



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

LABORATORIO DE HEMATOPOYESIS Y LEUCEMIA

**Estudio de la actividad antiproliferativa de
Rinvanil y Fenilacetilrinvanil en las líneas
leucémicas J774, WEHI-3 y médula ósea normal
de ratón.**

TESIS QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

Miriam Raquel Díaz Martínez

Director: M. en C. Edgar Ledesma Martínez

México, D.F. 8 de mayo del 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas

Tesis Digitales

Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

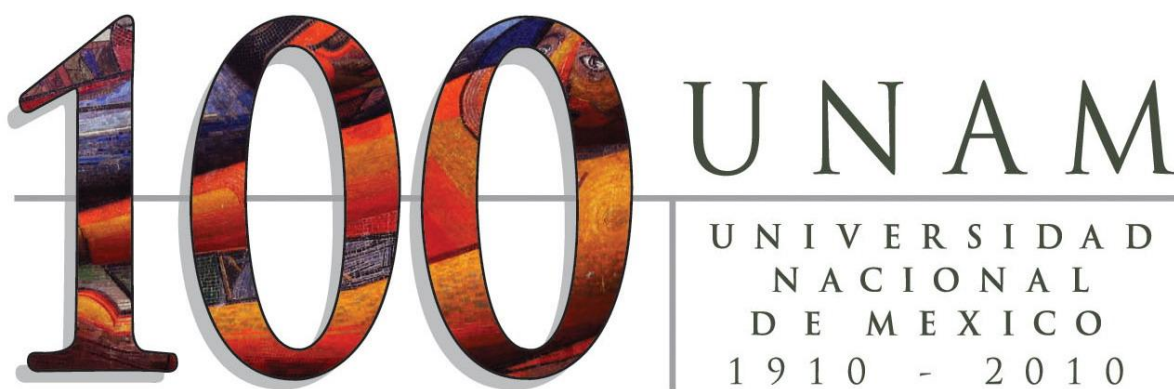
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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.

SINODALES

Presidente	Dr. Edelmiro Santiago Osorio
Vocal	M. en C. Edgar Ledesma Martínez
Secretario	Dra. Lourdes Mora García
Suplente	M. en C. Luis Sánchez Sánchez
Suplente	Dra. Lucila Álvarez Barrera





DEDICATORIA

Agradezco a Dios por permitirme una segunda oportunidad de vida, dándome la lección más importante de mi vida.

Con amor, respeto y admiración a las personas que me dan un ejemplo de fortaleza día a día **MIS PADRES** que me dieron la vida, y que gracias a su apoyo y motivación estoy cumpliendo una meta en mi vida. Gracias por darme la oportunidad de estudiar una carrea y sobre todo por creer en mí, porque a pesar de todos los momentos difíciles que hemos pasado ustedes nunca desistieron en apoyarme y motivarme, de corazón les doy las infinitas gracias, es un orgullo tener unos padres como ustedes, los quiero mucho y este trabajo es para ustedes. Jorge gracias por apoyarme, por los buenos ratos y por aguantarme hasta esta etapa es genial.

A mis abuelitos †Macario, †Antonio, Constanza y Refugio, por darme un ejemplo de fortaleza y lucha, por formar una familia tan bella, abuelitos a pesar de que ya no están conmigo físicamente estarán en mi corazón eternamente los extraño.

A mi familia que mencionar a cada uno sería interminable pero no por eso dejan de ser importantes, pero tíos, primos, sobrinos, a todos muchas gracias por darme su apoyo incondicional en momentos de felicidad y difíciles los quiero mucho a todos.

Monstry (EdRo) Infinitas gracias por darme estos años de felicidad, por compartir y ser parte fundamental de este momento tan importante en mi vida, por tu paciencia, consejos, amor y por recorrer este camino conmigo, nunca olvides lo importante que eres para mí.

A mi director de tesis M. en C. Edgar Ledesma Martínez, por haberme enseñado a trabajar en el laboratorio, por creer en mí y llevarme de la mano en esta tesis sin tus consejos, apoyo y dedicación a mi trabajo no lo hubiera logrado, estoy completamente agradecida ED mi respeto y admiración por siempre.

Al doctor Edelmiro Santiago Osorio que me dio la oportunidad de trabajar en el laboratorio y sobre todo darme su apoyo durante este tiempo.

A mi querido amigo Rafa que siempre me dio un motivo para ser feliz, siempre serás una persona muy especial para mí, gracias por ser mi amigo, mi confidente y mi apoyo, gracias por estar en momentos difíciles de mi vida y no dejarme caer, te quiero mucho peke y siempre podrás contar conmigo.

A mis compañeros de viaje Rey, Chio, Itzen, Yolita, Damian, Jessy, Petter, Angy, Lupis, Vero, a los Doctores OSWA y VAN gracias a cada uno de ustedes, porque cada día en el laboratorio fuera una experiencia sin igual. Fue genial compartir este tiempo con ustedes.

A mis amiguis BETS, CLAUS y LUPIS G., por su amistad, cariño, y por esas locuras que nos hacían reír en labo, gracias por apoyarme y estar cuando más las necesito, las quiero.

A mis amigas de carrera IPA, ERI, CIN, CRIS por darme la oportunidad de ser su amiga, de compartir tantas cosas juntas y por hacer que el transcurso de la carrera fuera ameno y muy divertido gracias chicas por su apoyo y cariño, cuenten conmigo en todo momento.

A cada uno de mis Sinodales para mi examen profesional, los cuales con sus observaciones y conocimientos enriquecieron esta tesis.

Presidente	Dr. Edelmiro Santiago Osorio
Vocal	M. en C. Edgar Ledesma Martínez
Secretario	Dra. Lourdes Mora García
Suplente	M. en C. Luis Sánchez Sánchez
Suplente	Dra. Lucila Álvarez Barrera

ÍNDICE

Introducción

❖ Hematopoyesis.....	1
❖ Leucemia.....	9
❖ Panorama epidemiológico de la leucemia.....	11
❖ Capsaicinoides.....	13
❖ Líneas Celulares.....	17

Planteamiento del problema.....	19
--	-----------

Justificación.....	20
---------------------------	-----------

Hipótesis.....	21
-----------------------	-----------

Objetivos.....	22
-----------------------	-----------

Método.....	24
--------------------	-----------

Resultados.....	32
------------------------	-----------

Discusión de resultados	47
Conclusiones	51
Referencias Bibliográficas	52
Apéndice A	66
Apéndice B	69

LISTA DE ABREVIATURAS

CMN	Células mononucleadas
CTH	Célula troncal hematopoyética
CTH-CP	Célula troncal hematopoyética a corto plazo
CTH-LP	Célula troncal hematopoyética a largo plazo
FAR	Fenilacetilrinvanil
TRPV-1	Receptor Vanilloide de Potencial Transitorio subfamilia-1
IMDM	Medio Iscove 's Modified Dulbecco 's
Lin	Linaje
MH	Microambiente hematopoyético
mL	mililitros
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos
rmIL-3	Interleucina-3 recombinante de ratón
rpm	Revoluciones por minuto
SE	Suero equino
SFB	Suero fetal bovino
Vh	Vehículo

RESUMEN

Es conocido que compuestos presentes en los alimentos ejercen sobre el organismo funciones adicionales a los simplemente nutritivos o saborizantes. Es por esto que desde hace siglos tanto extractos de plantas como principios activos, se han utilizado en el tratamiento de enfermedades humanas, de manera interesante, se ha mostrado que análogos sintéticos de moléculas de origen natural pueden tener mayor actividad biológica anti-cáncer con reducidos efectos secundarios no deseados respecto a los compuestos originales.

En este trabajo se evaluó la actividad antiproliferativa de Rinvanil y Fenilacetilrinvanil análogos sintéticos del principio activo del chile, la Capsaicina, sobre las líneas leucémicas de ratón J774, WEHI-3, así como también el efecto en células normales de médula ósea de ratón.

Se observó que los dos análogos no pungentes de Capsaicina; Rinvanil y Fenilacetilrinvanil inhiben la proliferación de las líneas leucémicas WEHI-3 y J774 en dosis menores respecto a la concentración necesaria para inhibir a las células normales de médula ósea. En base a los resultados obtenidos se puede deducir que los análogos de Capsaicina podrían tener potencial como agentes antineoplásicos.

INTRODUCCIÓN

Hematopoyesis

Las células sanguíneas maduras (eritrocitos, granulocitos, monocitos, linfocitos y plaquetas) tienen como principal función el transporte de oxígeno y la defensa del organismo contra la invasión de agentes patógenos. Estas células mueren por senescencia o bien durante el desarrollo de sus funciones normales siendo la hematopoyesis, el proceso por el cual se generan nuevas células sanguíneas^{1, 2, 3, 4}.

Funcionalmente pueden reconocerse diferentes compartimentos en el sistema hematopoyético (**Fig. 1**)⁵. Así, el primero corresponde a las Células Troncales Hematopoyéticas (CTH), las cuales son consideradas como las más primitivas, capaces de autorrenovarse y originar células de los distintos linajes sanguíneos sustentando la hematopoyesis durante toda la vida^{6, 7, 8, 9}. Estas células se concentran principalmente en el estroma de la médula ósea, constituyen el 0.05% de la población celular y carecen de características morfológicas y citoquímicas, propias de las células maduras o comprometidas hacia un linaje celular¹⁰. En condiciones normales la mayoría de las CTH's se

encuentran quiescentes (fase G0 del ciclo celular) y sólo se dividen para mantener los niveles de la hematopoyesis en el organismo^{11, 12, 13}.

El segundo compartimento está conformado por células progenitoras multipotente (PMP), representan entre 0.1 y 0.5 % del total de las células presentes en la médula ósea¹⁴. Las células progenitoras pierden su capacidad de auto-renovación y pluripotencialidad, pero adquieren la suficiente capacidad proliferativa para generar gran cantidad de células sanguíneas maduras. Se ha reportado la existencia de dos tipos de (PMP) multilinaje; un progenitor común de linfocitos, restringido a linfocitos T, B y células NK^{15, 16}, y un progenitor común mieloeritroide, restringido a granulocitos, macrófagos, megacariocitos y eritrocitos. Cuando los progenitores multilinaje son estimulados apropiadamente, generan colonias en cultivos semi-sólidos, por lo que son conocidos como unidades formadoras de colonias (CFU's). Éstas incluyen CFU-GM, CFU-Ba, CFU-Eo, CFU-E, CFU-MK, CFU-preB y CFU-DC para unidades formadoras de colonias de granulocitos-macrófagos, basófilos, eosinófilos, eritrocitos, megacariocitos, linfocitos-B y células dendríticas, respectivamente^{17, 18}. Los clones que crecen en los cultivos in vitro son de un sólo linaje y no exhiben características aberrantes; por ejemplo, gránulos eosinófilos en células eritroides, aun cuando las colonias sean el resultados de la

estimulación con un factor multilinaje, esto argumenta la unidireccionalidad en el comprometimiento de cada linaje y los subsecuentes eventos de maduración.

El tercer compartimento representan al 99.5 % de las células presentes en la médula ósea y comprende al grupo de los precursores reconocibles por su morfología. En las etapas finales, las células sufren una dramática especialización promovida por las fases de diferenciación. En estas etapas, los distintos precursores tienen una notable o total disminución en su capacidad proliferativa¹⁹.

Finalmente en el cuarto compartimento se localizan las células sanguíneas maduras, las cuales aunque están representadas en la médula ósea se encuentran fundamentalmente en la circulación^{20, 21}. Este compartimento contiene varios tipos de células completamente distintas en apariencia y con funciones específicas ²².

En condiciones normales, la mayoría de las células troncales se encuentran quiescentes, pero muchos de los progenitores más maduros están proliferando y produciendo progenie madura. En situaciones como sangrado o infección; los depósitos de células hematopoyéticas en la médula ósea o adherida al endotelio son rápidamente liberadas a la circulación localizándose en el sitio de daño, además, las células troncales y progenitoras son estimuladas a proliferar y diferenciarse en leucocitos, eritrocitos y plaquetas. Cuando la condición de estrés cesa y

la demanda de células sanguíneas disminuye, los procesos anti-apoptóticos y proliferativos caen, las células sanguíneas son redistribuidas a sus sitios de almacenamiento, y la cinética de la hematopoyesis retorna a sus niveles basales. Este proceso se repite innumerables veces durante la vida, y se ha visto de forma incrementada después de quimioterapia o de trasplante de médula ósea^{23, 24}.

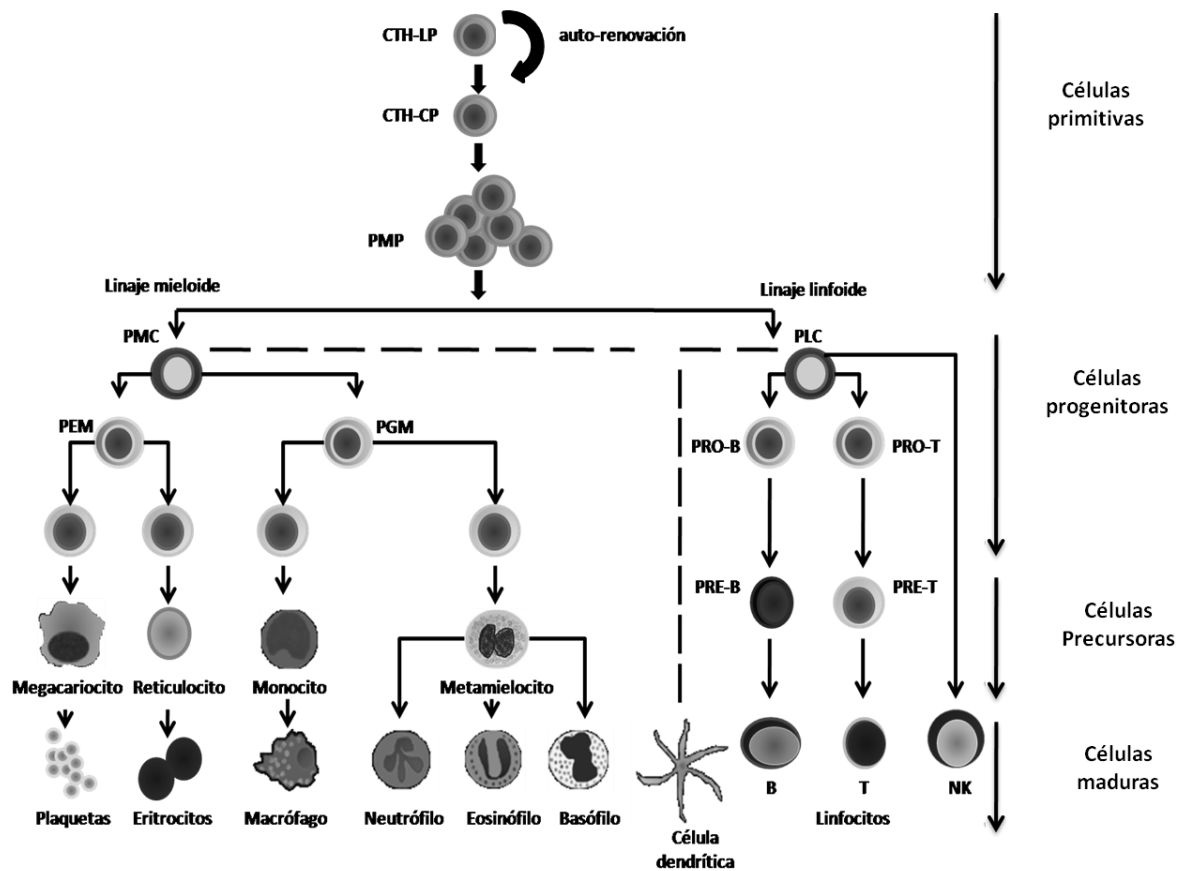


Figura 1. Jerarquía de las células hematopoyéticas. Las células hematopoyéticas pueden dividirse en cuatro compartimentos de acuerdo al grado de diferenciación; 1) Compartimento de las células más primitivas, célula troncal hematopoyética reconstituyente a largo plazo (CTH-LP), célula troncal hematopoyética reconstituyente a corto plazo (CTH-CP) y célula progenitora multipotente (PMP), 2) Compartimento de células progenitoras, progenitor mieloide común (PMC), progenitor linfóide común (PLC), progenitor eritroide-megacariocítico (PEM), progenitor granulocito-macrófago (PGM), progenitor de linfocitos B (Pro-B) y el progenitor de linfocitos T (Pro-T), 3) Compartimento de células precursoras y 4) Compartimento de células maduras (Tomado y modificado²⁵).

El mantenimiento de la generación de células sanguíneas involucra una compleja interrelación entre los procesos genéticos intrínsecos de las células hematopoyéticas y su entorno. Esta interrelación determina si se mantienen quiescentes, proliferan, auto-renuevan, sufren diferenciación o apoptosis²⁶. En el adulto, estos procesos se llevan a cabo principalmente en la médula ósea, en un entorno específico denominado micro-ambiente hematopoyético. El micro-ambiente hematopoyético, está constituido por un componente celular y uno proteico, que en conjunto regulan la hematopoyesis **(Fig. 2)**²⁷.

El componente celular y permanente de la médula ósea incluye células propiamente estromales, como endoteliales, reticulares, adipocitos y osteoblastos mientras que monocitos, linfocitos y células NK, son denominadas células accesorias por estar de forma transitoria. Las células estromales secretan y expresan una gran cantidad de moléculas de la matriz extracelular (MEC) como colágeno I-VI, fibronectina, tenascina y laminina, y moléculas de adhesión celular (CAM's); por su parte, las células accesorias, producen un gran número de citocinas y quimiocinas, las cuales se encuentran en solución y/o unidas a las células o a la matriz extracelular^{28, 29, 30}.

Del componente proteico, las citocinas son los reguladores hematopoyéticos mejor caracterizados. Las citocinas, son glicoproteínas

que actúan por unión a receptores específicos, y activan una variedad de rutas de señalización³¹. Históricamente, cultivos in vitro permitieron establecer que la proliferación de las células hematopoyéticas estaba sustentada por dichas glicoproteínas³².

Tradicionalmente, la transición de un compartimento a otro se considera un proceso unidireccional, siendo la diferenciación y maduración, así como la pérdida en la capacidad de auto-renovación y disminución en el potencial de diferenciación procesos irreversibles³³. Sin embargo, el proceso de la hematopoyesis es muy dinámico, y siendo un gran número de genes los responsables de controlar los mecanismos de proliferación, diferenciación o la sobrevivencia celular, mutaciones en uno o más de dichos genes pueden conferirles a las células hematopoyéticas ventajas sobre sus contrapartes normales³⁴ lo que eventualmente puede desencadenar el desarrollo de una neoplasia hematológica.

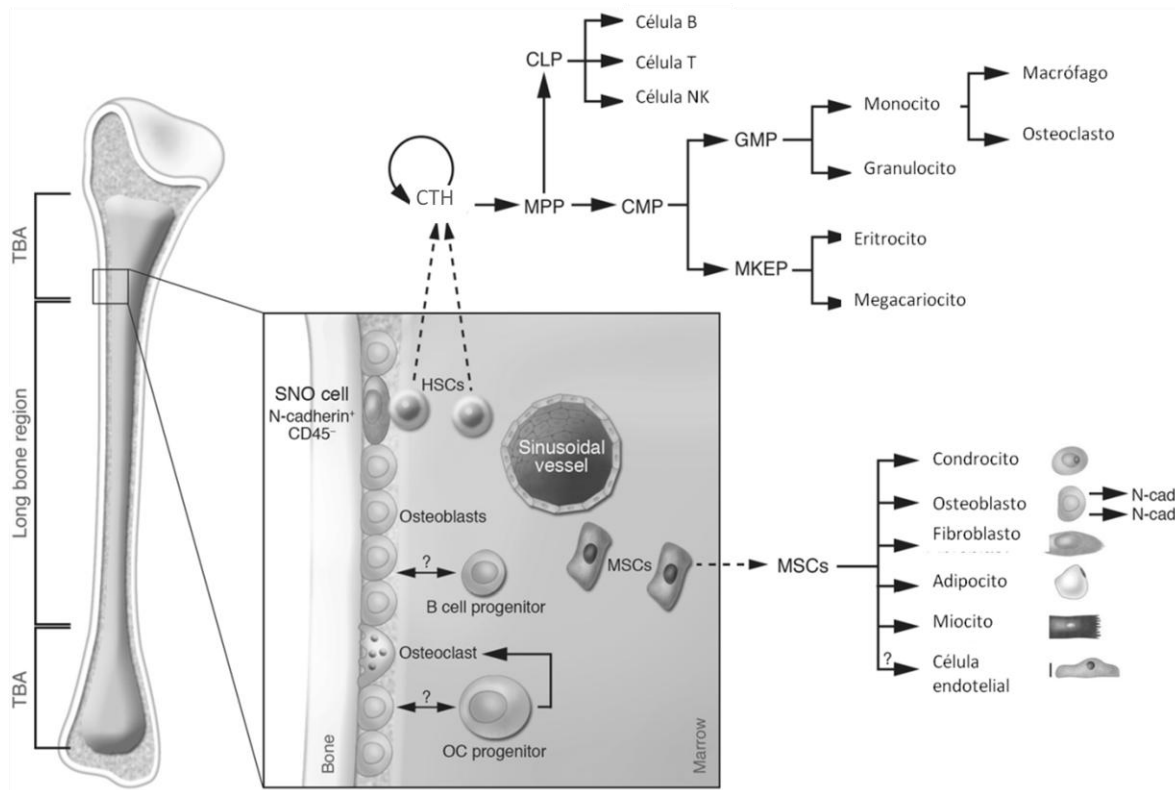


Figura 2. Microambiente hematopoyético. Dentro de la médula ósea las CTH habitan cerca de los osteoblastos, esto sobre el nicho endosteal o adyacentes a las células endoteliales de las vesículas sinusoidales sobre cada división, una célula hija deja el hueso para proliferar y diferenciarse hacia linajes. Las CTH y su progenie está rodeada por células estromales derivadas de las células tallo mesenquimales (MSC) quienes también residen en la cavidad ósea. Las MSC dan origen condrocitos, osteoblastos, fibroblastos, adipocitos, endotelio y miocitos (Tomado y modificado³⁵).

Leucemia

Las alteraciones en células hematopoyéticas progenitoras llevan a enfermedades hematológicas como las leucemias³⁶. Las leucemias se caracterizan por un incremento anormal en el número de células hematopoyéticas, presentes tanto en médula ósea como en sangre periférica, que además, son incapaces de diferenciarse completamente y de funcionar adecuadamente^{37, 38}. Estas células inmaduras no funcionales³⁹ llamadas genéricamente “blastos”, eventualmente sustituyen al tejido hematopoyético normal, ocasionando un descenso de la producción de las células normales en médula ósea y finalmente alteraciones en los niveles de células hematopoyéticas maduras presentes en sangre periférica^{40, 41}.

Es conocido que un trastorno hematopoyético conduce a un proceso neoplásico completo y maligno, solo cuando dos mutaciones actúan de manera cooperativa afectando la proliferación y diferenciación celular. De esta manera, las llamadas mutaciones de tipo I favorecen la proliferación celular y/o confieren una ventaja a nivel de sobrevivencia pero no interfieren con la capacidad de diferenciación. Esto es, activan de manera constitutiva receptores de tirosina cinasa o reguladores rio abajo de la proliferación, migración y sobrevivencia. Por otro lado, las

mutaciones de tipo II son complementarias e inciden sobre la capacidad de las células para diferenciarse de manera terminal. Estas mutaciones pueden involucrar factores de transcripción cruciales para la regulación de la hematopoyesis, siendo de hecho las mutaciones más comunes en leucemia aguda.

De esta manera, las mutaciones que interfieren con diferenciación terminal⁴², en conjunto con las mutaciones en reguladores de la proliferación, sobrevivencia e inducción de apoptosis, supresores de tumores, etc. son responsables de conducir la hematopoyesis normal a leucémica.

Un primer modelo que por mucho tiempo fue considerado como la visión general sobre el origen de la leucemia, estimaba que ésta podía surgir en distintas poblaciones de células hematopoyéticas^{43, 44} donde el estadio de maduración y el grado de compromiso de dichas poblaciones hacia un linaje específico, es lo que determinaba las manifestaciones clínicas de la enfermedad. En la actualidad, es ampliamente aceptado que la leucemia se origina en una misma población de células troncales⁴⁵ y que dependiendo de la naturaleza de las alteraciones genéticas que se presenten, la clona leucémica seguirá un cierto patrón de comportamiento biológico y éste, a su vez, determinará las características clínicas de la enfermedad⁴⁶.

Panorama epidemiológico de la leucemia.

La leucemia mieloide aguda (AML) es el subtipo más común de leucemia en adultos, representa alrededor del 25 % de todas las leucemias en adultos en el mundo occidental, pero comprende sólo el 15 a 20 % de los casos en pacientes ≤ 15 años, teniendo una media entre 65 y 75 años de edad, y la tasa más baja de supervivencia de todas las leucemias. En los Estados Unidos, 44270 nuevos casos de leucemia fueron reportados en 2008, de los cuales 13290 fueron AML en 2007, cerca de 9000 pacientes murieron de esta enfermedad⁴⁷. En México, para el 2008 se reportaron 71074 defunciones a consecuencia de algún tipo de cáncer, de las cuales el 13 % corresponde a algún tipo de leucemia⁴⁸.

El tratamiento para la AML incluye al menos un ciclo de quimioterapia de inducción intensiva, seguido por un curso adicional de terapia de consolidación y mantenimiento. El tratamiento estándar en los últimos decenios comprende el uso de citarabina y daunorrubicina, si bien otros regímenes de inducción, pueden incluir la alteración de las dosis de citarabina, la sustitución de diferentes antraciclinas y el estudio de adición de otros agentes para mejorar la eficacia del tratamiento estándar. Por su parte, el trasplante autólogo y alogénico de células

troncales, son procedimientos que se realizan sólo a pacientes seleccionados. Comparando la supervivencia relativa de pacientes con AML tratados entre 1973 y 2005, se ha mostrado que pacientes menores de 60 años han tenido una mejoría durante cada década, mientras que en adultos mayores de 60 años no se ha demostrado de manera convincente una mejora en su supervivencia, siendo la sobrevivencia a 5 años inferior al 10 %. Así, muchos nuevos agentes para el tratamiento de la AML se han desarrollado recientemente y están actualmente en ensayos clínicos^{49, 50, 51}. No obstante aún es desconocido el impacto de estas nuevas terapias en la sobrevivencia de pacientes con AML.

Entre las diferentes alternativas en investigación, es conocido que tanto extractos de plantas como principios activos extraídos de ellas, representan una fuente de gran potencial en la búsqueda de agentes anti-leucemia^{52, 53, 54, 55} por ejemplo, un alcaloide aislado de la planta herbácea *Catharanthus roseus* o vinca de Madagascar, se ha utilizado en el tratamiento de linfoma de Hodgkin⁵⁶ mientras que la capsaicina aislada del chile, ha mostrado potencial como bloqueador del crecimiento en cultivo de células leucémicas sin que se haya empleado hasta el momento en el tratamiento de cáncer⁵⁷.

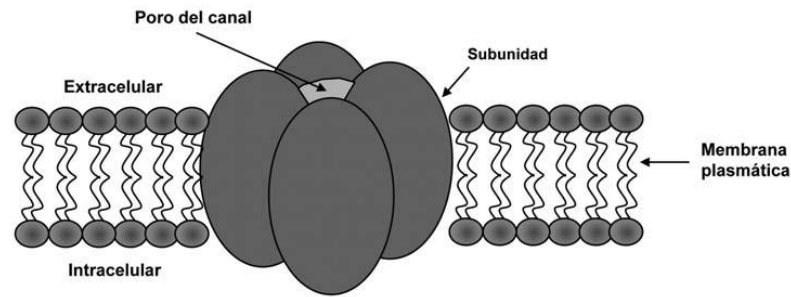
Capsaicinoides.

El chile (*Capsicum spp*) es uno de los primeros cultivos domesticados en Mesoamérica por lo que ahora se ha convertido en un ingrediente en la comida mexicana⁵⁸. México es el país en el mundo con la mayor variedad genética de *Capsicum*; comprende cerca de 27 especies, cinco de las cuales han sido domesticadas: *C annum*, *C baccatum*, *C chinense*, *C frutescens* y *C pubescens*. Se ha propuesto que estas especies, con su más de 2000 cultivares, se derivaron a partir de entre tres y cinco especies silvestres. Su riqueza genética se debe en gran parte a la diversidad de climas y suelos, pero también a las prácticas tradicionales de cultivo que efectúan los pequeños productores utilizando semillas de los frutos seleccionados de las plantas nativas^{59, 60, 61, 62}. Los compuestos que brindan al chile sus propiedades irritantes son los capsaicinoides un grupo de amidas ácidas derivadas de la vanillilamina, producidos en las glándulas de la placenta del chile sitio donde se producen las semillas, siendo la capsaicina el más abundante de los capsaicinoides responsable de la pungencia^{63, 64, 65}. Las diferentes especies de *Capsicum* pueden variar en grado de picor, lo que se relaciona con su capacidad de acumular capsaicina. La importancia de los capsaicinoides se debe a que además de proporcionar el sabor picante, son utilizados por la industria farmacéutica, de armas,

tabacalera, cosmética, de pinturas entre otras como ingrediente activo de diversos productos^{66, 67, 68}.

Uno de los principales efectos fisiológicos de la capsaicina es como agonista de los receptores TRPV1 (Receptor Vainilloide de Potencial Transitorio, subfamilia 1), los cuales son canales catiónicos no selectivos. El canal TRPV1 se expresa principalmente en el sistema nervioso periférico, como el ganglio de la raíz dorsal, los ganglios trigeminal torácico vagal y en fibras sensoriales. El canal TRPV1 también puede encontrarse en el sistema nervioso central y en múltiples tejidos no neuronales, donde su función aún se desconoce^{69, 70}. La estructura de este canal forma un homotetrámero, donde las subunidades presentan seis segmentos transmembranales y regiones amino (N-) y carboxilo (C-) terminales intracelulares. El conjunto de los segmentos (S5) y (S6) de cada subunidad, junto con el asa que los conecta, dan lugar al poro o vía de conducción iónica. Este es un canal catiónico no específico que permite el paso de diferentes cationes monovalentes o divalentes (**Fig. 3**)^{71, 72}.

A



B

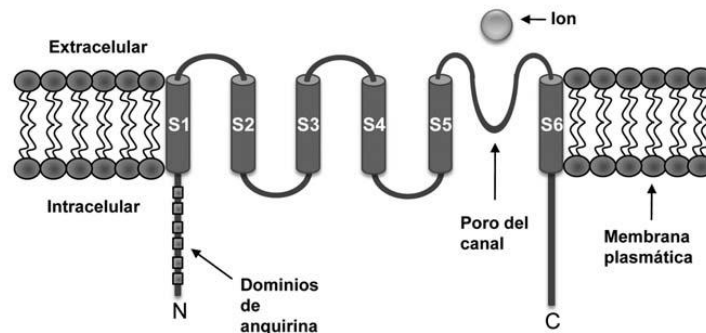


Figura 3. Canal subunidad del canal; cada una subunidad se compone de seis segmentos transmembranales (S1S2) y regiones amino-terminal (N) y carboxilo-terminal (C) intracelulares. Los segmentos S5 y S6 y el asa que los conecta dan lugar al filtro de selectividad y al poro del canal- La región N-terminal contiene seis dominios de unión a anquirina (cuadros). (B) El canal funcional forma un tetrámero compuesto de cuatro subunidades como las que se muestran en A)

73

La activación de estos receptores ocasiona la liberación endógena de diversos agentes químicos proinflamatorios como prostaglandinas, bradicinina y ATP, los cuales resultan de la liberación de diversos neurotransmisores, induciendo dolor e inflamación neurogénica por lo que estos receptores juegan un papel muy importante en estados de dolor neuropático, inflamación intestinal y otros desórdenes. Uno de los muchos neurotransmisores involucrados en los impulsos del dolor es el péptido conocido como sustancia P, en la actualidad se sabe que el principal mecanismo por el cual la capsaicina ejerce un efecto analgésico y antiinflamatorio después de un tratamiento prolongado es debido a la depleción de la sustancia P en las neuronas sensoriales ocasionando desensibilización^{74, 75, 76}.

Por otro lado, aunque es poco conocido el efecto de la capsaicina en la proliferación y viabilidad de células hematopoyéticas, de manera interesante se ha reportado que inhibe el crecimiento en cultivo de células leucémicas humanas HL-60, U937, K562 y Jurkat, vía inducción de apoptosis, donde se ha sugerido puede ser selectiva dado que parece afectar solo a células transformadas pero no así a las células normales del mismo linaje^{77, 78}. Estos resultados sugieren un posible uso terapéutico, sin embargo debido a la pungencia característica de la capsaicina se ha limitado su uso, en este sentido y con la intención de explorar sus cualidades terapéuticas se han descrito compuestos

vanilloides agonistas de los receptores de capsaicina pero sin el carácter irritante de ésta⁷⁹. Así recientemente se describió la síntesis y evaluación farmacológica de dos análogos sintéticos de capsaicina denominados Rinvanil y Fenilacetilrinvanil (FAR), de los cuales aún no se tienen reportes de uso terapéutico^{80, 81}.

Líneas Celulares.

Gran parte del conocimiento de la patogénesis de la leucemia, ha sido gracias al empleo de modelos animales, como lo es el ratón, esto es dadas las semejanzas fisiológicas, anatómicas y genómicas que comparten con los humanos. Así se han podido recrear diversos tipos de patologías, siendo por tanto un modelo irremplazable para el estudio de diversos padecimientos^{82, 83}. De manera análoga, el empleo de líneas celulares de ratón como modelo de estudio de la leucemia, y en particular en el análisis de moléculas con fines terapéuticos es de vital importancia dado que permite definir tanto el efecto biológico como en su caso, el mecanismo de acción de la molécula en estudio.

La línea celular leucémica J774 de morfología monoblástica proviene de un sarcoma (tumor) macrofágico que fue generado en una hembra de ratón BALB/c en 1968 mediante la inducción de plasmocitoma. Tienen la capacidad de formar tumores metastásicos;

presentan receptores Fc e Ig, liberan al medio IL-1 y lisozima (LZM) ⁸⁴ son inhibidas en presencia de LPS y sulfato dextrán.

La línea celular de leucemia WEHI-3, fue originalmente establecida a partir del cultivo sucesivo de un sarcoma mieloide de ratones BALB/c⁸⁵. Estas células expresan marcadores mieloides como CD11b, CD32 (FcγRII), Thy-1, Mac-3, F4/80. Positivas para esterasa, lisosima y 5'-nucleotidasa pero negativas para peroxidasa y aminopeptidasa⁸⁶. Expresan de manera constitutiva IL-3, cuerpos de Bauer y de manera característica, inducen leucemia cuando son inoculadas en ratones BALB/c⁸⁷.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se han extraído de diversas plantas, compuestos con potencial antileucémico. De entre ellos la capsaicina, el principio activo del chile, inhibe el crecimiento en cultivo de líneas celulares leucémicas, donde se ha sugerido, afecta solo a células transformadas pero no así a células hematopoyéticas normales. Estos elementos sugieren un posible uso terapéutico, sin embargo debido a la pungencia característica de la capsaicina se ha limitado su uso. Por lo anterior, diversos grupos de trabajo han desarrollado análogos sintéticos no irritantes pero agonistas de los receptores de la capsaicina; sin embargo, aún se desconoce su capacidad para inhibir la proliferación de líneas leucémicas y células hematopoyéticas normales.

JUSTIFICACIÓN

Pacientes con AML menores de 60 años por lo general logran la remisión completa con quimioterapia estándar, pero sólo el 40 % de ellos sobreviven a largo plazo libres de la enfermedad. En los adultos mayores la eficacia es aún más decepcionante, un 20 % mueren de complicaciones durante la inducción, sólo 40 a 50 % logran una remisión completa y no más del 10 a 20 % de ellos viven más de tres 3 años⁸⁸. Por lo anterior, sigue vigente la búsqueda de moléculas con potencial antileucémico, de igual o mayor efectividad a las actualmente en uso.

Se ha mostrado que la capsaicina, el principio activo responsable de la pungencia del chile, inhibe la proliferación de líneas leucémicas pero no de células hematopoyéticas normales, sin embargo, debido a su carácter altamente irritante no se utiliza con fines terapéuticos. Se sabe que los compuestos carentes de pungencia Rinvanil y Fenilacetilrinvanil son agonistas de los receptores de capsaicina pero hasta ahora, no se ha evaluado su capacidad para inhibir la proliferación de líneas celulares leucémicas. Si estos compuestos al igual que la capsaicina muestran actividad antiproliferativa sobre células leucémicas pero no sobre células hematopoyéticas normales, se abre la posibilidad de que puedan ser explorados como potenciales antineoplásicos in vivo.

HIPÓTESIS

La capsaicina inhibe la proliferación de líneas celulares leucémicas humanas, por lo tanto se espera que las moléculas análogas Rinvanil y Fenilacetilrinvanil también inhiban las líneas celulares leucémicas de ratón.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la capsaicina, Rinvanil y Fenilacetilrinvanil en la proliferación, viabilidad, citotoxicidad y apoptosis de las líneas celulares leucémicas J774, WEHI-3 y médula ósea normal de ratón.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Evaluar la proliferación de las líneas celulares leucémicas J774, WEHI-3 y médula ósea normal en presencia o ausencia de Capsaicina, Rinvanil y Fenilacetilrinvanil, mediante la técnica de cristal violeta.
- ❖ Determinar la viabilidad de las células leucémicas J774, WEHI-3 y médula ósea normal en presencia o ausencia de Capsaicina, Rinvanil y Fenilacetilrinvanil, mediante la técnica MTT y exclusión al azul tripano.
- ❖ Determinar la inducción de citotoxicidad en las células leucémicas J774, WEHI-3 y médula ósea normal en presencia o ausencia de Capsaicina, Rinvanil y Fenilacetilrinvanil, mediante la técnica de SRB.

- ❖ Evaluar la inducción de apoptosis en células leucémicas J774 y WEHI-3 en y médula ósea normal en presencia o ausencia de Capsaicina, Rinvanil y Fenilacetilrinvanil, mediante la fragmentación de ADN.

MÉTODO

MOLÉCULAS DE ESTUDIO.

Los análogos sintéticos de capsaicina, Rinvanil y Fenilacetilrinvanil, proporcionados por el grupo de trabajo del Dr. Ignacio Regla Contreras del laboratorio de Síntesis de Fármacos de la Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, fueron disueltos en etanol y posteriormente en solución estabilizadora de fosfatos (PBS) como vehículo. Como capsaicinoide control de la inhibición de la proliferación celular, se empleó capsaicina comercial (SIGMA ALDRICH).

LÍNEAS CELULARES y CÉLULAS MONONUCLEADAS

Las líneas celulares leucémicas de ratón J774 y WEHI-3, adquiridas de la American Type Collection Culture (ATCC) fueron cultivadas en medio de cultivo Iscove's Modified Dulbecco's (IMDM) (Gibco BRL NY, USA), suplementado con 10 % de suero fetal bovino (SFB), y mantenidas a una temperatura de 37 °C, en una atmosfera de 5 % de CO₂ y humedad saturante, con cambio de medio cada 48 h.

Por su parte, las células mononucleadas de ratón para cultivo, fueron obtenidas de hembras CD-1 de 2 a 3 meses de edad. Brevemente, después de sacrificio por dislocación cervical se recuperaron los

fémures, se obtuvieron las células totales por arrastre de medio de cultivo y posteriormente, se separaron las células mononucleadas mediante gradiente de densidad con Ficoll 1.077 g/mL (Microlab, México).

Los cultivos se realizaron en placas de 96 pozos fondo plano (Corning NY, USA), con una densidad inicial de 3×10^4 y 6×10^3 células/mL para J774 y WEHI-3 respectivamente, mientras que para las células mononucleadas se emplearon 1×10^5 células/mL y además se suplementó el cultivo con 15 % de SFB y 5 % de suero equino (SE) más 5 ng/mL de interleucina 3 recombinante de ratón (rmL-3) como factor de crecimiento. Fueron cultivados durante 72 h o 120 h en el caso de las células mononucleadas, con diferentes concentraciones (3, 6, 13, 25, 50, 100 μ g/ml) de Capsaicina, Fenilacetilrinvanil y Rinvanil y posteriormente fue evaluada la proliferación, citotoxicidad y viabilidad como se describe a continuación.

Evaluación de proliferación celular.

El colorante cristal violeta, posee características alcalinas, que le permiten incorporarse a los núcleos celulares. El número núcleos teñidos aumenta o disminuye conforme a la proliferación celular se ve estimulada o inhibida.

Se fijaron las células con glutaraldehído al 1.1 % durante 1 hora, para posteriormente ser lavadas con agua destilada y secadas al aire. Se adicionó 50 uL/pozo de cristal violeta (Apéndice A) al 0.1 % y luego, se lavó exhaustivamente con agua destilada para retirar el exceso de colorante. Finalmente, se solubilizó con ácido acético al 10 % dejando en agitación durante 20 minutos y se leyó la absorbancia a 570 nm en un lector de placas Tecan (Spectra, Austria). La absorbancia se graficó como porcentaje de proliferación celular con respecto al control⁸⁹.

Evaluación de citotoxicidad.

El colorante SRB se adhiere a los aminoácidos de las proteínas celulares y la valoración colorimétrica da una estimación de la masa total de proteínas, las cuales están relacionadas con el número celular.

Los cultivos celulares se fijaron con 50 µl de ácido tricloroacético (ATC) frío con una concentración de 5 % p/v y se dejó incubar por una hora a 4 °C, posteriormente la placa se lavó aproximadamente 5 veces

con ácido acético al 1 % para eliminar los restos de ATC. Se dejó secar a temperatura ambiente y luego se adicionó 50 μ l de SRB al 0.4 % diluido en ácido acético al 1 %, dejando incubar por 5 minutos a temperatura ambiente. Concluido el tiempo, se retiró el exceso de colorante con ácido acético al 1 % y finalmente se solubilizó con 50 μ l de tris base a 10 mM (pH 10.5). La densidad óptica fue leída a 570 nm en un lector de placas Tecan (Spectra, Austria) y se realizo una tabla como porcentaje de proliferación celular con respecto al control. Adicionalmente, la concentración que redujo el 50 % de la proliferación celular (IC_{50}), fue calculada mediante regresión lineal y comprobada experimentalmente para cada una de las moléculas por línea celular o cultivo de células mononucleadas⁹⁰.

Evaluación de viabilidad celular.

La viabilidad se determinó empleando la técnica de reducción de una sal de tetrazolio, en este caso 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-5-(3-carbimetoxifenil)-2-(sulfafenil)-2H-tetrazolio (MTS), mediante la actividad enzimática succinato-deshidrogenasa mitocondrial de las células vivas, mediante la aceptación de H^+ , en donde la sal de tetrazolio forma cristales azules de formación insolubles en agua, pero soluble sólo en disolventes orgánicos como el etanol, isopropanol, dimetil sulfóxido. La cantidad de formazan producido es directamente proporcional a la absorbancia que presentan los cristales de formazan en solución. Se evaluó la actividad metabólica como parámetro de viabilidad empleando el kit CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation (MTT) Assay de Promega (Madison, USA), de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se adicionaron 20 μ L de CellTiter 96® Aqueous One Solution Reagent a la placa y se incubó durante una a cuatro horas dentro de la incubadora. Posteriormente, se determinó la densidad óptica a 490 nm en un lector de placas TECAN (Spectra, Austria) ^{91, 92, 93, 94}.

Evaluación de viabilidad por exclusión al azul tripano.

El colorante azul tripano solamente es asimilado por las células cuando ésta se encuentra deteriorada de la membrana, en cambio las células que no lo incorporan se consideran como células viables.

Se utilizó la dosis IC₅₀ para analizar la viabilidad celular por exclusión al azul tripano (Sigma, USA). Una muestra celular en proporción 1:1 con colorante se evaluó por conteo directo en una cámara de Neubauer, expresándose el porcentaje de células vivas (refractantes) en oposición a las células muertas (teñidas de azul) respecto al número celular total⁹¹.

Morfología celular

Se tomaron alícuotas de las células en suspensión y fueron aplicadas a un portaobjetos mediante cytospin, para luego ser fijadas con metanol y teñidas con Giemsa, finalmente se observaron en el microscopio óptico en el objetivo de 10X. Adicionalmente, se analizaron los cambios en la morfología de las células como fragmentación celular, aumento del volumen celular, modificación en la proporción citoplasma-núcleo, condensación de la cromatina nuclear, fragmentación nuclear con membrana intacta y formación de cuerpos apoptóticos; cambios compatibles con el proceso de apoptosis ⁹². Se tomaron imágenes representativas en el microscopio óptico en el objetivo de 100X.

Fragmentación de ADN

La detección de DNA degradado se realizó como se describe en Ramírez-Ortega et al., 2006. Brevemente, 1×10^6 de células J774 o WEHI-3, fueron sometidas a dos buffer de lisis consecutivos de 1 % de NPO_4 , 20 mM de EDTA y 50 mM de Tris pH 7.9. Posteriormente, se añadió dodecilsulfato de sodio (SDS) a una concentración final de 1 % y 5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de RNasa y luego se digirió con 2.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de proteinasa K durante 30 min a 37°C . El DNA se precipitó con acetato de amonio y etanol y se recuperó por centrifugación a 4°C y luego, el botón se resuspendió en 10 mM de Tris, 1 mM de EDTA a pH 7.4 y se analizó la integridad del DNA por electroforesis en gel de agarosa al 2% con 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de bromuro de etidio. Las bandas de DNA se observaron con un transiluminador UV (FOTODYNE) y se fotografiaron geles representativos.

Manejo de datos

A menos que se indique lo contrario, todos los experimentos se realizaron al menos tres veces de manera independiente y por triplicado, presentando el promedio y desviación estándar. Para el análisis estadístico se realizó una prueba de Levene para determinar que las varianzas fuesen iguales y posteriormente una comparación múltiple de medias. Se empleó la prueba de Dunnett cuando uno de los tratamientos se consideró como control, comparando cada una de las otras medias de

los tratamientos contra él; o en su caso de Tukey, cuando se comparó todos los pares de medias entre sí. En ambos estadísticos se considero la $p < 0.05$ respecto al cultivo con solo vehículo.

RESULTADOS

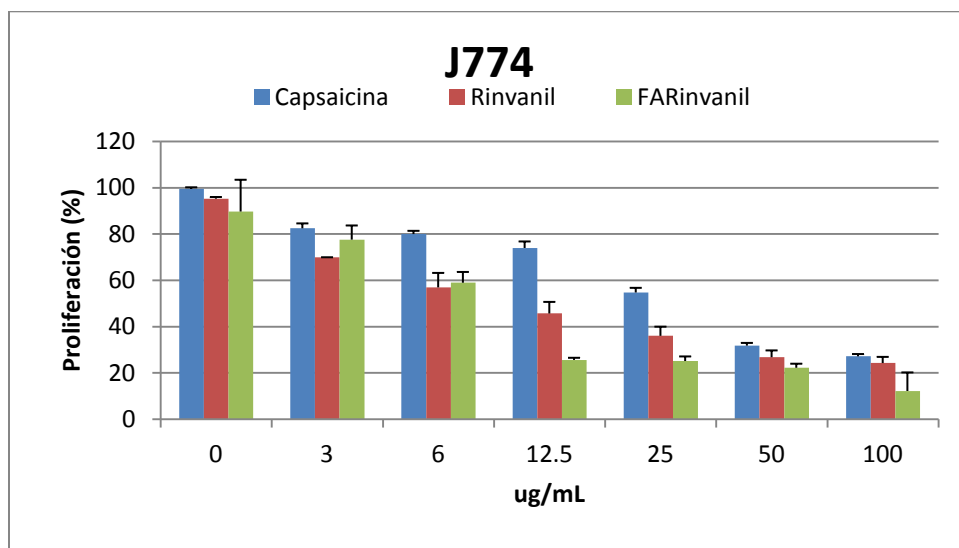
Capsaicina, Rinvanil y Fenilacetilrinvanil inhiben la proliferación de las líneas celulares leucémicas J774, WEHI-3 y médula ósea normal.

Los cultivos de células J774, WEHI-3 o mononucleadas de médula ósea normal estas últimas en presencia de rmIL-3 como factor de crecimiento, se trataron con 3 a 100 $\mu\text{g/mL}$ de capsaicina o molécula análoga y el número celular fue evaluado por medio de la técnica de tinción con cristal violeta (**grafica 1 a 3**). Para facilitar la comparación de la actividad biológica, se determinó la concentración requerida para inducir un decremento del 50 % en la densidad celular (IC_{50}) de los cultivos celulares (**tabla 1**).

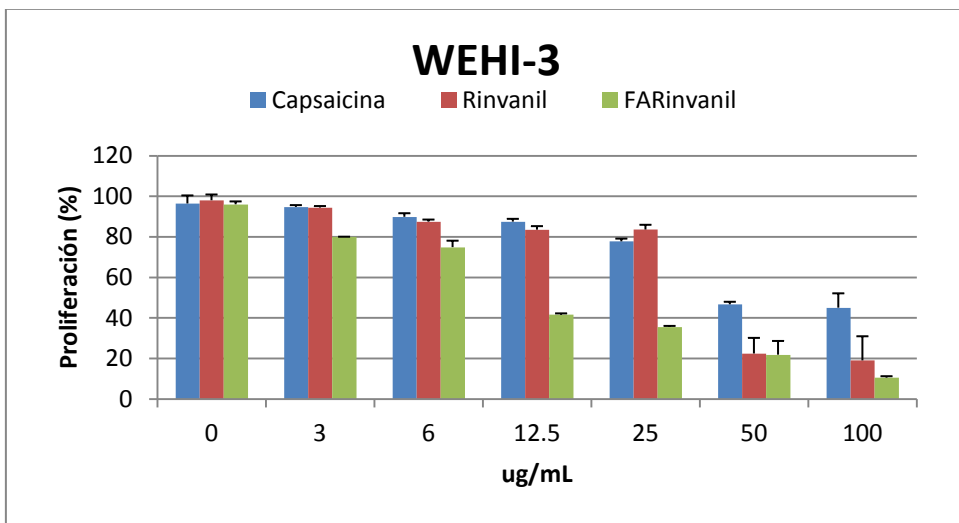
Los resultados indican que la proliferación de las células hematopoyéticas sean estas leucémicas o normales, son sensibles a la presencia de capsaicina y sus análogos sintéticos, siendo el efecto de las tres moléculas dosis-dependiente, es decir, conforme se incrementa la concentración disminuye el número celular. Sin embargo, las curvas dosis respuesta sugieren que las líneas celulares leucémicas son más sensibles al efecto antiproliferativo, respecto al cultivo primario de células hematopoyéticas normales. Para corroborar que las moléculas ejercieran un efecto antiproliferativo selectivo, los resultados fueron

linealizados, los valores para la IC_{50} calculados conforme a la ecuación de la línea recta y posteriormente se comprobaron experimentalmente. Encontramos que para las líneas leucémicas las IC_{50} de los análogos sintéticos, son menores que las obtenidas para el cultivo primario de células hematopoyéticas lo cual sugiere un efecto selectivo sobre la proliferación. Así en capsaicina, los valores de IC_{50} de menor a mayor corresponden a J774, médula y WEHI-3, mientras que para Fenilacetilrinvanil y Rinvanil, las células de menor a mayor sensibilidad son: medula, WEHI-3 y J774. De esta manera, las células leucémicas son en promedio más sensibles a Fenilacetilrinvanil que las células normales de la médula ósea, mientras que en Rinvanil, J774 y WEHI-3 son más sensibles al efecto antiproliferativo que las células normales. De manera notable, cuando comparamos el efecto de los análogos respecto a capsaicina por línea celular, encontramos que en J774, Fenilacetilrinvanil y Rinvanil son 10 y 4 veces más potentes inhibidores que la molécula original, mientras que en WEHI-3 son mejores inhibidores de la proliferación que capsaicina. Por el contrario, en las células normales, Capsaicina y Fenilacetilrinvanil son igualmente efectivos como bloqueadores de la proliferación pero, se requieren más Rinvanil para conseguir el mismo efecto biológico que Fenilacetilrinvanil o la Capsaicina.

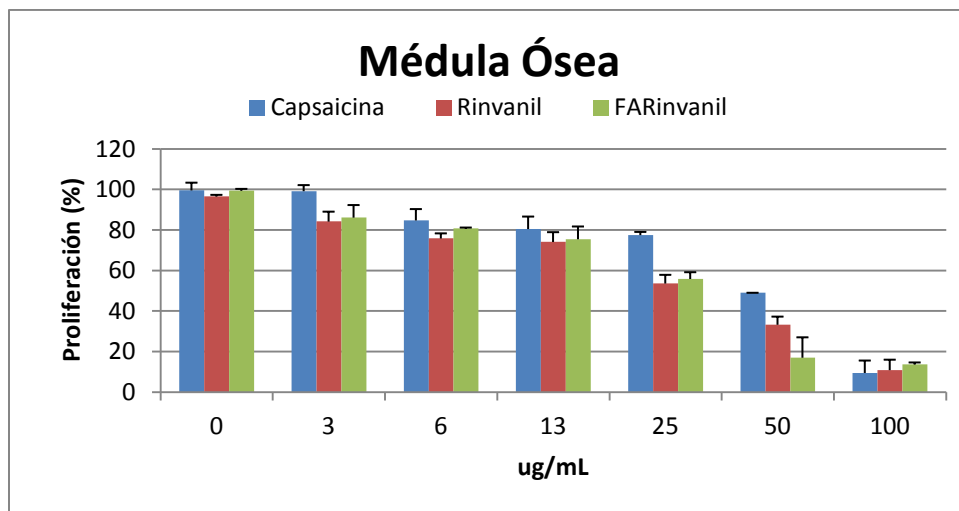
Imágenes representativas de cultivos de células J774, WEHI-3 o mononucleadas de medula ósea en ausencia o presencia de IC₅₀ de capsaicina y los análogos sintéticos, fueron fotografiadas con una cámara digital a un zoom de 10X. Las imágenes sugieren que estas moléculas inducen un afecto negativo sobre la viabilidad **(figura 4 a 6)** sin embargo, para corroborar esta apreciación, se evaluó la inducción de citotoxicidad mediante la técnica de Sulforodamina-B (SRB).



Gráfica 1. Curva dosis respuesta de la proliferación de las células J774 en presencia de diferentes concentraciones de capsaicina, Rinvanil o FARinvanil. Evaluado por cristal violeta, se expresa como % respecto a 0 $\mu\text{g}/\text{m}$. La diferencia es significativa respecto a 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ con $p < 0.05$ en el ANOVA dunnet.



Gráfica 2. Curva dosis respuesta de la proliferación de células WEHI-3, en presencia de diferentes concentraciones de capsaicina, Rinvanil o FARinvanil. Evaluado por cristal violeta, se expresa como % respecto a 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$. La diferencia es significativa respecto al control con $p < 0.05$ en el ANOVA dunnet.



Grafica 3. Curva dosis respuesta de la proliferación de células mononucleadas de médula ósea con 5 ng/ml de rmIL-3 como factor de crecimiento, en presencia de diferentes concentraciones de capsaicina, Rinvanil o FARinvanil. Evaluado por cristal violeta, se expresa como % respecto a 0 µg/ml. La diferencia es significativa respecto a 0 µg/ml con $p < 0.05$ en el ANOVA dunnet.

IC₅₀ DE CAPSAICINA Y SUS ANÁLOGOS SINTÉTICOS

Línea celular	Capsaicina	Fenilacetilrinvanil	Rinvanil
J774	32 µg	3µg	8 µg
WEHI-3	47 µg	4µg	50µg
Médula ósea	50 µg	50µg	80µg

Tabla 1. IC₅₀ para la Capsaicina y sus análogos sintéticos sobre las líneas leucémicas J774, WEHI-3 y células normales de médula ósea.

CAPSAICINA

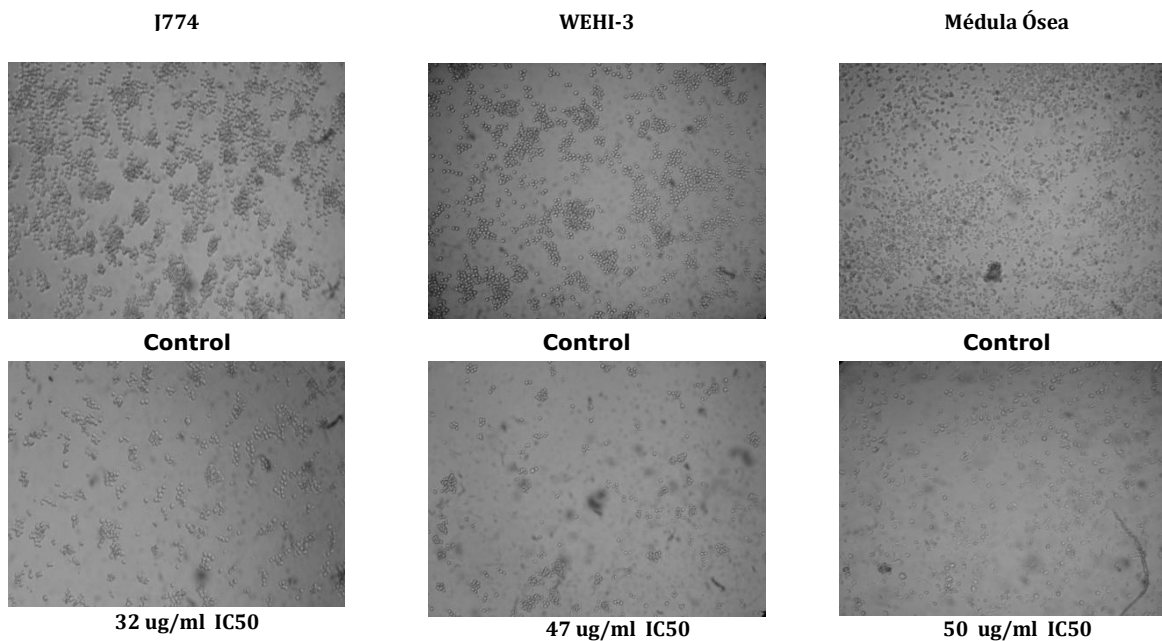


Figura 4. Imagen representativa de cultivos de células J774, WEHI-3 y células normales de médula ósea en presencia de Capsaicina en dosis de IC₅₀.

RINVANIL

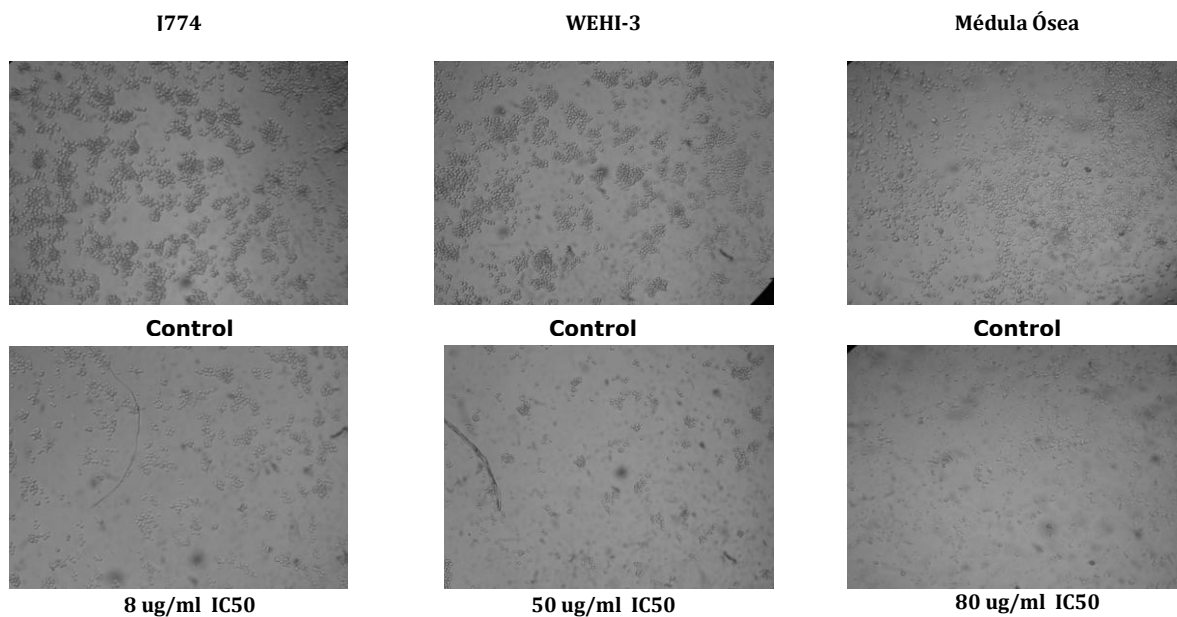


Figura 5. Imagen representativa de cultivos de células J774, WEHI-3 y células normales de médula ósea en presencia del análogo sintético Rinvanil en dosis de IC₅₀.

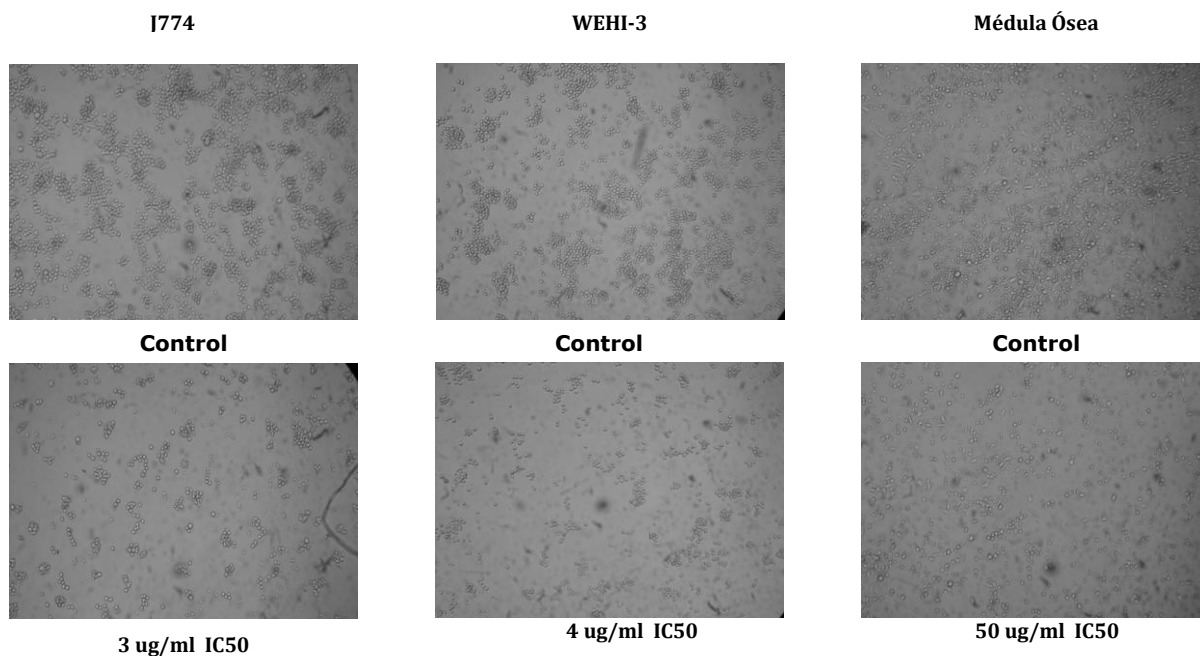
FARinvanil

Figura 6. Imagen representativa de cultivos de células J774, WEHI-3 y células normales de médula ósea en presencia del análogo sintético Fenilacetilrinvanil en dosis de IC₅₀.

Capsaicina, Rinvanil y Fenilacetilrinvanil son citotóxicos sobre las células leucémicas J774, WEHI-3 y médula ósea normal.

Considerando la inhibición de la proliferación en los cultivos en presencia de la Capsaicina y los análogos sintéticos, se analizó si se afectaba la viabilidad celular utilizando las IC_{50} y los resultados muestran que, Fenilacetilrinvanil reduce la viabilidad de cultivos de J774 y WEHI-3 al 27 % mientras que en médula ósea es del 53 %. Por el contrario, Rinvanil y capsaicina reducen la viabilidad de células normales al 43 %, pero solo hasta el 54 % y 52 % en las células leucémicas J774 y WEHI-3 respectivamente **(Tabla 2)**.

De manera similar a la proliferación celular, Fenilacetilrinvanil tiene mayor efecto negativo sobre la viabilidad de J774 y WEHI-3 que el análogo Rinvanil o el capsaicinoide original. En este sentido, Fenilacetilrinvanil es más potente que Rinvanil o capsaicina para reducir la viabilidad de las células leucémicas tanto J774 como WEHI-3. Por el contrario, este mismo análogo y la capsaicina son mejores inhibidores de la viabilidad de células normales de médula ósea que el análogo Fenilacetilrinvanil.

La disminución de la proliferación y viabilidad sugieren que la capsaicina y sus análogos actúan de manera citotóxica sobre las células leucémicas y normales de médula ósea, para verificar este efecto se empleó la evaluación de SRB y los resultados con IC_{50} , confirman que Fenilacetilrinvanil es más citotóxico sobre J774 y WEHI-3 con un 46 % y 35 % respectivamente que sobre la médula ósea cuya citotoxicidad es apenas del 30 %. Por el contrario, Rinvanil parece ser más citotóxico sobre las líneas leucémicas que sobre las células normales, considerando que en estas últimas el porcentaje de citotoxicidad es apenas del 18 % pero del 26 y 30 % en J774 y WEHI-3 respectivamente.

Al comparar el efecto de los análogos sintéticos respecto al capsaicinoide original encontramos que, Fenilacetilrinvanil es más citotóxico que Rinvanil y más que la capsaicina sobre J774. Por el contrario, estos mismos análogos sintéticos son menos citotóxicos en WEHI-3 que la molécula original, al menos en un 9 % y 4 % respectivamente. De manera interesante, no se identifica efecto citotóxico sobre las células de la médula ósea empleando capsaicina pero si Rinvanil y Fenilacetilrinvanil en los que el porcentaje es del 18 y 30 % respectivamente (**Tabla 3**).

PORCENTAJE DE VIABILIDAD

	J774		WEHI-3		Médula ósea	
	IC₅₀	% viabilidad	IC₅₀	% viabilidad	IC₅₀	% viabilidad
CONTROL	-	100	-	100	-	100
CAPSAICINA	32	52	47	52	50	45
RINVANIL	8	54	50	54	80	43
FARINVANIL	3	27	4	27	50	53

Tabla 2. IC₅₀ de la proliferación determinada experimentalmente y porcentaje de viabilidad de células J774, WEHI-3 o mononucleadas de médula ósea en presencia de Capsaicina, Rinvanil o Fenilacetilrinvanil. Evaluado por exclusión al azul tripano (Se adicionó 5 ng/mL de rmIL-3 al cultivo de médula ósea como factor de crecimiento).

PORCENTAJE DE CITOTOXICIDAD

	J774		WEHI-3		Médula ósea	
	IC₅₀	% citotoxicidad	IC₅₀	% citotoxicidad	IC₅₀	% citotoxicidad
CONTROL	-	0	-	0	-	0
CAPSAICINA	32	36	47	39	50	0
RINVANIL	8	26	50	30	80	18
FARINVANIL	3	46	4	35	50	30

Tabla 3. IC₅₀ de la proliferación determinada experimentalmente y porcentaje de citotoxicidad de células J774, WEHI-3 o mononucleadas de médula ósea en presencia de Capsaicina, Rinvanil o FARinvanil. Evaluado por SRB. (Se adicionó 5 ng/ml de rmIL-3 al cultivo de médula ósea como factor de crecimiento).

Capsaicina, Rinvanil y Fenilacetilrinvanil inducen a muerte celular por apoptosis sobre las células leucémicas J774, WEHI-3.

Para determinar si la capsaicina y sus análogos sintéticos inducían muerte celular vía apoptosis, analizamos algunas características morfológicas asociadas con células apoptóticas. Los cambios morfológicos estimulados por la capsaicina y los análogos sintéticos sobre las líneas leucémicas, muestran una disminución del volumen celular, condensación de la cromatina y fragmentación nuclear, dichos cambios sugieren la formación de cuerpos apoptóticos en estas líneas **(Fig. 7)**, por el contrario, las células normales de médula ósea tratadas con la IC_{50} de las moléculas de estudio, no mostraron cambios significativos en la morfología celular respecto al vehículo **(Fig. 8)**. Cuando analizamos el porcentaje de células positivas para cuerpos apoptóticos **(Tabla 4)**, observamos que la capsaicina y sus moléculas inducen similar porcentaje de apoptosis, no existiendo diferencia significativa entre tratamientos, mientras que en células normales, la presencia de capsaicina, Fenilacetilrinvanil o Rinvanil no incrementaron de manera significativa el número de células positivas para cuerpos apoptóticos.

Característica de la apoptosis es la activación de endonucleasas las cuales culminan en la fragmentación de DNA. Como muestran

corrimientos electroforéticos representativos, la capsaicina y moléculas análogas inducen un patrón de fragmentación internucleosomal del DNA, consistente en fragmentos de 180 a 200 pb, típico de células apoptóticas **(Fig. 9)**.

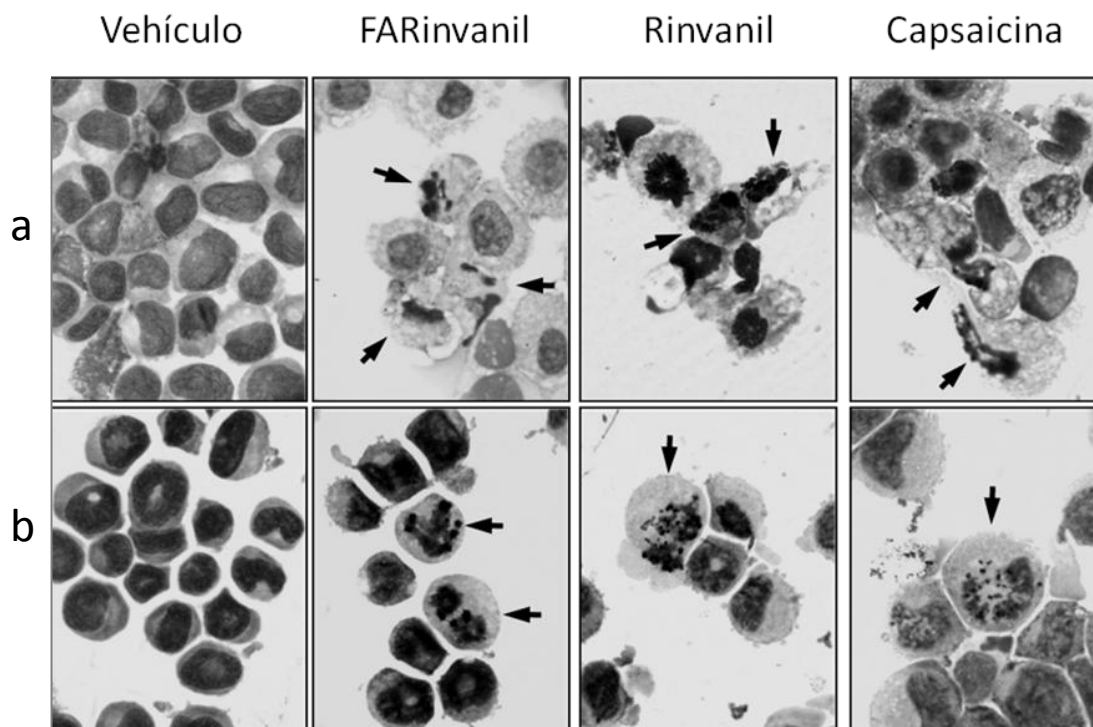
MORFOLOGÍA APOPTOTICA DE CÉLULAS J774 Y WEHI-3

Figura 7. Morfología apoptotica de células J774 (a), WEHI-3 (b). Fueron cultivadas con una densidad de 1×10^5 cel/mL, tratadas en presencia o ausencia de IC_{50} de Capsaicina y análogos sintéticos durante un periodo de 24 horas. Culminado el tiempo se tomaron alícuotas de células en suspensión que fueron colocadas en portaobjetos mediante cytopspin, para ser fijadas, teñidas con Giemsa y observadas al microscopio.

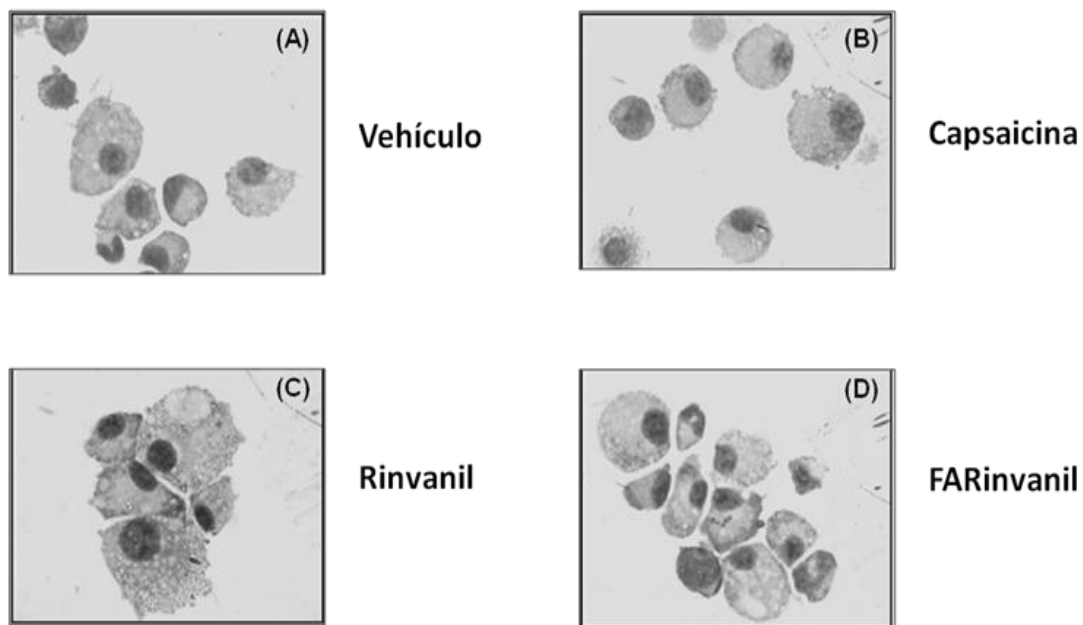
MORFOLOGÍA DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA NORMAL

Figura 8. Morfología de las células de médula ósea normal de ratón. Fueron cultivadas en placas de ultrabaja adherencia con una densidad de 1×10^5 cel/mL y tratadas en presencia o ausencia de los valores de IC_{50} de Capsaicina y sus análogos sintéticos durante 120 horas. Pasado el tiempo, se tomaron alícuotas de las células en suspensión aplicadas mediante cytopspin a portaobjetos, se fijaron con metanol y se tiñeron con Giemsa para observarse al microscopio.

CÉLULAS POSITIVAS DE CUERPOS APOPTÓTICOS

TRATAMIENTO

CUERPOS APOPTÓTICOS

	J774	WEHI-3	MÉDULA ÓSEA
Vehículo	2 ± 1	0	5 ± 3
Capsaicina	*31 ± 3	*17 ± 3	6 ± 4
Rinvanil	*30 ± 3	*15 ± 2	7 ± 2
Fenilacetilrinvanil	*37 ± 2	*16 ± 2	6 ± 4

TABLA 4. Células positivas para cuerpos apoptóticos en diferentes líneas celulares leucémicas y células mononucleadas de médula ósea normal de ratón. Los resultados se presentan con un nivel de significancia de $\pm$ DE de tres experimentos independientes con tres repeticiones. *Diferencia significativa con una $P < 0.05$ con respecto al vehículo (0 $\mu\text{g/mL}$) en ANOVA Dunnet.

FRAGMENTACIÓN DE DNA EN LAS LÍNEAS LEUCÉMICAS J774 Y WEHI-3

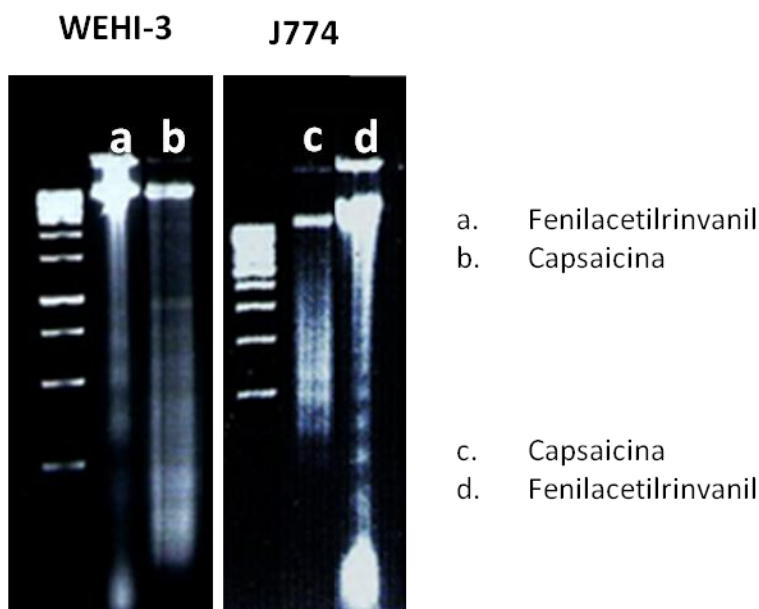


Figura 9. Fragmentación de DNA en las líneas leucémicas J774 y WEHI-3. Las líneas celulares J774 y WEHI-3 (1×10^6 cel/5 mL) fueron cultivadas en presencia o ausencia de los valores de IC_{50} de capsaicina y 12-FAR por 24 horas. Al cabo de este tiempo, se realizó la extracción del DNA y fue visualizado en un gel de agarosa bajo luz UV.

DISCUSIÓN.

Avances considerables se han hecho en los últimos 20 años en el pronóstico y tratamiento de pacientes con AML sin embargo, para pacientes de edad avanzada y más jóvenes con enfermedad recurrente o refractaria primaria, hay una evidente necesidad de desarrollar mejores estrategias, con nuevos medicamentos más específicos y activos⁹³.

A lo largo de la historia los productos naturales han sido una fuente de compuestos con aplicación en los campos de la medicina, farmacia y biología⁹⁴. Sin embargo, a pesar de su potencial para ser agentes efectivos contra el cáncer, los productos naturales a menudo enfrentan importantes limitaciones terapéuticas, por ejemplo baja solubilidad en líquidos biológicos, propiedades farmacocinéticas indeseables, neurotoxicidad en estudios con animales. Ejemplo de esta problemática lo encontramos en forma hormonalmente activa de la vitamina D3 [1,25-dihydroxyvitamina D3, 1,25-(OH)₂D3], la cual tiene acción antiproliferativa y de diferenciación, así como de inducción de apoptosis en una serie de líneas celulares de cáncer in vitro. Sin embargo el desarrollo de hipercalcemia tras su administración, ha limitado fuertemente la posible aplicación terapéutica. De manera interesante, se ha mostrado que análogos de esta molécula pueden ser de 50 a 200

veces más potentes que la original, en una serie de líneas celulares de cáncer y en modelos animales⁹⁵.

Lo anterior demuestra que molécula análogas de productos naturales, pueden tener mejor actividad farmacológica y propiedades farmacocinéticas más favorables, con reducidos efectos secundarios no deseados respecto a los compuestos originales. En este trabajo, se evaluó la capacidad antiproliferativa de dos análogos sintéticos de la capsaicina, Rinvanil y Fenilacetilrinvanil sobre células hematopoyéticas leucémicas y normales. Se observó que los análogos sintéticos son más potentes que la capsaicina, siendo Fenilacetilrinvanil la molécula que mayor efecto presentó a nivel de proliferación, viabilidad e inducción de citotoxicidad en dosis menores, sobre líneas celulares J774 Y WEHI-3.

Es conocido que existen diversas características para poder determinar una molécula antineoplásica, teniendo como un punto importante la inducción de apoptosis. En este sentido aunque Rinvanil y Fenilacetilrinvanil inducen a las células leucémicas a una muerte celular vía apoptosis, no encontramos cambios morfológicos que sugieran que también lo hagan sobre células hematopoyéticas normales. Estos resultados concuerdan con los reportado previamente donde se muestra que la capsaicina, induce apoptosis sólo en células tumorales⁷⁷.

Las células J774 y WEHI-3 aún cuando se trata de células leucémicas, para las que se ha demostrado su malignidad in vivo^{57, 78, 96} expresan

algunas características de células monocíticas maduras, por ejemplo Mac-1, F4/80⁹⁷, receptores Fc⁹⁸, e incluso capacidad fagocítica sobre partículas de látex opsonizadas con suero. El hecho de que células con características macrofágicas sean más sensibles que las primitivas normales de médula ósea, al efecto de la capsaicina y sus análogos, podría estar relacionado con el nivel de expresión de los receptores TRPV1.

En este sentido, se ha mostrado que células dendríticas (DC) de ratón, pueden expresar el receptor de la capsaicina⁹⁹, así se ha sugerido que la presencia de dicho receptor podría dotar a las células presentadoras de antígenos, de un mecanismo especialmente sensible para la integración de los estímulos inflamatorios y la señalización de su maduración¹⁰⁰. Considerando que células monocíticas y dendríticas comparten un origen común dentro de la cascada hematopoyética¹⁰¹ no carece de sentido pensar que las células J774 y WEHI-3 pero no las mononucleadas normales de médula ósea, tengan una mayor expresión de TRPV1 lo cual las haga más sensibles a la presencia de los capsaicinoides. Sin embargo, algunos autores como O'Connell et al 2005 no apoyan la idea de que las DC expresen canales TRPV-1, al no encontrar mRNA en DC generadas en cultivo a partir de células de médula ósea, o aisladas de esplenocitos de ratón, pero más importante aún estas células no fueron responsivas a la presencia de la capsaicina.

Por lo anterior sería interesante, analizar si las células hematopoyéticas expresan o no TRPV1 y en su caso si la transformación maligna de las células leucémicas J774 y WEHI-3 afecta dicha expresión.

Finalmente es interesante que Fenilacetilrinvánil fuese la molécula que presentó mayor efecto biológico sobre las líneas leucémicas, considerando que carece de la pungencia característica de la capsaicina. Este hecho sugiere que podría tener un importante papel como alternativa para la terapia contra problemas hemato-oncológicos, sobre todo considerando que la utilidad de un compuesto potencial contra el cáncer no sólo depende de su citotoxicidad en las células malignas, sino también en la relativa falta de toxicidad para los tejidos normales¹⁰² y como mostramos aquí, la dosis requerida de Fenilacetilrinvánil para inducir apoptosis sobre células leucémicas es irrelevante para las células hematopoyéticas normales.

CONCLUSIONES

- Capsaicina, Rinvanil y Fenilacetilrinvanil, inhiben la proliferación y son citotóxicos sobre células leucémicas J774, WEHI-3 y mononucleadas normales de médula ósea de ratón.
- Rinvanil y Fenilacetilrinvanil son más citotóxicos que la capsaicina.
- Rinvanil y Fenilacetilrinvanil inducen la formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación del DNA en células leucémicas J774 y WEHI-3 pero no en médula ósea normal.
- Capsaicina y Fenilacetilrinvanil inducen fragmentación del DNA en células leucémicas J774 y WEHI-3.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- 1. Metcalf D. (1988). Cell-cell signaling in the regulation of blood cell formation and fuction. Immunol Cell Biol. 76:441.**
- 2. Zambrano I. Santiago E. Weiss B. Cáceres J. (1999). Biología de las células totipotenciales hematopoyéticas. Rev Inv Clin. 51: 53.**
- 3. Bellantuono I. (2004). Haemopoietic stem cells. Int J Biochem Cell Biol. 36: 607. Review.**
- 4. Orkin H. (1995). Transcription factors and hematopoietic development. J Biol Chem. 240: 4955.**
- 5. Mayani H., E. Flores-Figueroa, R. Pelayo, J. J. Montesinos, P. Flores-Guzmán, A. Chávez-González. (2007). Hematopoyesis. Cancerología. 2:95.**
- 6. Spangrudge G. Heimfield S. Weissman I. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. Science. 241:58.**
- 7. Morrison S. Weisman I. (1994). The long.term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. Immunity. 1: 661.**
- 8. Baum C. Weissman I. Tsukamoto A. Buckle A. Peault B. (1992). Isolation of a candidate human hematopoietc stem-cell population. Proc Natl Acad Sci USA. 89:2804.**

9. Osawa M. Hanada K. Nakauchi H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*. 273: 242.
10. Orlic D. and Bodine D. (1994). What defines a pluripotent hematopoietic stem cell (PHSC): will the real PHSC please stand up?. *Blood*. 84: 3991.
11. Ogawa M., Matzunaga T. (1999). Humoral regulation of hematopoietic stem cell *Annu Acad Sci*. 872:17.
12. Kaufman D. Hanson E. Lewis R. Auerbach R. Thomson J. (2001). Hematopoietic colony forming cells derives from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98: 10716.
13. Abkowitz J. Catlin S. McCallie M. Gutter P. (2002). Evidence that the number of hematopoietic stem cells per animal is conserved in mammals. *Blood*. 100: 2665.
14. Mayani H. (2003). A glance into somatic stem cell biology: basic principles, new concepts, and clinical relevance. *Arch Med Res*. 34: 3.
15. Passegué E., C. H. M. Jamieson, Laurie E. Ailles, I. L. Weisman. (2003). Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics. *PNAS*. 100:11842.
16. Kondo M. Weissman IL. Akashi K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell*, 28:661

17. Akashi K. Traver D. Miyamoto T. and Weissman IL. (2000 a) A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature*. 404: 193-197
18. Akashi K. Reyna T. Dalma-Weishausz D. Weisman I. (2000 b). Lymphoid precursors. *Current Opin. Immunol*. 12: 144.
19. Bondurant M. Koury M. (1999). Origin and development of blood cells. En: Lee G. Foerster J. Lukens J. Paraskevas F. Greer J. Rodgers G. editors. *Wintrob's Clinical Hematology*. 10^a Ed. Lippincott Williams & Wilkins USA. 145:168.
20. Ivanova N. Dimos J. Schaniel C. Hackey J. Moore K. Lamichka I. (2002). A stem cell molecular signature. *Science*. 298:601.
21. McGrath KE. Palis J. (2005). Hematopoiesis in the yolk sac: more than meets the eye. *Exp Hematol*. 33:1021.
22. Munker R. (2000). *Modern hematology*. 1ra ed. Hunan Press USA.
23. Smith A. Metcalf D. Nicos A. (1997). Cytoplasmic domains of the common β -chain of the GM-CSF/IL-3/IL-5 receptors that are required for inducing differentiation or clonal suppression in myeloid leukaemic cell lines. *Jour*. 16: 451.
24. Schmidt M. Zickler P. Hoffmann G. Haas S. Wissler M. Muessig A. Tisdale J. Kuramoto K. Andrews R. Wu T. Dunbar C. Von Kalle C. (2002). Polyclonal long-term repopulating stem cell clones in a primate model. *Blood*. 100:2737.

25. Larsson J. Karlsson S. (2005). The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene*. 24: 5676.
26. Zandstra P. Lauffenburger D. Eaves C. (2000). A ligand-receptor signaling threshold model of stem cell differentiation control: a biologically conserved mechanism applicable to hematopoiesis. *Blood*. 96: 1215-22.
27. Whetton A. Spooncer E. (1998). Role of cytokines and extracellular matrix in the regulation of hematopoietic stem cell. *Curr Opin Cell Biol*. 10:721- 6. Review.
28. Prosper F. Verfaillie C. (2001). Regulation of hematopoiesis through adhesion receptors. *J Leukoc Biol*. 69:307.
29. Temeles D. McGrath H. Kittler E. Shadduck R. Kister V. Crittenden R. Turner B. Quesenberry P. (1993). Cytokine expression from bone marrow derived macrophages. *Exp Hematol*. 21: 388.
30. Munker R. Hiller. (1998). Paquette R. *Modern Hematology. Biology and clinical management* Ed Human Press. New Jersey.: pp 369
31. Watowich S. Wu H. Socolovsky M. Klingmuller U. Constantinescu S. Lodish H. (1996). Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Rev Cell Dev Biol*. 12:91.
32. Metcalf D. (1998). Cell-Cell signaling in the regulation of blood cell formation and function. *Inmunol Cell Biol*. 76: 441.

33. Metcalf D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood*. 111: 485.
34. Ryan K. Phillips A. Voused K. (2001). Regulation and function of the p53 tumor supresor protein. *Curr Opin Cell Biol*. 13:332.
35. Yin T. Li L. (2006). The stem cells niches in bone. *J Clin Invest*. 116: 1195.
36. Horny H. Ruck M. Kaiserling E. (1990). Immunohistology of human spleen after bone marrow transplantation for leukaemia with special reference to early post-trasplantation period. *Pathol. Res. Pract*. 186:775.
37. Jandl J. (1991). *Blood: Pathopgysiology*. 1a ed. Blackwell scientific publications inc USA
38. Cousar J. (1999). The hematopoietic-limphoid neoplasm: principles of diagnosis en: Lee H. Forester J. Lukens J. Paraskevas F. Greer J. Rodgers G. ed *Wintrobe´s clinical hematology*. 10ma ed. Lippincott Williams & Wilkins USA.
39. Richard M. Stone MD. (2002). The difficult problem of acute myeloid leukemia in the older adult. 52: 363
40. Gutierrez A. Cantú O. Llano O. Gonzalez R. Salazar R. Martínez O. Jaime J. Morales A. Tarín L. Ruiz G. Gómez D. (2007). Non-myeloablative hematopoietic stem cell transplantation is of limited value in advanced or refractory acute myeloblastic leukemia. The Mexican experience. *Hematol*. 12: 193.

41. Golub E. Diaz De Pagan T. Sun I. Hall A. Crane F. Isom G. (1998). Can opioids regulate hematopoietic differentiation? *Ann N Y Acad Sci.* 521: 123.
42. McKenzie S. (2005). Advances in understanding the biology and genetics of acute myelocytic leukemia. *Clin Lab Sci.* 18: 28.
43. Griffin J. Lowenberg B. (1986). Clonogenic cells in acute myeloblastic leukemia. *Blood.* 68: 1185.
44. Fialkow P. Singer J. Adamson J. Vaidya K. Dow L. Ochs J. Moohr J. (1981). Acute nonlymphocytic leukemia: heterogeneity of stem cell origin. *Blood.* 57: 1068.
45. Hasse D. Feuring M. Koneman S. (1995). Evidence for malignant transformation in acute myeloid leukemia at the level of early hematopoietic stem cell by cytogenetic analysis of CD34+ subpopulations. *Blood.* 86: 2906.
46. Merotha B. George T. Kavanau K. (1995). Cytogenetically aberrant cells in the stem cell compartment (CD34+ Lin-) in acute myeloid leukemia. *Blood.* 86: 1139.
47. Robak T. and Wierzbowska A. (2005). Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. *Clin Ther.* 31: 2349-2370.
48. Boletín de estadísticas vitales INEGI, 2008.
49. Shipley J. Butera J. (2009). Acute myelogenous leukemia. *Exp Hematol.* 37:649.

50. Erba H. (2010). Has there been progress in the treatment of older patients with acute myeloid leukemia?. *Best Pract Res Clin Haematol.* 23:495.
51. Papac R. (2001). Origins of cancer therapy. *Yale Jurnal Of Biology and Medicine.* 74:391.
52. Mans D. Da Rocha A. Shwarstsmann G. (2000). Anticancer drug discovery and development in brasil; target plant collection as rational strategy to acquire candidate anticancer compounds. *The Oncology.* 5: 85.
53. Hartewell J. (1976). Types of anticancer agent isolated from plants. *Cancer treat Rep.* 60: 1031.
54. Cordell G. Beecher C. Pezzuto J. (1991). Can ethnopharmacology contribute to the development of new anticancer drugs? *J Ethnopharmacol.* 32: 117.
55. Chapuis J. Sordat B. Hostettmann K. (1988). Screening for cytotoxic activity of plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol.* 23: 273.
56. Howard L. Talcott S. Brenes C- and Villalond B. (2000). Changes in phytochemical and antioxidant activity of selected pepper cultivars (*Capsicum Species*) As influenced by maturity. *J. Agric Food Chem.* 48: 1713.
57. Zhang J. Nagasaki M. Tanaka Y. Morikawa S. (2003). *Capsicum* inhibits growth of adult T-cell leukemia cells. *Leuk Res.* 27:275.

58. Barreiro P. (1998). Una hortaliza de México para el mundo Claridades Agropecuarias No. 56. Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. México, D. F.
59. Andrews J. (1995). Peppers. The domesticated Capsicum. 2a ed. University of Texas Press, Austin, TX. Pp 274.
60. Latournerie L. Chávez M. Perez G. Castañón S. Rodríguez L. Arias M. Ramírez P. (2002). Valoración *in situ* de la diversidad morfológica de chiles (*Capsicum annum* L. y *Capsicum chinense* jacq) en Yaxcabá, Yucatan Rev. Fitotec. Mex. 25: 25.
61. Organización de las naciones unidas para la agricultura y la alimentación (FAO) (2005). Estadísticas Agrícolas Anuales.
62. Secretaria de Agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación (SAGARPA) (2006). República Mexicana. Estadísticas agrícolas anuales.
63. Morán S. Aguilar V. Corona T. Castillo T. Soto M. San Miguel R. (2008). Capsaicinoides de chiles nativos de puebla, México. Agrociencia. 42: 807.
64. Salazar O. Silvia O. (2004). Efectos farmacológicos de la capsaicina, el principio pungente del chile. Biologia Scripta. 1:7-14.
65. De A. (2003). *Capsicum*. The genus *Capsicum*. Taylor and Francis. London. Pp 256.

66. Chaim A. Borovsky Y. Falise M. Mazourek M. Kang C. Paran I. Jahn M. (2006). QTL Analysis for capsaicinoid content in *Capsicum*. Theor. Appl. Genet. 113: 1481.
67. Robbins W. (2000). Clinical applications of capsaicinoids. Clin J Pain. 16: 86.
68. Djamgoz M. Isbilen B. (2006). Dietary compounds as anti-cancer agents: a preliminary evaluation of ion channels and membrane excitability as possible target mechanisms. Turkish Biochem. 31: 57.
69. Caterina M. Schumacher M. Tominaga M. Rosen T. Levine J. Julius D. (1997). The capsaicin receptor: a heat- activated ion channel in the pain pathway. Nature. 389: 816-24.
70. Szallasi A. Blumer P. (1999). Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. Pharmacol Rev. 51:159.
71. Ramsey I. Delling M Clapham D. (2006). An introduction to TRP channels. Annu Rev Physiol. 68:619.
72. Owsianik G. Talavera K. Voets T. Nilius B. (2006). Permeation and selectivity of TRP channels. Annu Rev Physiol. 68: 685.
73. Salazar H. Jara A. Rosenbaum T. (2009). El canal TRPV1 como Diana para tratar el dolor. Rev Neurol. 48: 357.
74. Deal C. Schnitzer T. Lipstein E. Seibold J. Stevens R. Levy M. Alberth D. Renold F. (1991). Treatment of arthritis with topical capsaicin: A double-blind trial. Clinic Ther. 13:383

75. Matucci-Cerinic M. McCarthy G. Lombardi A. Pignone A. Partsch G. (1995). Neurogenics influences in arthritis: Potential modification by capsaicin. *J Rheumatol.* 22:1447.
76. McCarthy G. McCarthy D. (1992). Effect topical capsaicin in the therapy of painful arthritis of the hands. *J. Rheumatol.* 19:604.
77. Morré D. Chue P. Morré D. (1995). Capsaicin inhibits preferentially the NADH oxidase and growth of transformed cells in culture. *Proc Natl Acad Sci. USA.* 92:1831
78. Jung M. Kang H. Moon A. (2001). Capsaicin-induced apoptosis in SK-Hep-1 hepatocarcinoma cells involves Bcl-2 downregulation and caspase-e activation. *Cancer Lett.* 165:139.
79. Brand L. Berman E. Schwer R. (1987). Drugs experimental clinical research. 13:259.
80. Castillo E. Regla I. Demare P. Luviano A. López A. (2008). Effinient chemoenzymatic sintesis of phenylacetylirivanil. An ultrapotente capsaicinoid. *Synlett.* 18:2869.
81. Appendino G. Minassi A. (2002). N-Acylvanillamides: development of an expeditious synthesis and discovery of new acyl templates for powerful activation of the vanilloide receptor. *J Med. Chem.* 45:3739.
82. Bernardi R. Grisendi S. Pandolfi P. (2002). Modelling hematopoietic malignancies in the mouse and therapeutical implications. *Oncogene.* 21:3445.

83. Cormack E. Bruserud Q. Gjertsen. (2005). Animal Models of acute myelogenous leukaemia-development, application and future perspectives leukemia. 19:687.
84. Ralph P. Moore M. Nilsson K. (1976). Lisisime synthesis by established human and murine histocytic lymphoma cell lines. J. Exp Med. 143:1528.
85. Warner N. Moore M. Metcalf D. (1969). A transplante myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotipe and muramidase content. J. Natl Cancer Inst. 43-963.
86. Van Furth R. Van chadewijk-nieuwstad M. Claasen E. Cornelisse C. Nibbering P. (1985). Morphological, cytochemical, functional and proliferative characteristics of four murine macrophagelike cell lines. Cellular immunology. 90:339.
87. Sarabani H. Izumchenco E. Wang Q. Kreinin R. Steiner M. Barvish Z. Danilenko M. (2006). Cooperative antitumor effects of vitamin D3 derivatives and rosemary preparations in a mouse model of myeloid leukemia Int. J. Cancer. 118:3012.
88. Stone R. (2007). Novel therapeutic agents in acute myeloid leukemia. Exp Hematol. 35: 163
89. Kueng W. Silber E. Eppenberg U. (1989). Quantification of cells cultured on 96 well plates. Anal. Biochem. 182:16.
90. Quispe A. Zavala D. Posso M. Rojas J. Vaisberg A. (2007). Efecto citotóxico de anona muricata (guanabana) en cultivo de

líneas celulares de adenocarcinoma gástrico y pulmonar. CIMEL. 12:1.

- 91. Dinezot F. Lang R. (1986). Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modification to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reability. J Immunol meth. 89:271.**
- 92. Borenfreud E. Babich H. Alguacil N. (1988). Comparisons of two in vitro cytotoxicity assays-the natural red (NR) and tetrazolium MTT test. Toxicol *in vitro*. 2:1.**
- 93. Castro S. (2006). Fracciones de Issertia laevis empleando líneas celulares derivadas de tumores humanos. Tesis doctoral. PUJ. Facultad de ciencias. Colombia.**
- 94. Tominaga H. Ishimaya M. Ohseto F. Sasamoto K. Hammamoto T. Suziki F. Watanabe M. (1999). A wáter-soluble tetrazolium SALT useful for colorimétrico cell viability assay. Anal Commun. 36:47.**
- 95. Miller J. Rouwe B. Gaitanos T. Hood K. Crume B. Berridge V. Northcote P. (2004). Peloruside A enhances apoptosis in H-ras-trasnformed cells and is cytotoxic to proliferating T cells. Apoptosis. 9:785.**
- 96. Lickler J. Wood N. Jhonson L. Mchugh G. Tan J. Wood F. Cox J. and Wickham N. (2003). HA14-1 selectively induces apoptosis in Bcl-2-overexpressing leukemia/ñymphoma cells, and enhances ytarabine-induced cell death. Leukemia, 17: 2074.**

97. Robak T. Wierzbowska A. (2009). Current and emerging therapies for acute myeloid leukemia. Clin. Ther. 31: 2349.
98. Cortez V. Macedo J. Hernández M. Arteaga G. Espinoza D. Rodríguez J. (2004). Farmacognosia: breve historia de sus orígenes y su relación con las ciencias médicas. Rev. Biomed. 15: 123.
99. Lemire J. Adams J. Sakai R. Jordan S. (1984). 1 α , 25-dihydroxyvitamin D₃ suppresses proliferation and immunoglobulin production by normal human peripheral blood mononuclear cells. J Clin Invest. 74: 657.
100. Ito K. Nakasato T. Yamato K. Miyakawa Y. Yamada T. Hozumi N. Segawa K. Ikeda Y. Kizaki M. (2004). Induction of apoptosis in leukemic cells by homovanillic acid derivative, capsaicin, through oxidative stress: implication of phosphorylation of p53 at Ser-15 residue by oxygen species. Cancer Res. 64:1071.
101. Leenen P. Jansen A. van Ewijk W. (1986). Murine macrophage cell lines can be ordered in a linear differentiation sequence. Differentiation. 32:157.
102. Falkenberg U. Leenen P. Falkenberg F. (1989). Characterization of mouse macrophage differentiation antigens by monoclonal antibodies. Cell Immunol. 124:77.

- 103. Basu S. Srivastava P. (2005). Immunological role of neuronal receptor vanilloid receptor 1 expressed on dendritic cells. Proc Natl Acad Sci USA. 102:5120.**
- 104. Chistianson D. (2007). Roots of biosynthetic diversity. Science. 316:60.**
- 105. Coleman C. Wu L. (2009). HIV interactions with monocytes and dendritic cells: viral latency and reservoirs. Retrovirology. 6:51.**
- 106. Lickliter J. Wood N. Johnson L. McHugh G. Tan J. Wood F. Cox J. Wickham N. (2003). HA14-1 selectively induces apoptosis in Bcl-2-overexpressing leukemia/lymphoma cells, and enhances cytarabine-induced cell death. Leukemia. 11:2074**

APÉNDICE A

1-. Preparación de Medio Iscove´s Modified Dulbecco´s (IMDM)

Preparación en 1L de agua-milliQ

- Iscove´s 17.7g (un sobre aproximadamente)
- Penicilina 0.031g
- NaHCO₃ 3.024g
- PH 6.9-7

Esta solución se esteriliza por medio de una membrana (Millipore) con un diámetro de 0.22 µm. Conservar en refrigeración a 4°C.

2-. Inactivación del suero fetal bovino (SFB).

El suero fetal bovino SFB (Gibco BRL, USA) congelado se coloca a temperatura ambiente para su descongelación, posteriormente se pasa a un baño de agua a 56° durante 30 minutos, con el propósito de inactivar proteínas del completo. Posteriormente se separa en alícuotas, para su mejor manipulación, conservándose a 4°C.

3-. Solución amortiguadora de fosfatos (PBS).

Esta solución de sales de fosfatos proporcionan la capacidad estabilizadora a esta solución y se compone de:

- Cloruro de magnesio (MgCl_2) (Sigma, chem, USA) 0.10g
- Cloruro de calcio (CaCl_2) (Sigma, Chem, USA) 0.10g
- Cloruro de sodio (NaCl) (Sigma, Chem, USA) 8.00g
- Cloruro de potasio (KCl) (Sigma, Chem, USA) 0.20g
- Fosfato monoácido de sodio (Na_2HPO_4) (Sigma, Chem, USA) 2.16g
- Fosfato diácido de potasio (KH_2PO_4) (Sigma, Chem, USA) 0.20g

El cloruro de magnesio y cloruro de calcio se disuelven en 100 ml de agua bidestilada. Las sales restantes, por separado se disuelven en 800 ml de agua bidestilada y después se mezclan ambas soluciones. Se ajusta el PH de 7.2 a 7.5 utilizando ácido clorhídrico 8N (Sigma, Chem, USA) y se afora a un volumen final de 1000 ml. Esta solución se esteriliza por autoclave, la solución se almacena a una temperatura de 4°C.

4.- Interleucina-3 recombinante murina (rmIL-3)

Se pesan 10mg de Alb y se disuelven en 10 mL de PBS. Posteriormente la solución se filtra mediante una membrana con un tamaño de poro 0.22µm, diámetro 25mm. Seguido se toman 100 µl de interleucina y se diluyen en los 10 mL de la solución filtrada. Después se toman alícuotas de 1mL en eppendorf estériles, por último se refrigeran a -20°C.

APÉNDICE B

1.-Preparación del glutaraldehído al 1%

A 1.47 mL de glutaraldehído se agrega 98.43 mL de agua destilada (agua Milli-Q). Se conserva a temperatura ambiente.

2.-Preparación de la solución de cristal violeta

Se prepara al 1% en una solución amortiguadora de ácido fórmico 200 Mm a pH 6 que se prepara al disolver 3.96g de NaOH a 4.28 mL de ácido fórmico. Una vez preparada esta solución se adiciona 1g de cristal violeta y se afora a 500 mL con agua destilada (agua Milli-Q). Finalmente la solución se filtra usando papel Whatman # 2 y para almacenar a temperatura ambiente.