

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO

Facultad de Química

**PAPEL DE NRF-2 EN LA RESPUESTA A QUIMIOTERAPIA EN LA
LÍNEA CELULAR LINFOBLÁSTICA MOLT-4.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA:

LOAIZA RUIZ BRENDA EDITH

MÉXICO, D.F.

2008



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Loaiza Ruiz Brenda Edith Becaria CONACyT Salud/2004/COI-085. Fondo Sectorial. Dr.Eduardo Lazcano

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Dra. Marisol López López

Vocal: Prof. Dra. Perla Carolina Castañeda López

Secretaria: Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez

1er. Suplente Prof. Q.F.B. Araceli Mendieta Rergis

2°. Suplente Prof. Dr. Antonio Ulises López Gutiérrez

Sitio donde se desarrollo el tema:

**Instituto de Investigaciones Biomédicas.
Depto. De Medicina Genómica y Toxicología Ambiental.**

Asesor del Tema:

Dra. Mahara Angélica Valverde Ramírez

Sustentante:

Loaiza Ruiz Brenda Edith

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN

1.1 NRF2

El factor de transcripción Nrf2

Estructura de Nrf2

Mecanismo de acción de Nrf2

Reguladores de Nrf2

Papel de la proteína p53 en la vía de Nrf2

Inductores de Nrf2

1.2 LEUCEMIA

1.20 Aspectos Históricos de la Leucemia

1.21 Epidemiología de la leucemia

1.22 LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda en Adultos

1.23 Clasificaciones de LLA

1.24 Características clínicas de la LLA

1.25 Quimioterapia para LLA

1.26 Farmacogenética de la LLA

1.27 Protocolo HGM-LLA-2000 Riesgo Estándar

1.28 Protocolo HGM-LLA-2000 Riesgo Alto

II. JUSTIFICACIÓN

III. HIPOTESIS

IV. OBJETIVO GENERAL

V. OBJETIVOS PARTICULARES

VI. METODOLOGÍA

6.1 La línea celular Molt-4

6.2 Tratamientos

6.3 Establecimiento de la concentración equivalente a la usada clínicamente

6.4 Esquemas de Tratamientos Aplicados

6.5 Curvas de Crecimiento, citotoxicidad y tiempo promedio generacional

6.6 Extracción de RNA y RT-PCR

6.7 Expresión Proteica a través de Western Blotting

VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS

VIII. CONCLUSIONES

IX. ANEXOS

1. Tabla para calcular la superficie corporal en m^2 de individuos adultos, usando peso y estatura

2. Características físico-químicas de los fármacos empleados en los diferentes tratamientos

X. BIBLIOGRAFÍA

RESUMEN

Actualmente la quimioterapia combinada ha incrementado los porcentajes de sobrevivencia de pacientes con LLA; sin embargo, sigue existiendo alrededor de un 20% de pacientes que no alcanzan la primera remisión completa y los porcentajes de sobrevivencia a los 5 años, siguen siendo muy bajos (30-45%). La capacidad de las leucémicas para adquirir resistencia a los fármacos antineoplásicos es una de las causas directas del fallo al tratamiento. En la mayoría de los Hospitales de México, la LLA se trata con el protocolo llamado VAP-Mtx, que incluye Vincristina, L-asparaginasa, Metotrexato, Prednisona, Doxorubicina, Ciclofosfamida, y Etopósido. Estos fármacos son metabolizados principalmente por complejos citocromicos, como los de la familia P450 y enzimas de fase II del metabolismo tales como: NADPH, GST, HO-1, UGT, γ -GCS; así como las proteínas MDR, que contribuyen a su eliminación. La expresión génica de estas proteínas esta mediada por el factor de transcripción Nrf2, a través de la interacción con sitios ARE de su región promotora, esta inducción ocurre en respuesta a la presencia de antioxidantes y otros xenobióticos dentro de la célula. En condiciones basales Nrf2 se encuentra en el citoplasma unido a su represor directo Keap1, una proteína de unión a actina que une al factor evitando su translocación nuclear y favoreciendo su degradación. La inducción se provoca cuando moléculas electrofílicas y EROS, interaccionan con grupos reactivos de Keap1 disociando el complejo Nrf2-Keap1 y favoreciendo la localización nuclear de Nrf2 y su unión a sitios ARE de enzimas antioxidantes y desintoxicantes.

Debido a la gran relevancia de Nrf2 como factor de protección celular, el objetivo de este trabajo fue determinar si la expresión de este gen esta asociada con la respuesta a quimioterapia en los linfoblastos de LLA, línea celular Molt-4. Para ello aplicamos un tratamiento con una mezcla de los principales antineoplásicos usados en el protocolo VAP-Mtx del H. General de México, a concentración equivalente a la usada clínicamente. Este tratamiento resulto altamente citotóxico (70%), los cambios en la expresión génica de Nrf2 sugieren que el estímulo fue capaz de inducir a la vía en las primeras horas; sin embargo estos se vio poco reflejado en la expresión de la proteína, por lo que la principal respuesta observada fue la muerte celular. Al trabajar con la concentración 100 veces menor, esta no produjo efecto citotóxico, pero si un retraso en el ciclo celular; la expresión génica de Nrf2 se vio inhibida bajo este tratamiento, mientras que la proteica presento ligeros aumentos. Trabajamos con un tratamiento más, el tratamiento equivalente segunda dosis, que fue aplicado a las células sobrevivientes al tratamiento equivalente, este mostró un aumento significativo en la viabilidad celular, tanto a las 24 como a las 48 horas; esta respuesta coincidió con el aumento en la expresión proteica de Nrf2. Otro resultado interesante fue el obtenido con la expresión proteica de Keap1, la cual presenta una disminución significativa, respecto a la expresión de Nrf2 en todos nuestros tratamientos.

INTRODUCCIÓN

1.1 NRF2

1.10 El Factor de Transcripción Nrf2.

El metabolismo de algunos agentes antineoplásicos es un proceso fundamental para que éstos lleven a cabo su efecto citotóxico, así como para definir el tiempo de estancia en la célula. Además, ante la inducción de daños al DNA, como los producidos durante la quimioterapia y la presencia de estrés oxidante, la célula también utiliza procesos desintoxicantes, como las enzimas antioxidantes y del metabolismo de fase II (Konigsberg, 2007). El factor de transcripción Nrf2 (por sus siglas en inglés NF-E2 (*nuclear factor erythroid 2 related factor 2*), es el principal factor sensible a cambios redox, que se une a sitios ARE (*Antioxidant Response Element*, por sus siglas en inglés) de la región promotora de genes antioxidantes y de metabolismo, regulando positivamente su expresión (Yu y Kensler, 2005). Entre los principales genes regulados por este factor de transcripción se encuentran:

- Enzimas de fase II del metabolismo, tales como: HO, GST, UGT, Sulfotransferasas, NQO1, Aflatoxina B1 aldehído reductasa, peroxirredoxina 1 (Kobayashi y Yamamoto, 2005).
- Enzimas antioxidantes como la catalasa y SOD, γ -GCS, GPx, tioredoxina (Kobayashi et al., 2005).
- Chaperoninas moleculares (Yu y Kensler, 2005).
- Subunidad 26 S del proteosoma (Yu y Kensler, 2005).
- Algunas proteínas de estrés térmico, HSP (Kobayashi y Yamamoto, 2005).
- Moléculas involucradas en la eliminación de metabolitos después de su conjugación con GST (MRPs MRP1 y MRP2) (Sing et al., 2006).

También se han encontrado sitios ARE, próximos al promotor de Nrf2, Keap1 y en regiones de diferentes proteosomas, lo que podría implicar una autorregulación del factor de transcripción, esto fue observado en queratinocitos (Kobayashi et al., 2005). De ésta manera Nrf2, regula la protección ante el estrés oxidante, los procesos desintoxicantes intracelulares y la respuesta inflamatoria, también se ha mostrado que tiene cierto efecto inhibitorio sobre la vía de muerte celular a través del ligando Fas. En estudios con ratones de genotipo nulo para el gen de Nrf2, estos mostraron mayor daño a DNA, con respecto a los controles, y gran susceptibilidad a desarrollar cáncer. Con estos antecedentes, se ha propuesto a la inducción de Nrf2, como proceso quimiopreventivo y se ha demostrado en múltiples estudios en los que observa el efecto protector de los agentes inductores de la vía (Yu y Kensler, 2005).

1.11 Estructura de Nrf2.

Nrf-2 pertenece a una familia de proteínas que contiene un dominio conservado llamado *Drosophila Cap and Collar (CNC)*, a esta misma familia pertenecen Nrf-1, p45-NF-E2, Bach 1 y 2, todas ellas son reguladoras en la eritropoyésis, excepto p45 y Nrf-2. Estas proteínas tienen una estructura bZIP, “zipper” o cierre de leucina en la región C terminal. La región básica corriente arriba del bZip es la responsable de la unión a DNA, mientras

que la región ácida al parecer se requiere para la activación transcripcional y la formación del dímero con las Small Maf, y se llama dominio Neh1 (Yu y Kensler, 2005).

Las regiones homólogas entre Nrf2 de ratón y de pollo son llamadas Neh (Nrf-2 ECH homology) y se conocen al menos 6 para Nrf-2 (Kobayashi et al., 2005). Estos dominios están localizados en la región N terminal, la pérdida del dominio Neh2 N terminal aumenta la actividad transcripcional de Nrf-2, por lo que se cree que este dominio actúa como un regulador negativo; este mismo dominio fue por el cual se logró aislar a Keap1. Se ha demostrado que el dominio Neh2 es el que media la degradación de Nrf-2 al estar unido a Keap1 en las cisteínas 273 y 288, requeridas para la ubiquitinación de Nrf-2 dependiente de Keap1 (Kobayashi et al., 2005). La unión a DNA también se controla a través de la competencia con otras proteínas de unión a los mismos sitios, éstas son los represores Bach 1 y Bach 2, que antagonizan la expresión de Nrf2, principalmente en la expresión de la hemoxigenasa (Kobayashi et al., 2005).

Para llevar a cabo la transactivación son necesarios los dominios Neh4 y Neh5, que tienen una actividad sinérgica que parece ser la responsable de que Nrf2 se una con una afinidad 100 veces mayor al DNA que sus homólogos de la misma familia (Ver figura 1) (Jaiswal, 2004; Kobayashi et al., 2005).

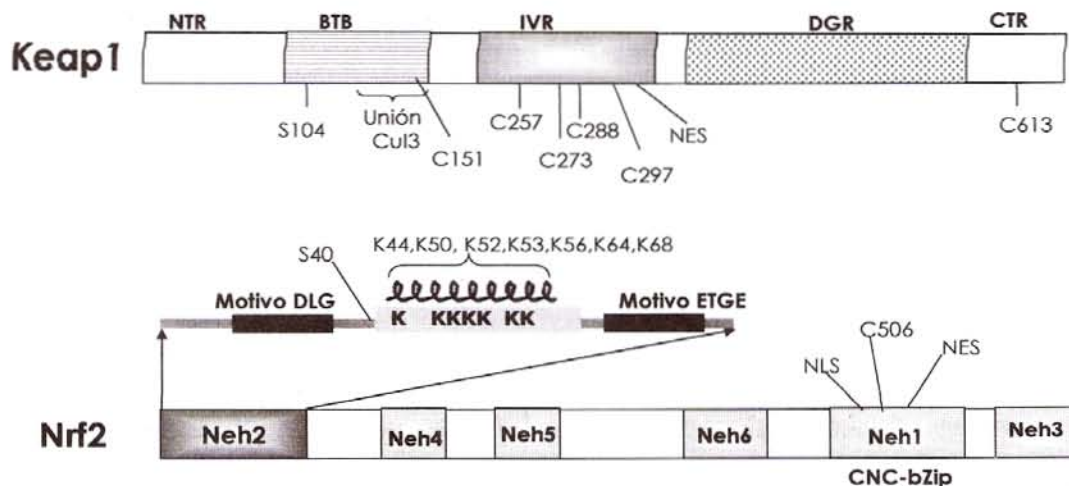


Figura 1. Dominios de interacción entre Keap1 y Nrf2. (Tomado de Konisberg, 2007)

Nrf-2: El dominio Neh2 se ha propuesto como sitio de unión a Keap1 mediante los motivos ETGE y DLG. Las letras D,L y G son los símbolos de una letra del aminoácido ác. aspártico, leucina, y glicina, respectivamente; mientras que el motivo ETGE está formado a su vez por los aminoácidos ác. glutámico, treonina, y glicina. En el dominio Neh2 también se encuentran siete residuos de lisina K que son importantes para su ubiquitinación y degradación (K44, K50, K52, K53, K56, K64 y K68).

Keap1: El dominio DRG provee el sitio de unión a Nrf2 y a actina, mientras que IVR contiene a los residuos de cisteína capaces de oxidarse y registrar el estado oxidante de la célula (C151, C257, C273, C288, C297). Cul3 es la ligasa E3 que sirve de adaptador para unirse al proteosoma.

1.12 Mecanismo de acción de Nrf2.

Nrf2 se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células, de manera que su actividad es debida principalmente a inducción y se encuentra estrictamente regulada. En condiciones basales, Nrf2 está unido a

la proteína citosólica Keap1, que a su vez, esta unida a filamentos de actina. El complejo entre Keap1 y actina interactúan con el extremo N terminal del dominio Neh2 de Nrf2, suprimiendo su actividad transcripcional al acoplarla y retenerla en el citosol. Además, la unión de Nrf-2 con Keap1, lo hace blanco de degradación, al funcionar Keap1 como un adaptador de sustratos al proteosoma (verfigura 2), por lo que ha resultado difícil detectar a la proteína madura; se ha propuesto que el tiempo de vida media de Nrf2 en la célula es entre 20 y 30 minutos (Yu y Kensler, 2005).

Se propone que Nrf2 se sintetiza y degrada de manera sistemática, por lo que el control primario de su función radica principalmente en su distribución dentro de la célula, más que en su síntesis *de novo* (Kensler y Wakabayashi, 2007). La activación se presenta cuando los residuos de cisteína C273, C288 y C151 de Keap1, (grupos sulfhídrido (SH) que son muy reactivos), interaccionan con agentes electrófilos, alquilantes u oxidantes. De esta manera al romperse la interacción de Nrf2 con Keap1, Nrf2 queda libre para dirigirse hacia el núcleo donde ejerce su función (Jaiswal, 2004), (verfigura 2).

Jaiswal (2004) propone que la fosforilación en serinas y treoninas es el proceso de señalización de Nrf2, una vez que este se ha liberado, le da estabilidad en ambientes celulares, siendo menos accesible a ligasas de ubiquitinación. Esta fosforilación, puede ser proporcionada por las vías de MAPK, P13K, PERK, PKC, la vía de la cinasa p38 (Jaiswal, 2004). La fosforilación de PKC en el residuo de Ser 40 del dominio Neh-2 podría ocultar la unión de Nrf-2 con Keap-1, promoviendo su localización nuclear, esto se ha observado tanto *in vivo* como *in vitro* (Yu y Kensler, 2005). También se ha sugerido que una mutación de Ser a Ala en el aminoácido 40 de Nrf2, que es el blanco de las PKC, disminuye su disociación con la misma (Kobayashi et al., 2005). Existe evidencia de la intervención de las MAP cinasas en la fosforilación de Nrf-2, principalmente por ERK5 (Owuor y Kong, 2002).

Como respuesta al estrés oxidante, la cascada de señalización mediada por PI3K produce la despolimerización de microfilamentos de actina, facilitando la translocación nuclear de Nrf2. Además PI3K puede también fosforilar a la proteína β de unión al amplificador CCAAT(C/EBP), que a su vez se transloca al núcleo y se une a su secuencia CCAAT del elemento de respuesta a xenobióticos (XRE), de manera paralela a Nrf-2, potenciándose así la respuesta del factor de transcripción.

Una vez liberado Nrf2 se transloca al núcleo donde se asume su heterodimerización con miembros de la familia de proteínas Maf pequeñas (Maf G, Maf- F y Maf K), con Maf grandes (c-Maf) o con otras proteínas b-ZIP como c-Fos, Fra1, p45-NF-E2, Bach1 y Bach2, para unirse a la región 5' de las secuencias ARE de genes de metabolismo de fase II principalmente y acelerar su transcripción. También se ha reportado que otros factores de transcripción como jun y ATF4 pueden formar heterodímeros con Nrf-2 y aumentar la actividad de los genes que contienen sitios ARE y EpRE (Jaiswal, 2004) (verfigura 2).

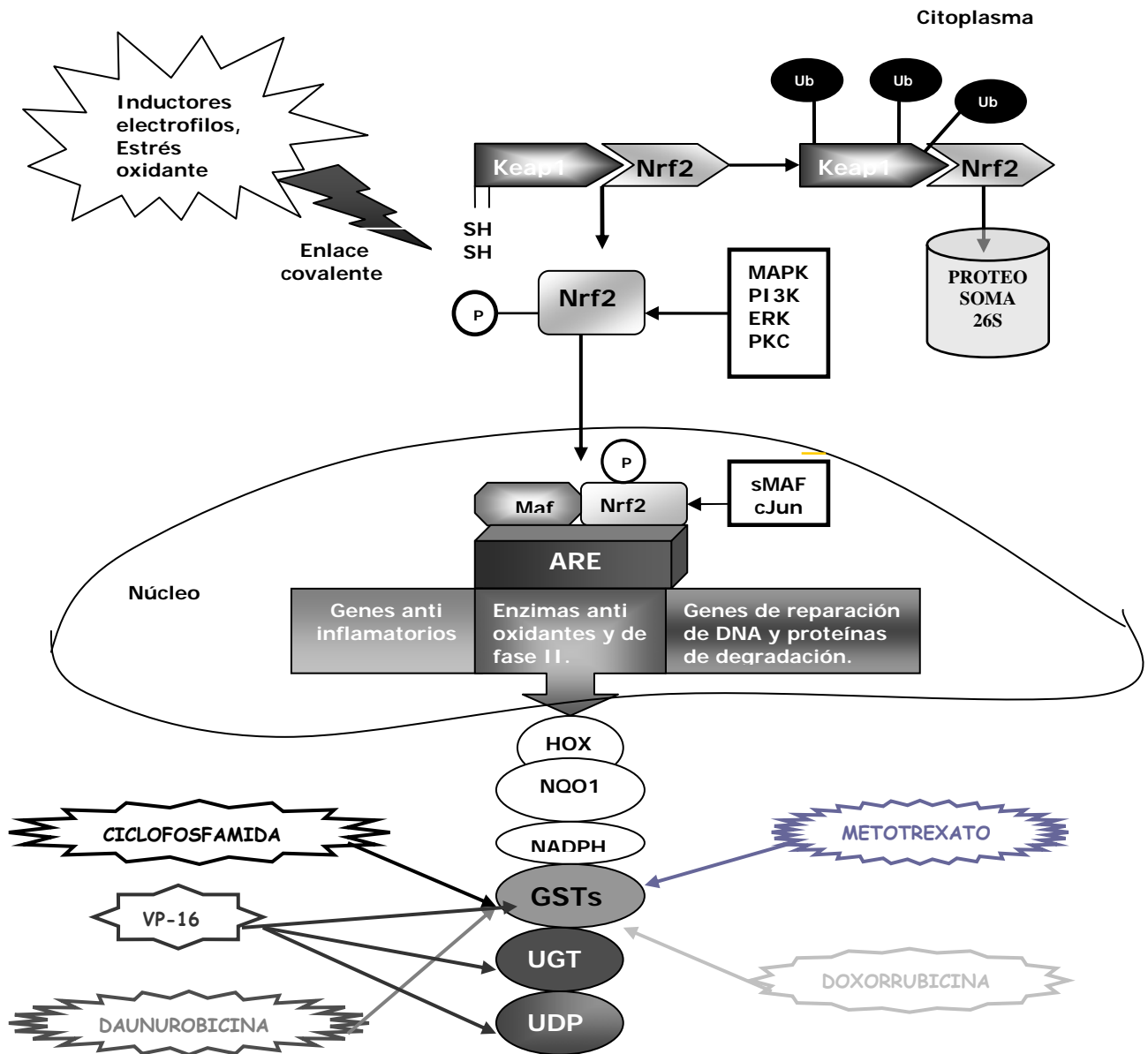


Figura 2. Activación y regulación génica por Nrf2. (Modificado de Yu y Kensler, 2005).

1.13 Reguladores de Nrf2.

Keap1.

Keap1 (por sus siglas en inglés *Kelch ECH associating protein*), es una proteína citoplasmática de 624 aminoácidos, que se encuentra unida a actina; actúa como un adaptador específico de sustrato de la ligasa de ubiquitinación Cul3, uniéndose a esta y facilitando la degradación de Nrf-2. Keap1 está localizada en el cromosoma 19 p13.2 y posee 2 dominios característicos, el complejo amplio BTB/POZ (por sus siglas en inglés *Bric-a-brac, tramtrack, broad-complex/poxovirus zinc finger*) que es un motivo muy conservado evolutivamente, responsable de la unión a actina, y el doble glicina, DGR o Kelch que aparece repetido seis

veces y le proporciona una estructura β plegada con varios sitios de contacto con otras proteínas. El dominio Kelch es el responsable de la interacción con Nrf2 a través del dominio Neh2 (Kobayashi et al., 2005).

Los otros tres dominios de Keap1 son: la región N terminal (NTR), la región C-terminal (CTR) y la región de intervención (IVR), la cual se distingue por su alto número de residuos de cisteína; se sabe que en la proteína Keap1 murina existen 25 residuos de cisteína, mientras que la humana contiene 27 y se ha propuesto que 9 de esos residuos tienen la capacidad de reaccionar, puesto que están ubicados cerca de aminoácidos básicos, lo cual disminuye su pKa y aumenta su reactividad (Dinkova-Kostova et al., 2002).

También se ha reportado que es necesaria la dimerización de Keap1 para retener a Nrf-2 en el citoplasma (Jaiswal, 2004). Una mutación puntual en la serina 104 del dominio BTB de Keap1 disminuye su asociación con Nrf-2, esta mutación provoca que Keap1 se auto asocie, rompiendo la dimerización de este. Además se ha demostrado que una mutación en la cisteína 151 de éste mismo dominio BTB, provoca que Keap1 actúe como represor constitutivo de Nrf2 (Kobayashi et al., 2005).

La disminución en la actividad represora de Keap 1 en células cancerosas, ya sea debida a mutaciones, deleciones, o pérdida de la heterocigosidad, se ha encontrado en más del 60% de las líneas celulares de cáncer de pulmón, y se ha observado que induce una mayor acumulación nuclear de Nrf-2, provocando el aumento en la transcripción de antioxidantes, enzimas del metabolismo de xenobióticos y bombas de salida de fármacos; lo cual se ha relacionado con la resistencia de estas células al tratamiento antineoplásico (Sing et al., 2006).

1.14 Papel de la proteína p53 en la vía de Nrf2.

La proteína p53 es el principal factor de transcripción que censa el daño por especies reactivas de oxígeno, principalmente en daño a DNA, para decidir si la célula activa mecanismos reparadores de dicho daño arrojando el ciclo celular; o llevando a apoptosis. En publicaciones muy recientes se ha propuesto a p53 como un represor directo de la vía de Nrf2, considerándose lógica la existencia de una relación entre las vías de Nrf-2 y p53, en el rescate celular ante un daño. La propuesta es que p53 se une a sitios ARE de al menos 3 genes regulados por Nrf2, estos son el componente x-CT del sistema de transporte de intercambio de cisteína/glutamato, la GSTy la GPx, bloqueando el sitio de unión de Nrf2 y evitando su transcripción (Faraonio et al., 2006). Las condiciones en las que se da esta situación aún no están bien esclarecidas, pero cada vez son más los trabajos que apoyan esta hipótesis.

1.15 Inductores de Nrf2

Se han descubierto muy diversas estructuras químicas inductoras de enzimas de fase II, principalmente compuestos electrófilos débiles, los cuales tienen la capacidad de reaccionar con grupos sulfhídrico, por reacciones de alquilación, oxidación o reducción, de los más de 27 residuos de cisteína de Keap1. Estos residuos de cisteína actúan como sensores, siendo los más activos los residuos 257, 273, 288 y 297, presentes en la región de intervención IVR de Keap1 (Kobayashi et al., 2005). Así mismo, la mutación en Cys 273 o 288, evita que Keap 1 reprima la actividad de Nrf2 (Jaiswal, 2004).

Al formarse el enlace covalente entre los grupos tioles de las cisteínas y los inductores, estos últimos rompen el complejo citoplasmático entre la unión a actina de Keap1 y el factor de transcripción Nrf-2. Algunos ejemplos de inductores son isotiocianatos como los sulforafanos, compuestos susceptibles a las reacciones de Michael, flavonoides, etc. (Dinkova-Kostova et al., 2002; Yu y Kensler, 2005). Además de algunos antioxidantes fenólicos que ya se han usado como inductores positivos de la vía en diversos experimentos, estos son principalmente el hidroxianisol butilado (BHA) y su metabolito activo hidroquinona terbutilada (tBHQ) y además, se ha observado que actúan activando a JNK1 y ERK2 de la vía de las MAP cinasas (Owuor y Kong, 2002).

1.2 LEUCEMIA

1.20 Aspectos históricos de la leucemia.

La historia de la leucemia comienza cuando en 1845, Rudolph Virchow, se enfrentó a una serie de síntomas de una de sus pacientes que mostraba fatiga, le sangraba la nariz frecuentemente y tenía hinchazón en piernas y abdomen; murió 4 meses después.

Al realizar la autopsia, el patólogo observó una muestra de su sangre al microscopio, detectando la carencia de glóbulos rojos y por el contrario, había un exceso de células incoloras, (de ahí surgió el vocablo “leucemia” que se refiere a *sangre blanca*). Tiempo después, al observar al microscopio una muestra de médula ósea, se encontró que no presentaba el color rojo característico, y por el contrario mostraba un color verde amarillento, de ahí se dedujo que la médula ósea era un sitio importante en la formación de las células sanguíneas (Patlak, 1987). Mediante un análisis microscópico, los investigadores se dieron cuenta que las células sanguíneas siguen un proceso de maduración, de esta manera se descubrieron dos tipos de antecesores para células blancas, los mieloblastos y los linfoblastos, estos últimos derivan en linfocitos T y B y los mieloblastos dan origen a distintos tipos de células que participan tanto en combatir infecciones y alergias, como en los procesos de coagulación (ver figura 3, proceso de Hematopoyesis) (Patlak, 1987).

La leucemia ocurre cuando un leucocito inmaduro, linfoblasto o mieloblasto, se duplica por sí mismo, es decir, sin necesidad de señales externas, la progenie resultante tiene el mismo estado de inmadurez y comparte los mismos marcadores de membrana que la célula progenitora.

De esta manera los investigadores a principios del siglo pasado, dejaron de ver a la leucemia como una sola enfermedad, la catalogaron como un árbol con dos ramas, las correspondientes a la línea linfoide y mieloide y de cada una de éstas sus derivados aguda, que refirieron como células inmaduras y crónica, para las más maduras (Munker y Hiller, 1998).

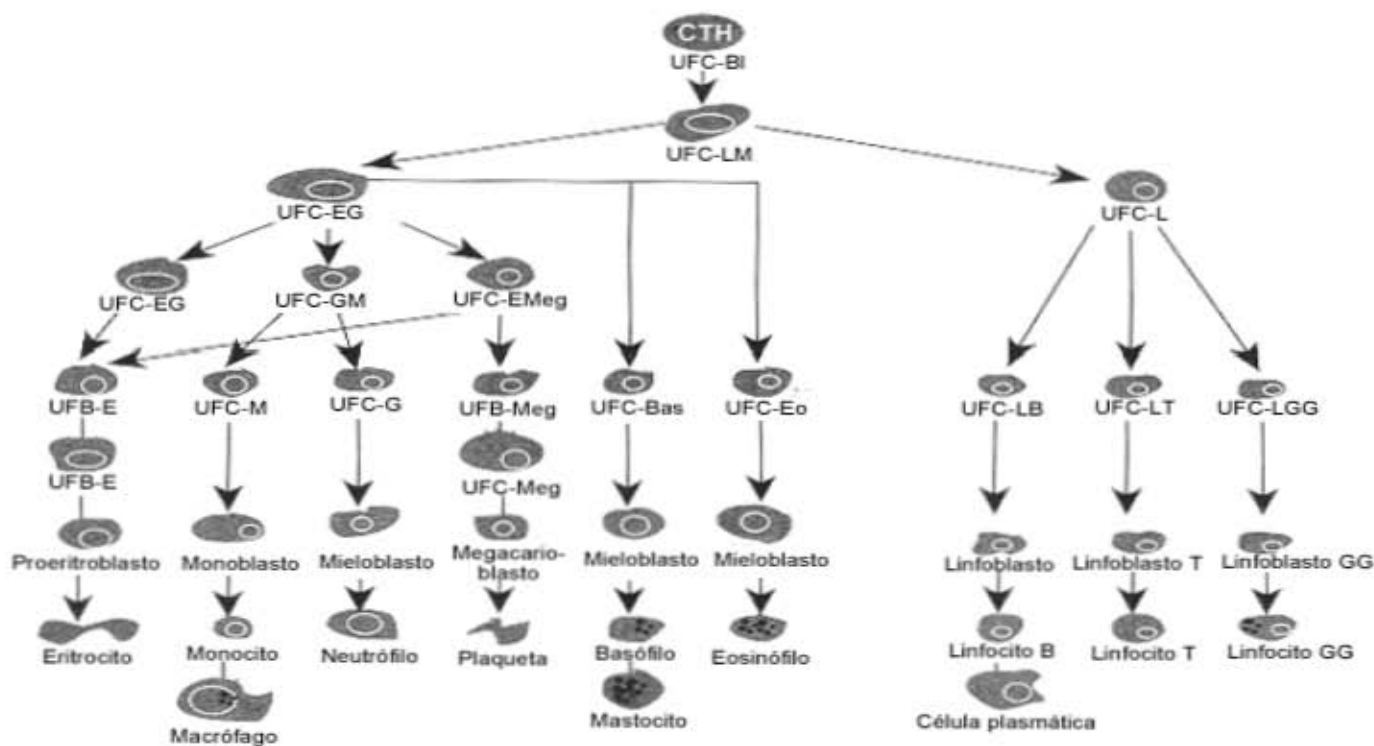


Figura 3. Proceso de hematopoyesis (Tomado de Munker y Hiller, 1998)

Se habla de leucemia aguda cuando existen en la médula ósea un porcentaje de células blásticas (células inmaduras, con cromatina laxa y nucleolo visible en la mayoría de las ocasiones) que supera el 20% del total de células de la médula. Antes de la nueva clasificación de las hemopatías malignas realizada por la OMS (1999) este porcentaje se establecía en 30% (*San Miguel y Sánchez, 2002*). El origen es desconocido, pero existen múltiples factores asociados: radiaciones ionizantes (Hiroshima, radioterapia), sustancias químicas como el benceno, virus (HTLV-1, VEB, VIH), factores genéticos (inmunodeficiencias, síndrome de Down, síndrome de Fanconi), factores raciales (*San Miguel y Sánchez, 2002*). Estos factores favorecen el desarrollo de alteraciones cromosómicas y anomalías en oncogenes que son finalmente los responsables de la expansión del clon leucémico.

1.21 Epidemiología de la leucemia.

La leucemia puede afectar tanto a niños como a adultos pero es más común en los primeros, sin embargo a diferencia de los adultos, los porcentajes de cura de la enfermedad son mucho mayores para los niños que para los adultos. En 1960 estadísticas del Reino Unido catalogaron a la leucemia como la segunda causa de muerte en niños. Actualmente a nivel mundial, este padecimiento se ubica el décimo lugar de morbilidad tanto en hombres como en mujeres (*WHO, 2002*). En el grupo de menores de 14 años, independientemente del género, las leucemias ocuparon el primer lugar entre las enfermedades meto-oncológicas que se registran en la población, el mismo lugar se ocupó para el caso de las mujeres de 15 a 44 años y posteriormente se ubicaron por debajo del linfoma no Hodgkin. El comportamiento fue similar en la población masculina (*WHO, 2002*).

En cuanto a los índices de mortalidad, las enfermedades hemato-oncológicas se encontraron dentro de las primeras 20 causas de muerte a nivel mundial y representaron el 3.6% del total de defunciones registradas, la tendencia fue ascendente de acuerdo con la edad, alcanzando su nivel máximo con el grupo de 65 años en adelante y las leucemias fueron las que presentaron la mayor mortalidad en menores de 15 años (*WHO, 2002*).

En México en el año 2002, los tumores malignos ocuparon el segundo lugar como causa de defunción (SSA, RHNM 2002). Las leucemias ocuparon el segundo lugar en mortalidad en niños de 5 a 14 años de edad. Del total de casos nuevos por cáncer registrados el 9.6% correspondieron a enfermedades hemato-oncológicas; el linfoma no-Hodgkin y la leucemia linfocítica se encontraron entre las primeras 15 causas y el 8.2% del total de casos nuevos registrados. Del total de defunciones registradas en ese mismo año, el 5.8% correspondió a leucemias, siendo las mayores tasas de mortalidad para hombres y las de tipo linfocítica las más frecuentes (46%) seguida por la mielocítica (33%)(SSA, RHNM, 2002).

La tasa de mortalidad por leucemias muestra una tendencia estable hasta los 35 años de edad, con una tasa de mortalidad entre 1.7 y 2.5 por cada 100 000 habitantes, tanto en hombres como en mujeres. A partir de los 35 años la tasa de mortalidad se duplica tanto en hombres (4.5), como en mujeres (3.8) y alcanza su nivel máximo en el grupo de mayores de 65 años, 16.3 en hombres y 13.0 en mujeres (*Tirado-Gómez y Mohar, 2007*).

En México estas incidencias se han relacionado con la industria del caucho, benceno, y otros hidrocarburos policíclicos, pesticidas y sustancias agroquímicas (plaguicidas y fungicidas); en el caso de las leucemias infantiles, se han relacionado con la exposición de los padres a estas mismas industrias, así como al consumo de tabaco, alcohol, y algunos medicamentos durante el embarazo (*Tirado-Gómez y Mohar, 2007*).

1.22 LLA: Leucemia Linfoblástica Aguda en adultos.

La LLA se define como un conjunto de neoplasias hematológicas que pueden ser subclasificadas por análisis cromosómico, inmunofenotípico y morfológico. Las estadísticas para la LLA han aumentado mucho en los últimos 30 años, (1 a 2 casos por cada 100, 000 habitantes por año, en los países de Occidente), especialmente en los grupos de 2-10 años en los que la mayoría de los pacientes se curan con quimioterapia. La enfermedad presenta 2 picos importantes de incidencia, la mayoría de los casos ocurre en niños y adultos jóvenes y es seguida por adultos mayores de 60 años (*Munker y Hiller, 1998*).

El evento inicial en la LLA es la transformación y expansión clonal de una célula madre linfocítica. El fenotipo de los blastos de LLA está determinado por la célula de la que son origen, así como de su grado de diferenciación, estos blastos son incapaces de terminar su diferenciación. En la mayoría de los casos de LLA se presentan aberraciones cromosómicas (translocaciones, deleciones, inversiones), algunas de las cuales son relevantes para el pronóstico. Los estudios moleculares han revelado una gran heterogeneidad para la LLA, sin embargo, no se ha logrado comprender el mecanismo por el cual se origina (*Munker y Hiller, 1998*).

1.23 Clasificaciones de la LLA.

Se han utilizado características morfológicas e inmunofenotípicas para clasificar a pacientes con LLA. La clasificación Francesa- Americana-Inglesa reconoce 3 subtipos (*Levitt y Lin, 1996*):

- L1: Linfoblastos pequeños uniformes, núcleo redondo regular y sin nucleolo ligeramente basófilos y escaso citoplasma. Más frecuente en niños.....**25-30%**
- L2: Linfoblastos largos pleiomórficos, núcleo irregular, basofilia y nucleolos evidentes; más frecuente en adultos..... **65-70%**
- L3: Estructura parecida a Linfoma de Burkitt, largos, homogéneos, basofilia oscura, prominentes vacuolas y nucleolo. Con inmunoglobulinas de membrana **2-7%**

Inmunofenotipo

Se ha realizado a través del uso de anticuerpos monoclonales. Las células de LLA sufren rearrreglos de inmunoglobulinas y receptores T por lo que expresan epítomos de moléculas receptoras de antígeno y diferenciación de glicoproteínas de superficie de una forma semejante a las células B y T normales (*Levitt y Lin, 1996*). Los marcadores considerados para establecer el inmunofenotipo tipo B se muestran en la tabla 1, mientras que los marcadores considerados para el inmunofenotipo tipo T se muestran en la tabla 2. Cabe mencionar que las leucemias mixtas también presentan marcadores específicos.

Tabla 1. Inmunofenotipo Tipo B : 75% de los casos, mal pronóstico .

Clasificación	CD19	CD10 CALLA	CD20	CyHg	Surf Ig	TdT	Pronóstico
Pre B temprana							
CALLA -- (10-38%)	+	-	--	--	--	+	Mal pronóstico
CALLA + (50-60%)	+	+	+/-	-	-	+	Mejor Pronóstico
Pre B cell	+	+/-	+	+	-	+	translocación específica t(1;19) en ¼ de pacientes se asocia con un pronóstico pobre
B cell (Burkitt's) (2-7%)	+	+/-	+	-	+	-	Alto potencial de proliferativo tiempo de duplicación 26 horas Citoplasma altamente basófilo

Tabla 2. Inmunofenotipo Tipo T: 25% de los casos, mejor pronóstico.

Clasificación	CD7	CD5	CD2	CD1	CD4	CD8	TdT	Pronóstico
Pre T cell	+	+	+	-	-	-	+	Mal pronóstico
T cell (5- 40 %)	+	+	+	+	+	+	+	Mejor Pronóstico

- **Leucemias Mixtas**, presentan antígenos mieloides de superficie (CD13, CD14 ó CD33) y linfoides; y se presentan del 10 al 20% en adultos con LLA, con subtipo CALLA negativo, pre B temprano y en pacientes con translocaciones cromosómicas únicas.

Anormalidades Citogenéticas.

Son muy comunes en pacientes con LLA y son un pronóstico muy importante para predecir el resultado al tratamiento quimioterapéutico. Es posible identificar anomalías cromosómicas en más del 90% de casos de pacientes con LLA (*Levitt y Lin, 1996*).

Anormalidades de Ploidía Celular

- Normal 15-20%
- Hiperdiploide (>50) 10-20%
- Hiperdiploide (47-50) 10%
- Pseudodiploide (46 anormal) 30-50%
- Hipodiploide 5 – 8%

Los pacientes con hiperdiploidia parecen tener un pronóstico más favorable, mientras que aquellos con pseudodiploidia acompañada de translocaciones, generalmente tienen mal pronóstico (*Levitt y Lin, 1996*).

Translocaciones Cromosómicas

Las translocaciones que se presentan con mayor frecuencia en la LLA son:

- **t (9;22) (q34;q11) Cromosoma Filadelfia.** El protooncogen *c-abl* del cromosoma 9, se fusiona con el gen *bcr* del cromosoma 22, justo en la parte media del gen, el producto de esto es un gen quimérico BCR-ABL que codifica para unas proteínas con actividad desreguladora de tirosina cinasas, que son las responsables de que la célula se encuentre en constante reproducción, independiente a señales externas del medio, mediante la activación de otras proteínas de señalización como la ras GTPasa. Esto se debe a que esta proteína híbrida carece de una sección vital que le permite desactivarse, deteniéndose así las señales de proliferación. Tanto para la Leucemia Mieloide Crónica como para la Leucemia Linfoblástica Aguda, los genes *c-abl* están translocados del cromosoma 9 al 22; los puntos de rompimiento están desplazados por mas de 175 Kb del exon *abl* (*Levitt y Lin, 1996*).

Se han utilizado técnicas de PCR para buscar arreglos BCR- ABL y se han observado en 43% de adultos con LLA, pero solo en 6% de niños que están en recaída para la misma leucemia. No se observo el rearrreglo en pacientes con LLA de células T, 55% se observó en pacientes de LLA de células B y que generalmente no alcanzan la remisión. Sin embargo, cabe señalar que para pacientes de Leucemia Mieloide Crónica que poseen este cromosoma, ya existe un medicamento capaz de bloquear la acción de la proteína tirosina cinasa, el *Gleevec* el cual al principio dio muy buenos resultados, pero actualmente ya presenta resistencia (*Levitt y Lin, 1996*).

- **t (8;14) (q 24; q 32)**. Se presenta en pacientes con LLA de células B; se han observado las siguientes variantes t(2;8) (p12, q24) y t (8;22)-(q24; q11). El protooncogen *c myc* es translocado del cromosoma 8 al 14, **locus** de la región constante de las Ig (H,K,L), lo que impide la regulación correcta de *c myc* (*Levitt y Lin, 1996*).
- **t (4;11) (q21, q23)**. Fenotipo de células preB, con rearrreglo de genes de la cadena pesada de las inmunoglobulinas; estas células pueden coexpresar antígenos mieloides y linfoides. Asociada a la translocación t(11;19)(q21;q23) en LLA y en al menos 10% de los casos de LMA. La translocación t(9;11) (p22, q 23) es la más común en la leucemia monocítica aguda en al menos 10% de los casos, el punto de rompimiento 11q 23 contiene genes que modulan la diferenciación linfóide y mielóide, por lo que se asocia a leucemias mixtas (*Levitt y Lin, 1996*).
- **t (1;19) (q23, p13)**. Rearreglo de secuencias hacia arriba del gen E2A (codifica para una proteína transcripcional) sobre el cromosoma 19, con un PBX1 hacia abajo que codifica una proteína homeótica de unión a ADN sobre el cromosoma 1, resultando en una proteína de regulación transcripcional irregular, que podría jugar un papel importante en la génesis de la leucemia (*Levitt y Lin, 1996*).
- **t (10;14) (q24,q11)**. Esta translocación en el **locus** delta se rearregla con el protooncogen HOX11 en el cromosoma 10. La proteína TAL1, es otro factor de transcripción que es desregulado (*Levitt y Lin, 1996*).
- **t (11;14) (p15; q11)**. Produce un rearrreglo del receptor alfa/delta de la célula T en el cromosoma 14 (banda q 11) con un gen TCG1 en el cromosoma 11 que codifica para una proteína reguladora transcripcional de unión a DNA (dedo de zinc) (*Levitt y Lin, 1996*).

1.24 Características Clínicas de la LLA.

Al igual que en cualquier leucemia aguda, los síntomas de la LLA resultan de la infiltración de la médula ósea y otros órganos por las células malignas. A consecuencia, se presenta anemia, palidez de piel y mucosas, cansancio, neutropenia, infecciones, especialmente abscesos, neumonía, trombocitopenia y hemorragias en diferentes sitios (*Hoelzer, 1991*).

Los pacientes con LLA también presentan síntomas tales como los enumerados enseguida:

- 50% de los pacientes presentan linfadenopatía, hepatosplenomegalía.
- 4% Síntomas del SNC (dolor de cabeza, vómito, papiledema, letargía, rigidez nuca, etc).
- 3-10% son asintomático del SNC. Diagnóstico por examinación del fluido cerebro-espinal.
- 1- 2% dolor de huesos.
- Otros: leucopenia, disminución de plaquetas, neutrófilos, hemoglobina, coagulopatía, complicaciones pulmonares.

Diagnóstico de LLA.

El diagnóstico es relativamente fácil, se caracteriza por un elevado número de blastos en sangre periférica y una disminución en el número de plaquetas y neutrófilos. En general los blastos de LLA tienen núcleo grande, redondo pero con bordes, así como citoplasma escaso de color azul oscuro, basófilo, en contraste con la LMA, no se presentan precipitados granulares en el citoplasma (Figura 4). Los blastos del subtipo de células B generalmente están vacuolados y más grandes que los de otros subtipos (*Levitt y Lin, 1996*).

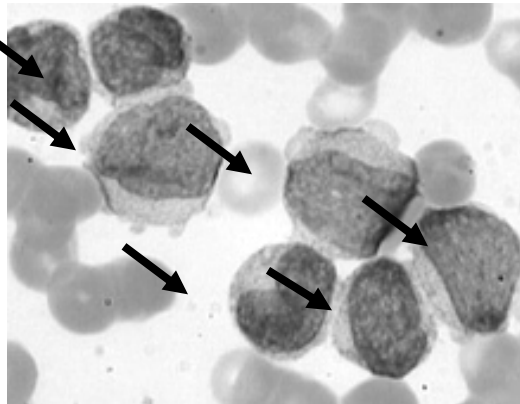


Figura 4. Micrografía de blastos característicos de LLA,
(Tomado de *Levitt y Lin, 1996*).

El siguiente paso en el diagnóstico de la LLA, es un aspirado de médula ósea que generalmente se lleva cabo en la cresta iliaca. El perfil cito-químico de los linfoblastos muestra negatividad para la peroxidasa, negro Sudan o cloroacetato esterasa, la mayoría de los casos son positivos para ácido de Schiff (PAS grandes agregados citoplasmáticos), la fosfatasa ácida puede también ser positiva. En muchos casos el aspirado de médula ósea muestra una infiltración densa de blastos leucémicos del 50 al 90%, que puede hacer imposible la aspiración, entonces se lleva a cabo una biopsia. La diferenciación inmunológica e histoquímica tiene que llevarse a cabo en sangre periférica y debe diferenciarse bien de la LMA, evaluando la expresión de

antígenos B, T, NK, y marcadores mielomonocíticos usando un panel de anticuerpos monoclonales; esto también debe llevarse a cabo para hacer la subclasificación de los diferentes tipos de LLA. Incluyendo inmunoglobulinas de membrana, citoplasmáticas, TdT y demás antígenos necesarios (Levitt y Lin, 1996).

Factores pronóstico de la LLA.

Los factores más importantes de pronóstico son las anormalidades citogenéticas, cuenta inicial leucocitaria, la edad, el tiempo para alcanzar la remisión completa y el subtipo inmunológico. Enseguida se enumeran algunos de los factores pronósticos desfavorables:

- Edad: > 35 años.
- Cuenta inicial leucocitaria: > 100×10^9 /L
- Índice de DNA (1.16-1.6)
- % de blastos en médula ósea: 5% de blastos.
- Presencia o ausencia de BCR-ABL t (9;22) o MLL AF4 [t (4; 11)], cromosoma Philadelphia.
- Enfermedad Residual mínima en fecha de remisión: 0.01%, o no alcanzar la remisión en 4 a 5 semanas de tratamiento de inducción.
- Tiempo para alcanzar la remisión: >4 semanas.
- Inmunofenotipo, linaje mixto, de células Pre T, CALLA negativa así como Pre B temprano.

En un estudio realizados por Levitt y Lin, (1996), los pacientes sin alguna de éstas características adversas tuvieron una remisión continua en un intervalo menor de 5 años del 62%. A diferencia de pacientes con alguna de éstas características que tuvieron un intervalo de supervivencia del 28% en 5 años. Se estima que cerca del 75% de pacientes con LLA poseen uno o más de los factores pronósticos desfavorables.

1.25 Quimioterapia para LLA

Para el tratamiento de la LLA se utilizan diferentes protocolos, pero el objetivo principal de todos ellos es alcanzar la remisión completa (RC), mediante el llamado tratamiento de *inducción*. Después, conseguir erradicar la enfermedad residual para alcanzar la cura definitiva. Esta es la segunda fase y se denomina *consolidación o intensificación* (Levitt y Lin, 1996).

La dosis de quimioterapia se administra en función de la superficie corporal expresada en m^2 y se obtiene a partir de tablas que relacionan el peso y talla del paciente (ver tabla en ANEXO 1) (Barton-Burke, 2001). Los antineoplásicos se administran vía endovenosa y en estos casos casi siempre, a través de catéteres centrales, que lleguen a la vena cava superior evitando que sean periféricos por el peligro de extravasación del fármaco. Suelen usarse catéteres permanentes como el de Hickman, que recorre un trayecto por debajo de la piel que evita la generación de infecciones (Barton-Burke, 2001).

Para el diseño de cualquier protocolo es necesario tomar en cuenta los siguientes aspectos:

- a) Cada fármaco usado en una mezcla, debe de ser tan activo como cuando es usado solo;

- b) El mecanismo de acción de los diferentes fármacos usados en el protocolo debe ser complementario para producir el mayor número de muertes celulares,
- c) Los fármacos que produzcan toxicidad en diferentes órganos, deben ser combinados de manera que se administre la dosis máxima, sin que esta sea excesivamente tóxica, así mismo, las dosis deben de ser combinadas para presentar la toxicidad en diferentes tiempos (*Barton-Burke, 2001*).

Quimioterapia de Inducción.

Es el tratamiento que se da por primera vez al paciente y es muy agresivo, ya que su meta es alcanzar la remisión completa. Se dice que un paciente ha alcanzado la RC, cuando por estudios morfológicos (utilizando el microscopio óptico) se detectan menos de un 5% de células tumorales en la médula ósea. Para confirmar esto, son necesarios los estudios de Enfermedad Mínima Residual (EMR), que consisten en detectar mediante técnicas más sensibles y específicas, como son la biología molecular PCR y la citometría de flujo, las posibles células tumorales residuales (*Barton-Burke, 2001*).

En los primeros tratamientos usando sólo vincristina y prednisona, el intervalo de remisión alcanzado es del 40 al 60% y en periodos cortos, agregando daunorubicina se alcanza hasta el 68%, el 47% es alcanzado con L-asparginasa y el 83% con los cuatro medicamentos (*Levitt y Lin., 1996*).

Se ha alcanzado del 70-80% con vincristina, prednisona, doxorubicina y citarabina. Sin embargo, para pacientes con subtipo de células B, se recomiendan ciclos de altas dosis de ciclofosfamida, metotrexato y citarabina (*Levitt y Lin, 1996*).

Quimioterapia de Consolidación.

Es la terapia de mantenimiento, después de haber alcanzado la remisión, y se refiere a bajas dosis del mismo tratamiento por varios años. Se ha observado remisión completa en 82% de pacientes menores de 25 años, y periodos de supervivencia de 10 años en el 38% (*Barton-Burke, 2001*).

El tratamiento para pacientes Filadelfia positivos es más complicado, con inducción intensificada se puede obtener hasta el 70% de remisión; sin embargo el periodo de supervivencia a los 3 años fue solo del 8% para aquellos BCR-ABL positivos, comparado con 59% para aquellos negativos. Altas dosis de citarabina pueden ser benéficas y un pequeño número de pacientes puede tratarse con interferon alfa. Se debe continuar la quimioterapia a bajas dosis de metotrexato y mercaptopurina por 2 a 3 años después de obtener la completa remisión, se observa mejor pronóstico para aquellos inmunofenotipos de células pre B tempranas o de células T, a diferencia de Burkitts o Filadelfia positivos (*Barton-Burke, 2001; Levitt y Lin, 1996*).

Esquema de la Quimioterapia Aplicada en el Hospital General de México para la LLA.

En el Hospital General de México se aplica el protocolo llamado VAP-Mtx, en pacientes adultos con LLA, el cual incluye terapia de inducción y consolidación. En las tablas 3 y 4 se muestran este tipo de esquemas de quimioterapia a través de ciclos de 28 días, donde se enumera la dosis sugerida de cada uno de los fármacos administrados.

Características Farmacológicas de los Antineoplásicos del protocolo VAP-Mtx.

El esquema de tratamiento aplicado en el Hospital General de México, denominado VAP-Mtx, incluye mecloretamina, ciclofosfamida, doxorubicina, metotrexato, citarabina, L-Asparaginasa, vincristina y vinblastina, cuyas características químicas y farmacológicas se resumen en la tabla 5. Es posible apreciar que los efectos tóxicos y adversos ocasionados por estos fármacos algunas veces son los mismos, es por ello que en la columna correspondiente se incluyen números entre paréntesis que refieren a dichos fármacos en el orden anteriormente citado.

1.26 Farmacogenética de la LLA.

Actualmente en Estados Unidos y Europa se utilizan las características genéticas de las células de pacientes con LLA para individualizar la terapia. Los polimorfismos en genes que codifican proteínas involucradas en la farmacodinamia y farmacocinética de los agentes antileucémicos son comunes en el alelo variante, en un intervalo del 5 al 50 %. Por estudios recientes se sabe que la vincristina, prednisona, dexametasona, etoposido y daunubicina son sustratos del citocromo P450 3A4 (CYP 3 A4), 3A5 (CYP 3A5), así como la glicoproteína-P (MDR1), que son parcialmente regulados por el receptor de vitamina D (VDR) y algunos de ellos también por el factor de transcripción Nrf-2 (ver figura 5, *Rocha et al., 2005*).

Los metabolitos del etopósido, daunubicina y ciclofosfamida son sustratos de la glutatión-S-transferasa (GSTM1, GSTP1, GSTT1). El etopósido además es glucuronidado por la UDP glucuronosil transferasa 1A1 (UGT1A1); la mercaptopurina es sustrato de la tiopurina S-metil transferasa (TPTM) y el metotrexato interactúa con la metilen tetrahidrofolato reductasa (MTHRF), la timidato sintetasa (TYMS) y el acarreador de folatos reducidos (RFC ó SLC19A1). La prednisona y dexametasona se unen al receptor de glucocorticoides NR3C1, (*Rocha et al., 2005*).

TABLA 3
1.27 PROTOCOLO HGM-LLA-2000 RIESGO ESTÁNDAR

INDUCCIÓN A LA REMISIÓN																							
FASE I.																							
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23-28
CFM 650 mg/ m ² ♣	♣																						
VCT 2mg ♥	♥							♥							♥							♥	
DOXO ♦ 25 mg/m ²	♦							♦							♦								
L-asparaginasa 6000 u / m ² ♠								♠		♠		♠		♠		♠		♠		♠			
PDN • 60 mg/ m ²	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	
QTX IT (MTX-DEX)																							*****
FASE II																							
CFM 650 mg/ m ² ♣	♣							♣							♣								
Ara-C√ 75 mg/m ²	√	√	√	√				√	√	√	√												
6 MP √ 50 mg/ m ²	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
QTX IT (Mtx-Dex)																							*****

VCT: vincristina, DOXO: doxorubicina, L-asparaginasa, PDN: prednisona, QTX IT: quimioterapia intratecal, Mtx: metotrexato, Dex: dexametasona, CFM: ciclofosfamida, Ara-C: citarabina, 6MP: 6-mercaptopurina,

CONSOLIDACIÓN I.																							
Ciclo 1																							
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	28
VP-16 100 mg/ m ² ♣	♣	♣	♣	♣	♣																		
Ara-C 75mg/m ² / día	♥	♥	♥	♥	♥																		
QTX IT (MTX-DEX)	*																						*
Repetir el ciclo.																							
REINDUCCIÓN A LA REMISIÓN																							
FASE I.																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	28
VCT 2mg ●	●							●							●							●	
DOXO 5mg/m ²	√							√							√								
PDN 60 mg /m ²	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√		
QTX IT (MTX-DEX)	*																						*
FASE II.																							
CMF 650 mg/m ²	√																						
Ara-C 75 mg/m ²	√	√	√	√				√	√	√	√												
6 MP 60 mg/ m ²	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√								
QTX IT (MTX-DEX)	*																						*
CONSOLIDACIÓN II (igual a CONSOLIDACIÓN I).																							

Mantenimiento:

- 6 MP. 50 mg / m² / día / VO de lunes a viernes.
- MTX 15 mg / m² / día / VO una vez por semana.

TABLA 4.
1.28 PROTOCOLO HGM-LLA -2000 RIESGO ALTO.

INDUCCIÓN A LA REMISIÓN																								
FASE I.																								
Día	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23...28	
CFM 650 mg/ m ² ♣	♣																							
VCT 2mg ♥	♥							♥							♥								♥	
DOXO 25 mg/m ² ♦	♦							♦							♦									
L-asp 6000 u / m ² ♠								♠		♠		♠		♠		♠		♠		♠				
PDN • 60 mg/ m ²	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•	•		
QTX IT (MTX-DEX)	√																							√

FASE II																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23- -28
CFM 650 mg/ m ² ♣	♣							♣							♣								
Ara-C 75 mg/m ²	√	√	√	√				√	√	√	√												
6 MP 50 mg/ m ²	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	
QTX IT (Mtx-Dex)	√																						√

CONSOLIDACIÓN I.																							
1er. ciclo																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	28
Mtx 1.5 g / m ² / IV	√																						
L-asp 10 mil U / m ²		√																					
Ac. fólico 12mg/m ²	√																						
Repetir 2 veces más el ciclo. (3 ciclos idénticos)																							
REINDUCCIÓN A LA REMISIÓN																							
FASE I.																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	28
VCT 2mg	√							√							√							√	
DOX 35mg/m ²	√							√							√								
PDN 60	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	√	

TABLA 5. FARMACOCINÉTICA Y EFECTOS SECUNDARIOS DE LOS ANTINEOPLÁSICOS EMPLEADOS EN EL PROTOCOLO VAP-Mtx

Fármaco	Farmacocinética	Usos	Toxicidad y Efectos secundarios
Mecloretamina MCT (1)	Altamente reactiva. Tiene una vida media de minutos y se une rápidamente a los tejidos. Interacciones farmacológicas ausentes (salvo agentes que disminuyen el glutatión).	<ul style="list-style-type: none"> • Enfermedad de Hodgkin • Agente esclerosante intrapleurales (dosis 10-20 mg). • Micosis fungoide (tópico). 	La mayoría de los antineoplásicos utilizados en este trabajo comparten las siguientes características.
Ciclofosfamida CMF (2)	Los metabolitos activos de la ciclofosfamida se unen en un 50% a proteínas plasmáticas con una vida media de 4-6 horas. La biodisponibilidad oral es del 90%. Eliminación vía renal. Interacciones Farmacológicas: a. Alopurinol (aumenta la vida media de los metabolitos). b. Fármacos inductores del sistema microsomal hepático, aumenta los niveles de metabolitos activos. c. Glucocorticoides, disminuyen la actividad del sistema Microsomal. d. Succinilcolina (la ciclofosfamida aumenta su actividad). e. Doxorubicina (se puede potenciar su cardiotoxicidad).	<ul style="list-style-type: none"> i. Actividad de amplio espectro en Leucemias, Linfomas, mieloma múltiple, carcinoma de mama, pulmonar de células pequeñas, neuroblastoma y sarcomas. f. Acondicionamiento en trasplantes medulares, ya que al ser su principal toxicidad hematológica, permite como otros agentes alquilantes, una adecuada escala en su dosis con una toxicidad extramedular aceptable. g. Como agente inmunosupresor: artritis reumatoide, lupus, citopenias inmunes, síndrome nefrítico, granulomatosis de Wegener y rechazo de trasplantes. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mielosupresión (dosis limitante). El descenso en la cifra de linfocitos ocurre en las primeras 24 horas, en 8 días la de Granulocitos y plaquetas, con recuperación en 3 semanas.(1,3, 4, 5, 6,7) 2. Náuseas y vómitos graves.(1, 5) 3. Alopecia. (1, 3, 7) 4. Hiperpigmentación en uso tópico. (1,3)
Doxorrubicina DOXO (3)	Metabolismo. En el hígado se transforma en doxorubicinol, también activo y en otros metabolitos no activos, pero potencialmente cardiotoxicos. Farmacocinética. Aclaración plasmática trifásica, con una vida media terminal de 30 horas. No se absorbe oralmente ni atraviesa la BHE. Eliminación. El 50% del fármaco se elimina por vía biliar en los primeros días y de un 5 a 10% en la orina. Interacciones Farmacológicas. 1. Precipita con la heparina y el 5-fluorouracilo.	<ul style="list-style-type: none"> i. Enfermedad de Hodgkin Linfomas ii. Leucemia Mieloide Crónica. iii. Carcinoma de mama. iv. Mieloma Múltiple. v. Sarcomas. <p>Otros carcinomas, próstata, vejiga, tiroides,</p>	<ol style="list-style-type: none"> 5. Leucemia Mieloide Aguda (1) 5.- Estomatitis. (2,3) 6.- Cistitis hemorrágica y secuelas como la fibrosis y el carcinoma vesical.(2)ç 7. Fibrosis pulmonar intersticial.

	<p>2.La anfotericina B aumenta la captación de doxorubicina por las células.</p> <p>3.La ciclofosfamida y la mitomicina aumentan el riesgo de cardiotoxicidad.</p> <p>4.La mercaptopurina aumenta la hepatotoxicidad.</p> <p>5.Se disminuye la biodisponibilidad oral de la digoxina.</p> <p>6.Los barbitúricos aumentan su metabolismo.</p>	ovario y testículo	<p>8.- Secreción inadecuada de ADH. Toxicidad cardiaca, especialmente a dosis elevadas y con administración de bolo(6)</p>
Metotrexato MTX (4)	<p>Aclaración plasmática trifásica, con una vida media terminal de 8-10 horas. Unión a proteínas plasmáticas en un 50%. En el líquido cefalorraquídeo LCR pueden obtenerse concentraciones citotóxicas sólo con dosis altas. El fármaco se acumula en derrames pleurales y peritoneales. La hemodiálisis y diálisis peritoneal no son eficaces para eliminar el metotrexato. Buena biodisponibilidad oral.</p> <p>Eliminación. Se elimina por vía renal.</p> <p>Interacciones Farmacológicas.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. fármacos con elevada unión a proteínas, lo pueden desplazar y aumentar su concentración. 2. Los salicilatos y el probenecid compiten con su eliminación renal. 3. Potencian los anticoagulantes orales. 4. La L-asparaginasa bloquea e inhibe la acción antitumoral del metotrexato. 	<ul style="list-style-type: none"> ▪ LLA. ▪ Linfomas. ▪ Profilaxis y tratamiento de meningitis leucémicas y carcinomatosas. ▪ Coriocarcinoma. ▪ Carcinoma de mama. ▪ Cánceres de cabeza y cuello. 	<p>9.- Insuficiencia Gonadal. (2)</p> <p>10.- La cardiotoxicidad es también acumulativa y aumenta su riesgo con dosis superiores a 550mg/m². (3)</p> <p>11.- Elevación de enzimas hepáticas (4).</p> <p>12.- Fibrosis hepática crónica.(4)</p> <p>13.- Mucositis y diarrea (4).</p>
Citarabina (Arabinósido de citosina Ara- c) (5)	<p>No es efectivo por vía oral, debido a la desaminación que se lleva a cabo en el tubo digestivo. Se produce una aclaración trifásica con una vida media terminal de 2 horas. Las formas de presentación oral están en proceso de estudio. En el SNC se obtiene concentraciones que equivalen al 50% de las sanguíneas.</p> <p>Eliminación. Se elimina por vía renal. El 90% de la dosis aparece en las 24 horas como metabolitos inactivos. Se eliminan por vía biliar en un pequeño porcentaje.</p>	<ul style="list-style-type: none"> ▪ Leucemias Mieloblásticas Agudas. ▪ Linfomas y Enfermedad de Hodgkin , segunda línea. ▪ LLA 	<p>14. Nefrotoxicidad, a dosis elevadas puede producirse precipitación tubular del metotrexato (4).</p> <p>15. Neumonitis, generalmente autolimitada.(4)</p> <p>16. <i>Rash</i> maculopapular (4,5,7)</p>

<p>L-Asparaginasa L-asp (6)</p> <p>Vincristina (7) VCT</p> <p>y Vinblastina. VBT (8)</p>	<p>Farmacocinética. La vida media es variable (8-30 horas). Eliminación por degradación metabólica.</p> <p>Interacciones Farmacológicas.</p> <p>Si se administra en forma simultanea al metotrexato, se disminuye el efecto de éste.</p> <p>Toxicidad</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Alergia y reacciones anafilácticas. 2. Anorexia nauseas y vómitos. 3. Disminuye algunos factores de coagulación. 4. Pancreatitis 5%. 5. Hepatotoxicidad. 6. Fallo renal-oligúrico, ocasional. <p>Debido a una absorción oral irregular se administra por vía intravenosa, mostrando una alta unión a tejidos con una vida media de 20 horas y mínima penetración del SNC. Eliminación. Se elimina fundamentalmente por vía biliar y en heces. Solo se excreta por vía urinaria un 5-15% del fármaco.</p> <p>Interacciones Farmacológicas.</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Se produce un incremento de la acumulación de metotrexato en las células tumorales. 2. La asparaginasa disminuye el aclaramiento hepático de la vincristina. 3. La biodisponibilidad de la digoxina se disminuye por la vincristina. 4. La vinblastina disminuye los efectos de la fenitoína. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. LLA. 2. Enfermedad de Hodgkin y linfomas no Hodgkinianos. 3. Leucemia Linfocítica Crónica LLC. 4. Mieloma Múltiple. 5. Como inmunosupresor en citopenias inmunes. 	<ol style="list-style-type: none"> 17. Toxicidad intratecal, aracnoiditis aguda, disfunción de pares craneales y encefalopatía desmielinizante. (4) 18. Hepatotoxicidad. (5,7) 19. Neurotoxicidad (5,6,7) 20. Conjuntivitis (5) <p>Los números entre paréntesis corresponden al número del antineoplásico de la columna fármaco, indicando cuales de ellos presentan la toxicidad y efecto secundario que se indica.</p>
--	---	--	--

Se han asociado diferentes polimorfismos con la respuesta al tratamiento quimioterapéutico, por ejemplo se sabe que aquellos pacientes con el genotipo GSTM1 nulo presentan menos recaídas, a diferencia de aquellos que lo tienen activo, debido a que en condiciones normales, la GST cataliza la inactivación de muchos agentes antineoplásicos y sus metabolitos, como la ciclofosfamida, antraciclinas, etopósido, etc y al mismo tiempo protege contra el estrés oxidante. Otros genotipos que se han relacionado con la respuesta al tratamiento son, el TYMS 3/3 que se ha asociado con alto riesgo, ya que proporciona una mayor expresión y actividad de uno de los blancos principales del Metotrexato, la timidato sintasa; no así los TYMS2/2, y TYMS 2/3. El acarreador de folatos reducidos NR3C1 AG, también, se ha asociado a recaída hematológica, así como también, el genotipo CC Fok 1 del receptor de vitamina D VDR, que regula la expresión de los citocromos CYP3A4 y la glicoproteína P (*Rocha et al., 2005*).

Con este tipo de estudios, la farmacogenética puede inferir resultados de la terapia antileucémica y puede proveer una herramienta para mejorar la individualización en el tratamiento.

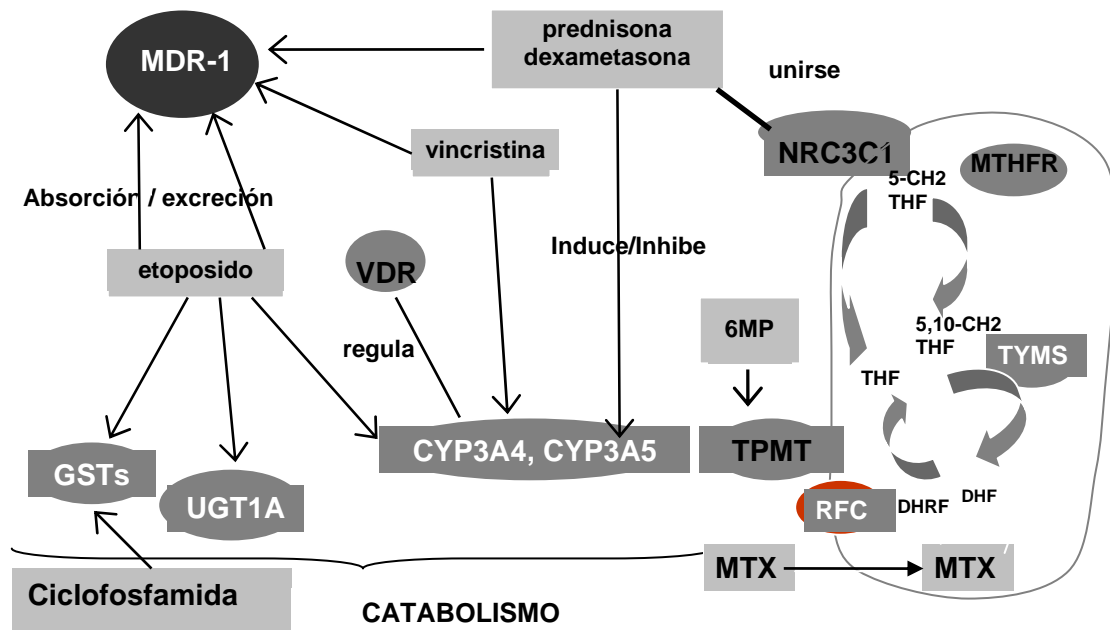


Figura 5. Farmacogenética de los Antineoplásicos empleados en LLA. (Tomado de *Rocha et al., 2005*).

II. JUSTIFICACIÓN

La elevada expresión de antioxidantes celulares y moléculas desintoxicantes de xenobióticos ha sido implicada en la resistencia de células tumorales contra la quimioterapia, al actuar conjuntamente con las bombas de exportación de fármacos y proveer citoprotección para atenuar el estrés oxidante generado por los fármacos, comprometiendo sus efectos citotóxicos. Es por ello que el estudio de los mecanismos de activación de proteínas antioxidantes y desintoxicantes proveerá información que ayude a la optimización de los protocolos quimioterapéuticos que resulten en mejores respuestas de los pacientes con cáncer. Al ser Nrf2 el principal factor de transcripción que regula la expresión de enzimas antioxidantes y desintoxicantes, muchas de ellas relacionadas con la respuesta a quimioterapia, su expresión podría funcionar como un factor pronóstico al tratamiento, ya que una elevada expresión podría significar la ineficiencia del tratamiento. Por otro lado, la línea celular Molt-4, representa un modelo celular idóneo para resolver esta problemática, al ser linfoblastos de Leucemia Linfoblástica Aguda.

III. HIPÓTESIS

Si los agentes antineoplásicos empleados para tratar la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) inducen la expresión génica y proteica del factor de transcripción Nrf-2, entonces en el modelo celular Molt-4 se observara un decremento en los efectos citotóxicos inducidos por dichos fármacos.

IV. OBJETIVO GENERAL

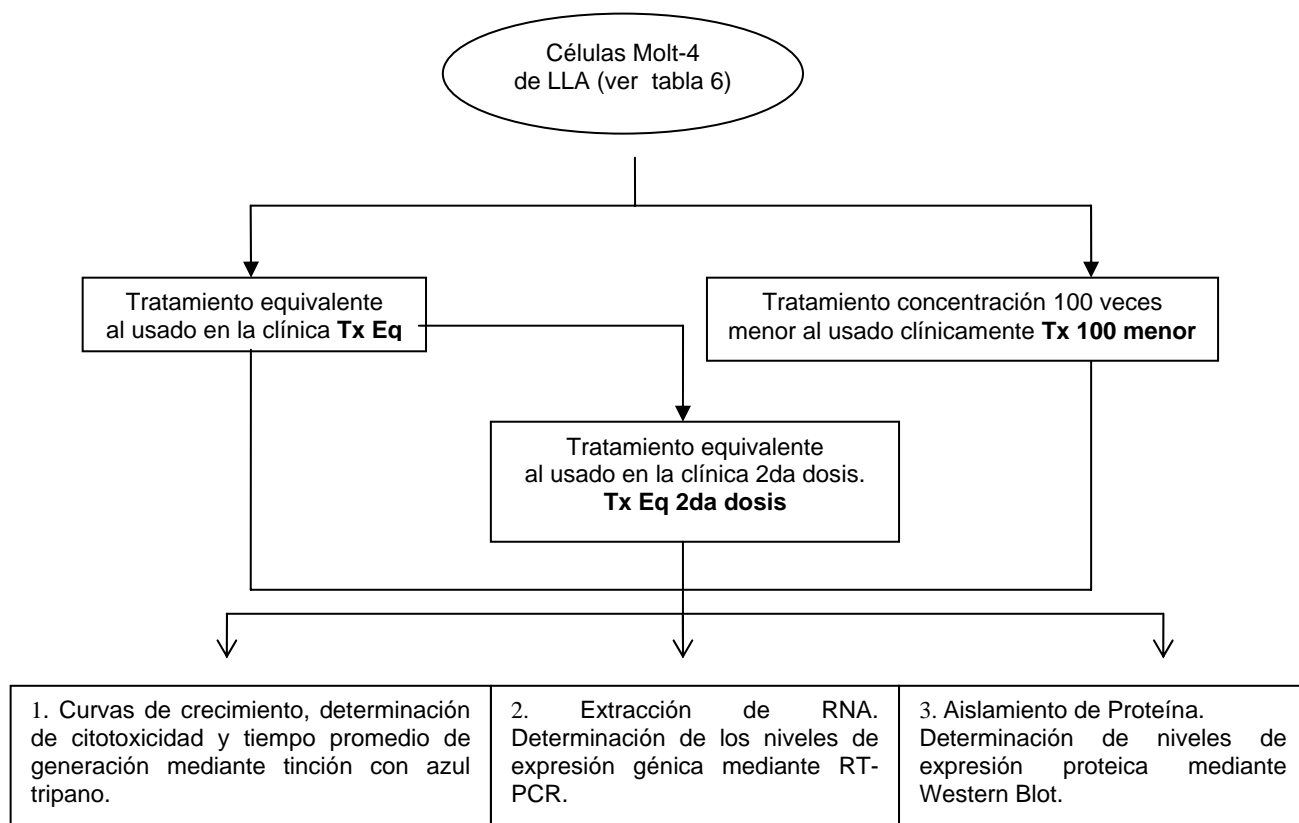
Determinar la relación entre los niveles de expresión génica y proteica del factor de transcripción Nrf-2 y la respuesta a la mezcla de antineoplásicos, en la línea celular Molt-4.

V. OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinar la citotoxicidad inducida tras el tratamiento con la mezcla de antineoplásicos, vinblastina, doxorubicina, L-asparaginasa, prednisona, mecloretamina a concentración equivalente a la usada en la clínica en células Molt-4.
- Determinar el tiempo promedio de generación en los cultivos de células Molt-4 posterior al tratamientos con la mezcla de antineoplásicos a concentración equivalente a la usada en la clínica.
- Determinar los niveles de expresión génica del factor de transcripción Nrf2, inducidos tras los tratamientos con la mezcla de antineoplásicos, vinblastina, doxorubicina, L-asparaginasa, prednisona, mecloretamina a concentración equivalente a la usada en la clínica y 100 veces menor a la usada clínicamente, en células Molt-4.

VI. METODOLOGÍA

Para determinar el papel del factor de transcripción Nrf2 en la respuesta a la quimioterapia de la Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA) se planteó el siguiente diseño experimental:



Modelo Celular.

El modelo celular empleado en este proyecto fueron las células, Molt-4, linfoblastos humanos de Leucemia Linfoblástica Aguda (LLA), cuyas características se enlistan en la tabla 6.

TABLA 6.1 CARACTERÍSTICAS DE LA LÍNEA CELULAR MOLT-4.

Tipo celular	Linfoblastos de LLA tipo T .
Origen	Paciente en recaída, que recibió previa quimioterapia (19 años, masculino).
Características Especiales	Tumorigénicas. Poseen una mutación G > A en el codón 248, del gen p53 haciendo que la proteína no se exprese
Características Citogenéticas	Hipertetraploide, con moda de 95 en 24% de las células. Todas las células presentaron 6 q y t (7;7); solo algunas i(17q). Todos los cromosomas tuvieron 4 copias por célula, excepto N7, X y Y. y de 2-3 copias para N17
Expresión de antígenos	CD1 (49%), CD2(35%), CD3A (26%), B(33%), C(34%), CD4 (55%), CD5(72%), CD6(22%), CD7(77%).
Crecimiento	Crecen en medio RPMI 1640 con L-glutamina 2 mM, NaHCO ₃ 1.5 g/L, 4.5 de glucosa g/L, 10 mM de HEPES, 1mM de piruvato de sodio; 10% de SFB y 1% de Antibióticos, estreptomycin y penicilina. 37°C y 5% de CO ₂ .
Otras Características	No producen Ig ni virus de Epstein- Barr. Presentaron infección con micoplasma que fue superada con antibióticos

(Minowada et al., 1972)

6.2 Tratamientos.

Los tratamientos aplicados a las células Molt-4 se realizaron empleando tres condiciones; la equivalente a la usada en la clínica **Tx Eq** (Hospital General de México), un tratamiento a concentración 100 veces menores a esta **Tx 100 menor** y finalmente, un segundo tratamiento al empleado en la clínica, a las células sobrevivientes al primer tratamiento, **Tx Eq 2da dosis**. Nuestro objetivo principal fue asemejar en lo posible las condiciones de nuestro cultivo de células Molt-4 (línea celular linfoblástica, comercializada por ATCC y establecida por *Minowada et al., 1972*), con aquellas empleadas en la clínica, es decir administrar los fármacos en los intervalos de tiempo y concentraciones equivalentes a las empleadas en el protocolo VAP-Mtx (ver tablas 3 y 4); sin embargo, el administrar estas concentraciones en tiempos análogos a los usados clínicamente implica la acumulación de las dosis, provocándose la potenciación del efecto citotóxico, de tal manera que no fue posible obtener muestra celular para trabajar con ella, por más de 48 horas (resultados no presentados). Por esta razón se decidió administrar solamente una dosis de tratamiento a concentración equivalente y realizar la cosecha de células a las 48 horas, tiempo en el que la citotoxicidad fue aproximadamente del 70%.

Con el objetivo de tener una menor citotoxicidad, que nos permitiera realizar dosis repetidas del tratamiento, decidimos trabajar con la concentración 100 veces menor, ya que previamente realizamos cultivos a una concentración 10 veces menor a la usada clínicamente, pero esta mostró una citotoxicidad a las 48 horas, muy parecida a la del Tx Eq (resultados no mostrados). El tratamiento 100 veces menor presentó una citotoxicidad a las 48 horas, parecida a la del control negativo, 10% aproximadamente (ver gráfica 2 en resultados).

6.3 Establecimiento de la concentración equivalente a la usada en la clínica.

Las concentraciones de agentes antineoplásicos, se consideraron con base a las tablas del protocolo de riesgo estándar para LLA correspondientes a la fase de Inducción a la Remisión Riesgo Estándar, aplicados en el Hospital General de México (ver tabla 3 de la introducción), por ejemplo para el caso de la ciclofosfamida la concentración reportada es, $650\text{mg}/\text{m}^2$.

Es importante considerar que la ciclofosfamida es un profármaco, es decir, que para ejercer su efecto requiere metabolizarse, y este metabolismo se lleva a cabo principalmente en el hígado. En nuestro modelo celular Molt4, este metabolismo no está presente, por lo que administramos uno de los principales metabolitos activos de la ciclofosfamida, la mecloretamina (*Pratt et al., 1994*).

Calculamos la estatura promedio de un paciente adulto con LLA del Hospital General de México, esta fue de 1.68 m y un peso de 73 kg; la superficie en m^2 corresponde a 1.8 según la tabla de Skeel (1982) (ver ANEXO 1). La superficie es 1.8 m^2 , se multiplicó por la concentración indicada para obtener la cantidad de ciclofosfamida necesaria para aplicarse en equivalencia:

$$(650 \text{ mg}/\text{m}^2) \times (1.8 \text{ m}^2) = 1170 \text{ mg}$$

Esta cantidad se administraría en un volumen aproximado de 5L de sangre, de un paciente que para ser considerado riesgo estándar, debe poseer una cuenta de blastos menor a 100 millones de células

por mililitro. Considerando una cuenta promedio de 50 millones de blastos por mililitro de sangre; este paciente tendría una cuenta total de:

$$(50\,000\,000 \text{ blastos/mL sangre}) \times (5000 \text{ mL de sangre total}) = 250 \times 10^9 \text{ blastos.}$$

Este total de blastos son los que recibirían los 1170 mg de mecloretamina; por lo que para equiparar estas condiciones nosotros seguimos el siguiente razonamiento:

Si 250×10^9 blastos reciben 1170 mg de mecloretamina
¿Cuántos mg deberían recibir nuestras células en cultivo?

Al representar esta concentración un tratamiento altamente citotóxico decidimos iniciar con una cantidad de células elevada, para así poder tener muestra suficiente para realizar nuestros análisis independientemente de la cantidad de células muertas. Esta cantidad fue 15 millones de células al día cero (día en que se administra el tratamiento); por lo que haciendo la equivalencia:

$$\begin{array}{l} 250 \times 10^9 \text{ blastos} \longrightarrow 1170 \text{ mg de mecloretamina} \\ 15 \times 10^6 \text{ blastos} \longrightarrow 0.072 \text{ mg de mecloretamina} \end{array}$$

Esta cantidad se administró en 15 mL de medio, en los que se encontraban los 15 millones de células, a densidad de 1 millón/mL. La concentración equivalente usando este volumen es 4.8×10^{-3} mg mecloretamina /mL de medio y tomando en cuenta el P.M. del fármaco (192.51), esto corresponde a 24.31 μ M, concentración de final de mecloretamina a la que están sujetas 15 millones de células en 15 mL de medio.

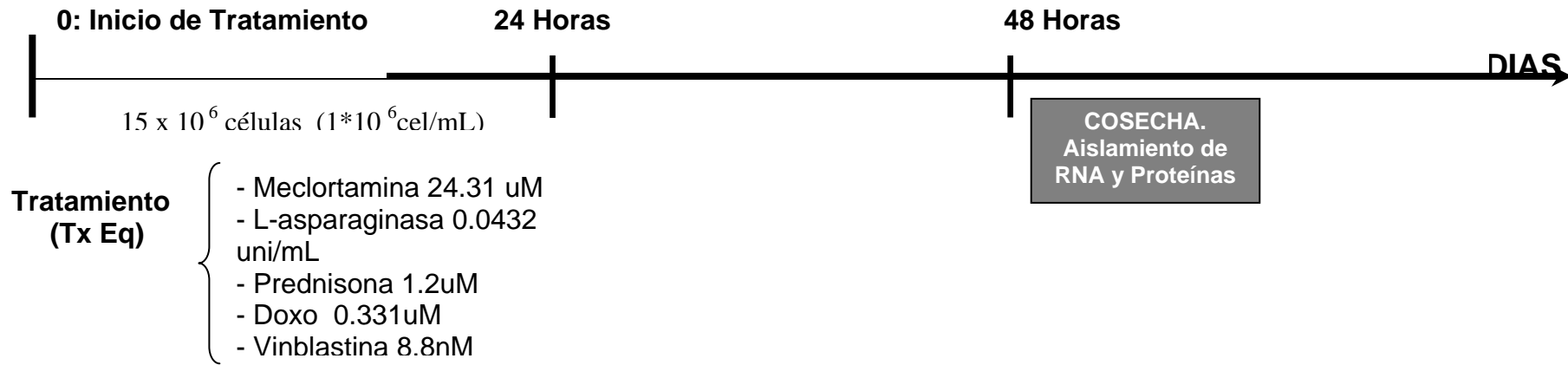
El mismo razonamiento se siguió para la concentración 100 veces menor, y de igual manera la concentración se ajustó al número de células presentes en el cultivo, ya que en este caso comenzamos con un número menor de células (5 millones), para poder mantenerlas en cultivo 7 días:

$$\begin{array}{l} 250 \times 10^9 \text{ blastos} \longrightarrow 11.7 \text{ mg mecloretamina} \\ 5 \times 10^6 \text{ blastos} \longrightarrow 2.34 \times 10^{-4} \text{ mg de mecloretamina} \end{array}$$

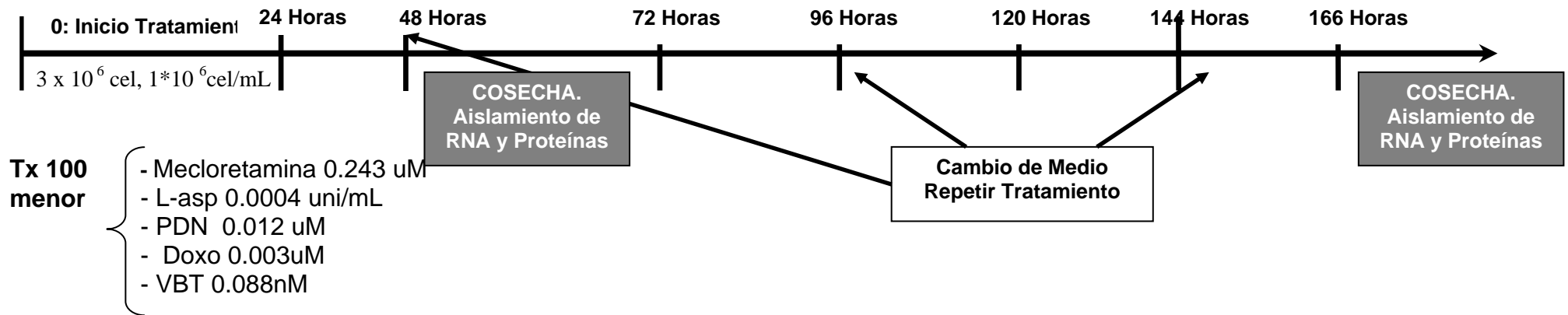
Esta cantidad se administró a 5 mL de medio, en los que se encontraban 5 millones de células, a densidad 1 millón/mL, por lo que la concentración utilizando este volumen sería 4.68×10^{-5} mg de mecloretamina /mL de medio, correspondiente a 0.243 μ M .

Los mismos cálculos se efectuaron para todos los fármacos empleados: vinblastina, L-asparaginasa, prednisona y doxorubicina, tomando en cuenta su peso molecular, y solubilidad (ver ANEXO 2. Características Físico-químicas de los fármacos empleados en los diferentes tratamientos). Los tratamientos administrados y sus variantes se muestran gráficamente en el esquema de tratamientos.

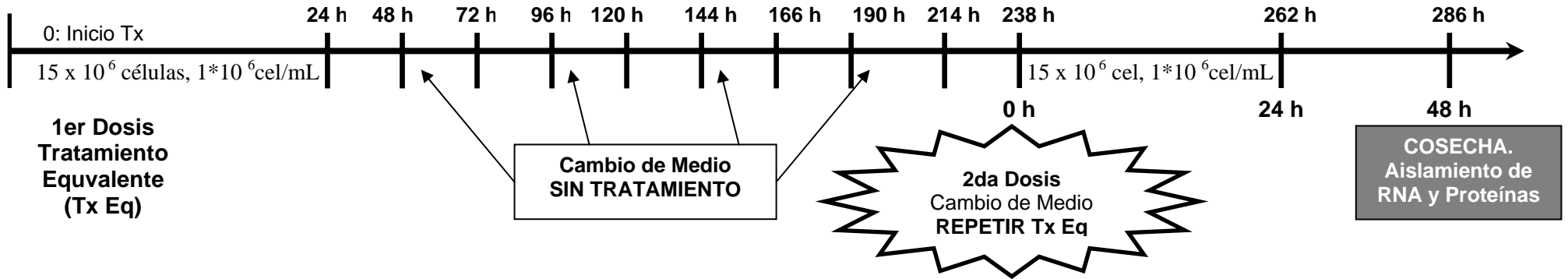
➤ **Tratamiento equivalente al empleado en la clínica “Tx Eq”**



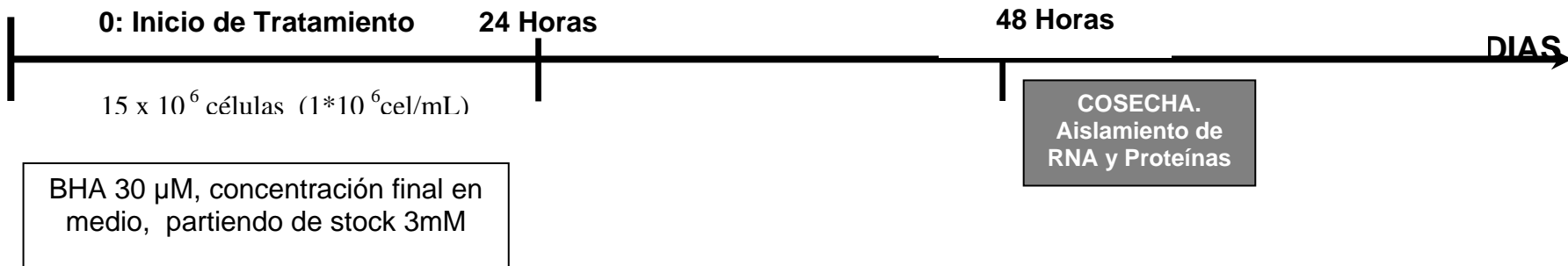
➤ **Tratamiento 100 veces menor al empleado en la clínica “Tx 100 menor”**



➤ **Tratamiento Equivalente al empleado en la clínica, segunda dosis “Tx Eq 2da dosis**



➤ **Tratamiento Control positivo**



6.5 Curvas de crecimiento, citotoxicidad y tiempo promedio de generación.

Las células crecieron en medio RPMI-1640 (Sigma R4130), suplementado con HEPES 10 mM, 25 mM de L-glutamina, 10% de suero fetal bovino (GIBCO 160000-044) y 1% de antibióticos penicilina-estreptomicina 10,000 unidades/mL (GIBCO 4064), a 37°C y 5% de CO₂.

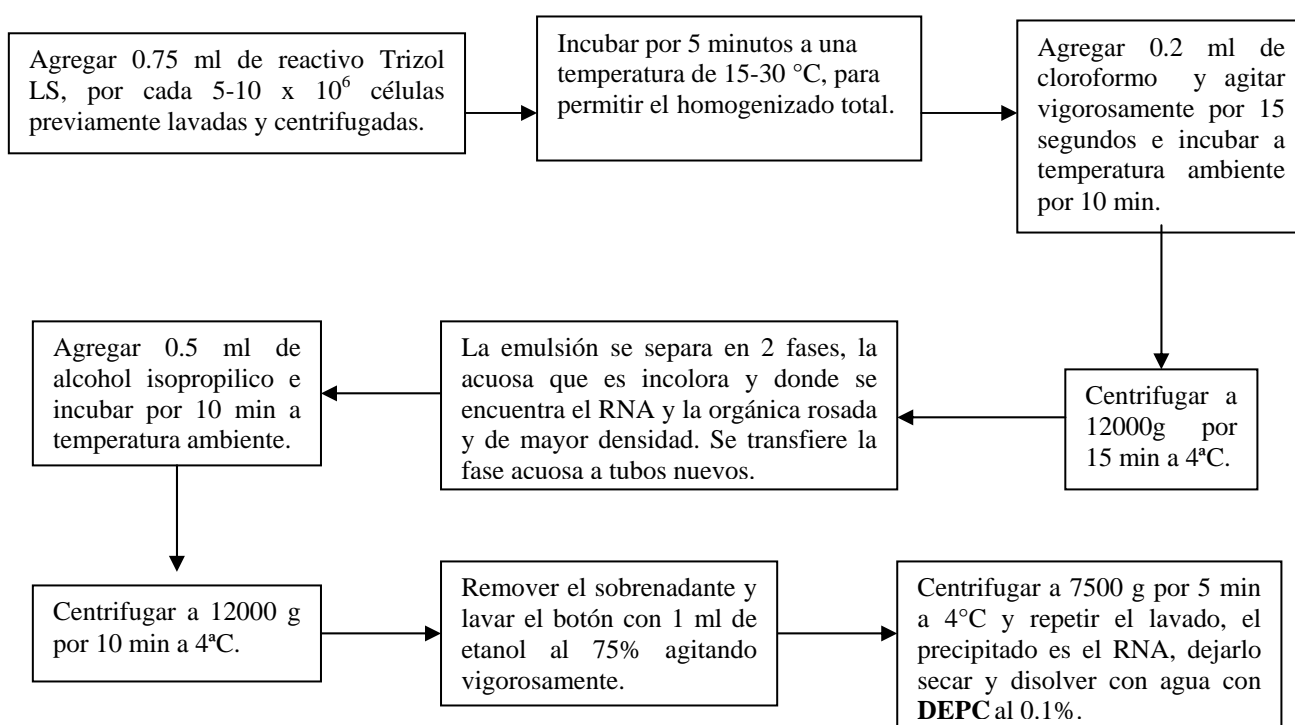
Para establecer las curvas de crecimiento, las células se cultivaron en frascos de 25 cm², y fueron determinados cada 24 horas empleando una tinción de exclusión con azul tripano al 0.4%; este procedimiento también se empleó para determinar la citotoxicidad. Para la determinación del tiempo promedio de generación se realizó la misma tinción y se aplicó la siguiente fórmula:

$$(\log N_2 - \log N_1) / \log 2$$

donde N₁ representa el número de células vivas iniciales y N₂ el número de células vivas finales, este valor corresponde al número de veces que se dividieron las células en el intervalo de tiempo de cuenta inicial a cuenta final, en nuestro caso este tiempo fue 24 horas. Con estos valores se hace la relación para saber en que tiempo (horas) las células se duplicaron una vez y este es el tiempo promedio de generación.

6.6- Extracción de RNA y RT-PCR.

El RNA total de las células se aisló usando Trizol (No. Catálogo 15596-018, Ver Anexo 5) para células en suspensión, mediante el siguiente protocolo:



Una vez resuspendido el RNA se cuantificó en el espectrofotómetro a 260nm. La razón de absorbancia A₂₆₀/A₂₈₀ se empleó para comprobar la pureza y calidad del RNA aislado.

RT-PCR.

Esta reacción esta basada en la capacidad de la DNA polimerasa para generar copias idénticas de fragmentos de DNA a partir de oligonucleótidos específicos para que la enzima reconozca fragmento del gen a amplificar en una reacción que contiene los elementos necesarios, tales como; dNTPs (nucleótidos trifosfatados de adenina, timina, guanina, citosina), sulfato de magnesio, y un buffer de pH neutro. A diferencia de la reacción de PCR convencional, esta reacción se vale de la enzima *Retro Transcriptasa* para convertir el RNA de nuestra reacción en DNA de cadena simple, para su posterior amplificación, y de esta manera poder determinar la expresión génica.

Para realizar nuestros experimentos, empleamos el sistema de RT-PCR de PROMEGA (No. Catalogo A1250) que contiene los siguientes reactivos en las cantidades especificadas en paréntesis para cada una de las reacciones de interés.

- Enzima Transcriptasa Reversa AMV, 5 unidades/uL (1µL)
- Tfi DNA Polimerasa, 5 unidades/uL (1µL)
- Mezcla de dNTP`s 10Mm de cada base, A,T,G,C. (2µL)
- AMV/Tfi 5X amortiguador de reacción. (10µL)
- Sulfato de Magnesio 25mM (2µL).

A la mezcla anterior se agregó también, 2uL a concentración 0.2ug/µL de oligonucleótido para amplificar un fragmento de 182bp del gen Nrf2 Humano, cuya secuencia sentido fue, CATTAACT CCCTGTTGTTG (IFC NrfF2-DB-F UBM No. 5118) y antisentido CTTTCAAATGATCTAAATCTTGC (IFC NrfF2-DB-R UBM No. 5119); se utilizó como control de expresión (gen constitutivo), oligonucleótidos para el gen que codifica para la enzima glucosa aldehído fosfato deshidrogenada, GAPDH cuya secuencia sentido fue CGCTGACTACGTCGTGGAGT (IFC GAPDH F-1 UBM No. 5557), y para el antisentido CAGGTTTTTCTAGACGGCGA (IFC GAPDH R UBM No. 5380). Finalmente se agrego el volumen de muestra que contuviera 1ug de RNA total y se completo el volumen hasta 50 uL con agua libre de nucleasas o agua con DPEC AL 0.1%.

Se llevo acabo la reacción en el termociclador a 35 ciclos y los productos se resolvieron en una electroforesis horizontal en un gel de agarosa al 3% previamente teñido con bromuro de etidio y se analizó la densitometría de las bandas con el programa Kodak 1D, versión 3.5.3, se utilizó como marcador de peso molecular una escalera de DNA de 100bp DNA, (Invitrogen 15628-019).

6.7 Expresión proteica con Western Blotting

Para obtener la proteína total, las células Molt-4, después de ser cosechadas y centrifugadas a 5000 rpm por 5 minutos; se resuspendieron en 1 mL de buffer RIPA a 4°C (PBS 1X pH: 7.4-7.6, Nonidet P40 al 1%, SDS 0.1%, Desoxicolato de sodio al 0.5%), mas inhibidores de proteasas PMSF (10mh/mL), en frío por mínimo 30 min. Posteriormente se centrifugaron a 10 000 X g por 10 min a 4°C, el sobrenadante contiene las proteínas solubles y el lisado total de células permaneció en el botón.

Se procedió a la cuantificación de proteína total, mediante el protocolo de ácido bicinónico (PIERCE 23225), empleando como estándar una curva de albúmina. Se colocan 50 µg de proteína total, en un gel al 10% de acrilamida, el cual se sometió a una electroforesis vertical por 1.5 horas a 100 volts. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa mediante electroforesis. Para la identificación de las proteínas se utilizaron los siguientes anticuerpos: anti-Keap1 (E-20 sc_15246, goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology), anti-Nrf2 (T-19, sc-30915, goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) y anti-actina (C-11, sc-1515, goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) anti-γGCSm (T-16 sc-22663 goat polyclonal IgG, Santa Cruz Biotechnology) y como marcador de peso molecular se utilizó el marcador Kaleidoscope presatines standards BIORAD 161-0324. Los anticuerpos primarios se diluyeron en solución de bloques 1:10 y se incubaron a 4° C toda la noche; la membrana se lavó 3 veces con TBS-Tween al 0.1% y se incubaron con el anticuerpo secundario Rabbit anti-Goat IgG (H+L) conjugado con HRP (peroxidasa de rábano ZIMED 81-1620), el cual se diluyó 1:20 000 en TBS-Tween 0.1%, 10% de sol de bloque, y se incubó con las membranas toda la noche a 4°C. Posteriormente se lavaron las membranas 3 veces con TBS-Tween 0.1% y se reveló la membrana mediante autoradiografía con los reactivos ECL Western Blotting Análisis Systems (G.E. RPN2109), lo cual consiste en una reacción quimioluminiscente que es catalizada por la peroxidasa conjugada al anticuerpo secundario, y que se hace evidente al quemar la placa de revelado, produciendo manchas oscuras. Finalmente, se realizó un análisis densitométrico empleando el programa Kodak 1D, versión 3.5.3.

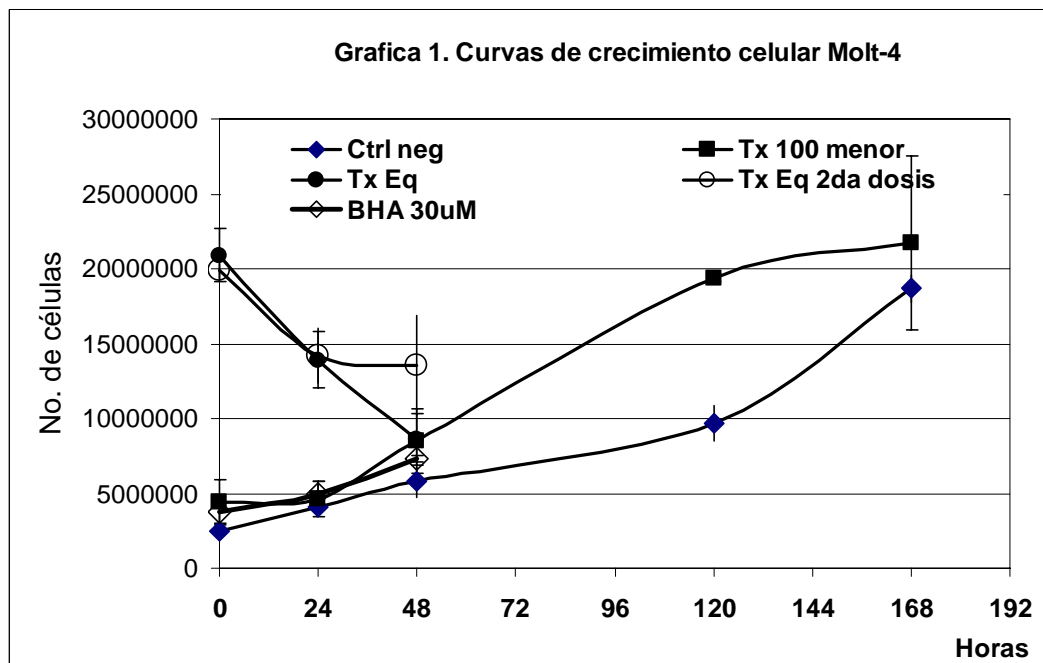
4.- Estadística.

El análisis de los resultados se realizó mediante la prueba estadística paramétrica, t de Student, empleando el programa *Graph PAD In Stat*, versión 1.14 (1990). El intervalo de confianza establecido fue del 95% con distribución de dos colas. El mismo análisis se aplicó para todos los parámetros evaluados para establecer diferencias con respecto al control negativo.

VII. RESULTADOS Y ANÁLISIS.

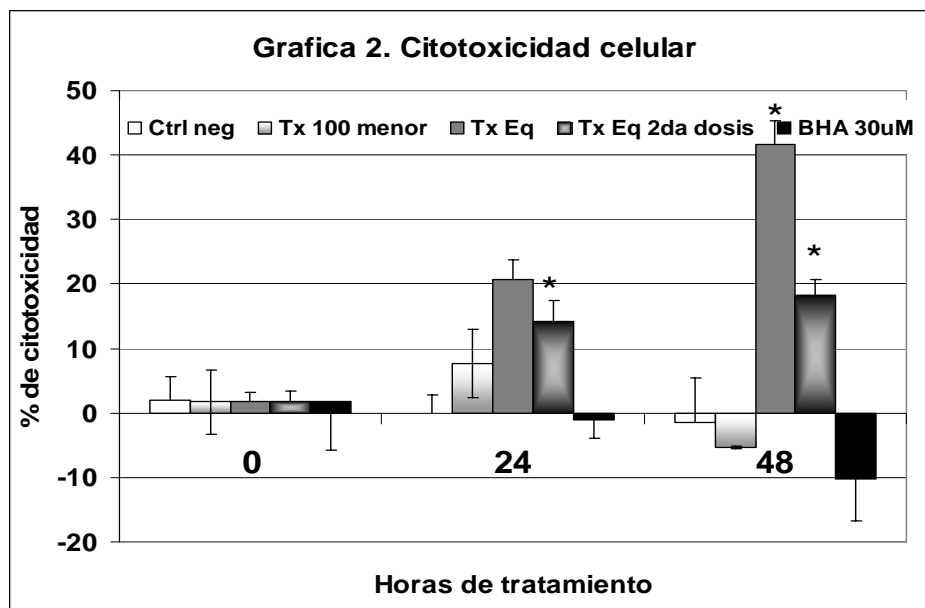
Curvas de crecimiento, citotoxicidad y tiempo promedio de generación.

Las curvas de crecimiento de las células Molt-4 se muestran en la gráfica 1. El promedio de las curvas de crecimiento descritas por el control negativo, es decir, células sin tratamiento, muestran un crecimiento lineal analizado desde las 24 hasta las 168 h de cultivo. El comportamiento del crecimiento celular, generado por el tratamiento equivalente al empleado en la clínica, se comportó como se esperaba, mostrando una disminución de aproximadamente el 20% en el número de células a la 24 h de cultivo y de más del 60% a las 48 h. Esto refleja la capacidad citotóxica de los fármacos antineoplásicos empleados, por esta razón se busco una concentración quimioterapéutica menor, que nos permitiera mantener el crecimiento celular por más tiempo, con la finalidad de poder aplicarle al cultivo de células Molt4, al menos tres tratamientos. Esta concentración fue la denominada "100 veces menor" a la usada en la clínica, condición para la cual observamos inhibición del crecimiento, a partir de administrado el tratamiento y hasta las 24 horas; sin embargo el crecimiento celular se recuperó en las siguientes 48 h de cultivo, manteniéndose así hasta 96 h de cultivo, este crecimiento es incluso mayor que el del control negativo, pero a las 96 horas, cuando es administrada la tercera dosis, se vuelve a presentar inhibición en el crecimiento hasta las 168 h de cultivo, que es el tiempo al que se cosecha el cultivo. La gráfica 1 también nos muestra el comportamiento celular del tratamiento equivalente de 2da dosis, el cual muestra un decremento importante en el número de células a las 24 h, casi de la misma magnitud que la mostrada por el tratamiento equivalente, sin embargo, a las 48 h de cultivo, el número de células Molt-4 se mantiene constante. Por otro lado, el tratamiento con BHA, analizado en cultivos de 48 h siempre mostró comportamientos semejantes al control negativo, reflejando ser una variable que no inhibe el crecimiento celular.



El crecimiento celular de cierta manera refleja los efectos citotóxicos que padecen los cultivos celulares, sin embargo cuando estos se analizan como porcentaje se compensa el hecho de partir de diferente número de células en los diferentes cultivos. La citotoxicidad de los cultivos celulares de Molt-4 hasta 48 h generada por las diferentes condiciones evaluadas se muestra en la gráfica 2; donde es posible observar que hay mayores efectos citotóxicos inducidos por el tratamiento equivalente que los generados por el tratamiento 100 veces menor, además de evidenciarse la moderada citotoxicidad a las 48 horas de tratamiento, inducida por el tratamiento equivalente en segunda dosis, respecto al Tx Eq; y la ausencia de efectos citotóxicos por parte del BHA.

El hecho de que el tratamiento equivalente al usado en la clínica presente una elevada citotoxicidad, nos indica que las células Molt-4, de Leucemia Linfoblástica Aguda, son sensibles a la mezcla de antineoplásicos usados en este tratamiento, que son los mismos que se aplican en el Hospital General de México. Sin embargo, el remanente de células sobrevivientes a las 48 h de este tratamiento, podrían poseer mecanismos de resistencia a los efectos citotóxicos de estos antineoplásicos, entre los cuales podría estar implicada la activación de la vía de Nrf2; es por ello que decidimos trabajar en la recuperación de éstas células, para su posterior análisis, a esta condición la llamamos, tratamiento equivalente de 2da dosis (ver esquema de tratamientos). Las células tratadas bajo estas condiciones mostraron una citotoxicidad entre 15% y 20% a las 48 h de cultivo, valores que son significativamente menores ($p > 0.05$) a los obtenidos bajo el tratamiento equivalente de una sola dosis. El tratamiento con BHA (30 μ M) no mostró efectos citotóxicos con respecto al control negativo, a las 48 horas, sin embargo el hecho de generar en los cultivos una viabilidad superior a la de este mismo control, lo explicamos como el posible resultado de su capacidad antioxidante, como se ha sido reportado en algunos trabajos empleando BHA a concentraciones menores de 50 μ M (*Kraft et al., 2004*), ya que, a concentraciones entre 0.2 y 0.3 mM se ha reportado inhibición de la proliferación y apoptosis (*Saito et al., 2003*).



* Estadísticamente significativo con $p > 0.05$

Si bien la capacidad citotóxica de un fármaco antineoplásico es fundamental, también lo es su capacidad citostática (Rojas, 1992; Pratt et al., 1994; Rojas y Valverde 2007); este parámetro lo evaluamos determinando el tiempo de duplicación, que es el tiempo que la célula invierte de mitosis a mitosis (Barton-Burke., 2001). En la tabla 7, se muestran los promedios del tiempo de duplicación, o tiempo generacional, calculados para cada condición experimental probada.

Tabla 7. Tiempo Promedio de Generación, determinado en células Molt-4, tratadas con la mezcla de antineoplásicos VAP Mtx.

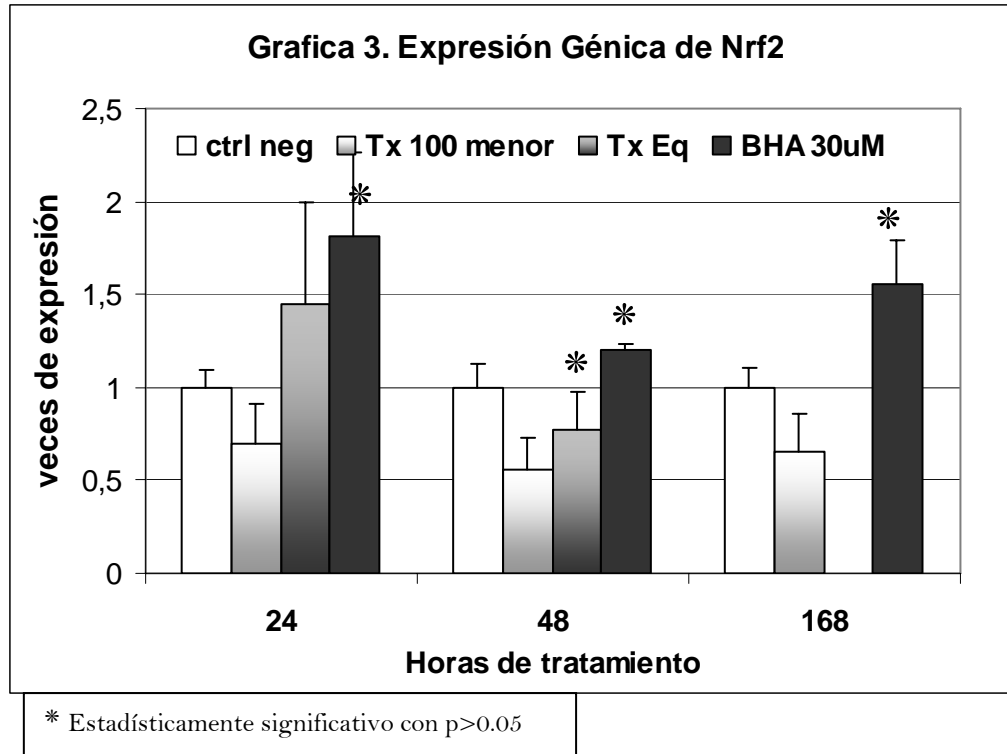
Tiempo Promedio de Generación (TPG)	
Condición	TPG en horas
Ctrl neg	57,47 ± 1,64
Tx 100 menor	68,17 ± 2,63 *
Tx. Eq	No determinado*
Tx Eq 2da dosis	No determinado*
BHA 30 uM	53,58 ± 15,87
* No se puede calcular puesto que el número de células al tiempo final es menor al número de células inicial. * Significativo estadísticamente (<i>t de Student, p>0.05</i>)	

Como podemos observar, aunque el tratamiento 100 veces menor no generó citotoxicidad, si causó aumento significativo, en el tiempo de duplicación promedio, 68 h contra 57 h del control negativo. Debido al fuerte efecto citotóxico del tratamiento equivalente en sus dos modalidades (dosis única y 2da dosis), no pudimos determinar el tiempo promedio de generación; matemáticamente este valor no puede ser determinado, biológicamente consideramos que el daño producido por los antineoplásicos a esta concentración es tan fuerte, que no puede ser reparado, por lo que la célula muere probablemente mediante apoptosis tal como se ha reportado con algunos agentes antineoplásicos (Meléndez y Maldonado, 1998). Por otro lado, cabe señalar que el tratamiento con el inductor de Nrf2 (BHA) no afectó significativamente este parámetro, mostrando un tiempo generacional promedio de 53.58 horas.

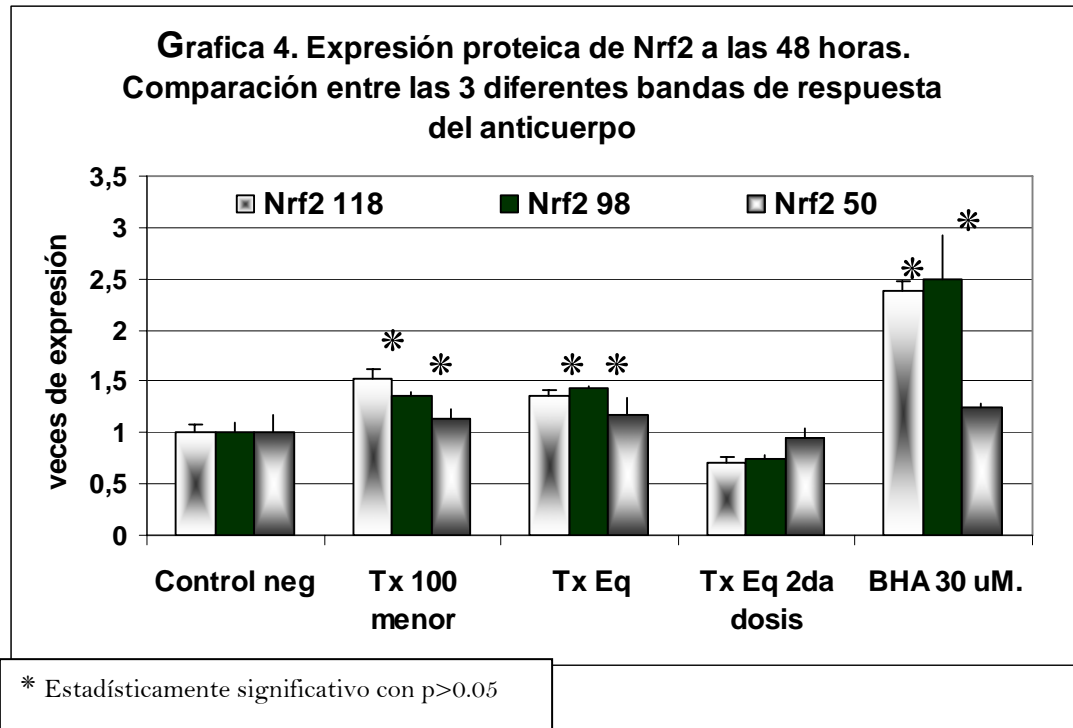
Expresión Génica y Proteica en cultivos de 48 horas.

Los resultados obtenidos de la expresión génica de Nrf2, en cultivos de células Molt4 tratadas con la mezcla de antineoplásicos (VAP-Mtx) por 24 h y 48 h, determinados a través de RT-PCR se muestran en la gráfica 3. Si bien es posible apreciar que los tratamientos con la concentración equivalente generaron cambios en la expresión génica, estos no son estadísticamente significativos, debido a la alta variabilidad presente en los datos individuales de los tres experimentos realizados. Con respecto a los cambios de expresión génica generados por el tratamiento 100 veces menor, en la gráfica 3 se observa la subexpresión de Nrf2 en todas las condiciones mostradas, sin embargo, solo en los cultivos de 48 h fue posible establecer diferencias estadísticas significativas con respecto al control negativo ($p>0.05$). Los cambios en la expresión génica de Nrf2 generados por el tratamiento con su inductor, BHA, señalan

la sobreexpresión significativa estadísticamente ($p > 0.05$) a los tres tiempos evaluados, 24, 48 y 168 horas. Con los resultados generados por la exposición a BHA $30\mu\text{M}$, podemos considerar que el modelo celular Molt4, es capaz de responder a dicho estímulo induciendo la vía de Nrf2, que al ser una vía de protección ante el estrés oxidante, responde rápidamente observando la mayor expresión de Nrf-2 a las 24 horas (gráfica 3), otros trabajos han reportado la inducción de Nrf-2 a través de BHA en las primeras 48 h posteriores al tratamiento (Sing et al., 2006).



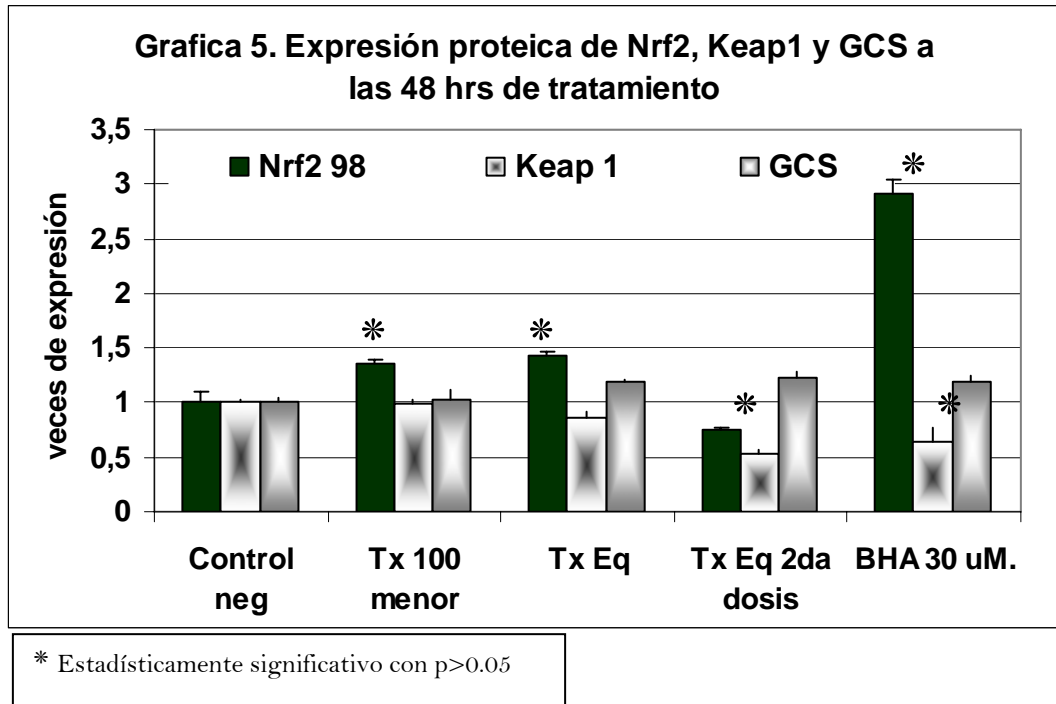
En lo referente a los cambios de expresión proteica de Nrf2 en cultivos de 24 h y 48 h determinados mediante Western Blotting, es importante señalar el análisis que realizamos previo a la interpretación de los resultados. Se utilizó el anticuerpo anti-Nrf2 T19 (sc-309015, Sta. Cruz Biotechnology), para el cual, la casa comercial refiere un patrón de tres bandas de aproximadamente 50 kDa, una alrededor de 100 kDa y una mayor a 110 kDa, ellos señalan que la banda correspondiente a Nrf2 es la de 50 kDa. Sin embargo, al no detectar cambios en el patrón de bandeado señalado coincidimos con un reporte de Walkees y colaboradores (2007), en el cual se describen cambios a nivel proteico de Nrf2, (empleando este mismo anticuerpo) utilizando arsenito de sodio $10\mu\text{M}$ como inductor de la vía (Kobayashi et al., 2005), en las bandas de 118 kDa y 98 kDa, en diversas líneas celulares. Este grupo sugiere ser la banda de 98 kDa es la que presenta actividad y que el aumento en el peso molecular es debido a fosforilaciones de la proteína activa, ya que el peso sin fosforilaciones es de 68 kDa (Pi et al., 2007). Ante esta situación, nosotros evaluamos el comportamiento en el modelo celular Molt4 de cada una de las tres bandas, 118 kDa, 98 kDa y 50 kDa, para determinar cuál de ellas respondía al inductor de Nrf2, el BHA a concentración $30\mu\text{M}$.



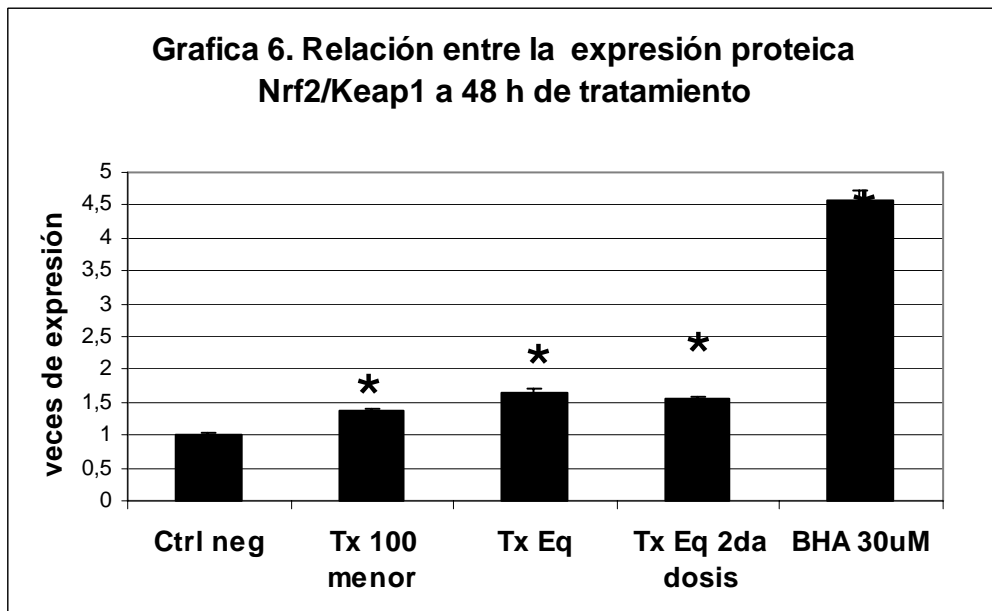
En la gráfica 4 se presentan los resultados obtenidos con cada banda, a las 48 horas de tratamiento, elegimos este periodo de tiempo porque es en el cual se han reportado cambios en la expresión de Nrf2 y sus efectores, tratados con BHA 30 μM en diversos trabajos (*Kraft et al., 2004; Sing et al., 2006*). Respecto al control, el tratamiento equivalente y el 100 veces menor muestran aumentos de casi un 50%, en la banda de 118 kDa y de 98 kDa, ambos aumentos en la expresión de Nrf2 son significativos estadísticamente ($p > 0.05$), mientras que la banda de 50 kDa no mostró cambios en sus niveles de expresión. Contrario a lo que esperábamos, la proteína Nrf2 no mostró cambios en su expresión tras el tratamiento equivalente de segunda dosis, en ninguna de sus bandas, a este tiempo. El aumento en la expresión proteica de Nrf2 inducido por el BHA en las banda de 118 kDa y 98 kDa nos llevo a considerar la banda de 98 kDa la apropiada para realizar el análisis y la interpretación de los resultados en este trabajo.

Una vez establecida la banda a considerar para determinar niveles de expresión proteica de Nrf2, evaluamos los cambios a este mismo nivel de Keap1 y GCS a las 48 h de tratamiento, resultados que se muestran en la gráfica 5. Estos resultados muestran que el tratamiento equivalente y 100 veces menor solo inducen de manera estadísticamente significativa la expresión de Nrf2 a nivel génico, no mostrando cambios a nivel proteico con respecto al control de Keap1 y GCS. En este análisis incluimos el tratamiento equivalente 2ª dosis, el cual genero la subexpresión de Nrf2 y Keap1, pero solo la de Keap1 fue estadísticamente significativa ($p > 0.05$). En esta misma gráfica, es posible observar que el tratamiento con el inductor de la vía de Nrf2, generó la sobre expresión del factor de transcripción, la subexpresión de su represor Keap1 ambas estadísticamente significativas, y un aumento no significativo en la expresión del efector de la vía, la γ -GCS.

Cabe mencionar que en esta gráfica, se resaltan también los decrementos de Keap1, tanto por el tratamiento con BHA, como por el tratamiento equivalente de 2ª dosis. Hasta el momento no se han reportado trabajos que señalen la degradación o decremento en la expresión de Keap1 para inducir la vía, sin embargo, nosotros consideramos que el hecho de que Keap1 actué como represor directo de Nrf2, podría significar que su decremento en la expresión o su degradación, facilite la translocación nuclear de Nrf2 (ver gráfica 6).

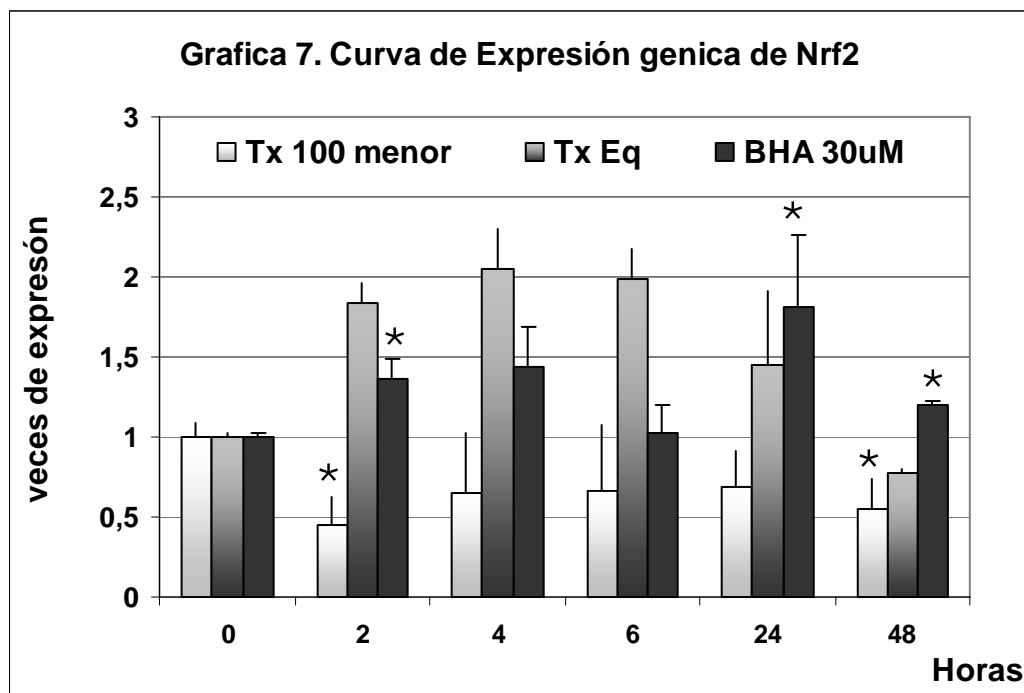


Con el propósito de determinar si había o no inducción de la vía de Nrf-2 a nivel proteico, se estableció relacionar los niveles de expresión proteica de Nrf-2 y Keap1, a través del calculo del cociente Nrf2/Keap1, datos que se muestran en la gráfica 6. Para todos nuestros tratamientos encontramos incrementos significativos respecto al control ($p > 0.05$), lo cual interpretamos como una mayor expresión de Nrf2 con respecto a la de Keap1; como era de esperarse el mayor cociente lo presenta el tratamiento con BHA 30 μ M, con un valor de aproximadamente 4.5, esto es Nrf2 se expreso 4.5 veces más que Keap 1.



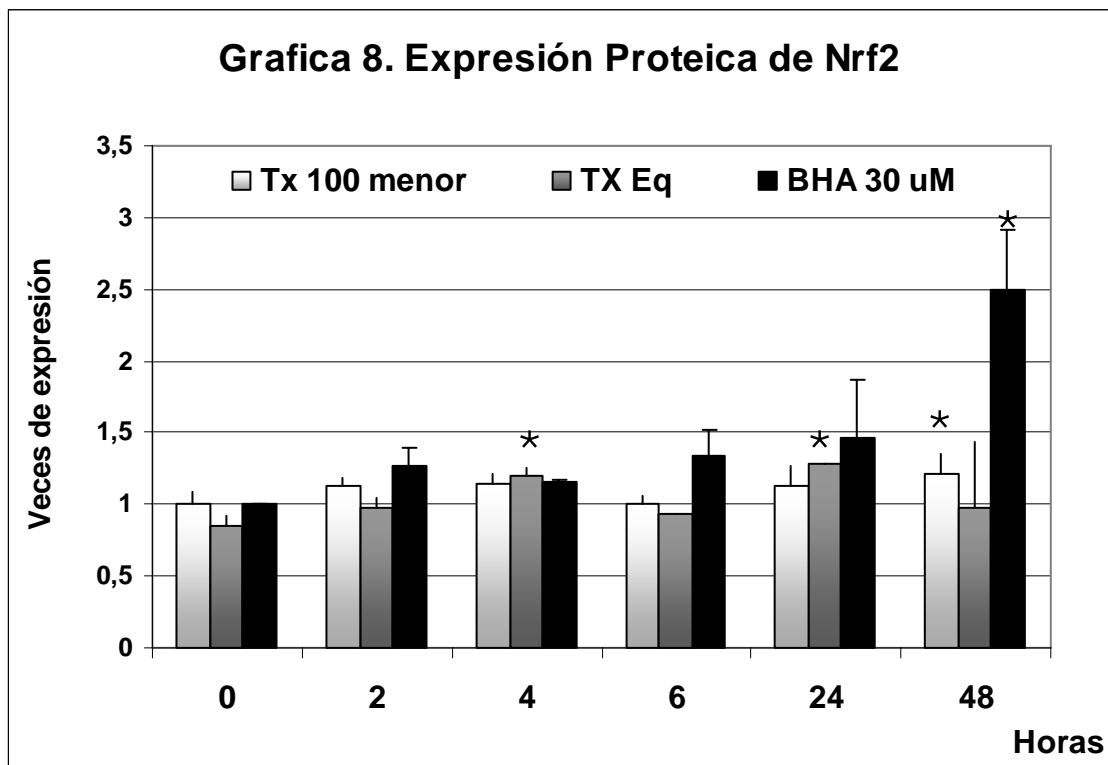
Los resultados anteriores nos exhortaron a realizar experimentos de curso temporalidad menores a las 24 h de cultivo, ya que al parecer la inducción de la vía de Nrf2, al ser una vía de protección a estrés, es activada en periodos inmediatos al estímulo de la vía (Kobayashi et al., 2005). Estos experimentos se realizaron para monitorizar cambios en la expresión del factor de transcripción Nrf2 cada 2 horas después del estímulo y hasta las 6 horas de cultivo subsecuentes; los resultados se muestran en la gráfica 7. Al igual que los resultados anteriores, primero presentamos los datos de expresión génica y posteriormente los de expresión proteica.

De los resultados presentados en la gráfica 7 se puede observar que en efecto, la estimulación de la vía se presento a tiempos menores a 24 h, puesto que el inductor de Nrf2, BHA, indujo la sobre expresión del factor de transcripción de manera estadísticamente significativa desde la 2 h posteriores al tratamiento, alcanzando su máximo nivel de expresión a las 24h a partir del cual muestra una disminución debida muy probablemente a la autorregulación de Nrf2. Los resultados del tratamientos equivalente muestran la inducción de Nrf2 (75% sobre expresión) desde las 2h posteriores al tratamiento, los cuales se mantienen constantes y comienzan a disminuir a las 24 h, es decir actúan de forma similar a lo mostrado por el tratamiento con BHA, lo cual consideramos poco alentador para el éxito del tratamiento antineoplásico, puesto que se espera la inducción de proteínas efectoras de Nrf2 que modulen negativamente el efecto de los fármacos (Rocha et al., 2005). Sin embargo, la respuesta del tratamiento 100 veces menor fue la inversa, puesto que se presentó la subexpresión de Nrf2 (50%) con respecto al control desde las 2 h posteriores al tratamiento con la mezcla de antineoplásicos lo cual nos lleva a sugerir que no habrá cambios en la expresión de efectores de Nrf2.



* Estadísticamente significativo con $p > 0.05$

Los niveles de expresión proteica de Nrf2 determinados en cursos temporales menores, se muestran en la grafica 8. Estos resultados muestran el mismo comportamiento que los determinados a nivel de expresión génica, solo difieren en que los cambios de magnitud son más conservadores a nivel de proteína. Nuevamente se observa que el inductor de Nrf2, BHA induce la sobre expresión del factor de transcripción desde las 2 h posteriores al tratamiento y esta sobre expresión incrementa de forma gradual hasta las 48h posteriores a la administración de la mezcla de antineoplásicos. Los incrementos a nivel de proteína inducidos por el tratamiento equivalente son mas evidentes a las 4h posteriores al estímulo y se mantienen hasta las 24h para posteriormente disminuir. Para el caso del Tx 100 menor observamos discretos incrementos que incluso llegan a ser significativos estadísticamente a las 48 h posteriores al tratamiento. De acuerdo con la grafica 7, hubiéramos esperado que se presentarían decrementos en la expresión proteica del factor, sin embargo puede deberse a la degradación proteosomal de Nrf-2, dado que sabemos que la unión de Nrf2 con Keap1 lo hacen blanco de degradación, al actuar Keap1 como un adaptador específico de sustrato de la ligasa de ubiquitinación Cul3 (Kobayashi *et al.*, 2005).



VIII. CONCLUSIONES

El objetivo de cualquier tratamiento antineoplásico es la eliminación del tumor y con esto la muerte de las células malignas responsables de la formación del mismo (*Fernández, 1998*). Aunque algunos tratamientos alternos son prometedores; la mayoría no ha alcanzado los resultados esperados. Los trasplantes alogénicos siguen siendo restringidos a pacientes con donadores HLA compatibles y en los autólogos, incluso los de células troncales, se siguen presentando recaídas considerables debidas a la contaminación por células transformadas capaces de volver a inducir la leucemia. Por otro lado, la terapia génica sigue estando lejos de ser un tratamiento accesible a todos los pacientes, principalmente por su elevado costo y por la falta de protocolos para su adecuada aplicación. Por todas estas razones, la quimioterapia combinada sigue siendo el método más utilizado, para tratar a la mayoría de los tumores, incluyendo las leucemias, al menos en nuestro país.

Desafortunadamente la quimioterapia tradicional también tiene desventajas considerables: al seguir una cinética de primer orden en su toxicidad, nunca va a eliminar el 100% de las células (*Fernández, 1998*), lo cual implica, que siempre quedará un pequeño porcentaje de células, que podrían implicar una recaída en el paciente; por otro lado, es bien sabido que, las neoplasias humanas no siempre muestran un crecimiento exponencial, si no que presentan una cinética gompertziana. De manera similar el grupo de Blair y Bonnet (1997) ha propuesto que la mayoría de las células leucémicas no son capaces de proliferar y que solo una pequeña población de éstas, (0.2-1.0 %), puede transmitir la patología en ratones NON/SCID; por lo que los fármacos ciclo específicos, como lo son la mayoría, no serían eficaces al tener como blanco un porcentaje tan bajo de células. Además la inestabilidad génica que se presenta en los tumores, favorece la adquisición de mutaciones y la expresión selectiva de genes que le confieren a estas células ventajas de sobrevivencia ante situaciones adversas, como podría ser la exposición a un tratamiento quimioterapéutico, por lo que frecuentemente se presentan mecanismos de resistencia a fármacos antineoplásicos en células tumorales (*Borst et al., 2000; Gottesmann et al., 2002*).

Por lo anterior, el propósito de este trabajo fue estudiar el papel de Nrf2 ante la respuesta a la quimioterapia en la línea celular linfoblástica Molt-4, al actuar como el principal factor de transcripción ubicuo que regula la expresión de enzimas antioxidantes y de metabolismos de fase II, involucradas en la desintoxicación de xenobióticos (*Yu y Kensler, 2005*). En resumen, los resultados obtenidos para este trabajo fueron:

- La línea celular Molt-4, Leucemia Linfoblástica Aguda, respondió al estímulo de BHA 30 μ M desencadenando la sobre expresión del factor de transcripción Nrf2 a nivel génico y proteico, describiéndolo como un buen modelo para estudiar la vía de Nrf2.
- Las células Molt-4, mostraron mayores efectos citotóxicos por el tratamiento con la mezcla de antineoplásicos en concentración equivalente a la empleada en la clínica (~ 50%) y en menor magnitud al tratamiento 100 veces menor (~ 10%).

- Los efectos a nivel de expresión génica de Nrf2, mostraron sobre expresión inducida por el tratamiento con la mezcla de antineoplásicos en concentración equivalente a la empleada en la clínica en tiempos menores a 48 horas, donde sus efectos citotóxicos son muy elevados, mientras que el tratamiento 100 veces menor no indujo su expresión.
- La expresión proteica de Nrf2 mostró sobre expresión desde las 2 h posteriores al tratamiento con la mezcla de antineoplásicos en concentración equivalente a la empleada en la clínica.

Con los resultados anteriores, concluimos que en nuestro modelo celular, la vía de Nrf-2 respondió de forma rápida ante el inductor clásico (BHA 30uM), como se ha reportado en diversos trabajos (*Kobayashi et al., 2005*), sin embargo, no observamos la inducción del efector GCS, pero si una disminución significativa del represor Keap1. Nuestro tratamiento equivalente al usado en la clínica no fue capaz de inducir aumentos significativos en la expresión génica y proteica de Nrf2, y esto se vio reflejado en una alta sensibilidad de las células al tratamiento, a las 48 horas. Por otra parte, el Tx 100 menor no produjo citotoxicidad en las células, pero si un aumento en el tiempo generacional, que se podría relacionar con la inhibición en la expresión génica de Nrf2 y la ausencia de cambio en la expresión proteica. Cabe señalar que el comportamiento del represor de la vía, Keap1, en todos los tratamientos, nos condujo a establecer una relación, entre los niveles de expresión del factor de transcripción Nrf2 y esta proteína. De esta relación establecimos que el tratamiento con BHA, el cual expresa un cociente Nrf2/Keap1 de 4.5 veces de expresión, fue el máximo valor determinado mientras que el menor cociente lo indujo el tratamiento 100 veces menor. La diferencia de magnitudes entre estos cocientes, podría explicar la citotoxicidad observada en el Tx Eq al suponer que la inducción no fue suficiente como para verse reflejada en una mayor viabilidad celular.

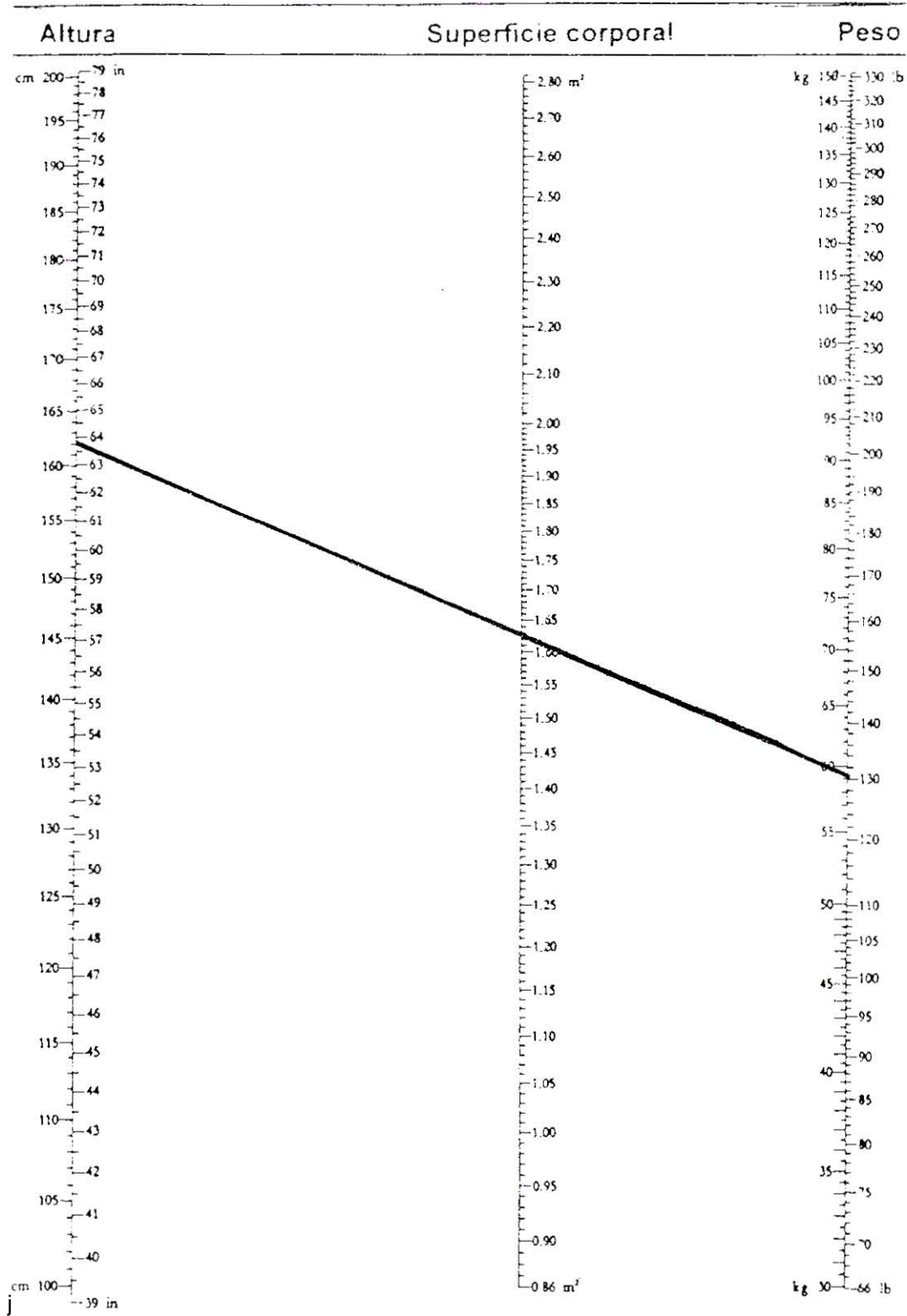
Finalmente conocer la contribución de los procesos involucrados en el metabolismo y eliminación de fármacos antineoplásicos; podría llevar a la optimización de los protocolos quimioterapéuticos, para hacerlos más eficaces y reducir los terribles efectos adversos causados por dosis inadecuadas, ya que, si la célula presenta actividad constitutiva de vías como la de Nrf2, la administración de dichos fármacos resultaría poco exitosa para la eliminación de células malignas.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **A:** Adenina
- **ABO:** Sistema de antígenos sanguíneos: A, B, O.
- **Ala:** Alanina
- **Ara-C:** arabinosido de citosina, citarabina
- **ARE:** Elementos de Respuesta Antioxidante
- **ATCC:** del inglés *American Type Culture Cells*
- **BCA:** Acido Bicinconinico.
- **BHA:** Hidroxianisol butilado.
- **BTB:** Dominio Amplio de Keap1
- **BSA:** Albúmina Sérica Bovina
- **C:** Citosina
- **CALLA:** Antígeno Común de LLA
- **CAT:** Catalasa
- **C/EBP α :** del inglés *CCATT/enhancer binding protein alpha*
- **CNC:** Gen de *Drosophila cap and collar*
- **CTH:** Célula Troncal Hematopoyética, o célula Madre Hematopoyética
- **Cul:** Culina
- **CyHg:** Inmunoglobulina citoplasmática
- **DEPC:** Dietil-piro carbonato
- **DGR:** Dominio Doble Glicina Repetido
- **EPO:** Eritropoyetina
- **EpRE:** Elementos de Respuesta a Estrés
- **ERK:** Proteína cinasa regulada por señales extracelulares
- **EtBr:** Bromuro de Etidio
- **EtOH:** Alcohol etílico
- **dNTPs:** Nucleótidos trifosfatados
- **DGR:** Dominio Doble Glicina Repetido de Keap1
- **DNA:** Ácido Desoxirribonucleico
- **Doxo:** Doxorubicina
- **G:** Guanina
- **G1:** Gap1, fase del ciclo celular posterior a la S
- **G2:** Gap2, fase del ciclo celular posterior a la M
- **G-CSF:** Factor Estimulador de colonias Granulocíticas
- **GM-CSF:** Factor Estimulador de colonias Granulo-Monocíticas
- **GPx:** Glutation peroxidasa
- **GST:** Glutation S-Transferasa
- **GTPasa:** Enzima degradante de GTP
- **γ -GCS:** gamma-Glutamil-cistein-sintetasa
- **Gy:** Grays
- **HLA:** Antígeno de Leucocito Humano
- **HO:** Hemo-oxigenasa
- **HSP:** del inglés *Heat Shock Protein*
- **HTLV1:** Virus Linfotrópico Humano tipo 1, de células T
- **IARC:** Agencia Internacional para la Investigación en Cáncer.
- **Ig:** Inmunoglobulina
- **IL:** Interleucina
- **IVR:** Región de Intervención de Keap1
- **JNK1:** Cinasa del dominio N terminal de c-Jun
- **Keap1:** del inglés *Kelch ECH associating protein 1*
- **L-asp:** L- asparaginasa

- **LCR:** Líquido Cefalo-raquídeo
- **LLA:** Leucemia Linfoblástica Aguda.
- **LMA:** Leucemia Mieloide Aguda
- **M:** Mitosis
- **6MP:** 6- Mercaptopurina
- **Maf:** del inglés *Muscle aponeurotic fibrosarcoma*
- **MAPK:** Proteínas cinasas activadoras de mitógeno
- **MDR:** del inglés *Multi Drug Resistance*
- **M.O.:** Médula Ósea.
- **MTHRF:** Metilen tetrahidrofolato reductasa
- **Mtx:** Metotrexato
- **Neh:** del inglés *Nrf2 ECH homology (chicken Nrf2 homologous domain)*
- **NK:** Células Natural Killer
- **NQO1:** Quinona oxidorreductasa1 del NADPH
- **Nrf2:** del inglés *NF-E2 (nuclear factor erythroid 2) related factor 2*
- **NR3C1:** Receptor de glucocorticoides
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud
- **PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa
- **PKC:** Proteína Cinasa C
- **PI3K:** Fosfatidil inositol 3-cinasa
- **RC:** Remisión Completa
- **RFC ò SLC19A1:** Acarreador de folatos reducidos
- **RHNM:** Registro Hematológico de Neoplasias Malignas
- **RNA:** Ácido Ribonucleico
- **ROS:** Especies reactivas de oxígeno
- **RPMI:** del inglés *Roswell Park Memorial Institute*
- **RT-PCR:** del inglés *Reverse Transcriptase- Polymerase Chain Reaction*
- **S:** Síntesis, Fase del ciclo celular donde se replica el DNA
- **Ser:** Serina
- **SFB:** Suero Fetal Bovino
- **SNC:** Sistema Nervioso Central
- **SOD:** Super óxido dismutasa
- **SSA:** Secretaría de Salud
- **Surf Ig:** Inmunoglobulina de superficie de membrana.
- **tBHQ:** hidroquinona terbutilada
- **T:** Timina
- **TdT:** Transferasa desoxinucleotídica terminal
- **TPTM:** Tiopurina S metil transferasa
- **TYMS:** Timilidato sintetasa
- **Tx Eq:** Tratamiento equivalente al usado en la clínica
- **Tx Eq 2da dosis:** Segunda dosis del Tratamiento equivalente al usado en la clínica
- **Tx 100 menor:** Tratamiento 100 menor al usado en la clínica
- **U:** Uracilo
- **UFC:** Unidad Formadora de Colonias
- **UGT:** UDP -glucuronosil-transferasas
- **VB:** Vinblastina
- **VCT:** Vincristina
- **VDR:** Receptor de vitamina D
- **VP-16:** Etopósido
- **WB:** Western Blot
- **WR:** Working Reagent

ANEXO 1. TABLA PARA CALCULAR LA SUPERFICIE EN M² DE INDIVIDUOS ADULTOS, UTILIZANDO PESO Y ALTURA (Skeel, 1982).



ANEXO 2. CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS DE LOS FARMACOS EMPLEADOS EN LOS DIFERENTES TRATAMIENTOS.

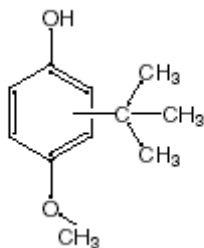
BHA (Butylated Hidroxianisole)

(Sigma Aldrich No. Cat. B1253)

2(3)-*t*-Butyl hidroquinone monomethyl ether;

$(\text{CH}_3)_3\text{CC}_6\text{H}_3(\text{OCH}_3)\text{OH}$

P.M. 180.24



Se considera carcinógeno en ratones, por la IARC (1986, 9187), y en humanos por la *Sixth Annual Report on Carcinogens (1991)*. Es un sólido blanco, ligeramente amarillento, con un olor característico. Es una mezcla de los isómeros 2-terbutil-4-hidroxianisol y 3-terbutil-4-hidroxianisol; se funde de 45 a 63° y su punto de ebullición está entre los 264 y 270°, es inflamable a los 156°. Es insoluble en agua, soluble en etanol al 50% y en otros alcoholes como propileno glicol, éter de petróleo; así como en aceites. El BHA posee propiedades antioxidantes, por lo cual se usa ampliamente en la industria, cosmética y alimentaria, sobre todo en alimentos grasos, ya que al cocinarse no pierde sus propiedades, por lo que funciona como un buen conservador. Está avalado por la FDA como conservador en cantidades no mayores al 0.02% peso/peso del total de grasas y aceites en los alimentos. Se degrada al exponerse prolongadamente al sol y al fundirse produce vapores irritantes.

Se estima que la población está expuesta a este compuesto por ingestión directa en la dieta, consumiendo hasta 4.3mg diarios (IARC 1986), cantidad que ha aumentado en las últimas décadas, debido a el incremento en el consumo de alimentos industrializados.

Tomado de: *Report on Carcinogenesis eleventh edition*

<http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/roc/eleventh/profiles/s027bha.pdf>

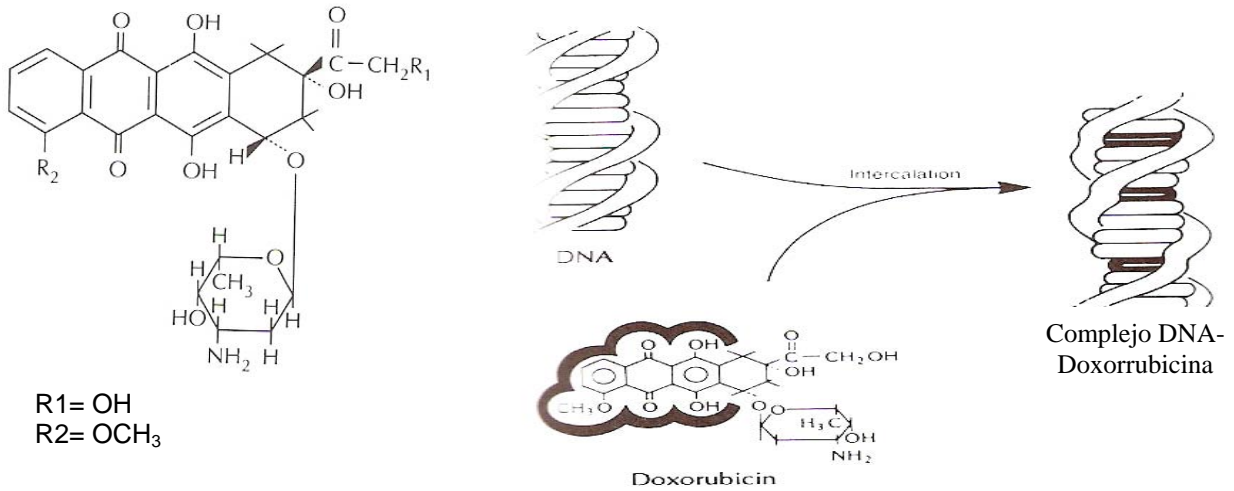
CLORHIDRATO DE DOXORUBICINA O ADRIAMICINA.

(Sigma Aldrich No. Cat. 25316-40-9)

(8*S*,10*S*)-10-(4-amino-5-hidroxy-6-metil-tetrahidro-2*H*-piran-2-yloxy)-6,8,11-trihidroxy-8-(2hidroxiacetil)-1-metoxi-7,8,9,10-tetrahidrotetraceno-5,12-dione.

$\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}\cdot\text{HCl}$ P.M. 579.98

Biodisponibilidad del 5% por administración oral, metabolismo a través del CYP3A4, tiempo de vida media 12-18.5 h, excreción fecal y biliar. Antraciclina obtenida a partir de *Streptomyces peucetius*. En ambiente ácido forma un aglicona insoluble en agua, y en ambiente básico se reduce a una amono azúcar. La sal se llama cloruro de adriablastina y tiene la siguiente fórmula $\text{C}_{27}\text{H}_{29}\text{NO}_{11}\cdot\text{HCl}$ P.M. 579.99 y son cristales en forma de aguja color rojo, mp 204-205° C, solubles en agua y metanol, insolubles en acetona, benceno, cloroformo y éter de petróleo. Las soluciones acuosas son amarillo-naranja a pH ácido, rojo-naranjas a pH neutro y violetas azules a pH básico y son sensibles a temperaturas altas. Considerada como carcinógeno humano por *Ninth Annual Report on Carcinogens (2000)*.



(Tomado de Pratt et al., 1994)

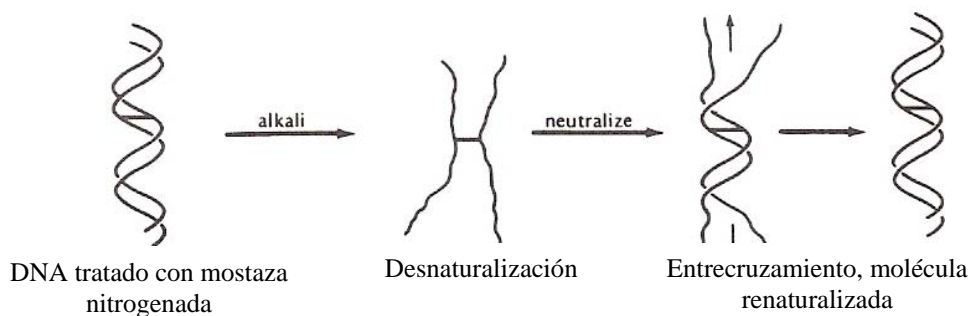
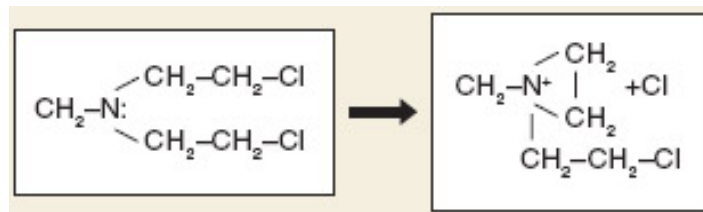
CLORIDRATO DE MECLORRETAMINA

(Sigma- Aldrich No. Cat. M 4878)

Chloro-*N*-(2-chloroethyl)-*N*-methylethanamine; *N*-Methylbis(2-chloroethyl)amine hydrochloride; Bis(2-Chloroethyl)methylamine; Bis(2-chloroethyl)methylamine (ClCH₂CH₂)₂NCH₃·HCl

P.M. 192.51 mp 108-111 °C(lit.)

El líquido actúa como potente irritante, eritema y vesicante en contacto con la piel (quemaduras graves), potente irritante de los ojos (conjuntiva y córnea; incluso ceguera) y vías respiratorias. Por vía inhalatoria en exposición aguda y en el hombre, el valor CL₅₀ es de 3000 mg-min/m³ (al vapor); la concentración letal más baja (LCLo) es 10 mg/m³; NOEL 2 mg-min/m³. La mediana de la concentración-tiempo incapacitante para la visión en el hombre (CL₅₀) es 100mg-min/m³ (Tomado de Pratt et al., 1994).

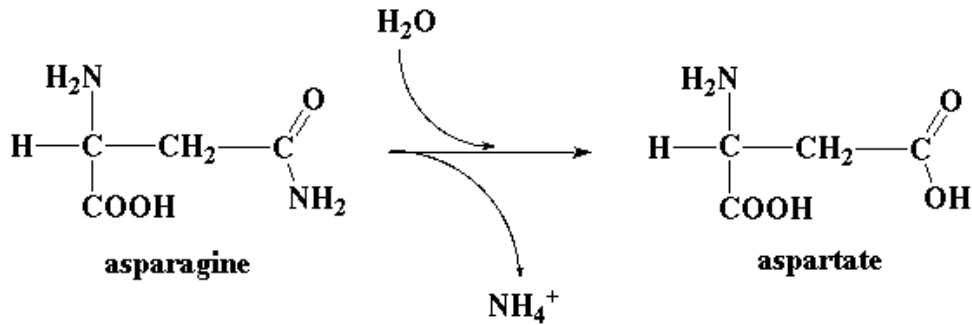


L-ASPARAGINASA.

(Sigma- Aldrich No. Cat. 9015-68-3)

L- Asparagina amidohidrolasa.

Una unidad corresponde a la cantidad de enzima necesaria para liberar 1 $\mu\text{mol NH}_3$ por minuto a pH 8.6 y 37°C. Enzima que hidroliza la L-asparagina en ácido L-aspartico y amonio. Comúnmente se obtiene de *E. Coli* y *Erwina sp.* La asparaginasa de *E. coli* tiene un peso molécula aproximado de 136000y se compone de 4 subunidades idénticas. Comercialmente es un polvo cristalino blanco muy soluble en agua, su actividad se presenta a pH 5-9, es insoluble en metanol, acetona y cloroformo.



PREDNISONA 98%

(Sigma- Aldrich No. Cat. 53-03-2)

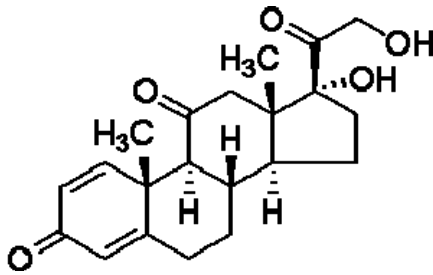
1,4-Pregnadiene-17 α ,21-diol-3,11,20-trione; 1-Cortisone;

17 α ,21-Dihydroxy-1,4-pregnadiene-3,11,20-trione

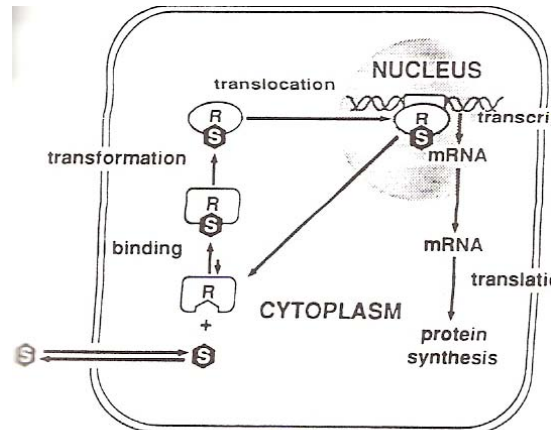
Dehydrocortisone

C₂₁H₂₆O₅ P.M.358.43

Propiedades: Cristales muy poco solubles en agua, solubles en alcohol 1g/150 mL y cloroformo 1g/200mL; ligeramente soluble en metanol y dioxano; punto de fusión 236-238 °C. Glucocorticoide que afecta la función endocrina linfocitolítica en altas concentraciones, posee afinidad por sitios de respuesta hormona en el ADN, aumentando la transcripción de proteínas reguladoras de la proliferación celular. Induce apoptosis.



(Tomado de Pratt et al., 1994)



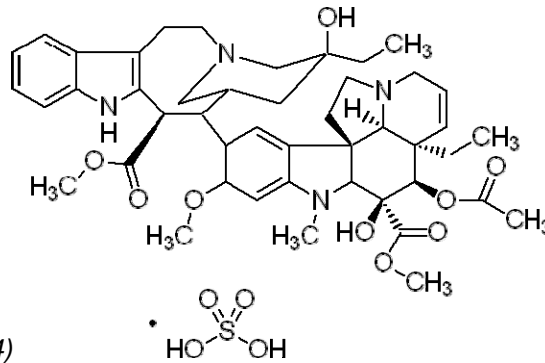
SULFATO DE VINBLASTINA.

(Sigma- Aldrich No. Cat 143-67-9)

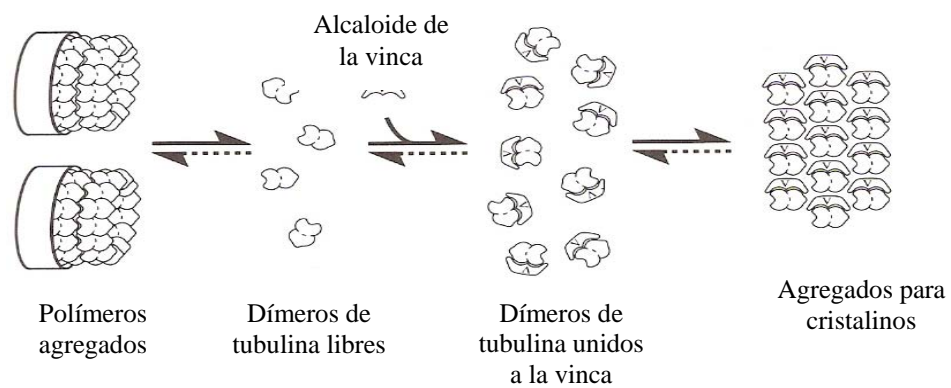
$C_{46}H_{58}N_4O_9 \cdot H_2SO_4$

P.M. 909.05

Propiedades: Polvo blanco, pureza del 97%, punto de fusión 267°, solubilidad, en agua 10mg/mL y en DMSO: 50 mg/mL. Sensible a la luz. Puede ser fatal si se absorbe por la piel y causa irritación de los ojos. Proveniente de la *Vinca rosasea*, inhibe el ensamblaje de los microtubulos al unirse al extremo C terminal de la tubulina e inducir su auto-asociación formando agregados espirales. Arresta el ciclo celular en fase G2. Induce la activación de Raf-1, la fosforilación de las proteínas de la familia bcl-2, induce p53 y apoptosis en diversas líneas celulares. Es sustrato de Pgp y CYP3A4.



(Tomado de Pratt et al., 1994)



X. BIBLIOGRAFIA

- **Barton-Burke M.** *Cancer Chemotherapy. A nursing process approach.* 3rd Edition Jones & Bartlett Publishers, Boston 2001, 225-269.
- **Borst P, Eevers R, Kool M, Wijnholds J.** *A family of drug transporters: The multidrug resistance-associated proteins.* J Natl Cancer Inst 2000;92:1295-1301.
- **Dinkova-Kostiva T, Holtzclaw, Yamamoto X.** *Direct evidence that sulfhydryl groups of Keap 1 are the sensors regulating induction of phase 2 enzymes that protect against carcinogens and oxidants.* PNAS 2002;99(18):11908-11913.
- **Doney K, Buckner C, Fisher L.** *Autologous bone marrow transplantation for acute lymphoblastic leukaemia.* Bone Marrow Transplant 1993;12:315 -321.
- **Faraonio R, Vergara P, Di Marzo D.** *p53 Supresses the Nrf-2-dependent transcription of antioxidant response genes.* J. Biol. Chem 2006;281(52):39776-39784.
- **Fernández J M.** *Terapia Oncohematologica.* Har Curt Brace, Madrid 1998, 102-154.
- **Gottesmann M, Fojo T, Bates S.** *Multidrug resistance in cancer. Role of ATP-dependent transporters.* Nat Rev Cancer 2002;2:48-58.
- **Hirsch-Gingsberg C, Huh Y, Kagan J, Liang J, Stass S.** *Advances in the diagnosis of acute leukemia.* Hematol Oncol Clin North Am 1993;7:1-46.
- **Hoelzer D.** *Acute Lymphoblastic Leukemia in Adults.* Hematology: Basic Principles and Practice. New York , NY, Churchill Livingstone, 1991: 793-804.
- **Jaiswal A .** *Nrf2 Signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression.* Free Radical Biology & Medecine, Vol 36, 2004, No. 10, 1199-1207.
- **Kensler T, Wakabayashi N.** *Cell survival responses to environmental stresses via the Keap1-Nrf2 –ARE pathway.* Annu Rev Pharmacol Toxicol 2007;47:6.1-6.28.
- **Konigsberg M.** *Nrf2: La Historia de un Nuevo factor de transcripción que responde a estrés oxidativo.* REB 2007;26(1):18-28.
- **Kobayashi M, Yamamoto M.** *Molecular Mechanism activating the Nrf2-keap 1 Pathway of antioxidant gene regulation.* Antioxidant and Redox Signaling 2005;7(3):385-394.
- **Kraft A, Johnson D, Jeffrey J.** *Nuclear Factor E2-Related Factor 2-Dependent Antioxidant Response Element Activation by tert-Butylhydroquinone and Sulforaphane Occurring Preferentially in Astrocytes Conditions Neurons against Oxidative Insult.* The Journal of Neuroscience 2004;24(5):1101-1112.
- **Larson R, Dodge R, Burns P.** *A five drug remission induction Regimen with Intensive Consolidation for Adults with Acute Lymphoblastic Leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 8811.* Blood 1995;85(8):2025-2037.
- **Leith P, Chir M , William C.** *Prognostic markers in acute leukemia.* Hematologic malignances 1996;3:329-334.

- **Levitt L, Lin R.** *Biology and treatment of adult acute lymphoblastic leukemia.* West J Med. 1996;164(2):143-155.
- **Meléndez J, Maldonado V.** *Cisplatino: Avances Recientes en su mecanismo de acción.* 1998;44(1):28-34.
- **Minowada J, Onuma T, Moore G.** *Rosette-forming human lymphoid cell lines. I. Establishment and evidence for origin of thymus-derived lymphocytes.* J Natl Cancer Inst 1972;49(3):891-5
- **Miyajima A, Ito Y, Kinoshita T.** *Cytokine signaling for proliferation, survival and death in hematopoietic cells.* Int J Hematology 1999; 69:137-146.
- **Munker R, Hiller E,** *Modern Hematology. Biology & Clinical Management.* Human Press N.J. 1998, 131-145.
- **Owour E, Kong T,** *Antioxidants and oxidants regulated signal transduction pathways.* Bioch Pharm 2002;64:765-770.
- **Patlak M.** *Targeting Leukemia: From bench to bedside.* Breakthroughs in Bioscience committee U.S.A 2001.
- **Pratt W, Ruddon R, Ensminger W, Maybaum J.** *The anticancer drugs.* 2nd, Edition, Oxford University Press, New York 1994
- **Rlibera M, Ortega J, Oriol A.** *Late Intensification Chemotherapy has not improved the results of intensive chemotherapy in adult acute lymphoblastic leukaemia. Results of a prospective multicenter randomized trial. (PHETEMA ALL-89).* Haematologica 1998;83:222-230.
- **Rocha J, Cheng C, Liu X, Kishi P.** *Pharmacogenetics of outcome in children with acute lymphoblastic leukemia.* Blood 2005;105:4752-4758.
- **Rojas E, Montero R, Herrera LA, Sordo M, Gonsebatt ME, Rodriguez R, Ostrosky-Wegman P.** *Are mitotic index and lymphocyte proliferation kinetics reproducible endpoints in genetic toxicology testing?* Mutat Res 1992;28:283-6.
- **Rojas E, Valverde M.** *Approach for identify antineoplastica drugs.* Advances in Cancer Research at UNAM. Manual Moderno 2007: 1109-125.
- **San Miguel J, Sanchez M.** *Cuestiones en Hematologia.* Ed. Harcourt Elsevier Sciences, Madrid 2002, 116178.
- **Saito M, Sakagami H, Fujisawa S.** *Cytotoxicity and apoptosis induction by butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT).* Anticancer Res. 2003;23:4693-701
- **Sing A, Misra V, Thimulappa R, Lee H, Ames S.** *Dysfunctional Keap1-Nrf2 Interaction in Non- Small-Cell Lung Cancer.* Plos Medecine 2006;3:420-431.
- **Sutton L, Kuentz M, Cordonnier C.** *Allogenic Bone Marrow transplantation for adult acute lymphoblastic leukemia in first complete remision : factors predictive of transplant-related mortality and influence of total body irradiation modalities.* Bone Marrow Transplant 1993;12:583-589.
- **Pi J, Bai Y, Reece M, Williams J, Liu D, Freeman M, Fahl W, Shugar D, Liu J, Qu W, Collins S, Waalkes M.** *Molecular mechanism of human Nrf2 activation and degradation: Role of sequential phosphorylation by protein kinase CK2.* Free Radical Biology & Medicine 2007;42:1797-1806.
- **Yu X, Kensler T,** *Nrf2 as a target for cancer chemoprevention.* Mutat Res 2005;11;591:93-102.