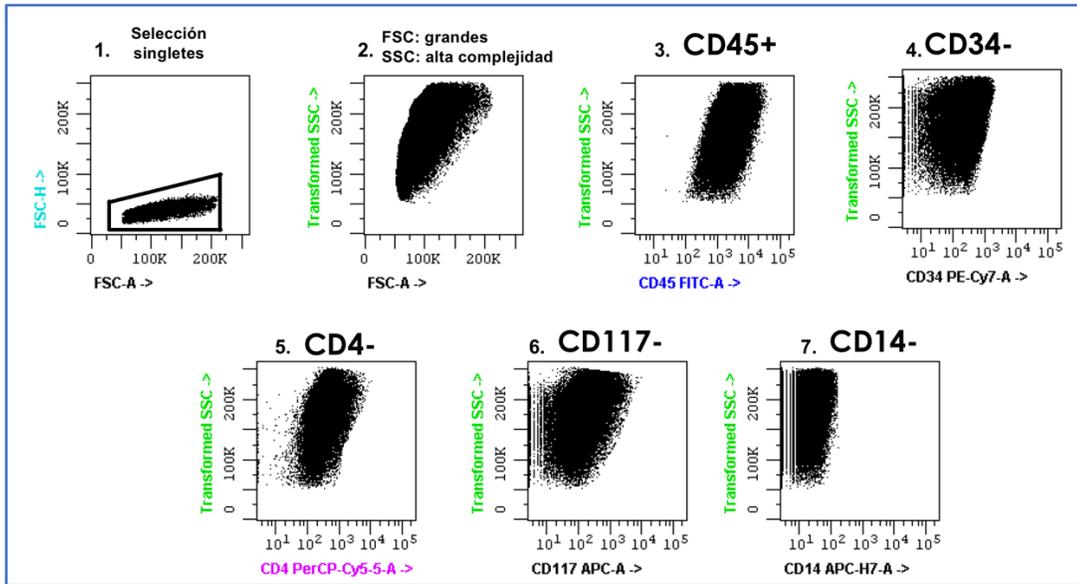
Los valores de los test son presentados como la media  $\pm$  SEM de 3 experimentos. Los datos fueron analizados con ANOVA de una y dos vías y las diferencias entre el control y los tratamientos se determinaron usando el test de tukey usando el programa GraphPad Prism 5.0. Las diferencias se consideraron significantes con  $P < 0.05$ .

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Caracterización inmunofenotípica de las líneas K562 y U937

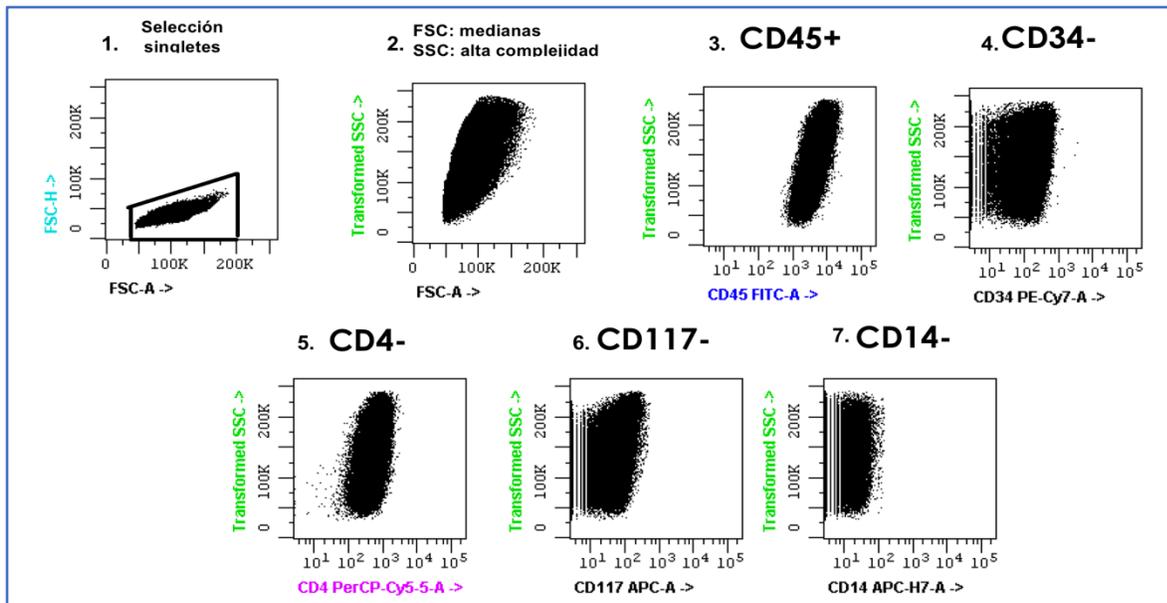
Con el propósito de confirmar el linaje hematopoyético de las dos líneas leucémicas K562 y U937 se realizó la inmunofenotipificación donde se estudiaron las proteínas de membrana expresadas por las células. Los resultados obtenidos muestran que las K562, son de tamaño grande (FSC) y de alta complejidad (SSC) y únicamente fueron positivas para el marcador CD45 (antígeno común leucocitario) (Khalidi HS, 1998) (Reid AG, 2009) (Saikia T, 1988) (Figura 1). Las células U937 son de tamaño mediano (FSC) y de alta complejidad (SSC). Al igual que las K562, únicamente expresaron el marcador CD45 (antígeno común leucocitario) (Figura 2).

Estos hallazgos confirman que ambas líneas celulares son de linaje hematopoyético. La negatividad para los demás marcadores podría deberse a que aunque las células en cultivo tienen todos los nutrientes requeridos para su correcto desarrollo, no están en un microambiente adecuado, por lo tanto este hecho puede influir en la pérdida de expresión de algunos antígenos de membrana.



**Figura 1. Caracterización inmunofenotípica de la línea K562**

En el dot plot Forward Scatter -FSC-H- vs. -FSC-A- (1) se seleccionan los singletes y en un segundo dot plot Side Scatter -SSC- vs. Forward Scatter -FSC- (2) se seleccionan las células por sus características de complejidad vs. tamaño (células de color negro). En el dot plot CD45 FITC-A vs. Side Scatter -SSC se distinguen las células positivas para CD45 (3), en el dot plot CD34 PE-Cy7-A vs. Side Scatter las células son negativas para CD34 (4), en el dot plot CD4 PE-Cy7-A vs. Side Scatter las células son negativas para CD4 (5), en el dot plot CD117 PE-Cy7-A vs. Side Scatter las células son negativas para CD117 (6) y finalmente en el dot plot CD14 PE-Cy7-A vs. Side Scatter las células son negativas para CD14 (7).



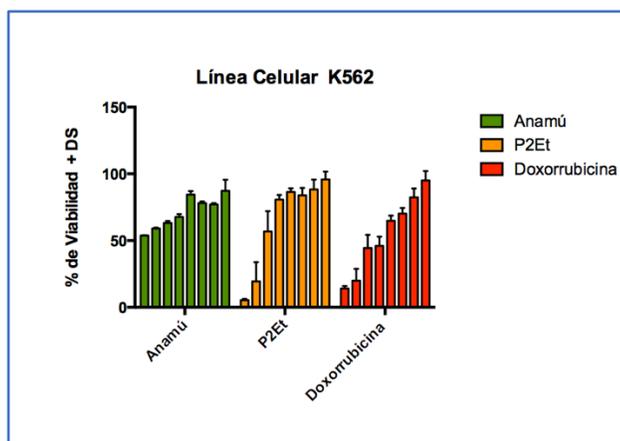
**Figura 2 . Caracterización inmunofenotípica de la línea U937**

En el dot plot Forward Scatter -FSC-H- vs. -FSC-A- (1) se seleccionan los singletes y en un segundo dot plot Side Scatter –SSC- vs. Forward Scatter –FSC- (2) se seleccionan las células por sus características de complejidad vs. tamaño (células de color negro). En el dot plot CD45 FITC-A vs. Side Scatter –SSC se distinguen las células positivas para CD45 (3), en el dot plot CD34 PE-Cy7-A vs. Side Scatter las células son negativas para CD34 (4), en el dot plot CD4 PE-Cy7-A vs. Side Scatter las células son negativas para CD4 (5), en el dot plot CD117 PE-Cy7-A vs. Side Scatter las células son negativas para CD117 (6) y finalmente en el dot plot CD14 PE-Cy7-A vs. Side Scatter las células son negativas para CD14 (7).

### Determinación de las diferencias en la sensibilidad a los tratamientos de Anamú, P2Et y Doxorubicina de dos líneas celulares leucémicas K562 y U937.

En este trabajo experimental se quiso determinar el efecto citotóxico de forma individual de los extractos de *P. alliacea* (Esperanza), *C. spinosa* (P2Et) y de Doxorubicina la cual es una antraciclina utilizada en quimioterapia de Leucemias Agudas, sobre las líneas celulares de origen leucémico: K562 y U937. La IC<sub>50</sub> para cada tratamiento se calculó con base en un solo experimento por lo tanto no fue posible calcular la desviación estándar. Esta técnica es frecuentemente utilizada para realizar estudios de citotoxicidad celular, ya que se considera precisa y rápida; pero esta precisión y reproducibilidad de los resultados se ve afectada por errores de pipeteo, no utilizar un número exacto de células en cada pozo ya que el conteo se realiza por cámara de Neubauer y la pérdida de células no adherentes en cada lavado durante el procedimiento de la técnica.

En la línea celular K562 se calculó la IC<sub>50</sub> para la Anamú, P2Et y Doxorubicina, demostrando que las células son más sensibles al tratamiento con Anamú en comparación con el P2Et; mientras que la Doxorubicina mostró una alta actividad citotóxica. Es importante mencionar que en reportes anteriores, esta línea celular ha presentado una variabilidad en relación a la sensibilidad al tratamiento con Anamú ya que los valores de IC<sub>50</sub> difieren, en ensayos pasados se obtuvo un valor IC<sub>50</sub> 75.4 ± 9,3 µg/ml (Aldana,E, 2016) y actualmente se obtuvo una IC<sub>50</sub> 52,7 µg/ml. Así mismo para el valor de IC<sub>50</sub> con el extracto de P<sub>2</sub>Et se observan divergencias ya que en reportes previos se había obtenido una IC<sub>50</sub> de 154,6 ± 21,4 µg/ml (Aldana,E, 2016) en comparación con el reporte actual donde se obtuvo una IC<sub>50</sub> de 183,8 µg/ml. La Doxorubicina es el tratamiento que refleja la mayor alta actividad citotóxica comparado con los extractos, y las concentraciones IC<sub>50</sub> reportadas son diferentes entre si IC<sub>50</sub> de 0,333 ± 0,22 µg/ml (Aldana,E, 2016) y actualmente es de 0,619 µg/ml. (Figura 3) (Tabla 1).



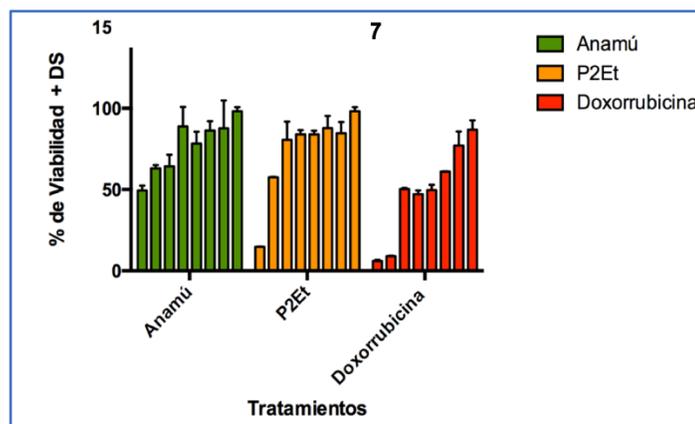
**Figura 3. Ensayo de citotoxicidad (MTT) de los extractos y quimioterapéutico sobre la línea celular K562.** Las células fueron tratadas con los extractos de *P. alliacea* (Anamú), *C. spinosa* (P2Et) a concentraciones entre 250 y 1,95 µg/ml y el quimioterapéutico utilizado en el tratamiento de Leucemia: Doxorubicina desde 10 µM hasta 0,078 µM por 48 horas. Se utilizaron como controles negativos el DMSO (diluyente de Doxorubicina), Etanol (Diluyente de los extractos) y Células con RPMI suplementado; y el efecto citotóxico fue evaluado mediante la IC<sub>50</sub> determinada por la técnica MTT. La gráfica fue realizada en el programa GraphPad Prism 6.

**Tabla 1. IC<sub>50</sub> de los extractos y quimioterapéutico sobre la línea K562.** La IC<sub>50</sub> es una medida cuantitativa que indica cual es la concentración de cada tratamiento en (µg/ml) que se necesita para inhibir a la mitad de la población de células leucémicas K562. Este valor estadístico fue calculado por medio del programa GraphPad Prism 6.

<b>Tratamientos</b>	<b>IC<sub>50</sub> K562</b>
Anamú	52,7 µg/ml
P2Et	183,8 µg/ml
Doxorrubicina	0,619 µg/ml

En la línea celular U937 se logró calcular la IC<sub>50</sub> para la Anamú, P2Et y Doxorrubicina. Demostrando que al igual que las K562, esta línea celular parece ser más sensible al Anamú en comparación con el P2Et y Doxorrubicina demuestra la mayor citotoxicidad sobre esta línea tumoral, pero es un poco más resistente comparando la sensibilidad de K562 ante este quimioterapéutico.

Todos los tratamientos demuestran al igual que la otra línea leucémica, variabilidad entre los resultados encontrados y los reportes anteriores. Para Anamú en ensayos pasados se obtuvo un valor IC<sub>50</sub> 96,14 ± 1,4 µg/ml (Aldana,E, 2016) y actualmente se obtuvo una IC<sub>50</sub> 102,4 µg/ml. Así mismo para el valor de IC<sub>50</sub> con el extracto de P<sub>2</sub>Et en reportes previos se había obtenido una IC<sub>50</sub> de 102,3 ± 14,5 µg/ml (Aldana,E, 2016) y en el reporte actual se obtuvo una IC<sub>50</sub> de 150,2 µg/ml. La IC<sub>50</sub> para Doxorrubicina anteriormente fue de 0,059 ± 0,03 µg/ml (Aldana,E, 2016) y en este ensayo se reporta un valor de 1,21 µg/ml (Figura 4) (Tabla2).



**Figura 4. Ensayo de citotoxicidad (MTT) de los extractos y quimioterapéuticos sobre la línea celular U937.** Las células fueron tratadas con los extractos de *P. alliacea* (Anamú), *C. spinosa* (P2Et) a concentraciones entre 250 y 1,95  $\mu\text{g/ml}$  y el quimioterapéutico utilizado en el tratamiento de leucemia: Doxorubicina desde 10  $\mu\text{M}$  hasta 0,078  $\mu\text{M}$  por 48 horas. Se utilizaron como controles negativos el DMSO (diluyente de Doxorubicina), Etanol (Diluyente de los extractos) y Células con RPMI suplementado; y el efecto citotóxico fue evaluado mediante la  $\text{IC}_{50}$  determinada por la técnica MTT. La gráfica fue realizada en el programa GraphPad Prism 6.

**Tabla 2.  $\text{IC}_{50}$  de los extractos y quimioterapéutico sobre la línea U937.** La  $\text{IC}_{50}$  es una medida cuantitativa que indica cual es la concentración de cada tratamiento en ( $\mu\text{g/ml}$ ) que se necesita para inhibir a la mitad de la población de células leucémicas U937. Este valor estadístico fue calculado por medio del programa GraphPad Prism 6.

Tratamientos	$\text{IC}_{50}$ U937
Anamú	102,4 $\mu\text{g/ml}$
P2Et	150,2 $\mu\text{g/ml}$
Doxorubicina	1,21 $\mu\text{g/ml}$

Evaluación de las diferencias relacionadas con la producción de ROS intracelular respecto a los tratamientos de Anamú, P2Et y Doxorubicina en las líneas celulares leucémicas K562 y U937.

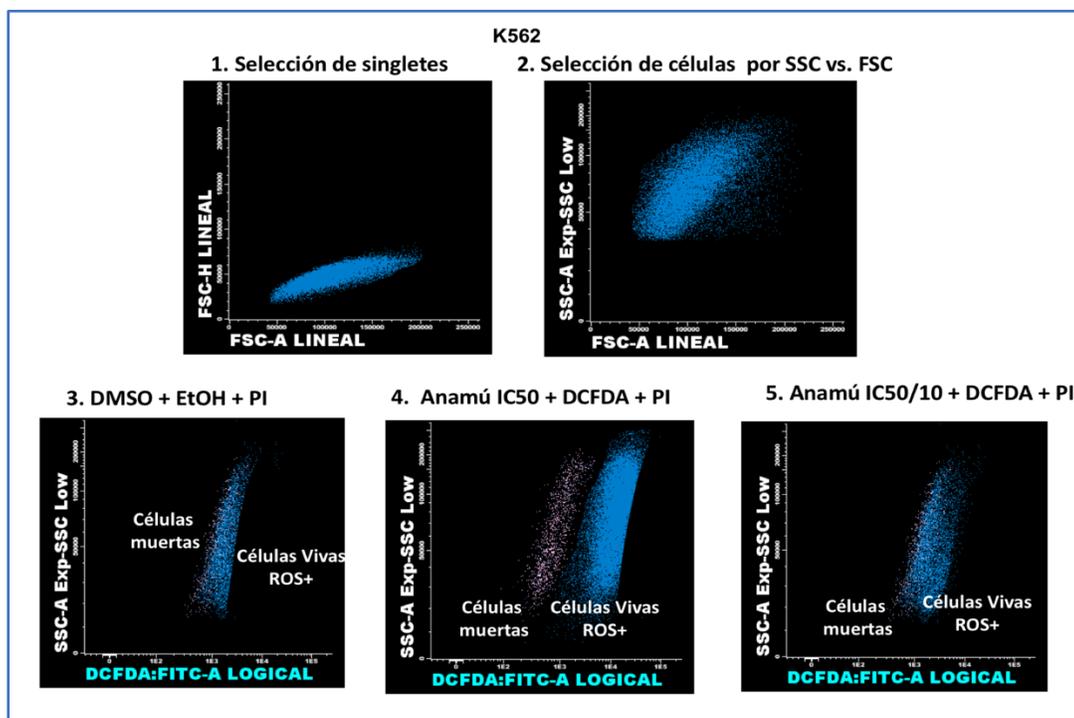
Con el fin de determinar la capacidad de los extractos para modular los niveles intracelulares de ROS y establecer las diferencias entre cada tratamiento utilizado, se cultivaron las células en presencia de los tratamientos durante 6 horas y posteriormente se pusieron las células tratadas con la sonda fluorescente DCFDA, para ser evaluados mediante citometría de flujo. Esta sonda se ha utilizado previamente como una medida sensible, que cuantifica ROS intracelulares, el nivel de fluorescencia es directamente

proporcional a la cantidad de ROS intracelular que tiene la célula. La estrategia de análisis de los niveles de ROS mediante citometría de flujo, está representada en la Figura 5.

## Análisis de ROS en la línea leucémica K562

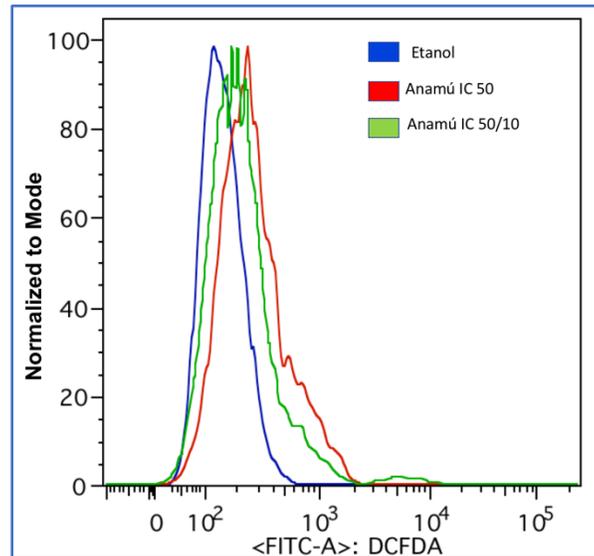
### Tratamiento con Anamú

Las concentraciones utilizadas en el tratamiento con Anamú fueron la  $IC_{50}$  y la  $IC_{50/10}$ , y se utilizó como control las células tratadas con el diluyente del extracto que era el Etanol. Los resultados muestran que los niveles de ROS aumentaron con las diferentes concentraciones de Anamú respecto a los niveles basales; la concentración que tiene la capacidad de inducir mayores niveles significativos de ROS es la de Anamú  $IC_{50}$ , respecto en relación a la concentración Anamú  $IC_{50/10}$  (Figuras 5-7). Adicionalmente se observó que el extracto de Anamú en las dos concentraciones utilizadas, tiene un efecto citotóxico en un tiempo de 6 h, con reducción de la viabilidad celular respecto al basal pero entre las dos concentraciones de Anamú no hay diferencias significativas (Figura 8).

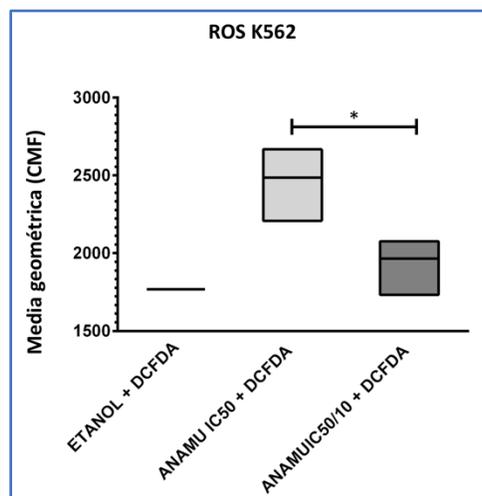


**Figura 5. Fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Anamú.** En el dot plot Forward Scatter - FSC-H- vs. -FSC-A- (1) se seleccionan los singletes y en un segundo dot plot Side Scatter

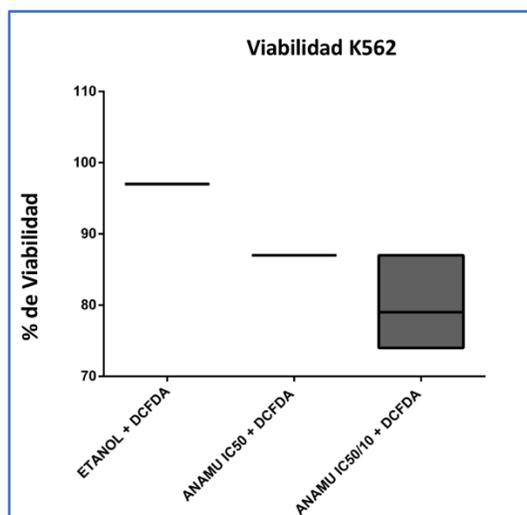
-SSC- vs. Forward Scatter -FSC- (2) se seleccionan las células por sus características de complejidad vs. tamaño (células de color azul). En el dot plot (3) se distinguen la fluorescencia basal de las células para ROS con el control Etanol, en el dot plot (4) se distinguen la fluorescencia de las células para ROS con el tratamiento Anamú IC<sub>50</sub>, en el dot plot (5) se distinguen la fluorescencia de las células para ROS con el tratamiento Anamú IC<sub>50/10</sub>.



**Figura 6. Histograma de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Anamú.** Los histogramas muestran que los extractos de Anamú a las concentraciones empleadas, inducen mayores niveles de expresión de ROS respecto al etanol. Los tratamientos se distinguen con diferentes colores: Etanol (azul), Anamú IC<sub>50</sub> (rojo) y Anamú IC<sub>50/10</sub> (Verde).



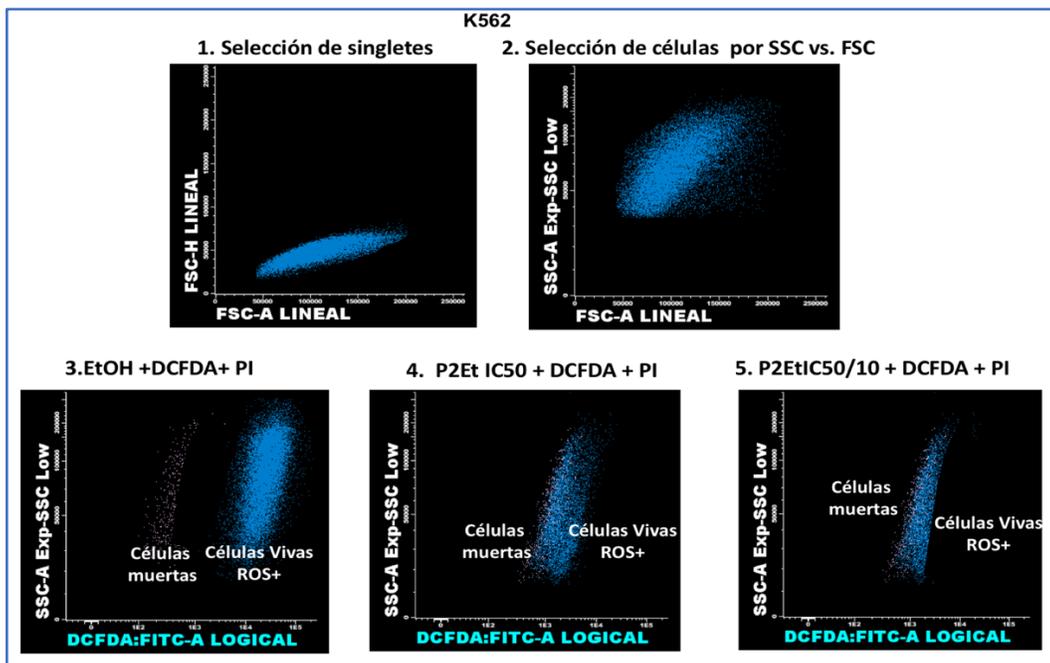
**Figura 7. Representación de la media geométrica de fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Anamú.** La figura muestra que hay diferencias en la producción de ROS al comparar Anamú IC<sub>50</sub> con Anamú IC<sub>50/10</sub> (p=0,0162).



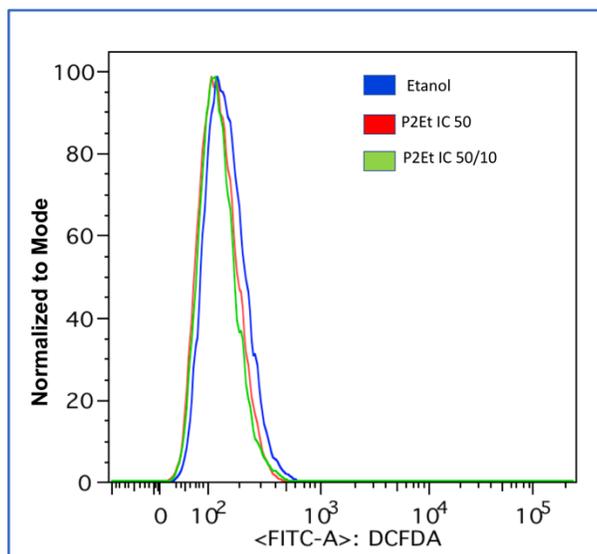
**Figura 8. Análisis del porcentaje de viabilidad de las células K562 con las diferentes concentraciones del extracto de Anamú.** La figura muestra que la viabilidad celular no difiere entre las dos concentraciones de Anamú empleadas.

#### *Tratamiento con P2Et*

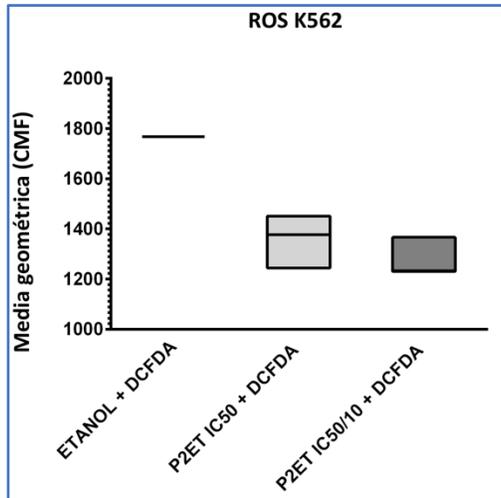
Las concentraciones utilizadas en el tratamiento con P2Et fueron la IC<sub>50</sub> y la IC<sub>50/10</sub>, y se utilizó como control las células tratadas con el diluyente del extracto que es el Etanol. Se observa que los niveles de ROS disminuyen con las diferentes concentraciones de P2Et respecto a los niveles basales, aunque al comparar los niveles de ROS entre las dos concentraciones de P2Et empleadas no hay diferencias significativas (Figuras 9-11). Adicionalmente se observa que el extracto de P2Et no tiene un efecto citotóxico significativo a las 6 h de cultivo (Figura 12).



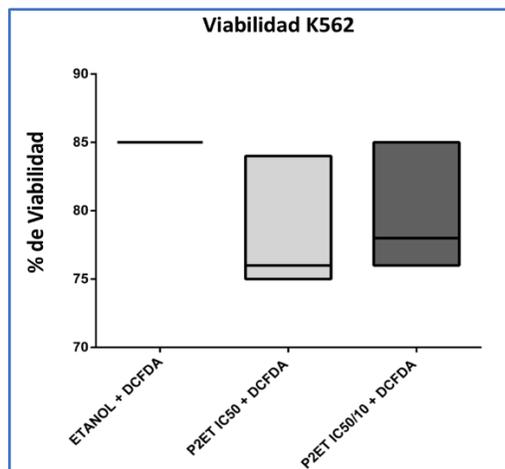
**Figura 9.** Fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de P2Et. En el dot plot Forward Scatter -FSC-H- vs. -FSC-A- (1) se seleccionan los singletes y en un segundo dot plot Side Scatter –SSC- vs. Forward Scatter –FSC- (2) se seleccionan las células por sus características de complejidad vs. tamaño (células de color azul). En el dot plot (3) se distinguen la fluorescencia basal de las células para ROS con el control Etanol, en el dot plot (4) se distinguen la fluorescencia de las células para ROS con el tratamiento P2Et IC<sub>50</sub>, en el dot plot (5) se distinguen la fluorescencia de las células para ROS con el tratamiento P2Et IC<sub>50/10</sub>.



**Figura 10.** Histograma de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de P2Et. Los histogramas muestran que no hay diferencias en los niveles de expresión de ROS respecto al etanol. Los tratamientos se distinguen con diferentes colores: Etanol (azul), P2Et IC<sub>50</sub> (rojo) y P2Et IC<sub>50/10</sub> (Verde).



**Figura 11. Representación de la media geométrica de fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de P2Et.** La figura muestra que no hay diferencias en la producción de ROS al comparar P2Et IC<sub>50</sub> con P2Et IC<sub>50/10</sub>.

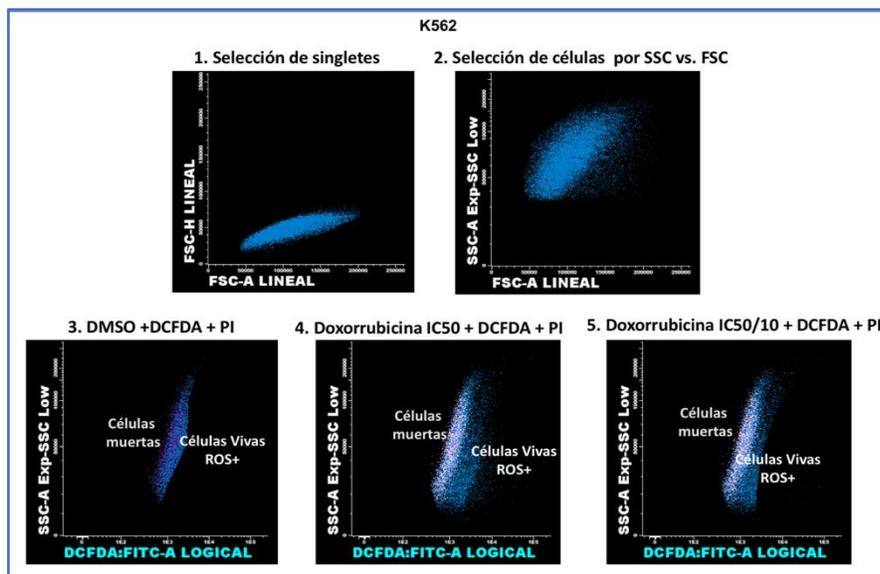


**Figura 12. Análisis del porcentaje de viabilidad de las células K562 con las diferentes concentraciones del extracto de P2Et.** La figura muestra que la viabilidad celular disminuye entre las dos concentraciones de P2Et empleada respecto al control empleado.

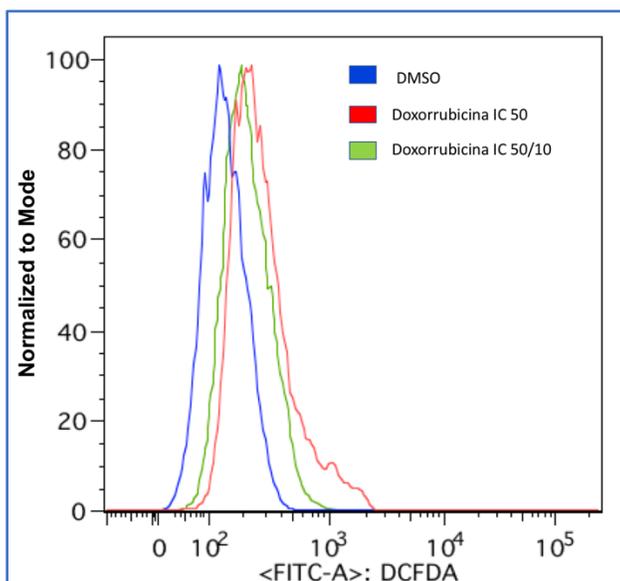
### *Tratamiento con Doxorrubicina*

Las concentraciones utilizadas en el tratamiento con Doxorrubicina fueron la IC<sub>50</sub> y la IC<sub>50/10</sub>, y se utilizó como control las células tratadas con el diluyente del quimioterapéutico que es el DMSO. Se observa que los niveles de ROS aumentan con las diferentes concentraciones de Doxorrubicina respecto a los niveles basales y la concentración que

aumenta más los niveles de ROS es Doxorubicina IC<sub>50</sub>, aunque la diferencia no es estadísticamente significativa (Figuras 13-15). Adicionalmente se observa que el quimioterapéutico reduce la viabilidad celular en las dos concentraciones empleadas, pero al comparar la viabilidad entre estas dos concentraciones no hay diferencias significativas (Figura 16).

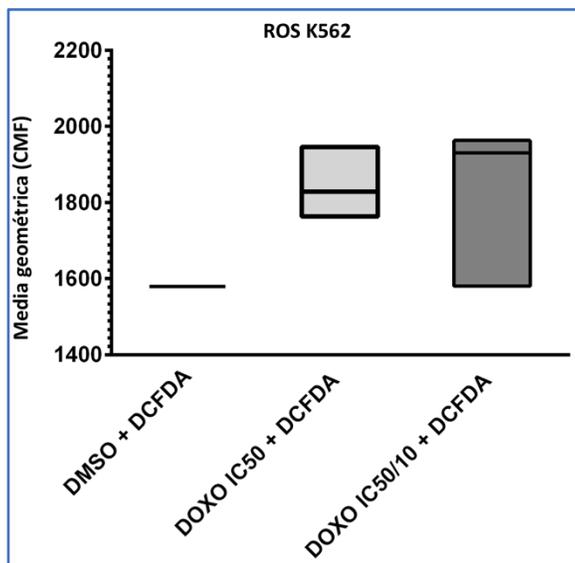


**Figura 13. Fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Doxorubicina.** En el dot plot Forward Scatter -FSC-H- vs. -FSC-A- (1) se seleccionan los singletes y en un segundo dot plot Side Scatter –SSC- vs. Forward Scatter –FSC- (2) se seleccionan las células por sus características de complejidad vs. tamaño (células de color azul). En el dot plot (3) se distinguen la fluorescencia basal de las células para ROS con el control DMSO, en el dot plot (4) se distinguen la fluorescencia de las células para ROS con el tratamiento Doxorubicina IC<sub>50</sub>, en el dot plot (5) se distinguen la fluorescencia de las células para ROS con el tratamiento Doxorubicina IC<sub>50</sub>/10.

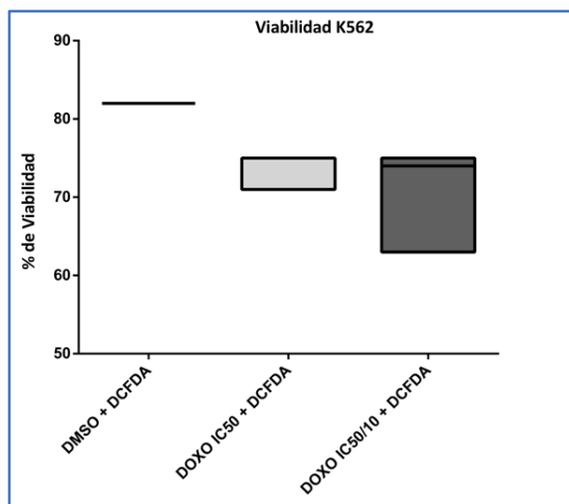


**Figura 14. Histograma de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Doxorubicina.**

Los histogramas muestran mayores niveles de expresión de ROS de las células tratadas con Doxorubicina respecto al DMSO. Los tratamientos se distinguen con diferentes colores: DMSO (azul), Doxorubicina IC<sub>50</sub> (rojo) y Doxorubicina IC<sub>50/10</sub> (Verde).



**Figura 15. Representación estadística de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Doxorubicina.** La figura muestra que hay mayores niveles de ROS al tratar las células con Doxorubicina, pero al comparar la IC<sub>50</sub> con la IC<sub>50/10</sub> no hay diferencias significativas.

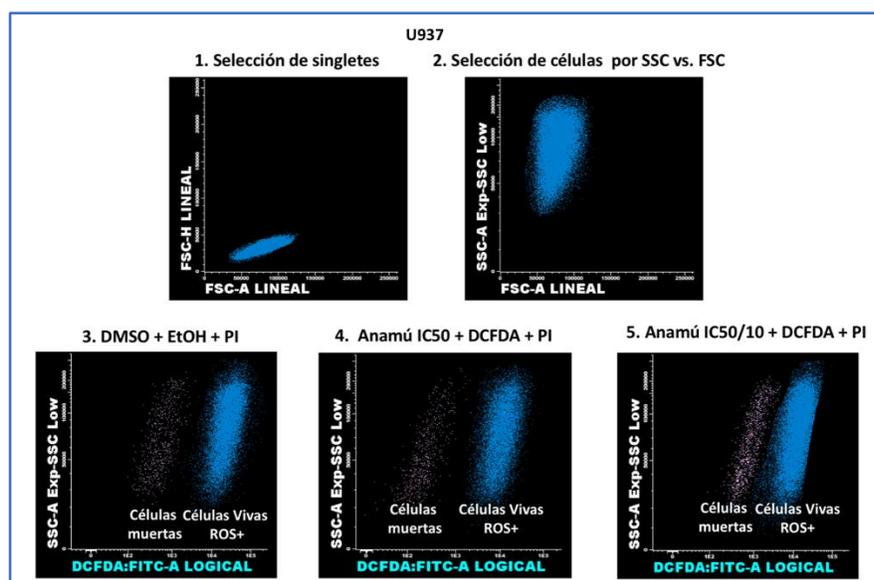


**Figura 16. Análisis del porcentaje de viabilidad de las células K562 con las diferentes concentraciones de Doxorrubicina.** La figura muestra que la viabilidad celular no difiere entre las dos concentraciones de Doxorrubicina empleadas.

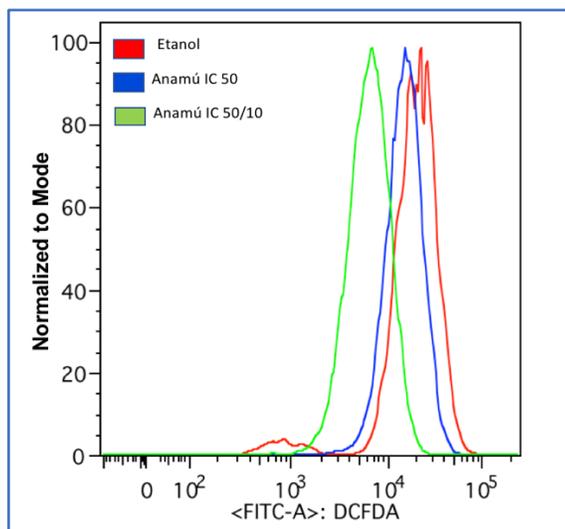
Niveles de ROS en la línea leucémica U937

### *Tratamiento con Anamú*

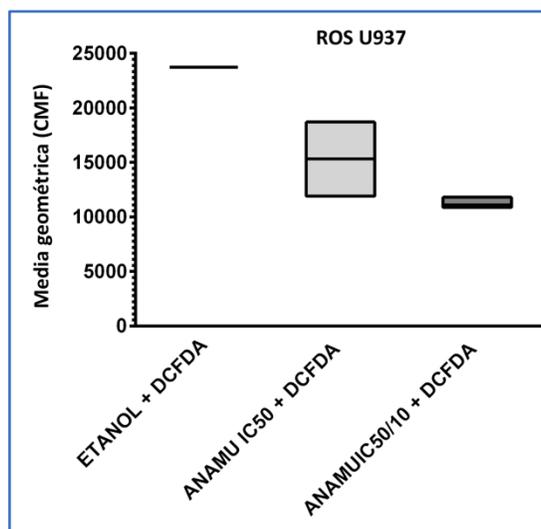
Las concentraciones utilizadas en el tratamiento con Anamú fueron la IC<sub>50</sub> y la IC<sub>50/10</sub>, y se utilizó como control las células tratadas con el diluyente del extracto que es el Etanol. Se observa que los niveles de ROS disminuyen con las diferentes concentraciones de Anamú respecto a los niveles basales elevados que tiene la línea U937 (Figuras 17-19). Adicionalmente se observa que el extracto de Anamú no tiene un efecto citotóxico significativo a las 6 h de incubación (Figura 20).



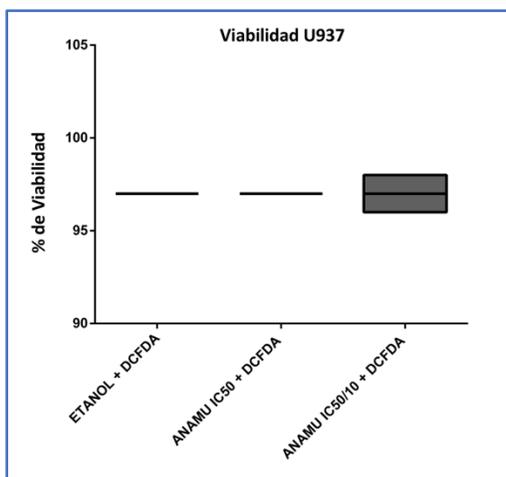
**Figura 17. Fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Anamú.** En el dot plot Forward Scatter -FSC-H- vs. -FSC-A- (1) se seleccionan los singletes y en un segundo dot plot Side Scatter -SSC- vs. Forward Scatter -FSC- (2) se seleccionan las células por sus características de complejidad vs. tamaño (células de color azul). En el dot plot (3) se distinguen la fluorescencia basal de las células para ROS con el control Etanol, en el dot plot (4) se distinguen la fluorescencia de las células para ROS con el tratamiento Anamú IC<sub>50</sub>, en el dot plot (5) se distinguen la fluorescencia de las células para ROS con el tratamiento Anamú IC<sub>50/10</sub>.



**Figura 18. Histograma de la fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Anamú.** Los histogramas muestran menores niveles de expresión de ROS de las células tratadas con Anamú en las dos concentraciones empleadas respecto al etanol. Los tratamientos se distinguen con diferentes colores: Etanol (rojo), Anamú IC<sub>50</sub> (azul) y Anamú IC<sub>50/10</sub> (Verde).



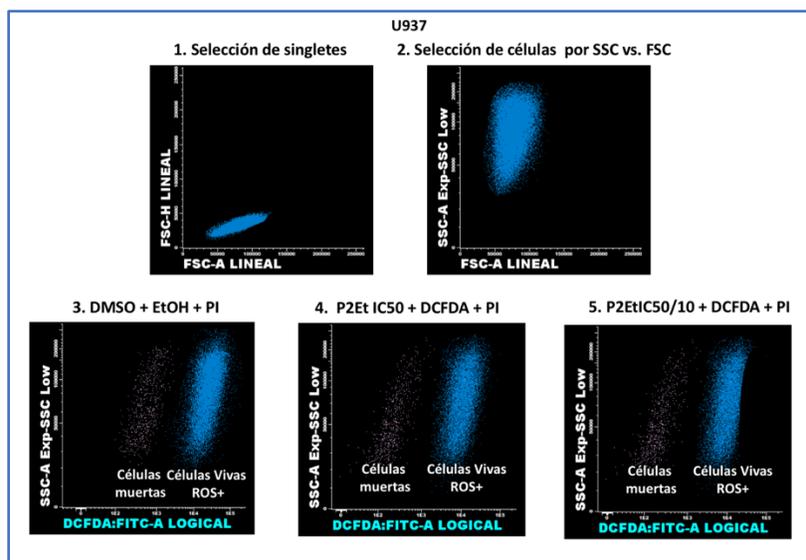
**Figura 19. Representación estadística de la fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Anamú.** La figura muestra que hay menores niveles de ROS al tratar las células con Anamú, pero al comparar la IC<sub>50</sub> con la IC<sub>50/10</sub> no hay diferencias significativas.



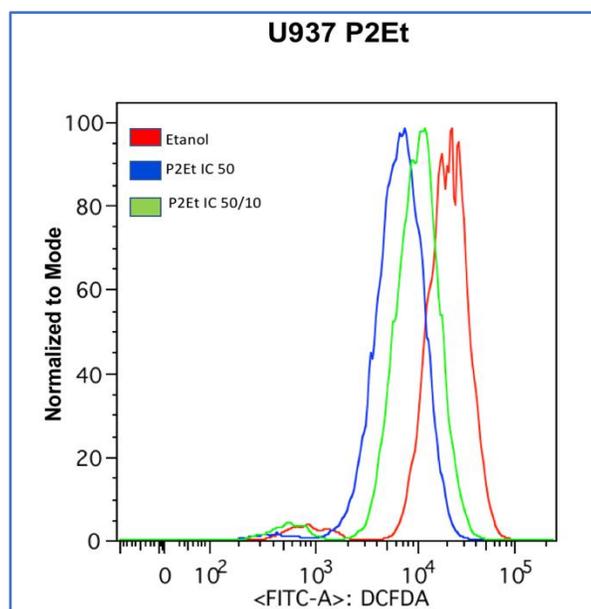
**Figura 20. Análisis del porcentaje de viabilidad de las células U937 con las diferentes concentraciones del extracto de Anamú.** La figura muestra que la viabilidad celular no difiere entre las dos concentraciones de Anamú empleadas.

#### *Tratamiento con P2Et*

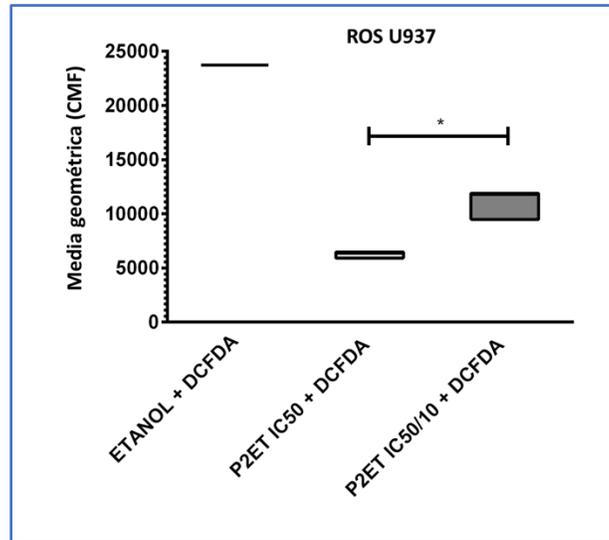
Las concentraciones utilizadas en el tratamiento con P2Et fueron la IC<sub>50</sub> y la IC<sub>50/10</sub>, y se utilizó como control las células tratadas con el diluyente del extracto que es el Etanol. Se observa que los niveles de ROS disminuyen con las diferentes concentraciones de P2Et respecto a los niveles basales; hay diferencias significativas entre la producción de ROS con la concentración de P2Et IC<sub>50</sub> e IC<sub>50/10</sub> (Figuras 21-23). Adicionalmente se observa que el extracto de P2Et no tiene un efecto citotóxico significativo a las 6 h de tratamiento (Figura 24).



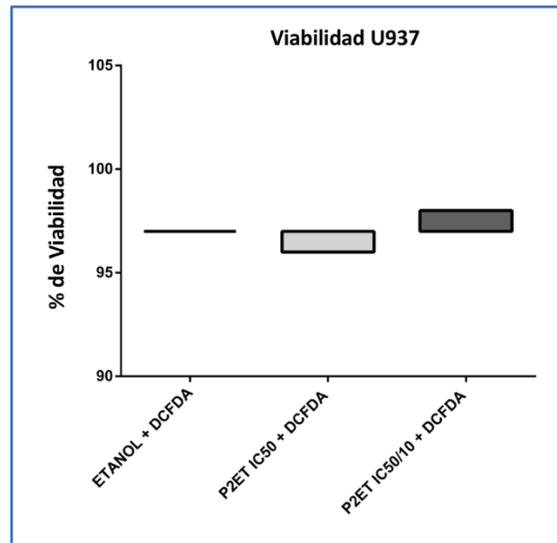
**Figura 21. Fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de P2Et.** En el dot plot Forward Scatter -FSC-H- vs. -FSC-A- (1) se seleccionan los singletes y en un segundo dot plot Side Scatter –SSC- vs. Forward Scatter –FSC- (2) se seleccionan las células por sus características de complejidad vs. tamaño (células de color azul). En el dot plot (3) se distinguen la fluorescencia basal de las células para ROS con el control Etanol, en el dot plot (4) se distinguen la fluorescencia de las células para ROS con el tratamiento P2Et IC<sub>50</sub>, en el dot plot (5) se distinguen la fluorescencia de las células para ROS con el tratamiento P2Et IC<sub>50/10</sub>.



**Figura 22. Histograma de la fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de P2Et.** Los histogramas muestran menores niveles de expresión de ROS de las células tratadas con P2ET en las dos concentraciones empleadas respecto al etanol. Los tratamientos se distinguen con diferentes colores: Etanol (rojo), P2ET IC<sub>50</sub> (azul) y P2ET IC<sub>50/10</sub> (Verde).



**Figura 23.** Representación estadística de la fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de P2Et. La figura muestra que hay menores niveles de ROS al tratar las células con P2ET con diferencias significativas al comparar la IC<sub>50</sub> con la IC<sub>50/10</sub> (p=0,05).

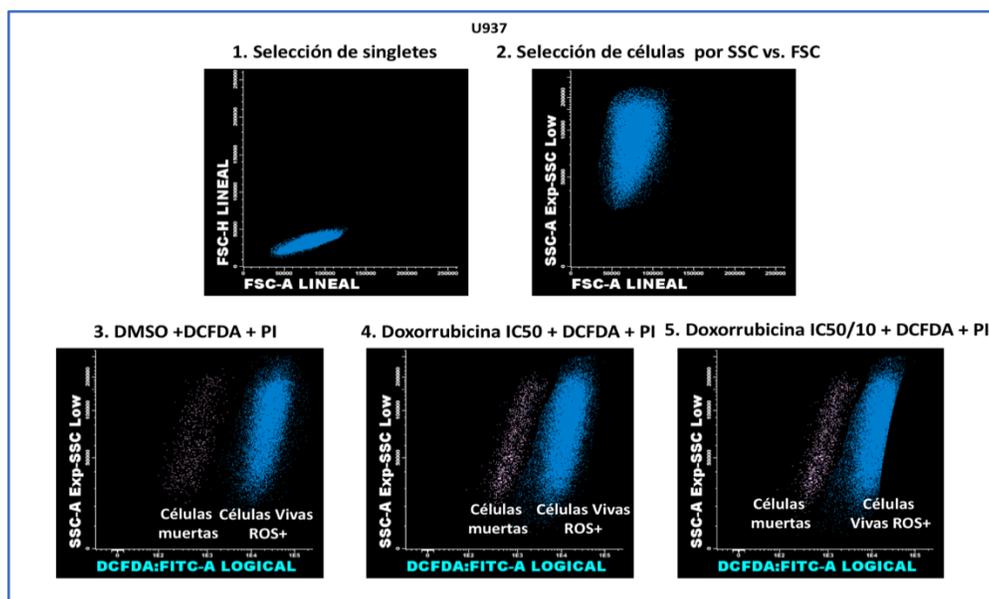


**Figura 24.** Análisis del porcentaje de viabilidad de las células U937 con las diferentes concentraciones del extracto de P2Et. La figura muestra que la viabilidad celular no difiere entre las dos concentraciones de P2Et empleadas.

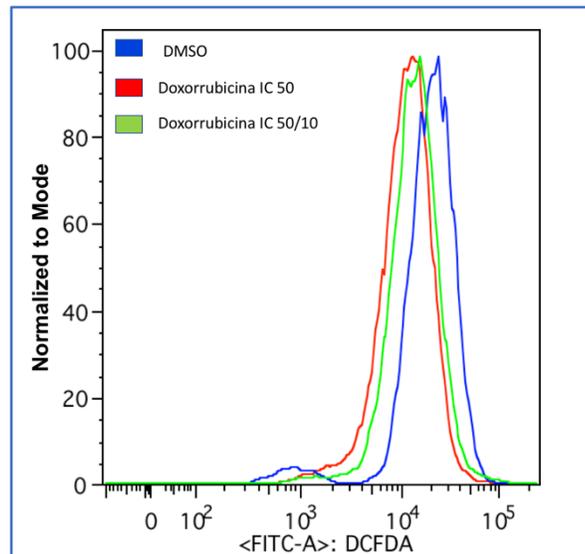
### *Tratamiento con Doxorrubicina*

Las concentraciones utilizadas en el tratamiento con Doxorrubicina fueron la IC<sub>50</sub> y la IC<sub>50/10</sub>, y se utilizó como control las células tratadas con el diluyente del quimioterapéutico que es el DMSO. Se observan que los niveles de ROS disminuyen con las diferentes

concentraciones de Doxorrubicina respecto a los niveles basales pero al comparar la  $IC_{50}$  con la  $IC_{50/10}$ , no hay diferencias significativas (Figuras 25-27). Al comparar con la línea K562 (Figura 15), el efecto de la Doxorrubicina es contrario, ya que en la línea U937 los niveles de ROS disminuyen (Figura 27). Adicionalmente se observa que el tratamiento no tiene un efecto significativo en la viabilidad celular contrario a lo que observado en la línea K562 (Figuras 16 y 28, respectivamente).

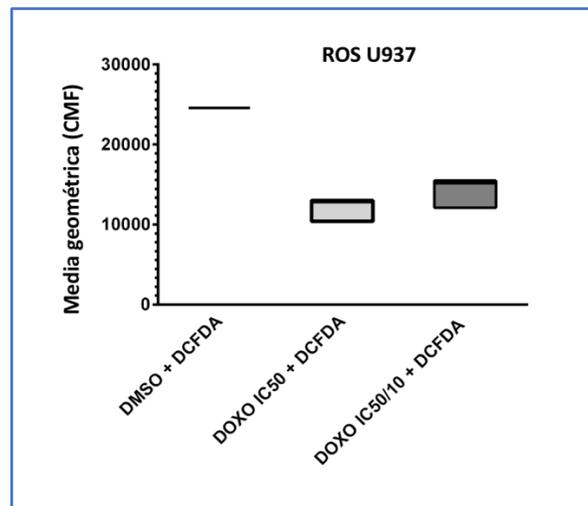


**Figura 25. Fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Doxorrubicina.** En el dot plot Forward Scatter -FSC-H- vs. -FSC-A- (1) se seleccionan los singletes y en un segundo dot plot Side Scatter –SSC- vs. Forward Scatter –FSC- (2) se seleccionan las células por sus características de complejidad vs. tamaño (células de color azul). En el dot plot (3) se distinguen la fluorescencia basal de las células para ROS con el control DMSO, en el dot plot (4) se distinguen la fluorescencia de las células para ROS con el tratamiento Doxorrubicina  $IC_{50}$ , en el dot plot (5) se distinguen la fluorescencia de las células para ROS con el tratamiento Doxorrubicina  $IC_{50/10}$ .

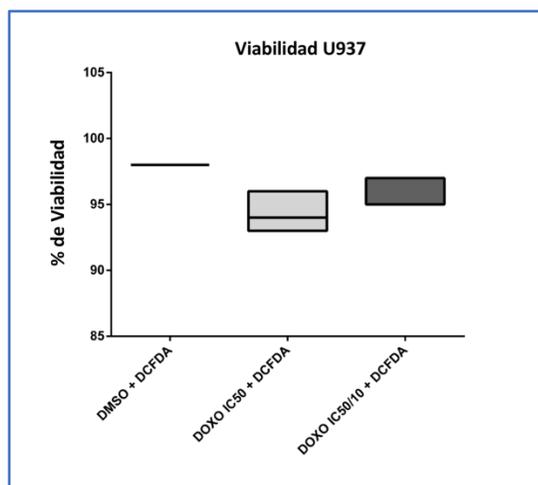


**Figura 26. Histograma de la fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Doxorubicina.**

Los histogramas muestran menores niveles de expresión de ROS de las células tratadas con Doxorubicina en las dos concentraciones empleadas respecto al DMSO. Los tratamientos se distinguen con diferentes colores: DMSO (azul), Doxorubicina IC<sub>50</sub> (rojo) y Doxorubicina IC<sub>50/10</sub> (Verde).



**Figura 27. Representación estadística de la fluorescencia para ROS de las células U937 con la sonda DCFDA en diferentes concentraciones del extracto de Doxorubicina.** La figura muestra que hay menores niveles de ROS al tratar las células con Doxorubicina.

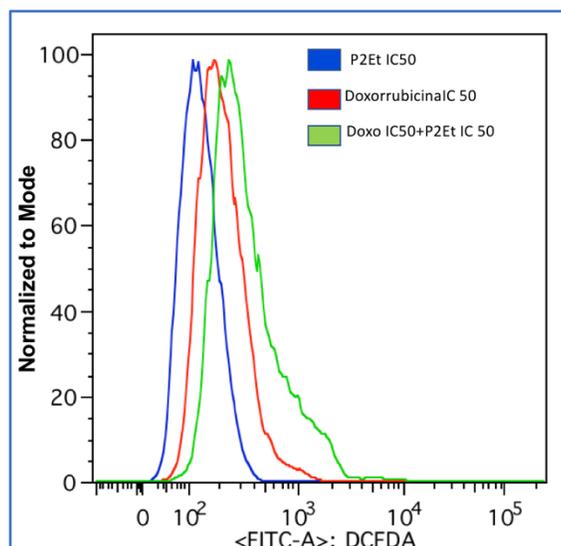


**Figura 28. Análisis del porcentaje de viabilidad de las células U937 con las diferentes concentraciones de Doxorrubicina.** La figura muestra que la viabilidad celular no difiere entre las dos concentraciones de Doxorrubicina empleadas.

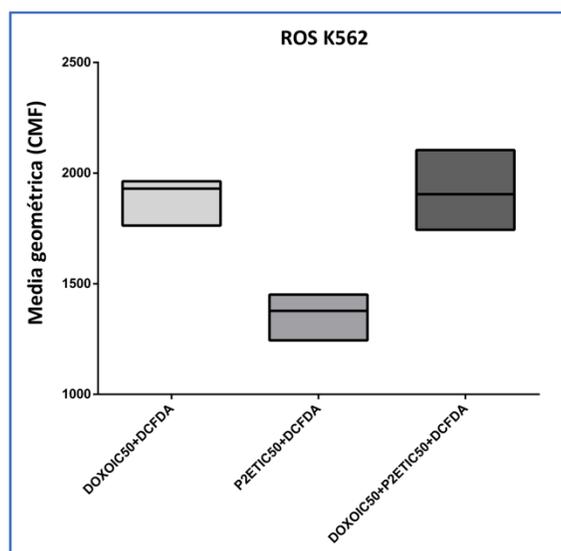
Comparación de la producción de ROS intracelulares cuando se utilizan co-tratamientos (P2Et + Doxorrubicina) respecto a los tratamientos individuales P2Et y Doxorrubicina en la línea celular K562

El análisis de ROS con el tratamiento simultáneo P2Et y Doxorrubicina se realizó en la línea celular K562, con el fin de conocer si existía un efecto de sinergia en la producción de ROS como en la citotoxicidad celular. Las combinaciones evaluadas fueron (Doxorrubicina IC<sub>50</sub> + P2Et IC<sub>50</sub>) y (Doxorrubicina IC<sub>50/10</sub> + P2Et IC<sub>50</sub>) y se compararon con los tratamientos individuales.

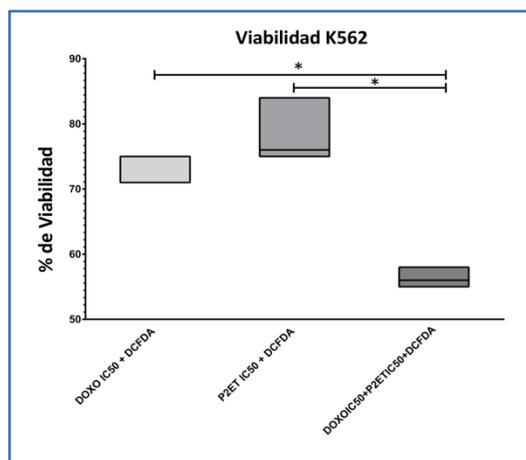
En relación a la producción de ROS, los resultados muestran que no existe sinergismo entre los tratamientos empleados (Figuras 29-30 y 32-33). Por el contrario, si se encontró sinergismo de los dos tratamientos en la viabilidad celular, con reducción estadísticamente significativa (Figuras 31 y 34).



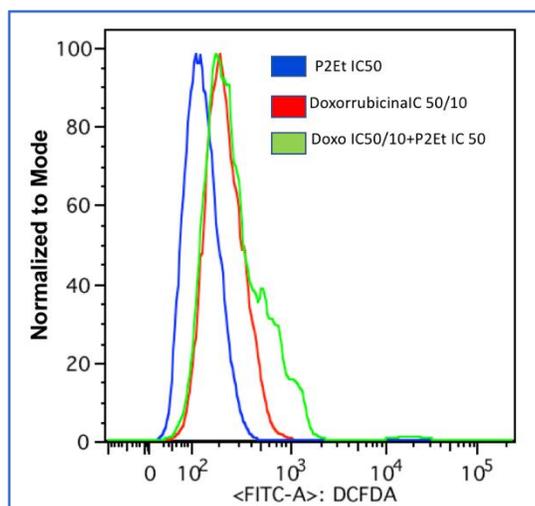
**Figura 29.** Histograma de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA con la combinación de Doxorubicina IC<sub>50</sub> + P2Et IC<sub>50</sub>. Los histogramas muestran mayores niveles de expresión de ROS de las células tratadas con la combinación, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los tratamientos se distinguen con diferentes colores: P2Et IC<sub>50</sub> (azul), Doxorubicina IC<sub>50</sub> (rojo) y Doxorubicina IC<sub>50</sub> + P2Et IC<sub>50</sub> (verde).



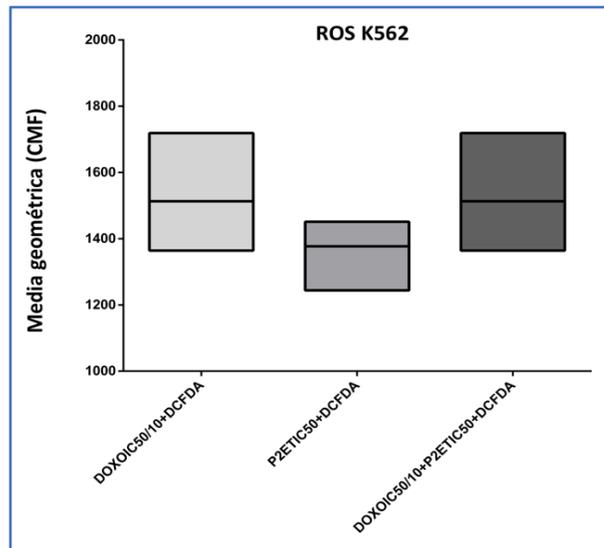
**Figura 30.** Representación estadística de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA con la combinación de Doxorubicina IC<sub>50</sub> + P2Et IC<sub>50</sub>. La figura muestra que no existe sinergismo al combinar los dos tratamientos.



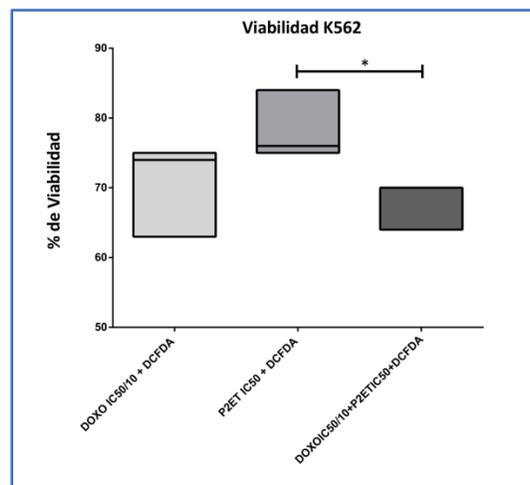
**Figura 31. Análisis del porcentaje de viabilidad de las células K562 con la combinación Doxorubicina IC<sub>50</sub> + P2Et IC<sub>50</sub>.** La figura muestra que la viabilidad celular disminuye significativamente con el co-tratamiento ( $p < 0,05$ )



**Figura 32. Histograma de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA con la combinación de Doxorubicina IC<sub>50</sub>/10 + P2Et IC<sub>50</sub>.** Los histogramas muestran aumento en los niveles de expresión de ROS de las células tratadas con la combinación, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Los tratamientos se distinguen con diferentes colores: P2Et IC<sub>50</sub> (azul), Doxorubicina IC<sub>50</sub> (rojo) y Doxorubicina IC<sub>50</sub> + P2Et IC<sub>50</sub> (verde).



**Figura 33.** Representación estadística de la fluorescencia para ROS de las células K562 con la sonda DCFDA con la combinación de Doxorubicina IC<sub>50</sub>/10 + P2Et IC<sub>50</sub>. La figura muestra que no existe sinergismo al combinar los dos tratamientos.



**Figura 34.** Análisis del porcentaje de viabilidad de las células K562 con la combinación Doxorubicina IC<sub>50</sub>/10 + P2Et IC<sub>50</sub>. La figura muestra que la viabilidad celular disminuye significativamente con el co-tratamiento (p=0,02).

Estos resultados muestran que los niveles de ROS son diferenciales según el tipo de leucemia analizada, siendo estos superiores a nivel basal, en la línea de leucemia mieloide aguda monocítica (U937) en comparación con la línea de leucemia mieloide crónica con evolución a crisis blástica K562. Es importante tener en cuenta que estos niveles diferenciales de ROS en las células leucémicas pueden ser el resultado de

distintos procesos celulares que incluyen la activación de diversas rutas de señalización celular como las reguladas por receptores de factores de crecimiento (PDGF-R, TGF- $\beta$ , CSF-M) y por oncogenes que pueden estar sobre-expresados en estas células como consecuencia de mutaciones y translocaciones cromosómicas. De forma particular en la línea K562, la presencia de la oncoproteína Bcr-Abl, puede activar corriente abajo rutas de señalización que aumentan los niveles de ROS en comparación con CMH normales y estas incluyen STATs, MAPK, PI3K/Akt y de esta manera, ROS a su vez contribuyen en estas cascadas de señalización, en particular con la activación de los factores de transcripción NF- $\kappa$ B y AP-1, quienes regulan la transcripción de genes involucrados en regulación del crecimiento, proliferación y apoptosis celular (Sattler M, 2000). Se ha descrito que la producción de ROS inducida por BCR-ABL1, promueve la inestabilidad genética y por lo tanto contribuye a nuevos daños en el ADN.

Así mismo, en este trabajo se encontró que las células responden de manera diferencial al tratamiento quimioterapéutico con Doxorubicina como con los extractos Anamú y P2Et, encontrando que los niveles de ROS aumentan con el tratamiento con Anamú y Doxorubicina en K562 y por el contrario disminuyeron con todos los tratamientos realizados en la línea U937. El tratamiento con P2Et disminuye los niveles de ROS en K562.

De forma interesante, en la línea K562 los tratamientos que aumentaban más los niveles de ROS también eran los que reflejaban una mayor toxicidad, lo cual corresponde con lo que se ha reportado en la literatura donde a pesar de que los ROS tienen un efecto dual en células tumorales, muchos tratamientos que son utilizados en la actualidad de forma convencional y que tienen un efecto pro-oxidante, demuestran ser efectivos sobre la célula tumoral ya que conlleva a que se pierda la homeostasis de Redox y la célula entre en proceso de apoptosis (Mary E, 2011).

Un ejemplo claro de ello es la Doxorubicina la cual es una antraciclina que ejerce su mecanismo de acción sobre su actividad en la enzima topoisomerasa II y sobre los niveles de radicales libres. La Doxorubicina sirve como sustrato para enzimas oxoreductoras como XO y TRX; la activación de cualquiera de estas enzimas puede hacer que la Doxorubicina y otras antraciclinas como la Adriamicina, la Daunorrubicina y la Idarrubicina se conviertan en radicales libres (Goodman J, 1977). Estas formas de

semiquinonas de radicales libres de antraciclinas inducen directamente el daño directo del ADN, o pueden interactuar con el oxígeno molecular para promover la formación de ROS. Estos quimioterapéuticos también pueden formar complejos con hierro libre en las células, lo que conduce a una reacción química llamada reacción de Fenton, que genera más ROS a través de la combinación de hierro y peróxido de hidrógeno (Gewirtz DA, 1999). La acumulación de ROS y el efecto deletéreo de los radicales libres dentro de las células leucémicas puede conducir al estrés oxidativo citotóxico como se vio en los experimentos realizados en este trabajo. También se observó que el extracto de Anamú tenía un comportamiento similar al del quimioterapéutico utilizado y que había un efecto dosis respuesta tanto en la producción de ROS como en la citotoxicidad; y esto puede deberse a que este fitoterapéutico induce estrés metabólico en la célula leucémica lo que puede contribuir a la generación de ROS, a parte de sus otros efectos citotóxicos (Hernandez,J, 2014) lo cual lleva a considerarse una buena alternativa terapéutica para células tumorales con características similares a la línea celular K562. El extracto P2Et tiene propiedades antioxidantes por lo tanto en esta línea disminuían los ROS y su toxicidad no era tan efectiva.

En relación al sinergismo evaluado, la línea K562 muestra menor viabilidad celular con las combinaciones (Doxorrubicina  $IC_{50}$  + P2Et  $IC_{50}$ ) y (Doxorrubicina  $IC_{50/10}$  + P2Et  $IC_{50}$ ), sin tener un efecto claro en la producción de ROS.

Estos resultados fueron encontrados en trabajos previos del grupo donde la combinación de los tratamientos (Doxorrubicina  $IC_{50}$  + P2Et  $IC_{50}$ ) y (Doxorrubicina  $IC_{50/10}$  + P2Et  $IC_{50}$ ) tuvo efecto de sinergismo en la citotoxicidad de células leucémicas (Aldana,E, 2016). La combinación más efectiva en términos de citotoxicidad fue Doxorrubicina  $IC_{50}$  + P2Et  $IC_{50}$ , donde el P2Et parece perder su actividad antioxidante y potencializa el efecto de la Doxorrubicina. Lo cual lleva a pensar en que los extractos de *Petiveria alliacea* (Anamú) y *Caesalpinia spinosa* (P2Et) podrían ser tratamientos coadyuvantes a las quimioterapias convencionales utilizadas actualmente en las Leucemias Mieloides Aguda.

## CONCLUSIONES

1. El análisis de la sensibilidad de las líneas K562 y U937 a los extractos de *Petiveria alliacea* (Anamú) y *Caesalpinia spinosa* (P2Et) y al quimioterapéutico Doxorrubicina, muestra que la línea K562 es más sensible al Anamú y a la Doxorrubicina mientras que la línea U937 fue más sensible al P2Et, demostrando el efecto diferencial de estos tratamientos en la citotoxicidad de células tumorales.
2. Los tratamientos empleados tienen diferentes efectos en los niveles de ROS, con aumento de los mismos en la línea K562 al tratar las células con Anamú y Doxorrubicina, mientras que en la línea U937 todos los tratamientos disminuyeron estos niveles. Estos resultados son reflejo de la individualidad biológica de cada tumor, lo cual puede influir en los niveles de ROS basales y post-tratamiento, según las cascadas de señalización activadas en estas células y el perfil genético de las mismas.
3. El co-tratamiento P2Et + Doxorrubicina en diferentes concentraciones, tuvo un efecto sinérgico en la disminución de la viabilidad celular de la línea K562, sin afectar los niveles de ROS. Estos resultados sugieren que el P2Et podría estar potenciando el efecto citotóxico de la Doxorrubicina, por lo que este extracto puede ser considerado co-adyuvante junto con este quimioterapéutico de uso convencional en leucemias.

## BIBLIOGRAFIA

- Suganuma K, M. H. (2010). Energy metabolism of leukemia cells: glycolysis versus oxidative phosphorylation. *Informa Healthcare*, 2112-2119.
- Castañeda, D. (2011). Tesis: Modulación de la actividad de los fármacos antitumorales de uso convencional por fracciones de *C.spinosa* y *P.alliacea*. 8-11.
- Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nature Reviews Cancer*, 635-649.
- Muños,I. (2011). Tesis: Evaluación de los contenidos metabólicos en cultivos de células de *Petiveria alliacea* (anamú).
- Osorio, M. (2007). Perspectiva de la psicología de la salud infantil en programas holísticos de atención a pacientes pediátricos con leucemia: ilustración de una experiencia mexicana. . *Avances en Psicología Latinoamericana*, 81.
- Medina, E. (2018). Leucemia/linfoma T del adulto en pacientes infectados con HTLV-1: reporte de dos casos de Colombia. *scielo*.
- Rosada, J. (2007). Hematopoyesis extramedular: ¿mecanismo compensador o síndrome clínico? Descripción de un caso y revisión bibliográfica. *Scielo*, 2-8.
- Sanchez,L. (2011). De la inmunodeficiencia primaria al cáncer. *evista Cubana de Hematología, Inmunología y Hemoterapia*, 212-223.
- Instituto Nacional de Cáncer*. (2018). Obtenido de <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/leucemia/pro/tratamiento-all-adulto-pdq>
- Lozano, J. (2002). Leucemias Agudas. *Elsevier*.
- La ciencia es noticia* . (2018). Obtenido de Son tan graves los efectos a largo plazo de las bombas de Hiroshima y Nagasaki?: <http://www.agenciasinc.es/Noticias/Son-tan-graves-los-efectos-a-largo-plazo-de-las-bombas-de-Hiroshima-y-Nagasaki>
- Fernández N. (2000). Síndrome mielodisplásico. *Revista Cubana Hematología e Inmunología* .
- Instituto Nacional de Salud*. (2012). Obtenido de <https://www.minsalud.gov.co/sites/rid/Lists/BibliotecaDigital/RIDE/IA/INCA/plan-nacional-control-cancer-2012-2020.pdf>
- Finkel T. (2003). Oxidant signals and oxidative stress. *Curr Opin Cell Biol*, 247–254.
- Finkel T. (2011). Signal transduction by reactive oxygen species. *J Cell Biol*, 7–15.
- Bowen DT. (2005). Mutations in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. . *Blood*, 2113–2119.
- Yahata T. (2011). Accumulation of oxidative DNA damage restricts the self-renewal capacity of human hematopoietic stem cells. *Blood*, 2941–2950.
- Kanno S. (2004). Susceptibility to cytosine arabinoside (Ara-C)- induced cytotoxicity in human leukemia cell lines. *Toxicol Lett*, 149–158.
- Iacobini M. (2001). Involvement of oxygen radicals in cytarabine-induced apoptosis in human polymorphonuclear cells. *Biochem Pharmacol*, 1033–1040.
- Celik H. (2008). Bioreduction of idarubicin and formation of ROS responsible for DNA cleavage by NADPH-cytochrome P450 reductase and its potential role in the antitumor effect. *Pharm*, 68–82.
- National Cancer Institute*. (2018). Obtenido de Leucemia mieloide aguda en adultos: <https://www.cancer.gov/espanol/tipos/leucemia/paciente/tratamiento-lma-adultos-pdq>

- Urueña C. . (2008). Petiveria alliacea extracts uses multiple mechanisms to inhibit growth of human and mouse tumoral cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 8-60.
- Castañeda D. (2012). A gallotannin-rich fraction from Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 1-10.
- Urueña C. (2013). Gallotannin-rich Caesalpinia spinosa fraction decreases the primary tumor and factors associated with poor prognosis in a murine breast cancer model. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 13-74.
- Sinergismo farmacológico*. (2013). Obtenido de SlideShare: <https://es.slideshare.net/AnikaVillaverde/tema-11-sinergismo-de-farmacologa>
- Xue-Qing Hu. (2016). Advances in Synergistic Combinations of Chinese Herbal Medicine for the Treatment of Cancer. *Current Cancer Drug Targets*, 346-356.
- Klein E. (1976). Properties of the K562 cell line, derived from a patient with chronic myeloid leukemia. *International Journal Of Cancer*, 421-431.
- Lozzio BB. (1981). Una línea celular de leucemia multipotencial (K-562) de origen human. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 546-550.
- Fan Yanhua. (2016). Efecto de la fracción activa de Eriocaulon sieboldianum en células de leucemia humana K563 mediante la inhibición de la proliferación, el arresto del ciclo celular y la inducción de la apoptosis. *Toxicología Ambiental y Farmacología* 13-20, 13-20.
- Bartram CR. (1983). Translocation of c-ab1 oncogene correlates with the presence of a Philadelphia chromosome in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*, 277-280.
- Khalidi HS. (1998). The immunophenotype of blast transformation of chronic myelogenous leukemia: a high frequency of mixed lineage phenotype in "lymphoid" blasts and a comparison of morphologic, immunophenotypic, and molecular findings. *Mod Pathol*, 211-221.
- Reid AG. (2009). Phenotype of blasts in chronic myeloid leukemia in blastic phase analysis of bone marrow trephine biopsies and correlation with cytogenetics. *Leuk Res*, 18-25.
- Saikia T. (1988). Characterisation of blast cells during blastic phase of chronic myeloid leukaemia by immunophenotyping experience in 60 patients. *Leuk Res*, 499-506.
- Sundström C. (1976). Establecimiento y caracterización de una línea celular de linfoma histiocítico humano (U-937). *En t. J. Cancer*, 565-577.
- Lehmann MH. (1998.). Recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor triggers interleukin-10 expression in the monocytic cell line U937. *Mol. Immunol*, 479-485.
- Gebreselassie D. (2006). Sampling of major histocompatibility complex class I-associated peptidome suggests relatively looser global association of HLA with peptides. *Hum Immunol*, 894-906.
- Strober W. (2001). Trypan blue exclusion test of cell viability. *PubMed*.
- Mary E. (2011). Redox Control of Leukemia: From Molecular Mechanisms to Therapeutic Opportunities. *Antioxidants & Redox Signals* , 1351-1353.
- Aldana,E. (2016). Tesis:Determinación de la actividad sinérgica o antagónica de las fracciones de Petiveria alliacea Y Caesalpinia spinosa, con quimioterapéuticos alopatócos sobre células tumorales leucémicas.
- Hernandez,J. (2014). Tesis: Estudio de actividad antitumoral in vitro e in vivo , de una fracción estandarizada de Petiveria alliacea L.: implicación de las vías de producción de energía en la modulación de la sobrevivida tumoral. 26-30.

- Sattler M. (2000). The BCR/ABL tyrosine kinase induces production of reactive oxygen species in hematopoietic cells. *The Journal of biological chemistry*, 24273–24278.
- Gewirtz DA. (1999). A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the antitumor effects of the anthracycline antibiotics adriamycin and daunorubicin. *Biochem Pharmacol*, 727–741.
- Goodman J. (1977). Generation of free radicals and lipid peroxidation by redox cycling of adriamycin and daunomycin. *Biochem Biophys Res Commun*, 797–803.